สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

Study on Methodology for Gene Transformation into Lotus

(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)

ผศ. ดร. กัญจนา แซ่เตียว

รศ. ดร. สุเม อรัญนารถ

RCH
ก 3827
2550

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 141518
รับ เดือน ปี 16 มี.ค. 2559

.b 12756350
.i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปี 2550

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายใต้ปัจจัยแสง สีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และก้านใบจากเอมบริโอ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน โดยชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุด คือ 3.80 คะแนน แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเขียว ฉ่ำน้ำ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบ ภายใต้แสงสีแดง (red light) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในแสงสีขาว (white light) ชิ้นส่วนก้านใบจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตายอด

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และเอมบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ มีสีน้ำตาลทั้งหมด ชิ้นส่วนเอมบริโอทั้งชิ้นนั้น ยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ

ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ ใช้ส่วนของตายอดจากเอมบริโอ ภายใต้ระดับความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และระยะเวลาในการบ่มเชื้อโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (pCAMBIA 2301) ที่ระดับความเข้มข้น 1:10 นาน 10 นาที, 1:10 นาน 30 นาที และ 1:20 นาน 30 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์, TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ และสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotoxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบน MS ในสัปดาห์ที่ 10–16 พบว่าชิ้นส่วนตายอดที่บ่มร่วมกับเชื้ออะโกแบคทีเรียมที่ 1:10, เป็นเวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดในวิธีการที่ถ่ายยีนทั้งหมด คะแนนการเจริญเติบโตและขนาดเล็กกว่าวิธีการอื่นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Effects of explant types and light on callus growth of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik were studied. The apical buds and petioles from embryo were cultured on Murashige and Skoog (MS) (1962) medium containing a combination of 40 μM NAA (α-Naphthaleneacetic acid) and 0.5 μM TDZ (Thidiazuron) under 16 hours of white light for 16 weeks. It was found that all explants produced callus. The callus induction was produced from both apical buds and petioles. The callus was friable and green and the highest score of callus growth was 3.80. The both explants cultured under red light also showed the same result as the white light.

The kanamycin concentration was tested for selection of transgenic plant. The apical buds from embryo and embryos cultured on MS medium supplemented with 0, 50, 100, 200 and 300 mg/l kanamycin for 8 weeks. The explants were removed to new selective medium every 2 weeks. It was found that 50 mg/l kanamycin was the lowest concentration which the apical buds could not grow. However, the embryo could grow in all selective medium.

The optimization of *Agrobacterium* mediaed transformation condition into lotus using the apical buds from embryo was studied. *Agrobacterium* concentration and duration of inoculation of *A. tumefaciens* EHA 105 (pCAMBIA 2301) were used at ratio of 1:10 dilution for 10 min, 1:10 dilution for 30 min and 1:20 dilution for 30 min. All samples were cultured on MS medium containing 40 μM NAA, 0.5 μM TDZ and 50 mg/l kanamycin with 300 mg/l cefotoxime for 8 weeks after that MS medium was applied for week 9 to week16. It was found that the explants cultured on MS medium containing *Agrobacterium* concentration ratio of 1:10 dilution, incubated for 30 min gave the highest percentage of survived explants. The score of growth and size of explants were slightly less than other methods but these were not statistical significant difference. The explants are green and yellow in colour.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนสนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
คำนิยม	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VI
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
วิธีการดำเนินงาน	12
ผลการทดลอง	21
วิจารณ์ผลการทดลอง	30
สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเจริญเติบโตแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์	22
2	ขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์	22
3	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ	24
4	ขนาดของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ	24
5	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ	26
6	คะแนนการเจริญเติบโตของตายอดเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10-16	29
7	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10-16	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	4
2	แสดงลักษณะเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	15
3	แสดงคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (การทดลองที่1)	17
4	แสดงคะแนนการเจริญเติบโตชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (การทดลองที่ 2)	18
5	แสดงคะแนนการเจริญเติบโตชิ้นส่วนเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (การทดลองที่ 2)	19
6	แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอที่ได้รับการถ่ายยีน *A. tumefacience* (pCAMBIA 2301) (สัปดาห์ที่ 1-16) (การทดลองที่ 3)	20
7	แสดงการทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (สัปดาห์ที่ 7)	25
8	แสดงการทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อชิ้นส่วนเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (สัปดาห์ที่ 7)	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

บัวหลวงเป็นพืชน้ำชนิดหนึ่งที่รู้จักกันเป็นอย่างดีในประเทศไทย เขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว เป็นพืชที่ปลูกง่ายและขึ้นโดยทั่วไป จึงพบว่ามีทั้งที่ขึ้นเองตามธรรมชาติหรือปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับตามบ้านในกระถาง บ่อ หรือคูน้ำ ตลอดจนปลูกจำนวนมากเรียกว่านาบัว เพื่อเก็บดอกหรือเมล็ดขายเป็นการค้า นอกจากนี้ส่วนอื่น ๆ ของบัวหลวงยังนำมาใช้ประโยชน์ได้อีก

บัวหลวงเป็นพืชในวงศ์ Nymphaeaceae พืชวงศ์นี้เป็นพืชน้ำล้มลุก มีอายุหลายปี มีการเจริญเติบโตอยู่ในน้ำบางส่วน และเหนือน้ำบางส่วน หรือ Emerged Plant ลักษณะใบและดอกชูเหนือน้ำ ขอบเรียบ ผิวด้านบนมีขนนวลละเอียดคุมไม่ซับน้ำ ดอกมีขนาดใหญ่ เป็นรูปไข่ ปลายเรียว ก้านใบและก้านดอกแข็งเปราะ มีหนามเล็กๆ จับระคายมือ การเจริญเติบโตมีไหลชอนไชไปใต้ดิน บัวหลวงจัดเป็นไม้ตัดดอกที่คนนิยมกันมาก เป็นพืชที่ขึ้นง่ายในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว มีผู้นิยมนำมาปลูกประดับตลอดจนปลูกเป็นการค้าทั้งตัดดอกและเก็บฝักขาย นอกจากจะเป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญแล้ว ทุกส่วนของต้นบัวหลวงยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีกมากมาย เช่น ไหลหรือรากบัวนำมาเป็นอาหาร ใบบัวใช้ห่อของ กลีบดอกตากแห้ง ใช้มวนบุหรี่ ต้มเป็นเครื่องยาไทย ใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ แก้ไข้ แก้โรคตับ ใช้ทำเครื่องสำอาง เกสรตัวผู้นิยมนำไปใช้เข้ายาหอม ยาขับปัสสาวะ ชงแทนชา เมล็ดบัวใช้ประกอบเครื่องดาวหวาน เป็นยาบำรุงกำลัง แก้กษัย แก้อุจจาระร่วง สมานแผล แก้ร้อนในกระหายน้ำ ช่วยให้เจริญอาหาร ฝักที่แกะเมล็ดออกแล้วสามารถใช้ทำเป็นปุ๋ยหมักใช้เพาะเห็ด หรือนำไปเป็นส่วนผสมของยากันยุง ดีบัว เป็นยาสมุนไพรช่วยขยายหลอดเลือดในหัวใจ แก้อาเจียนเป็นโลหิต แก้น้ำกามเคลื่อนขณะหลับ และแก้กระหาย เป็นต้น (กวินหาญ. 2534) สำหรับบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นบัวหลวงสายพันธุ์หนึ่งที่ดอกมีสีขาว ขนาดใหญ่ ปลายกลีบมีสีชมพูเรื่อๆ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว (เสริมลาภ. 2537) เป็นบัวหลวงที่นิยมใช้ในพิธีกรรมทางศาสนา และสามารถใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆได้ เช่นเดียวกับบัวหลวงพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีประโยชน์ในหลายๆ ด้านแต่ก็ยังมีปัญหาบางประการ เช่น ปัญหาเรื่องศัตรูพืช อายุการใช้ประโยชน์สั้นเกินไป กลีบดอกจะเหี่ยวและร่วงเร็ว (สายชล. 2531) รูปทรงของดอกและสีมีให้เลือกจำกัดอย่างมาก

จากสภาพปัญหาที่กล่าวมานั้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกให้มีคุณภาพด้านรูปทรงดอก สีสัน โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ จึงจำเป็นที่จะมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ร่วมกับศึกษาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

บัวหลวง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. ซึ่งเป็นวงศ์ Nymphaeaceae มีอายุหลายปีและเป็นพืชน้ำทั้งหมด (ไชยา - ลาวัลย์. 2541) พืชในวงศ์นี้มีทั้งหมด 8 สกุล (Genus) 50 ชนิด (Species) ที่พบในประเทศไทยมีเพียง 3 สกุล คือ สกุลบัวหลวง (Genus Nelumbo Adans.) สกุลบัวสาย (Genus Nymphaea Lin.) และสกุลบัววิกตอเรีย (Genus Victoria Lindl.) (เสริมลาภ . 2537) พืชในสกุลนี้พบได้ทั่วไปมีทั้งหมด 2 ชนิดคือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. และ *Nelumb lutea* Pers. (Burkill. 1966; Core. 1955) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา. 2535) อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม. 2537) แต่ที่พบในประเทศไทยมีเพียงชนิดเดียว คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (สุชาดา. 2530) ส่วนบัวหลวง *Nelumbo lutea* Pers เป็นบัวหลวงชนิดที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาเหนือ มีลักษณะดอก และใบคล้ายกับบัวหลวงของไทย แตกต่างกันที่สีของดอกจะเป็นสีเหลือง โดยบัวชนิดนี้เคยมีผู้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย แต่ทนต่อสภาพภูมิอากาศที่ร้อนไม่ได้จึงสูญพันธุ์ไป (ไชยา – ลาวัลย์. 2541) บัวหลวงมีหลายพันธุ์ และหลายชื่อ ซึ่งอาจแยกออกตามลักษณะ รูปร่าง และสีของดอกได้เป็น 6 พันธุ์ โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของวิชาพฤกษอนุกรมวิธาน และพันธุศาสตร์ ดังนี้ (ภาพที่ 1) (สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520; วิเชษฐ. 2535)

พันธุ์ที่ 1 มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู หรือปทุม ประทุม ปทุมมาลย์ โกกระณต โกกนุท บัวแหลมแดง บัวหลวงแดง หรือ ปัทมา ดอกสีชมพูขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว ประกอบด้วยกลีบเลี้ยงขนาดเล็ก เรียงตัวซ้อนกัน 2 ชั้น ส่วนกลีบดอกสีชมพูโคนสีเหลืองอ่อน เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นประมาณ 3 ชั้น ล้อมรอบฐานรองดอก เส้นกลีบดอกเห็นเด่นชัด

พันธุ์ที่ 2 มีชื่อว่า บุณฑริก ปุณฑริก บัวหลวงขาว หรือ บัวแหลมขาว ดอกสีขาวขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่คล้ายพันธุ์บัวหลวงชมพู กลีบเลี้ยงเรียงเป็น 2 ชั้น ด้านนอกสีขาวอมเขียว ด้านในสีอ่อนเล็กน้อย โค้งหรือโปร่งตรงกลาง กลีบดอกเรียงซ้อนกัน 3 ชั้น กลีบชั้นนอกและชั้นในมีขนาดเล็กกว่าชั้นกลาง ด้านนอกกลีบสีเหลืองอมเขียว ด้านในสีอ่อนกว่า เส้นบนกลีบดอกสีขาวเห็นเด่นชัด

พันธุ์ที่ 3 มีชื่อว่า สัตตบงกช บัวหลวงชมพูซ้อน บัวหลวงป้อมแดง บัวฉัตรแดง หรือบัวฉัตรชมพู ดอกสีชมพู ขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ทรงป้อม จำนวนดอกมีน้อยกว่าพันธุ์บัวหลวงชมพู และบัวหลวงขาว กลีบเลี้ยงเป็นรูปรีเล็ก เรียงซ้อนกัน 2 – 3 ชั้นสลับกัน ด้านนอก และด้านในของกลีบเลี้ยงจะมีสีเขียวอมชมพู กลีบดอกรูปไข่กว้างกว่าส่วนบน กลีบดอกสีชมพูตลอด แต่ส่วนโคนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีขาวอมเหลือง เส้นกลีบมองไม่เห็นเด่นชัด

พันธุ์ที่ 4 มีชื่อว่า สัตตบุษย์ บัวหลวงขาวซ้อน บัวฉัตรขาว หรือ บัวป้อมขาว ดอกสีขาวขนาดใหญ่ ดอกตูมรูปไข่ทรงป้อมเช่นเดียวกับสัตตบงกช กลีบเลี้ยงสีเขียวอมขาวเรียงซ้อนกัน ส่วนกลีบดอกสีขาวตลอด ทรงกว้างเรียงซ้อนกัน 3 – 4 ชั้นสวยงาม เส้นบนกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมองไม่เห็นเด่นชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ที่ 5 มีชื่อว่า บัวเข็มสีชมพู บัวปักกิ่งชมพู หรือบัวหลวงจีนชมพู ดอกสีชมพูรูปไข่ คล้ายกับพันธุ์บัวหลวงชมพู แต่ดอกมีขนาดเล็กกว่า กลีบเลี้ยงสีชมพูอมเหลืองเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น ส่วนกลีบดอกสีชมพูปลายเข้ม โคนกลีบดอกสีชมพูอมขาว เส้นกลีบเลี้ยง และกลีบดอกมองเห็นชัดเจนเรียงขนาดใกล้เคียงกัน

พันธุ์ที่ 6 มีชื่อว่า บัวเข็มสีขาว บัวปักกิ่งขาว หรือบัวหลวงจีนขาว ดอกสีขาวรูปไข่ คล้ายกับพันธุ์บัวหลวงขาว แต่ดอกมีขนาดเล็กกว่า กลีบเลี้ยงสีขาวอมชมพู กลีบดอกขาวตลอดเรียงซ้อนกัน 3 ชั้น กลีบด้านนอก และด้านกลางมีขนาดใหญ่กว่ากลีบด้านใน

ลักษณะประจำพันธ์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (เสริมลาภ. 2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Nelumbo nucifera* Gaertn.
ชื่อสามัญ	HINDU LOTUS
ชื่อวงศ์	NYMPHAEACEAE
ชื่อไทย	บุณฑริก ปุณฑริก บัวหลวงขาว บัวแหลมขาว

ลักษณะทั่วไป

ลำต้น ลำต้นอยู่ใต้ดินใต้น้ำเรียกว่าเหง้า อยู่ในดินลึกประมาณ 5 - 15 เซนติเมตร ลำต้นอ่อนมีสีขาว หรือค่อนข้างแดงมีจุดประปราย เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีจุดสีน้ำตาล ปล้องรูปทรงกระบอก ยาว 3.0 - 4.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 - 3.60 เซนติเมตร ตรงข้อมีตาที่ให้กำเนิดใบและดอก ส่วนล่างมีรากในลำต้นมีน้ำยางสีขาวขุ่น

ราก เป็นแบบรากฝอย เกิดตรงบริเวณส่วนข้อของลำต้นรากอ่อนมีสีขาว และหมวกรากใหญ่เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกจากข้อตั้งตรงชูขึ้นมาเหนือน้ำโดยจะอยู่ที่ผิวน้ำและชูใบเหนือน้ำหลายระดับ ใบมีรูปร่างเกือบกลม (suborbicular) เป็นแบบ peltate leaf มีส่วนที่เว้าเข้ามาตรงข้ามกันที่ขอบใบ 2 ตำแหน่ง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อยผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อนกว่า เส้นใบแตกออกจากจุดกึ่งกลางใบ แบบ palmately netted venation ก้านใบแข็งมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปรายและจำนวนของหนามลดลงในตอนโคนก้านใบ โดยทั่วไปก้านใบมีสีเขียวแต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำจะมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสาวเมื่อถูกกับอากาศจะเหนียวเป็นเส้นก้านใบติดกับตัวใบตรงกลางทางด้านล่างของใบ

ดอก เป็นดอกขนาดใหญ่สีขาว สมบูรณ์เพศมีกลิ่นหอมอ่อนๆดอกออกตรงข้อของลำต้นใต้ดินคู่กับใบแล้วส่งดอกขึ้นมาอยู่เหนือน้ำ ดอกมีขนาดใหญ่ ขณะที่ดอกตูมจะมีลักษณะเป็นรูปไข่ปลายเรียว เมื่อบานมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 - 18.5 เซนติเมตร กลีบดอกเรียงตัวเป็นสองชั้น สับหว่างกัน ด้านนอกของกลีบมีสีขาวปนเขียว ส่วนด้านล่างมีสีจางลง เส้นบนกลีบมีขนาดใกล้เคียงกันและมีจำนวนมากแต่ไม่นูนเด่นชัด กลีบนอกมีรูปร่างโค้งป้องตรงกลางกลีบในมี 12 -14 กลีบ เรียงตัวเป็นชั้น

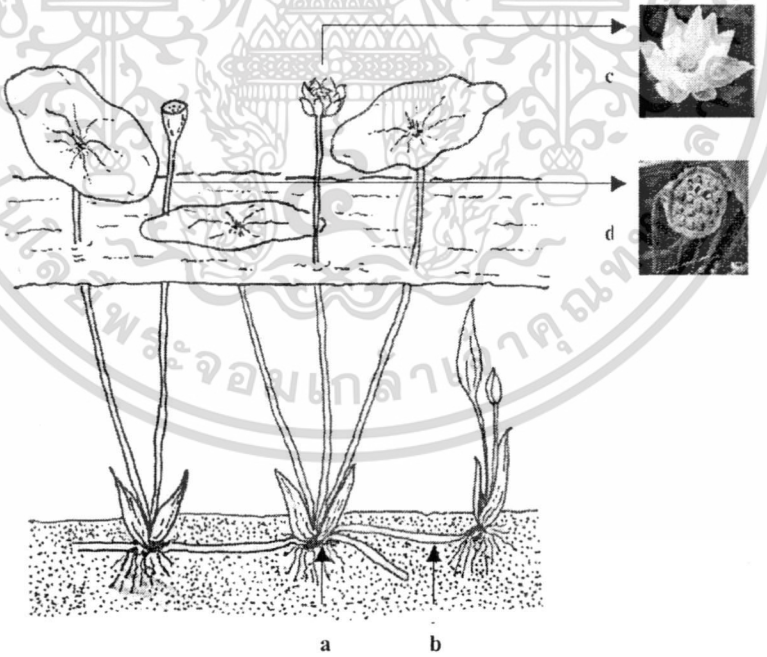
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 8 ชั้น โดยรอบของฐานรองดอก กลีบชั้นนอกและชั้นใน (obovate) เห็นเส้นบนกลีบในชัด มีสีขาวนวลโดยตลอด ทั้งด้านในและด้านนอก ยกเว้นส่วนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีเหลือง เกสรตัวผู้มี 90-117 อัน อยู่เหนือกลีบชั้นใน ก้านเกสรตัวผู้เรียวเล็ก มีสีเหลืองนวลตอนบนมีอับเรณูสีเหลืองสดติดตามความยาวของแกนเหนืออับเรณูขึ้นไปมีส่วนปลายสีขาวขุ่น รูปร่างเรียวเล็กที่ฐานและใหญ่ที่ส่วนปลาย เกสรตัวผู้มีกลิ่นหอม เกสรตัวเมียมีรังไข่อยู่สูงกว่าเกสรตัวผู้ มีสีเหลืองนวล มีผนังหนาฝังอยู่ส่วนบนของฐานรอง ดอกมีลักษณะรูปกรวยและมีสีเหลือง ก้านชูเกสรตัวเมียสั้น ยอดเกสรตัวเมียกลมแบน สีเหลืองเป็นมันแข็ง ในดอกหนึ่งจะมี carpel 15 - 30 อัน และอยู่กระจายไม่ติดกัน ภายในแต่ละรังไข่จะมีไข่อยู่ 1 อัน (จารีย์. 2519) ก้านดอกแข็งเหมือนก้านใบ คือ ก้านดอกแข็ง มีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปรายและจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านดอกมีสีเขียว แต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาว เมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้น

กลีบเลี้ยง ลักษณะเป็นรูปไข่รี เหี่ยวและร่วงง่าย แต่บางครั้งก็อยู่จนติดเป็นผล กลีบเลี้ยง และกลีบดอกรูปร่างคล้ายกันมากแยกจากกันยาก กลีบเลี้ยงจะมีสีขาวอมเขียว

ผล เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) มักเรียกกันว่า ฝัก ประกอบด้วยผลย่อยๆเมื่ออ่อนเปลือกหนาสีเขียว ด้านในสีขาว พอแก่เปลี่ยนเป็นสีดำและแข็ง ผลอ่อนแต่ละผลเป็นแบบ nut มักเรียกกันว่า เมล็ดบัว

เมล็ด มีเปลือกหุ้มบางสีขาว อ่อนนุ่ม ภายในมีใบเลี้ยงหนามีสีขาวนวล 2 ใบ ไม่มี endosperm ต้นอ่อนมีสีเขียวเข้มมักเรียกกันว่า ดีบัว (embryo)



ภาพที่ 1 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ได้แก่ (a) เหง้า (b) ไหล (c) ดอก (d) ฝัก

ที่มา: สุรเชษฐ์ และ ปัญญา, 2533

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

กชกร (2533) ได้ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการเกิดยอดของกุหลาบพันธุ์ Rosmarin ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ปลายยอดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA พบว่าหลังเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ 60 วัน เนื้อเยื่อส่วนปลายยอดมีการเพิ่มปริมาณยอดเฉลี่ยมากที่สุด จำนวนใบมากที่สุด และความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด จำนวนใบมากที่สุด และความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สุเมธ (2536) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก มาทำการทดลองชักนำชิ้นส่วนให้เกิดตาจากเนื้อเยื่อส่วนตาไหลของบัวหลวง โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็ง พบว่าอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดตาได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

พรทิพย์ (2537) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนของตาไหลบัวพันธุ์บุณฑริกไปเลี้ยงบนอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร 1/2 MS พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำชิ้นส่วนให้เกิดรากได้ดี ส่วนอาหารที่เติม BA 7.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำชิ้นส่วนให้เกิดตาได้มากที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 16 สัปดาห์

ศิริศักดิ์ (2537) ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ โดยนำชิ้นส่วนของตาไหลบัวพันธุ์สัตตบุษย์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร 1/2 MS พบว่าอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม IAA 3 ไมโครโมลาร์ และ 2iP 15 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดชิ้นส่วนของตาไหลเกิดตาเฉลี่ย 0.78 ตา ตามีขนาด 1.0 - 1.5 เซนติเมตร จำนวนใบเฉลี่ย 0.82 ใบ ความกว้างของใบเฉลี่ย 0.93 เซนติเมตร ความยาวรากเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 สัปดาห์

สุทธิพร (2537) ทำการศึกษาเรื่องสถานะของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนของตาไหลพันธุ์บุณฑริก มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง อาหารเหลว อาหารเหลวบนอาหารแข็ง และอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า อาหาร Wick paper มีผลทำให้ชิ้นส่วนเกิดจำนวนตา และจำนวนใบได้ดีที่สุด ส่วนอาหารเหลว สามารถทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนเกิดใบ และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใบมากที่สุด เมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

ธนพรรณ (2538) ทำการศึกษาผลของ IAA และ 2iP ต่อการเพิ่มปริมาณการเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ส่วนตาไหลทำการเลี้ยงบนอาหารเหลว บนอาหารแข็งสูตร 1/2 MS + IAA 3 ไมโครโมลาร์ + 2iP 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า เป็นวิธีการที่ดีที่สุด ในการชักนำชิ้นส่วนของตาไหลให้เกิดตาเฉลี่ย 9.56 ตา จำนวนใบเฉลี่ย 10.93 ใบ ขนาดใบเฉลี่ย 4.30 เซนติเมตร ความยาวก้านใบเฉลี่ย 25.74 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ย 31.56 ราก และความยาวของรากเฉลี่ย 3.01 เซนติเมตร หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ณราวุฒิ (2539) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงในสภาพหลอดทดลอง โดยนำเมล็ดบัวหลวงอายุ 7 วันหลังดอกบาน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ศึกษาผลของออกซิน 3 ชนิด ได้แก่ NAA 2,4-D และ dicamba ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า NAA สามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่า dicamba แต่ปริมาณแคลลัสที่ได้ก็ยังน้อยมาก ส่วน 2,4-D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อใช้ออกซินแต่ละชนิดร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ออกซินร่วมกับ TDZ ชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ออกซินเพียงอย่างเดียว โดยที่ NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ TDZ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณแคลลัสสูงสุด ลักษณะแคลลัสเกาะกันหลวมๆ ใส ฉ่ำน้ำ และมีสีน้ำตาลปนเขียว

อุไร (2542) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอเมซอล โดยนำต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ต้นอ่อนเกิดแคลลัสที่ระยะเวลา 30 วัน ได้แคลลัสขนาดประมาณ 1 - 2 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต่อต้นอ่อน 1 ต้น

กุลวรา และ จันทิมา (2543) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช โดยนำส่วนตาไหลมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS โดยทำการทดสอบผลร่วมของ IAA และ 2iP และผลร่วมของ NAA และ TDZ พบว่า การใช้ NAA 15 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ TDZ 0.005 ไมโครโมลาร์ ให้ผลดีที่สุด โดยมีคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโต 4.85 คะแนน มีคะแนนเฉลี่ยการพัฒนาการเกิดยอด 3.25 คะแนน และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 80 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ NAA 5 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ TDZ 0.005 ไมโครโมลาร์ ตาไหลมีการเกิดแคลลัส โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 80 เปอร์เซ็นต์

จิตเกษม (2545) ทำการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่าชิ้นส่วนตาไหลจากคัพภะมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ ส่วนการใช้คัพภะอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงใน NAA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.15 ไมโครโมลาร์

มนทิรา (2544) ทำการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัส และโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสในบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช พบว่าการเพาะเลี้ยงตาจากไหล (shoot) ในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และเมื่อย้ายชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงในสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jordan and Oyanedel (1992) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบของ *Pouteria lucuma*. พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 45 วัน ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ 4.45 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ NAA 5.37 ไมโครโมลาร์ มีการเกิดแคลลัสจำนวนมากที่บริเวณก้านใบ

Huetteman and Preece (1993) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Thidiazuron (TDZ) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็ง พบว่า TDZ เป็นไซโตไคนินที่สามารถส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ เมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ไมโครโมลาร์

Neuman *et al.* (1993) ทำการศึกษาการสร้าง somatic embryogenesis และแคลลัส จากส่วนใบเลี้ยงของต้น Eastren black walnut โดยนำส่วนของใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็งที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ TDZ ความเข้มข้น 0.05, 0.5 และ 5 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ จากการทดลองพบว่า somatic embryos สามารถเกิดได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ 0.5 และ 5 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ และพบว่า เมื่อความเข้มข้นของ TDZ หรือ 2,4-D เพิ่มขึ้น แคลลัสสามารถเกิดได้ดีขึ้น

Sankhla *et al.* (1994) ทำการศึกษาผลของ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Albizzia julibrissin.* พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยง 8 - 10 วัน การใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นสูง 5 - 10 ไมโครโมลาร์ จะชักนำให้เกิดแคลลัสที่บริเวณฐานของส่วนใต้ใบเลี้ยง และปลายรากของต้นกล้า *Albizzia julibrissin.*

Zhou *et al.* (1994) ทำการศึกษาผลของ TDZ ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cyratia japonica.* โดยนำส่วนของวงกลีบรวม และ ก้านชูเกสรตัวผู้ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ระดับต่างๆเพียงอย่างเดียว หรือ ใช้ร่วมกับ TDZ 0.009 ไมโครโมลาร์ หรือ kinetin 0.23 ไมโครโมลาร์ พบว่า 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2.3 - 9.2 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 25 - 35 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักสดต่อชิ้นเป็น 8 - 16 มิลลิกรัม แต่ถ้าใช้ร่วมกับ TDZ 0.009 ไมโครโมลาร์ หรือ kinetin 0.23 ไมโครโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักสดจะมีค่าสูงกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D เดียวกัน TDZ จะมีประสิทธิภาพมากกว่า kinetin

Declerck and Korban (1996) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 6 ชนิด ได้แก่ TDZ BA zeatin kinetin dicamba และ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัสจากส่วนใบของต้น peach พบว่า TDZ ชักนำให้เกิดแคลลัสสีเขียว แบบ compact ส่วน BA และ zeatin ชักนำแคลลัสได้ขนาดเล็ก และ kinetin ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ สำหรับ dicamba และ 2,4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสสีขาวถึงเหลืองอ่อน แบบ friable callus

Lo (1996) ทำการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบของต้นมันเทศ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำส่วนใบ หรือ ก้านใบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ 0.9 – 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การใช้ TDZ มีผลยับยั้งการเกิดราก และการเกิดต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paiva *et al.* (1997) ทำการศึกษาการเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อกล็อกซิเนีย โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่างๆ ได้แก่ BAP 0, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0, 0.1 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 หรือ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0, 0.1 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 0, 0.5, 1.0, 2.0 หรือ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0, 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TDZ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0 หรือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการชักนำแคลลัสกล็อกซิเนีย

Albarran (1998) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของต้นมะฮอกกานี (*Swietenia maerophylla.*) ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยศึกษาสูตรอาหารพื้นฐาน สารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มแสง และระยะเวลาการให้แสง พบว่า การชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนข้อ กลีบดอก และใบเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติม TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

Al-Juboory (1998) ทำการศึกษาการชักนำแคลลัส และการเกิดยอดของต้น gardenia โดยนำส่วนใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 - 1 ไมโครโมลาร์ และ IAA ความเข้มข้น 0.1 - 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า แคลลัสเกิดดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของ IAA 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ทุกๆระดับความเข้มข้น และเมื่อทำการย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่เติม TDZ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 1 ไมโครโมลาร์ จะมีผลให้เกิดยอดมากที่สุด

Nyochembeng and Garton (1998) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของต้น cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) โดยนำส่วนปลายยอด และก้านใบ มาเพาะเลี้ยง พบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสในก้านใบมากกว่าปลายยอด และการเติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.045 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ dicamba 13.5 ไมโครโมลาร์ มีผลให้เกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น

Dipali (2001) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.05, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงส่วน hypocotyl ของต้น cumin (*C. cyminum*) พบว่าเกิดแคลลัสสีเขียว แบบ compact ในทุกๆระดับความเข้มข้นของ TDZ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 10 วัน

ปัจจัยแสงที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอจีนีซีส

Rojas and Kitto (1991) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นในพืชตระกูลมะละกอ ผ่านกระบวนการโซมาติคเอมบริโอจีนีซีส ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน พบว่า การเพาะเลี้ยง ovule ภายใต้แสง cool - white fluorescent ความเข้มแสง 12 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ สามารถชักนำให้พัฒนามาเป็นโซมาติคเอมบริโอ และเกิดต้นพืชในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lakshmanan (1994) ศึกษาการเพิ่มจำนวน Nymphaea hybrid 'James Bsydon' ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การเพาะเลี้ยงปลายราก ร่วมกับ 2iP, BA และ NAA โดยใช้ความเข้มแสง 30 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ มีความเหมาะสมต่อการเจริญของยอด และการเพิ่มจำนวนยอดมากที่สุด โดยยอดที่ได้สามารถพัฒนารากภายใน 4 สัปดาห์

Torne *et al.* (1996) ศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีต่อการเกิดโซมาติคเอมบริโอจีนีซีสจากกลีบดอกรัก พบว่า การให้แสงสีแดง ความเข้มแสง 26 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ เป็นแสงสุดท้ายของวัน มีผลให้ได้โซมาติคเอมบริโอมากกว่าการให้แสงฟาเรด (far red) เป็นแสงสุดท้ายของวัน

Castillo and Smith (1997) ศึกษาการชักนำ somatic embryo ในบีโกเนีย พบว่าการเพาะเลี้ยงก้านใบของบีโกเนีย ภายใต้แสงสีแดง ความเข้มแสง 45 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ 80 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนก้านใบเกิด somatic embryo ใน 5 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง และสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

Torne (1997) ศึกษาการชักนำเอมบริโอจากกลีบดอกของดอกรัก และปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเอมบริโอ จากการทดลองพบว่า กลีบดอกสามารถชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอได้ง่าย และมีปริมาณสูงสุด ภายใต้ความเข้มแสง 90 - 100 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ เอมบริโอที่ได้สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

Onofrio *et al.* (1998) ทำการศึกษาอิทธิพลของคุณภาพแสงที่มีต่อการเกิดโซมาติคเอมบริโอจีนีซีสจากใบมะตูม พบว่า การเกิดโซมาติคเอมบริโอมีจำนวนมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดง ความเข้มแสง 20 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$

Kintzios et al. (1999) ศึกษาการเกิดโซมาติคเอมบริโอจีนีซีสจากการเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสจากใบ *Salvia offcinalis* และ S. *truticosa* พบว่า การชักนำในระดับความเข้มแสงที่ต่ำ (50 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$) มีผลให้เกิดแคลลัส และโซมาติคเอมบริโอในระดับที่สูงกว่าการชักนำในความเข้มแสงสูง (250 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$)

Das et al. (2002) ทดลองชักนำโซมาติคเอมบริโอจีนีซีสจากแผ่นใบขององุ่น โดยใช้ระดับฮอร์โมน ความเข้มแสง และอุณหภูมิ กระตุ้นการเกิดโซมาติคเอมบริโอ พบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากแผ่นใบภายใต้ความเข้มแสง 15 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 60 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ มีผลทำให้แคลลัสกลายเป็นเอมบริโอได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 60 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ โดยไม่ผ่านความเข้มแสง 15 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ ซึ่งจะมีผลยับยั้งการเกิดโซมาติคเอมบริโอจีนีซีส และทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีชมพู

ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีน

รงรอง (2541) ทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสชนิด embryogenic callus ที่เจริญมาจากใบของกุหลาบ (*Rosa hybrida*) พันธุ์ Carl Red โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (A281/pBI121) เป็นพาหะ ซึ่งเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A281/pBI121 มี GUS gene เป็น marker gene และมี kanamycin เป็น antibiotic resistant gene (NPTII gene) จากการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแคลลัสทั้งหมด เมื่อนำแคลลัสที่ต้านทานต่อ kanamycin เหล่านี้มาทดสอบการแสดงออกของ GUS พบจุดสีน้ำเงินบนก้อนแคลลัสและภายในเซลล์ จากนั้นนำ transformed calli เหล่านี้ไปตรวจสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบเพียงเล็กน้อย เพื่อยืนยันการถ่ายยีนของ Agrobacterium หลังจากตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis แล้วพบแถบที่แสดง GUS gene ที่ระดับ 1.2 kb และแถบที่แสดง *NPTII* gene ที่ระดับ 0.7 kb ใน transgenic calli ที่ตรวจสอบ

รงรอง, เพิ่มพงษ์ และอัญชลี (2543) ทดสอบเบญจมาศพันธุ์ดอกสีเหลือง เมื่อนำข้อมาเลี้ยงในอาหารที่มี kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 ppm พบว่าในทุกระดับความเข้มข้นสามารถทำให้ข้อเบญจมาศตายได้ ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm จากการเลี้ยงในเดือนแรก พบว่า ข้อจะมีสีเขียว จากนั้นเริ่มมีสีขาวซีด และตายในที่สุด เมื่อเลี้ยงครบ 2 เดือน สำหรับข้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม kanamycin จะเจริญเติบโต เกิดยอดที่ตา และบริเวณรอยตัดตามปกติ

Kim and Kim (2000) ทดลองถ่ายยีนในผักกาด *Lactuca sativa* ใช้เชื้อ *A.tumefaciens* เป็นพาหะถ่ายยีน *AmAI* เพื่อให้ต้านทานต่อโรคใบด่าง โดยใช้ส่วนของยอด เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ารากขึ้นได้ดีในอาหารดังกล่าว หลังจากนั้นนำพืชที่ถ่ายยีนแล้วไปตรวจสอบยีน *AmAI* ด้วยวิธี PCR เพื่อยืนยันในระดับ DNA

ประวีณา, สุมนทิพย์ และปิยะดา (2546) ทดลองศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องเงิน โดย *A. tumefaciens* พบว่า kanamycin ความเข้มข้น 150 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของโพรโทคอร์ม และต้นอ่อนเอื้องเงินได้ตามลำดับ ความเข้มข้นสูงสุดของ cefotaxime ที่โพรโทคอร์ม และต้นอ่อนเอื้องเงิน สามารถเจริญได้คือ 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การส่งถ่ายยีนสู่โพรโทคอร์ม และต้นอ่อนเอื้องเงินโดย A. *tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4401 (pBI121) ที่มียีน *NPTII* เป็นยีนคัดเลือกและยีน *GUS* เป็นยีนเครื่องหมาย พบว่าสามารถส่งถ่ายยีนที่ต้านทานต่อ kanamycin สู่โพรโทคอร์ม และต้นอ่อนเอื้องเงินได้ โดยเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีนของเอื้องเงินคือ โพรโทคอร์ม มีเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อ kanamycin เท่ากับ 62.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยการแสดงออกของ GUS พบว่ามีกิจกรรมของยีน GUS และเมื่อตรวจสอบการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) พบว่ายีนที่ส่งถ่ายเข้าไปสามารถเข้ารวมกับโครโมโซมของกล้วยไม้ได้ เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ที่ผ่านการถ่ายยีน และกล้วยไม้ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน พบว่ามีโครโมโซมเท่ากันคือ $2n = 38$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mahadtanapuk *et al.* (2005) ทดลองวิธีการทำให้เกิดต้นใหม่ และการถ่ายยีนถูกสร้างขึ้นสำหรับ *Curcuma alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Chiang Mai Pink โดยใช้ retarded shoot เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น โดยตัดชิ้นส่วนขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร แล้วเลี้ยงรวมกันกับ (co-cultivate) *A. tumefaciens* strain AGLO ซึ่งมี binary vector คือ pBI121 หรือ pBI121-Ca-ACS1 นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 วัน แล้วย้ายลงใน MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, IMA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร, TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ vancomycin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการ subculture ชิ้นส่วนพืชทุกๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นตายอดเกิดขึ้น แล้วจึงย้ายเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ให้แยกส่วนของยอดออก และเลี้ยงบน MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (subculture ทุกๆ 2 สัปดาห์) นำไปวิเคราะห์ผลด้วย PCR ตรวจสอบการแสดงออกของ Gus และ เซาเทิร์นบลอท (Southern blot) เพื่อตรวจสอบการถ่ายยีน จากการทดลองพบว่า ได้พืชที่ถูกถ่ายยีนเป็นผลสำเร็จ ภายในระยะเวลา 3 เดือน หลังจากเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* และมีความถี่ที่เกิดการถ่ายยีนมากกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเหมาะสมต่อการนำไปใช้จริง

Xiaomei and Paula (2006) ทดลองการถ่ายยีนในแบล็คเชอรี่ (*Prunus serotina* Ehrh.) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะถ่ายยีน *AGAMOUS* เพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยใช้ส่วนใบของแบล็คเชอรี่คัดเลือกเซลล์ และยอด ใช้เวลา 12 สัปดาห์ เลี้ยงบนอาหาร WPM ที่เติม kanamycin เป็นสารคัดเลือกยอดใหม่สามารถเจริญได้ในอาหาร WPM ที่เติม TDZ 9.1 ไมโครโมลาร์, NAA 1.1 ไมโครโมลาร์ และ kanamycin 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่เติม Timentin 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อ *A. tumefaciens* ซึ่งถ่ายยีน *AGAMOUS* สามารถทำได้สำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดำเนินงาน

1 อุปกรณ์

1.1 เมล็ดบัวพันธุ์บุณฑริก (ภาพที่ 2)

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็ง และเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962)

1.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

- สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA (α-napthalene acetic acid) และ TDZ [1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)- UREA]

1.2.3 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ

- เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (clorox)
- ทวีน 20 (polyoxyethylene sorbitan)

1.2.4 สารปฏิชีวนะ

- กานามัยซิน (kanamycin)

1.3 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

1.3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และแบบหยาบสำหรับชั่งสารเคมี

1.3.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.3.3 อุปกรณ์ เครื่องมือสำหรับย้ายชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อหรือตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar flow) ปากคีบที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด จานแก้ว (petri disc)

1.3.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

1.3.5 เตาแก๊ส

1.3.6 ตู้ไมโครเวฟ

1.3.7 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว ได้แก่ กรวย กระบอกตวง บีกเกอร์ ปิเปต จานแก้ว (petri disc) ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวด Duran ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร แท่งแก้วคนสาร

1.3.8 ปิเปตอัตโนมัติ (autopipett) tip ขนาด 1000 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร

1.3.9 กล้องดิจิตอล และกล้องสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.10 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส แสงจากหลอด cool white 16 ชั่วโมงต่อวัน ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ

1.3.11 อุปกรณ์ และเครื่องมืออื่นๆ ได้แก่ ปากกา ดินสอ สมุดบันทึก ถุงพลาสติก ยางรัด กระดาษกราฟ และนาฬิกา

2 วิธีการทดลอง

2.1 การฟอกฆ่าเชื้อ ภัควดี (2547)

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก นำเมล็ดบัวหลวงมาผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที จากนั้นฟอกด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ ทวีน 20 2 หยด นาน 20 นาที และล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

2.2 การเตรียมอาหาร

การเตรียมอาหารสูตรชักนำแคลลัส ตามวิธีการทดลองของ ภัควดี (2547) โดยใช้อาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร และเตรียมอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ไม่เติมวุ้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

<u>การทดลองที่1</u> ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดบัวหลวงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาผ่าในสภาพปลอดเชื้อ โดยเอาเฉพาะส่วนของเอมบริโอ บริเวณที่เป็นตายอด และก้านใบ (ภาพที่ 1) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) จัดกลุ่มการทดลองแบบ 2×2 Factorial experiment in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย จำนวน 3 ซ้ำๆละ 5 ชิ้น

ปัจจัย 1 แสงสีที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

- แสงสีขาว (white light)
- แสงสีแดง (red light)

ปัจจัย 2 ชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบ ได้แก่

- ตายอด
- ก้านใบจากเอมบริโอ

แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ให้แสง 16ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหาร 2 ทุกสัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือก

ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ในการใช้เป็นสารคัดเลือก สำหรับเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน *npt* โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 วิธีการวิธีการละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ชิ้น โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด และเอมบริโอ บนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 0 50 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

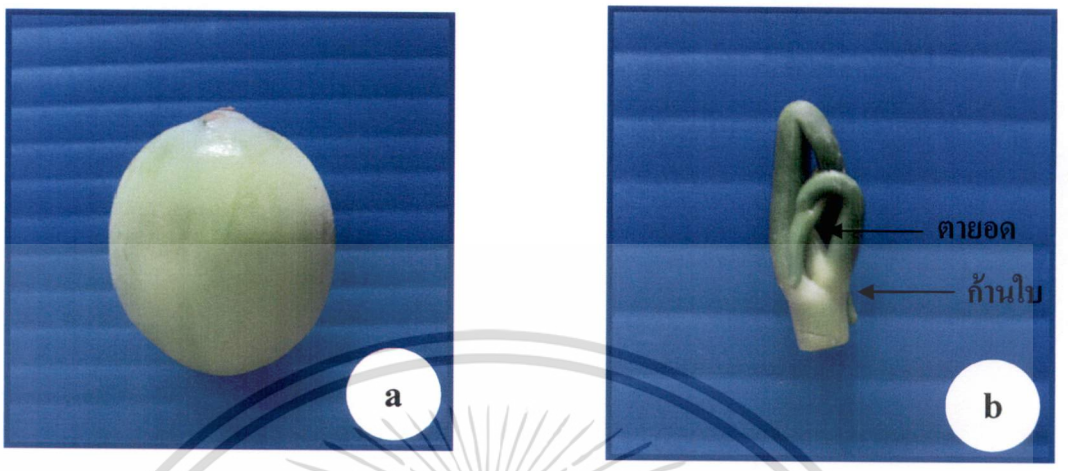
<u>การทดลองที่ 3</u> การถ่ายยีนเข้าสู่ตายอดของเอ็มบริโอบัวหลวงโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (pCAMBIA 2301)

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดส่วนตายอดของเอ็มบริโอ จากนั้นนำส่วนของตายอดจากเอมบริโอ(ภาพที่ 1b) มาแช่ในอาหารทั้ง 5 treatment โดยแต่ละวิธีการมี 5 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น ดังนี้

วิธีการที่ 1 = Control + แช่ในอาหาร MS
วิธีการที่ 2 = Control - แช่ในอาหาร MS (เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก)
วิธีการที่ 3 = แช่ในเชื้อ *A. tumefaciens* EHA 105 (pCAMBIA 2301) 1:10 , 10 นาที
วิธีการที่ 4 = แช่ในเชื้อ *A. tumefaciens* EHA 105 (pCAMBIA 2301) 1:10, 30 นาที
วิธีการที่ 5 = แช่ในเชื้อ *A. tumefaciens* EHA 105 (pCAMBIA 2301) 1:20 , 30 นาที

นำชิ้นส่วนแต่ละวิธีการซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นวางบนอาหารMS ที่เติม Acetocyringone 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงไว้ 2 วัน แล้วนำชิ้นส่วนมาล้างด้วย MS + Cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำชิ้นส่วนแต่ละวิธีการซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อ วิธีการที่ 1 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ส่วนวิธีการที่ 2-5 เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก(MS + NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ + kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร+ Cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมและเลี้ยงต่อไปอีก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime (MS + NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ + kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และทำการเลี้ยงชิ้นส่วนต่อจนถึงสัปดาห์ที่ 8 หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหาร MS อีก 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (a) และเอมบริโอ (b)

3 การบันทึกข้อมูล

การทดลองบันทึกผลทุกสัปดาห์ ดังนี้

<u>การทดลองที่</u> 1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

1. บันทึกการเจริญเติบโตแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ด้วยการให้คะแนน โดยแบ่งระดับคะแนนออกเป็น 5 ระดับ (สัปดาห์ที่ 1 - 16) ดังนี้ (ภาพที่ 3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก)

คะแนน 1 ชิ้นส่วนตาย (a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีสีเหลือง ขาวหรือน้ำตาล แสดงอาการเริ่มตาย (b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนคงสภาพเดิม มีสีเขียวอ่อน (c)

คะแนน 4 ชิ้นส่วนที่มีแคลลัสเกิดขึ้น แคลลัสมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่นสีเขียวเข้ม (d)

คะแนน 5 ชิ้นส่วนมีแคลลัสเกิดขึ้น และมีลักษณะที่เจริญเป็นยอด (e)

2. ขนาดของชิ้นส่วน

<u>การทดลองที่</u> 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือก

1. บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS (Murashige and Skoog. 1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ ให้คะแนน โดยแบ่งระดับคะแนนออกเป็น 5 ระดับ (สัปดาห์ที่ 1 - 8) ดังนี้ (ภาพที่ 4 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก)

คะแนน 1 ชิ้นส่วนเริ่มตาย (a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลดำ (b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนมีสีเหลือง หรือ น้ำตาล (c)

คะแนน 4 ชิ้นส่วนมีสีขาว (d)

คะแนน 5 ชิ้นส่วนมีเขียวอ่อน (e)

2. ขนาดของชิ้นส่วน

3. บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS (Murashige and Skoog. 1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ ให้คะแนนโดยแบ่งระดับคะแนนออกเป็น 5 ระดับ (สัปดาห์ที่ 1 - 8) ดังนี้ (ภาพที่ 5 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตชิ้นส่วนเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก)

คะแนน 1 ชิ้นส่วนเป็นต้นไม่มียอด ไม่มีราก (a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนมียอดสีชมพูขาว (b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนมียอดสีชมพู มีราก (c)

คะแนน 4 ชิ้นส่วนมียอดสีขาว มีราก (d)

คะแนน 5 ชิ้นส่วนเจริญเป็นต้นมีเขียว (e)

4. ขนาดของชิ้นส่วน

<u>การทดลองที่ 3</u> การถ่ายยีนเข้าสู่ตายอดของเอ็มบริโอบัวหลวงโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (pCAMBIA 2301)

1. บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน ตายอดเอ็มบริโอของหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งระดับคะแนนออกเป็น 5 ระดับ (ภาพที่ 6)

คะแนน 1 ชิ้นส่วนดำหรือชิ้นส่วนตาย (a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีสีเหลือง ขาวหรือน้ำตาล แสดงอาการเริ่มตาย (b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนคงสภาพเดิม มีสีเขียวอ่อน (c)

คะแนน 4 ชิ้นส่วนมี สีเขียวเข้ม (d)

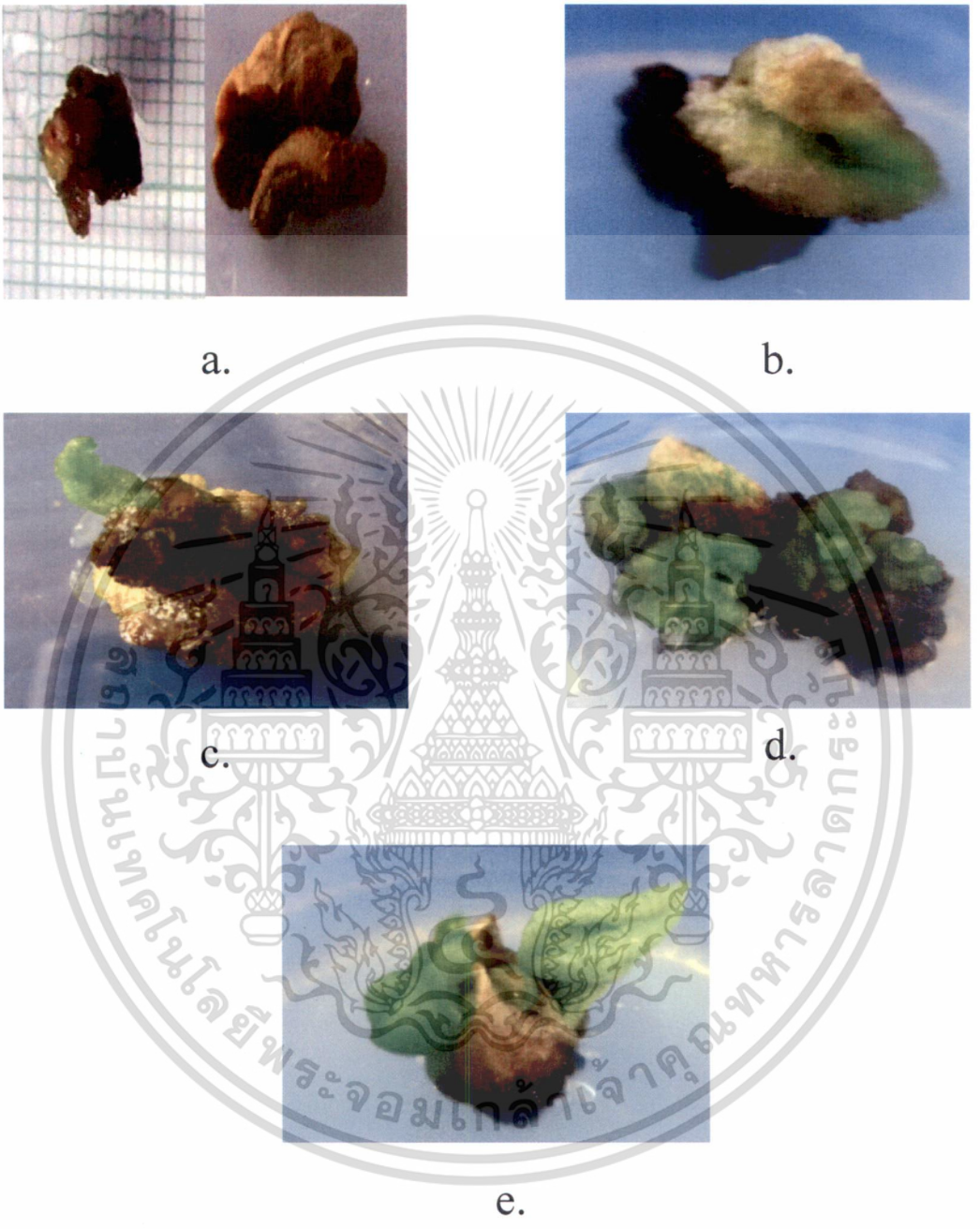
คะแนน 5 ชิ้นส่วนมีสีเขียวเข้ม และมีลักษณะที่เจริญที่ดี (e)

2. ขนาดของชิ้นส่วน

3. เปอร์เซ็นต์การตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (สัปดาห์ที่ 1-16) (การทดลองที่ 1)

a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน

b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน

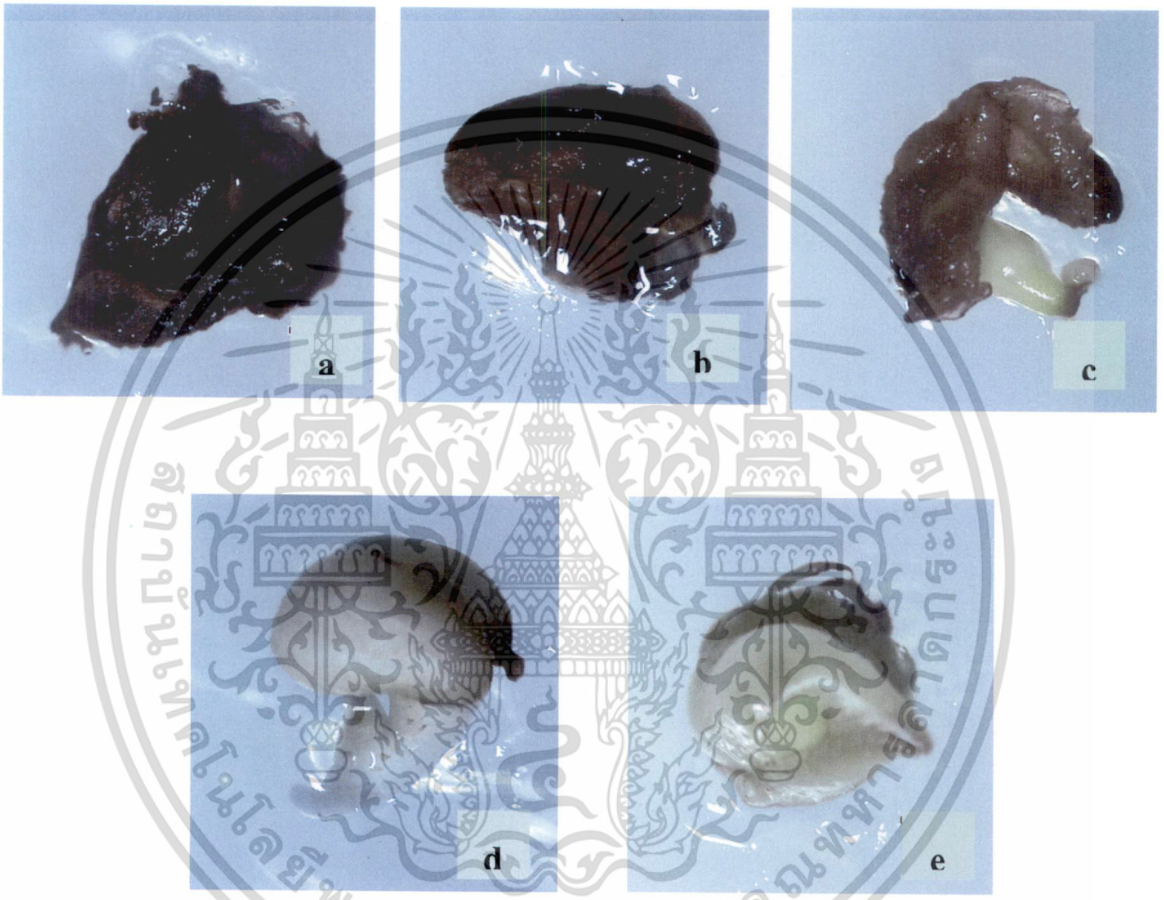
c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน

d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน

e แสดงการให้คะแนน 5 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

141518



ภาพที่ 4 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (การทดลองที่ 2)

a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน

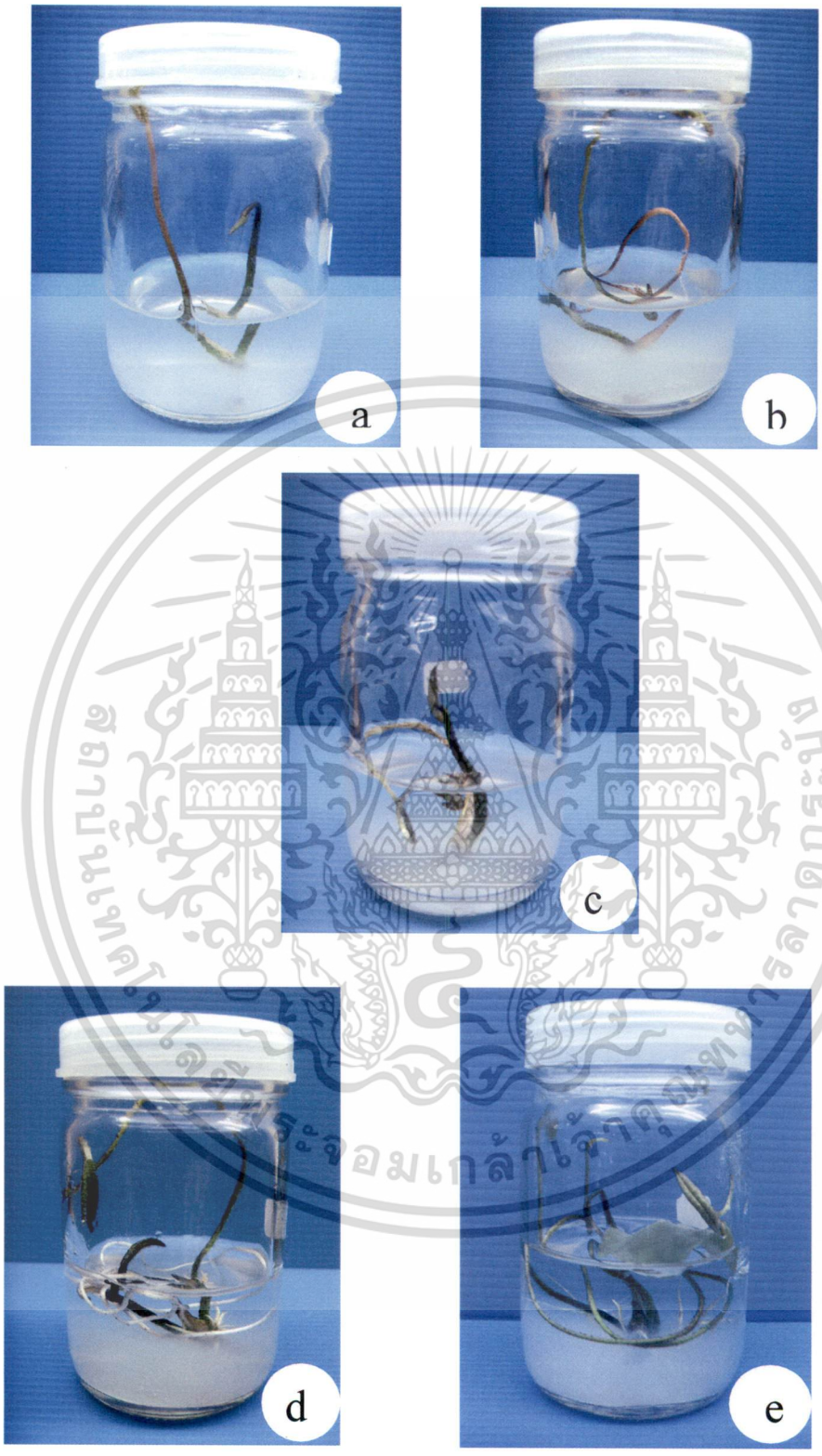
b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน

c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน

d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน

e แสดงการให้คะแนน 5 คะแนน

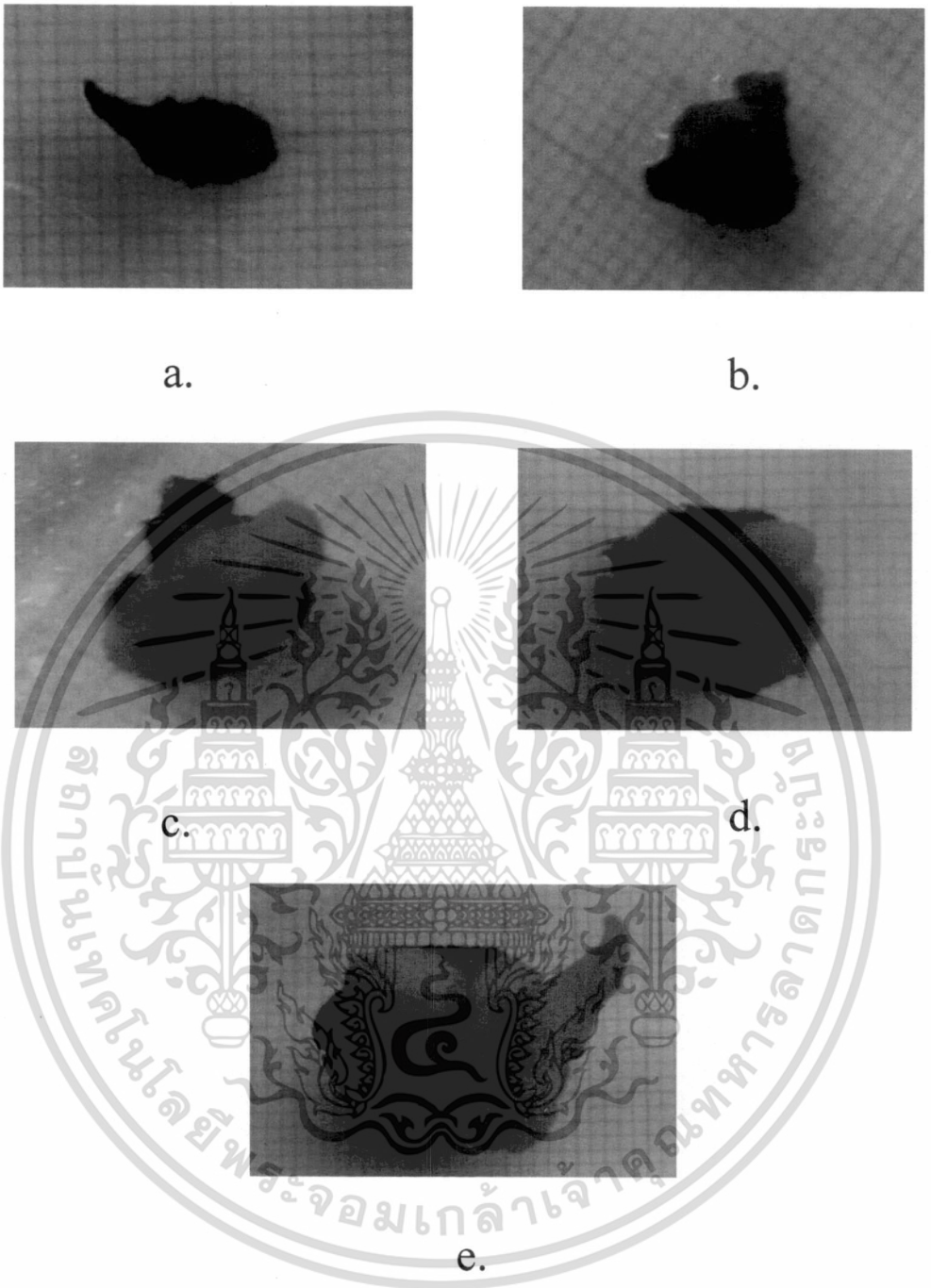
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตชิ้นส่วนเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (การทดลองที่ 2)

a = 1 คะแนน b = 2 คะแนน c = 3 คะแนน d = 4 คะแนน e = 5 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่6 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอที่ได้รับการถ่ายยีน *A. tumefacience* (pCAMBIA 2301) (สัปดาห์ที่ 1-16) (การทดลองที่ 3)

a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน
b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน
c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน
d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน
e แสดงการให้คะแนน 5 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ภายใต้ปัจจัยแสงสีระหว่างแสง cool white fluorescent และ red light โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และก้านใบจากเอมบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนต่างๆ ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมีดังนี้

การเจริญเติบโตแคลลัส ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

จากการศึกษาการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยนำชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ พบว่า ทุกๆสัปดาห์คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) และพบว่า ชิ้นส่วนจากเอมบริโอ ทั้ง 2 ชนิด สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตายอดจากเอมบริโอ และก้านใบจากเอมบริโอ มีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น มีสีเขียว (ภาพที่ 3) โดยค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสมีค่าสูงที่สุด เมื่อใช้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ คือ 3.80 คะแนน และชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอนี้ยังพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นต้นได้ (ภาพที่ 3, e) ภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาพแสงสีขาว (white light) และเมื่อเลี้ยงในสภาพแสงสีแดง (red light) ชิ้นส่วนก้านใบจะมีแนวโน้มของคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่เจริญดีกว่าในส่วนของตายอด

ขนาดแคลลัสภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยนำชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบ เลี้ยงในสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตดังที่กล่าวมา เมื่อพิจารณาผลของขนาดการเจริญเติบโตพบว่า ภายใต้แสงสีขาว (white light) และภายใต้แสงสีแดง (red light) ขนาดการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัสของชิ้นส่วนทั้งสอง พบว่า ในทุกๆสัปดาห์ ขนาดของแคลลัสจะเพิ่มขึ้น และขนาดชิ้นส่วนก้านใบจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นกว่าชิ้นส่วนตายอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

แสง	ชิ้นส่วน	การเจริญเติบโตแคลลัส (คะแนน) อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
แสงสีขาว	ตายอด	3.00±0.00	2.86±0.13	2.73±0.17	2.60±0.23	2.86±0.26	3.40±0.34	3.40±0.30	3.80±0.23
(White light)	ก้านใบ	3.00±0.11	3.00±0.00	2.80±3.14	2.60±0.00	2.66±0.13	3.15±0.18	3.20±0.20	3.20±0.20
แสงสีแดง	ตายอด	2.86±0.13	2.86±0.13	2.86±0.13	2.80±0.20	2.41±0.41	2.25±0.52	2.00±0.50	1.58±0.36
(red light)	ก้านใบ	3.00±0.11	2.93±0.06	2.73±0.13	3.00±0.00	2.93±0.06	2.93±0.48	3.13±0.59	2.93±0.46
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV%		6.15	5.93	8.03	9.62	16.44	23.88	25.30	20.02

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 2 ขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

แสง	ชิ้นส่วน	ขนาดของแคลลัส (ตารางเซนติเมตร) อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
แสงสีขาว	ตายอด	0.20±0.01	0.36±0.02	0.49±0.03	0.55±0.06	0.81±0.09	1.06±0.12	1.42±0.17	1.84±0.23
(White light)	ก้านใบ	0.26±0.01	0.50±0.00	0.69±0.01	0.70±0.08	1.11±0.11	1.70±0.18	2.04±0.19	2.34±0.21
แสงสีแดง	ตายอด	0.33±0.10	0.37±0.05	0.52±0.08	0.80±0.15	0.79±0.17	1.00±0.27	1.05±0.17	0.82±0.16
(red light)	ก้านใบ	0.32±0.03	0.54±0.03	0.72±0.06	0.85±0.05	1.10±0.15	1.32±0.16	1.30±0.30	1.61±0.36
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV%		33.34	12.94	16.19	23.34	25.22	26.63	25.96	26.81

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือก

ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ในการใช้เป็นสารคัดเลือก สำหรับ เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน *npt* โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 วิธีการ วิธีการละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้น โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด และเอมบริโอ บนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) ที่ดัดแปลงโดยเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

เปอร์เซ็นต์การตาย และขนาดของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือก ในชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในอาหารคัดเลือกทุกวิธีการ จะมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 1 ชิ้นส่วนตายอด ในอาหารคัดเลือกมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ ชิ้นส่วนยังมีสีเขียวอ่อน (ตารางที่ 3) โดยมีคะแนนการเจริญเติบโต ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายคือ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ชิ้นส่วนตายอด ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin (control) ลักษณะชิ้นส่วนยังมีสีเขียว แต่ในอาหารคัดเลือกที่ความเข้มข้นต่างๆ ชิ้นส่วนมีลักษณะที่เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง โดยจะมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในทั้ง 2 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 4 ถึง สัปดาห์ที่ 6 ชิ้นส่วนตายอดที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin (control) มีลักษณะชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และในอาหารคัดเลือกความเข้มข้นอื่นๆ มีลักษณะชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาว จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 8 และในสัปดาห์ที่ 8 นี้พบว่า มีเพียง ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ kanamycin ที่เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ที่ทำให้ชิ้นส่วนตายอดมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลปนเหลืองทุกชิ้นส่วน และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเป็น 72.27 เปอร์เซ็นต์ และทุกสัปดาห์ที่กล่าวมาไม่มีการเกิดเป็นแคลลัส เมื่อพิจารณาจากสีของชิ้นส่วนที่เปลี่ยนไป โดยดูจากคะแนนการเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน) จะเห็นได้ชัดกว่า ดังภาพที่ 7 และชิ้นส่วนมีขนาดโตขึ้นในทุกสัปดาห์ของทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (ตารางที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน/อายุ (สัปดาห์)[1/]							
kanamycin (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8
control	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{c}	17.80±2.20^{b}	22.27±2.26^{c}	23.33±8.81^{b}	24.47±15.57^{b}	28.47±15.21^{b}
50	0.00±0.00	17.80±2.22^{ab}	27.80±6.17^{b}	50.06±1.90^{a}	54.47±0.14^{a}	54.47±2.93^{a}	61.13±1.13^{a}	72.27±4.82^{a}
100	0.00±0.00	23.33±8.81^{a}	37.80±2.20^{ab}	47.80±4.02^{a}	51.13±0.29^{ab}	52.27±1.13^{a}	54.47±2.93^{a}	54.47±2.93^{ab}
200	0.00±0.00	22.26±2.26^{ab}	35.60±2.20^{ab}	41.13±1.13^{a}	41.13±0.05^{b}	42.27±3.97^{a}	44.47±4.46^{ab}	45.60±4.02^{ab}
300	0.00±0.00	17.80±11.75^{ab}	40.00±0.00^{a}	41.20±2.94^{a}	41.80±0.14^{b}	42.26±4.82^{a}	42.27±2.26^{ab}	48.93±5.87^{ab}
CV%	0.00	71.69	18.97	23.29	27.33	29.13	29.06	26.88

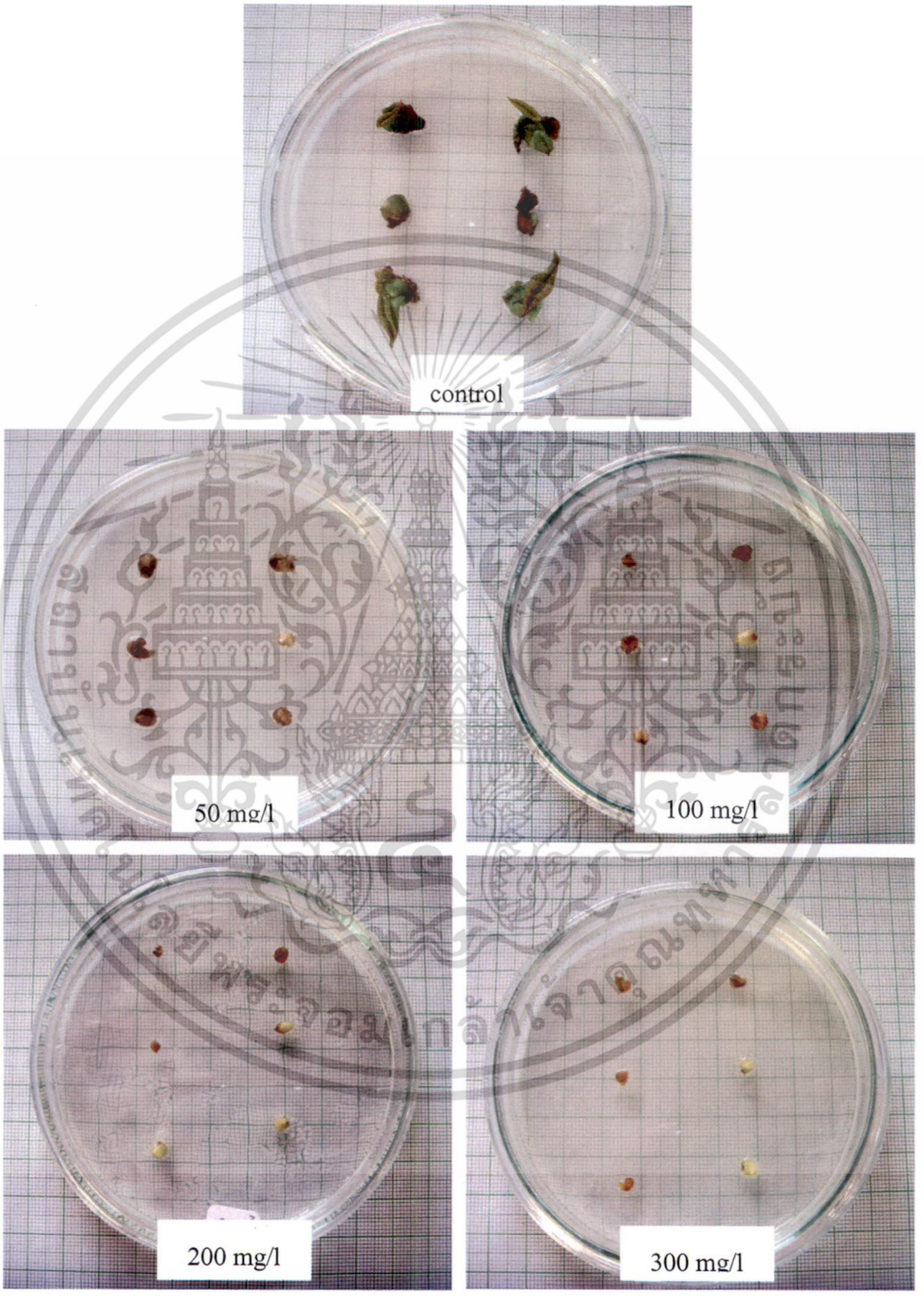
[1/]ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ขนาดของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ	ขนาดตายอดจากเอมบริโอ (ตารางเซนติเมตร)/อายุ (สัปดาห์)[1/]							
kanamycin (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8
control	0.21±0.00^{b}	0.21±0.00^{b}	0.62±0.07^{a}	1.03±0.13^{a}	1.11±0.14^{a}	1.20±0.14^{a}	1.32±0.14^{a}	1.53±0.14^{a}
50	0.21±0.00^{b}	0.21±0.00^{b}	0.32±0.00^{b}	0.39±0.00^{b}	0.51±0.04^{b}	0.59±0.00^{b}	0.59±0.00^{b}	0.58±0.00^{b}
100	0.32±0.00^{a}	0.32±0.00^{a}	0.39±0.00^{b}	0.45±0.02^{b}	0.40±0.00^{b}	0.38±0.01^{b}	0.38±0.01^{b}	0.36±0.01^{b}
200	0.34±0.01^{a}	0.34±0.01^{a}	0.38±0.01^{b}	0.38±0.01^{b}	0.47±0.02^{b}	0.48±0.02^{b}	0.48±0.02^{b}	0.47±0.03^{b}
300	0.34±0.01^{a}	0.34±0.01^{a}	0.37±0.01^{b}	0.39±0.02^{b}	0.41±0.04^{b}	0.52±0.07^{b}	0.48±0.06^{b}	0.43±0.08^{b}
CV%	7.13	7.13	13.61	21.05	21.12	20.43	19.04	19.62

[1/]ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 แสดงการทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (สัปดาห์ที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การตาย และขนาดของชิ้นส่วนเอมบริโอ บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin

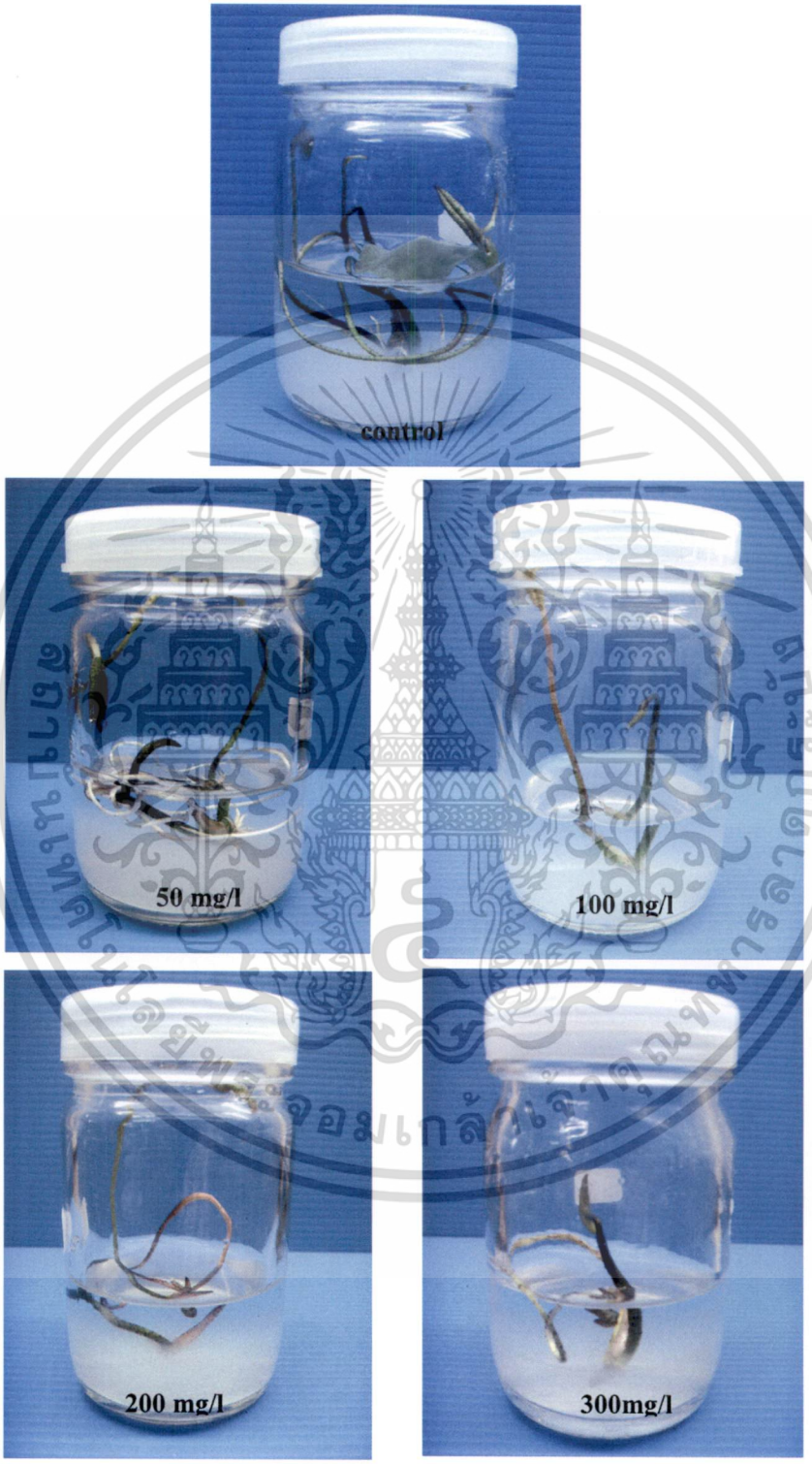
จากการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือก ในชิ้นส่วนเอมบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกสัปดาห์การเจริญเติบโตจะลดลงทุกสัปดาห์ และมีความแตกต่างกันยิ่งทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 5) แต่เอมบริโอยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin และพัฒนาไปเป็นต้น และยอดของบัวที่เกิดใหม่ จะมีสีชมพู และขาว ในแต่ละความเข้มข้น และชิ้นส่วนมีขนาดเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ และในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ แต่เมื่อพิจารณาจากคะแนนการเจริญเติบโตที่คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตาย จะเห็นว่าในความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญเติบโตลดลงมากกว่าในความเข้มข้นอื่นๆ และที่ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ยอดของบัวมีสีขาวซีด ต่างจากความเข้มข้นอื่นในการทดลอง ที่ยอดบัวจะยังมีสีชมพูปนเขียว ลักษณะของต้นในแต่ละความเข้มข้นแสดงในภาพที่ 8

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน//อายุ (สัปดาห์)[1/]							
kanamycin (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8
control	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	6.66±0.33^{b}	20.00±0.00^{b}	20.00±0.00^{b}	20.00±0.00^{b}
50	0.00±0.00	20.00±0.00	20.00±0.00	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}
100	0.00±0.00	20.00±0.00	20.00±0.00	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}	40.00±0.00^{a}
200	0.00±0.00	20.00±0.00	20.00±0.00	26.66±6.66^{a}	26.66±6.66^{a}	26.66±6.66^{ab}	26.66±6.66^{ab}	26.66±6.66^{ab}
300	0.00±0.00	20.00±0.00	20.00±0.00	26.66±6.66^{a}	26.66±6.66^{a}	26.66±6.66^{ab}	26.66±6.66^{ab}	26.66±6.66^{ab}
CV%	0.00	0.00	0.00	27.38	31.94	23.81	23.81	23.81

[1/]ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 แสดงการทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อชิ้นส่วนเอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (สัปดาห์ที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 3</u> การถ่ายยีนเข้าสู่ตายอดของเอ็มบริโอบัวหลวงโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (pCAMBIA 2301)

การศึกษาความเข้มข้มของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (pCAMBIA 2301) ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อส่วนตายอดจากเอมบริโอ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 วิธีการ วิธีการละ 5 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น

การเจริญเติบโตและขนาดของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบนอาหารคัดเลือก

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 2301 ที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* และระยะเวลาในการบ่มเชื้อร่วมกับเนื้อเยื่อในระยะต่างๆ เมื่อนำมาคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ + kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร + cefotoxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสัปดาห์ 2-6 ทุกวิธีการมีคะแนนการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 8 คะแนนการเจริญเติบโตมีความแตกต่างระหว่างชิ้นส่วนที่อยู่บนอาหาร MS และอาหารคัดเลือก และในสัปดาห์ที่ 10 เริ่มเห็นความแตกต่างระหว่างชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน และไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก มีคะแนนการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเป็นผลเนื่องจากสารคัดเลือก แต่เมื่อนำชิ้นส่วนทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารถคัดเลือก พบว่าในทุกวิธีการมีคะแนนการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6)

เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ พบว่า ในอาหารคัดเลือกทุกวิธีการ จะมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ โดยสัปดาห์ที่ 2 ไม่มีการตายเกิดขึ้นเลย ลักษณะของชิ้นส่วนยังคงมีสีเขียวเข้มจนถึงอ่อนอยู่ (ตารางที่ 7) โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายคือ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 - 8 ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin เปอร์เซ็นต์การตายน้อยมาก วิธีการที่ 1 ต้นไม่ได้รับการถ่ายยีนและเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่มีสารคัดเลือก มีเปอร์เซ็นต์การตาย 12.00 เปอร์เซ็นต์ แต่ในวิธีการที่ 2 ชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก มีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีลักษณะสีชิ้นส่วนน้ำตาลปนดำทุกชิ้นส่วน และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ มีเปอร์เซ็นต์การตาย 80.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสัปดาห์ที่ 10 ซึ่งนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การตาย 100.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนื้อเยื่อที่มีการถ่ายยีนในวิธีการที่ 3-6 (เชื้อ *Agrobacterium* ต่ออาหาร MS 1:10 แช่นาน 10 นาที , 1:10 แช่นาน 30 นาที และ 1:20 แช่นาน 30 นาที) มีเปอร์เซ็นต์การตาย เพิ่มขึ้น คือ 24 , 8 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สัปดาห์ที่ 12 พบว่าวิธีการที่ 3-6 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 28 , 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 14-16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 คะแนนการเจริญเติบโตของตายอดเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10-16

Tretment	คะแนนชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ /อายุ (สัปดาห์)[1/]							
	2	4	6	8	10	12	14	16
Control +	3.60±0.24	4.40±0.24	4.00±0.00	4.00±0.00[a]	2.40±0.24[a]	2.40±0.24[a]	2.40±0.24[a]	1.80±0.20
Control -	3.80±0.20	3.60±0.24	3.40±0.24	2.60±0.24[b]	1.40±0.24[c]	1.20±0.20[c]	1.20±0.20[b]	1.00±0.00
1:10 , 10 min	4.00±0.00	3.60±0.24	3.60±0.24	3.00±0.00[b]	2.20±0.20[a]	2.00±0.00[ab]	1.40±0.24[b]	1.40±0.24
1:10 , 30 min	3.60±0.24	4.60±0.24	3.60±0.24	3.00±0.00[b]	2.00±0.00[ab]	1.60±0.24[bc]	1.20±0.20[b]	1.20±0.20
1:20 , 30 min	3.40±0.24	3.40±0.24	3.00±0.31	2.60±0.24[b]	1.60±0.24[bc]	1.40±0.24[bc]	1.40±0.24[b]	1.40±0.24
CV%	13.03	14.76	15.81	11.15	20.83	25.00	26.31	36.02

[1/]ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10-16

Tretment	เปอร์เซ็นต์การตายของตายอดจากเอมบริโอ /อายุ (สัปดาห์)[1/]							
	2	4	6	8	10	12	14	16
Control +	0±0.00	0±0.00	8±7.99[b]	8±7.99[b]	12±7.99[b]	12±7.99[b]	16±9.79[b]	16±9.79[b]
Control -	0±0.00	24±9.79	36±10.95[a]	80±10.95[a]	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[a]
1:10 , 10 min	0±0.00	0±0.00	0±0.00[b]	0±0.00[b]	24±14.69[b]	28±13.56[b]	28±13.56[b]	28±13.56[b]
1:10 , 30 min	0±0.00	0±0.00	0±0.00[b]	0±0.01[b]	8±4.89[b]	8±4.89[b]	8±4.89[b]	12±4.89[b]
1:20 , 30 min	0±0.00	0±0.00	4±3.99[b]	4±3.99[b]	8±4.89[b]	12±7.99[b]	12±7.99[b]	16±7.48[b]
CV%	0.00	204.12	122.39	84.89	58.28	58.46	59.89	53.12

[1/]ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายใต้ปัจจัยแสง ระหว่างแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ หลังจากการทดลองเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) พบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้ง 2 ส่วน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อพิจารณาจากคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตแล้วนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้งสองนี้จะเริ่มพัฒนาเป็นแคลลัส โดยชิ้นส่วนจะสร้างแคลลัสขึ้นที่บริเวณรอยตัด เนื่องจากบริเวณรอยตัดมีการตอบสนองต่อสารต่างๆได้ก่อนบริเวณอื่นๆ และมีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีกว่าเซลล์ข้างใน (คำนูญ . 2542) โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) นี้ จะมีสีเขียว ลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น เนื่องจากแสงสีขาว มีความสมารถในการกระตุ้นสารตัวกลางที่จะเปลี่ยนเป็นรงควัตถุชนิดต่างๆให้กลายเป็นคลอโรฟิลล์ ทำให้แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงสีขาว (white light) สามารถเปลี่ยนเป็นสีเขียว (เชาวน์ และพรรณี. 2539) และชิ้นส่วนทั้ง 2 จะให้แคลลัสลักษณะใกล้เคียงกัน เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ เซลล์มีการตื่นตัว (active cell) และแบ่งเซลล์สูง จึงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Dixon and Gonzales. 1994) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองชักนำการเกิดแคลลัสในองุ่นที่พบว่า การเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบ และต้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Seung and Seon.2002) และการชักนำให้เกิดแคลลัสใน *Cyclamen persicum* พบว่าส่วนก้านใบ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนอื่นๆ (Karam and Majathoub. 2000) แต่เมื่อพิจารณาคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตระหว่างชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ พบว่าคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอสูงกว่าชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ โดยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสมีค่าสูงที่สุด เมื่อใช้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ คือ 3.80 คะแนน โดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ มีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น มีสีเขียว ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ มีลักษณะของแคลลัสคล้ายกับแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ มีสีเขียว เป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น และชิ้นส่วนมีขนาดเพิ่มขึ้นทุกๆสัปดาห์ คล้ายกับการทดลองของ Al-Juboory and Williams. 1990. โดยทำการศึกษาการชักนำการเกิดแคลลัสใน Algerian Ivy (*Hedera canariensis* L.) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ แต่อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนที่ได้จากชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอจะมีลักษณะที่คล้ายกับต้น แต่ในชิ้นส่วนก้านใบที่ได้จากเอมบริโอไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว นั้นอาจเป็นเพราะตัดติดบริเวณที่สามารถชักนำเป็นต้น หรือบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญมาด้วย จึงไม่ต้องผ่านการเจริญเป็นแคลลัสก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะเดียวกัน เมื่อพิจารณาผลของขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นระหว่างชิ้นส่วนทั้งสอง คือ ชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ พบว่า ชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้ง 2 ส่วน สามารถที่จะเพิ่มขนาดของชิ้นส่วนได้ในทุกสัปดาห์ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ มีลักษณะใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ โดยการเพิ่มขึ้นของขนาดชิ้นส่วนทั้งสองนั้นชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และบางชิ้นส่วนจากชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอแคลลัสมีสีน้ำตาล บางชิ้นส่วนตาย และบางชิ้นส่วนค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำทั้งชิ้นส่วน อีกทั้งชิ้นส่วนบางชิ้นยังมีสีเหลือง และสีชมพู โดยอาจเป็นเพราะว่า ในชิ้นส่วนอาจมีสารเคมีบางชนิดที่ปล่อยออกมาทำให้ชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเขียว ไปเป็นสีขาว และสีชมพูตามลำดับได้

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และเอมบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่าอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (control) มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ 5.00 คะแนน มีการเกิดเป็นแคลลัส และยอด ส่วนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ มีสีน้ำตาลทั้งหมด และไม่สามารถอยู่รอดได้ และอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นที่ 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนยังมีเปอร์เซ็นต์การรอดอยู่

สำหรับในชิ้นส่วนเอมบริโอทั้งชิ้นนั้น ยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของลำต้น และยอดที่เกิดใหม่เท่านั้น โดยส่วนดังกล่าวจะมีสีชมพู และขาว แต่ยังสามารถอยู่รอดได้ (ภาพที่ 8) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ชิ้นส่วนเอมบริโอไม่ตายนั้น อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่เกินไป ทำให้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใส่ลงไปได้ผลไม่ดีเช่นเดียวกับงานทดลองของ วันเพ็ญ (2546) ในขั้นตอนการคัดเลือก embryogenic callus ของแตงกวาพันธุ์เจ็ดใบ คัดเลือกในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวซีด ยุบตัวเป็นก้อนเหนียว และตาย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์คือ 21 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสูตรอาหารคัดเลือกที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ และชิ้นส่วนที่ใช้ เช่น ในการทดลองของประวีณา, สุมนทิพย์ และปิยะดา (2546) ทดลองศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องเงิน โดย *Agrobacterium tumefaciens* พบว่า kanamycin ความเข้มข้น 150 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของโพรโทคอร์ม และต้นอ่อนเอื้องเงินได้ตามลำดับ และ ในการทดลองของ รงรอง, เพิ่มพงษ์ และอัญชลี (2543) ทดสอบเบญจมาศพันธุ์ดอกสีเหลือง เมื่อนำข้อมาเลี้ยงในอาหารที่มี kanamycin ที่ระดับความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 ppm พบว่าในทุกระดับความเข้มข้นสามารถทำให้ข้อเบญจมาศตายได้ และในการทดลองของ รงรอง (2541) ทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสชนิด embryogenic callus ที่เจริญมาจากใบของกุหลาบ (*Rosa hybrida*) พันธุ์ Carl Red โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (A281/pBI121) เป็นพาหะ ซึ่งเชื้อ A281/pBI121 มี GUS gene เป็น marker gene และมี kanamycin เป็น antibiotic resistant gene (NPTII gene) จากการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแคลลัสทั้งหมด

จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอร่วมกับการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (pCAMBIA 2301) ที่ระดับความเข้มข้นและช่วงเวลาในการบ่มต่างๆ กัน คือ ความเข้มข้นของเชื้อ 1:10 แช่นาน 10 นาที ความเข้มข้นของเชื้อ 1:10 แช่นาน 30 นาที และความเข้มข้นของเชื้อ 1:20 แช่นาน 30 นาที หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ และร่วมด้วยสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารคัดเลือก และกำจัด *Agrobacterium* โดยใช้สารปฏิชีวนะ Cefotoxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารคัดเลือกต่ออีกจนครบ 16 สัปดาห์ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* อัตราส่วน 1:10 ทำการบ่มร่วมกับเนื้อเยื่อเป็นเวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำที่สุด คือ 12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* 1:20 บ่มเป็นเวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การตาย 16 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีเปอร์เซ็นต์การตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาคะแนนการเจริญเติบโต พบว่า การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ทั้ง 3 วิธีการ ให้คะแนนการเจริญเติบโต และขนาดของเอมบริโอ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และในการทดลองของ Chakrabarty (2002) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีน เพื่อที่จะหาความเข้มข้นของ *Agrobacterium* ดีที่สุดที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนใบเลี้ยงของ กระหล่ำดอก โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ GV2260 (p35SGUSINT) เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด พบว่า อายุในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาบ่มเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* และ *Agrobacterium* เข้มข้นเป็นตัวสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอน ที่ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* 1:10 แช่นาน 30 นาที เป็นวิธีการที่ดีที่สุด ที่ยีนจะถูกเข้าไปสู่ กระหล่ำดอกได้

สำหรับในชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอนั้น ยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* ที่ทดสอบ แต่ส่วนดังกล่าวจะมีสีเขียว และสีเหลืองปนน้ำตาล แต่ยังสามารถอยู่รอดได้ พบว่า วิธีการที่ 4 คือการใช้ *Agrobacterium* ที่ความเข้มข้น 1:10 บ่มเป็นเวลานาน 30 นาที เป็นวิธีการที่คาดว่าจะเหมาะสมที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุดเพียง 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ วิธีการที่ 5 โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* ความเข้มข้น 1: 20 บ่มเชื้อเป็นเวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การตาย 16 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายใต้ปัจจัยแสง ระหว่างแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน และโดยชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุด คือ 3.80 คะแนน โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเขียว ฉ่ำน้ำ และชิ้นส่วนที่ได้จากชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอจะมีลักษณะที่คล้ายกับต้น แต่ในชิ้นส่วนก้านใบที่ได้จากเอมบริโอไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ ภายใต้แสงสีแดง (red light) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้งสองชิ้นส่วนเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในแสงสีขาว (white light) แต่ชิ้นส่วนทั้งสองไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะไปเป็นต้น และการเพิ่มขึ้นของขนาดชิ้นส่วนนั้น ชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ แต่อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้งสองจะเพิ่มขึ้นในทุกๆสัปดาห์ของทั้งสองชิ้นส่วนในปัจจัยแสงทั้งสองสีที่ทำการทดลอง

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และเอมบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่าสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกไม่สามารถอยู่รอดได้ แต่ในชิ้นส่วนเอมบริโอทั้งชิ้นนั้น ยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของลำต้น และยอดที่เกิดใหม่เท่านั้น โดยส่วนดังกล่าวจะมีสีชมพู และขาว แต่ยังสามารถอยู่รอดได้

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายใต้ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* เพื่อทดสอบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีน โดยใช้ชิ้นส่วนของตายอดจากเอมบริโอ นั้น พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (pCAMBIA 2301) และระยะเวลาในการบ่มเชื้อรวมกับเนื้อเยื่อตายอดจากเอมบริโอที่ดีที่สุด คือ ความเข้มข้น 1: 10 และทำการบ่มเบื้อเป็นเวลา 30 นาที ทำให้เนื้อเยื่อส่วนตายอดจากเอมบริโอ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ 88 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดการเจริญเติบโตดี คือ 0.73 ตารางเซนติเมตร และคะแนนชิ้นส่วน 1.20 คะแนน โดยลักษณะชิ้นส่วนเป็นสีเขียวปนเหลือง แต่ในชิ้นส่วนเอมบริโอใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการอื่นๆ ก็ยัง สามารถทำให้ชิ้นส่วนตายอดอยู่รอดได้บ้างในทุกความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* ที่ทดสอบ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของขนาดและสีของชิ้นส่วนเท่านั้น โดยชิ้นส่วนจะมีสีเขียวปนเหลือง และน้ำตาลปนดำ แต่ยังสามารถอยู่รอดได้บางชิ้นส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กชกร สายสวัสดิ์. 2533. **"ผลของ BA และ NAA ต่อการเกิดยอดของกุหลาบพันธุ์ Rosmarin ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ."** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

กวินหาญ พลหาญ. 2534. **นาบัวตัดดอก** อ.บางกรวย จ.นนทบุรี. วารสารเคหเกษตร. 15(11):37 – 47.

กุลวรา จารุพันธุ์ และ จันทิมา วรสัมปุรณะ. 2543. **"ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์ "สัตตบงกช"ในสภาพปลอดเชื้อ."** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

คณิตา เลขะกุล. 2535. **บัว : ราชินีแห่งไม้น้ำ**. มูลนิธิส่วนหลวง ร.9. กรุงเทพมหานคร.

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จารีย์ หอยทอง. 2519. **"การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย."** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาชีววิทยา สาขาพฤกษศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

จิตเกษม เที่ยงจิตต์. 2545. **"การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก."** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

ไชยา-ลาวัลย์. 2541. **การปลูกบัว**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม. นนทบุรี.

ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย. 2539. **"ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ในสภาพหลอดทดลอง."** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย สาขาพฤกษศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

ธนพรรณ พร้อมมูล. 2538. **"ผลของ IAA และ 2iP ต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

ประวีณา มณีรัตนรุ่งโรจน์ สุมนทิพย์ บุนนาค และปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์. 2546. **การศึกษาเบื้องต้น ในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องเงินโดย *Agrobacterium tumefaciens***. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 3 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรทิพย์ จิรกิตยางกูร. 2537. **"ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

ภัควดี ภักดีงาม. 2547. **"การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และแสงต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก."** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

มนทิรา ไชยตะญากูร. 2544. **"การชักนำให้เกิดแคลลัส แลโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช."** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

รงรอง หอมหวล. 2541. **เทคนิคการถ่ายยีนในกุหลาบ.** ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รงรอง หอมหวล เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ และอัญชลี รวีโรจน์วิบูลย์. 2543. **การสร้างระบบ plant regeneration ที่มีประสิทธิภาพในเบญจมาศเพื่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* : รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543.** สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. การพัฒนาพันธุ์แตงกวา และแตงร้านต้านทานไวรัสจุดวงแหวนมะละกอโดยเทคนิคการถ่ายยีน. สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช.

วิเชษฐ ค้าสุวรรณ. 2535. **การปลูกบัว.** พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพมหานคร. 55 หน้า.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร. 2537. **"การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงสัตตบุษย์ในสภาพปลอดเชื้อ."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520. **ทะเบียนพันธุ์ไม้ประดับ.** กรุงเทพมหานคร: บพิธการพิมพ์.

สายชล เกตุษา. 2531. **เทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวของดอกไม้.** กรุงเทพมหานคร: บพิธการพิมพ์.

สุทธิพร อังสะนันธ์. 2537. **"การศึกษาผลของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. **พรรณไม้น้ำ**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 233 หน้า.

สุเม อรัญนารถ. 2537. "ปทุมชาติ บัวตัดดอกที่อนาคตยังสดใส." **ชัยพฤกษ์ศาสตร์**. 291: 30 - 32.

สุเมธ อินทมาตย์. 2536. **"การศึกษาเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

สุรเชษฐ์ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2533. **เทคนิคการปลูกบัว**. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 52 หน้า.

เสริมลาภ วสุวัต. 2537. **บัวไม้ดอกไม้ประดับ**. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

อุไร เรืองฉรงค์. 2542. **"การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการชักนำให้เกิดการกลายในต้นอเมซอลโดยใช้รังสีแกมมา."** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

Albarran, J.G. 1998. "*In vitro* culture of *Swietenia macrophylla*. Optimum condition for regeneration and genetic transformation." **Revista Forestal Venezolana**. 31(41-2): 111 – 118.

Al-Juboory, H.K. 1998. "Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides Ellis.*) leaf explant." **Scientia Horticulturae**. 72(3 - 4): 171 – 178.

Burkill, I.H. 1966. **A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula**. Vol. 11. Ministry of Agriculture and Cooperatives. Kuala Lumpur.

Castillo, B. and M.A.L. Smith. 1997. "Direct Somatic Embryogenesis from *Begonia gracilis* Explant." **Plant Cell Reports**. 16: 385 – 388.

Core, L.E. 1955. **Plant Taxonomy**. Englewood Cliffs. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 459 p.

Das, D.K., M.K. Reddy, K.C. Upadhyaya and S.K. Sopory. 2002. "An Efficient Leaf-Disc Culture Method for The Regeneration Via Somatic Embryogenesis and Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.)." **Plant Cell Reports**. 20: 999 – 1005.

Declerck, V. and S.S. Korban. 1996. "Infulence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissue of peach." **Journal of Horticultural Science**. 71(1): 49 – 55.

Dipali, G. 2001. "Thidiazuron induced regeneration in *Cuminum cyminum* L." **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**. 10(1): 61 – 62.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dixon, R.A. and R.A. Gonzaies. 1994. **Plant Cell Culture: APractical Appoach.** New York: TRL Press.

Huetteman, A.C. and E.J. Preece. 1993. "Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture." **Plant cell, Tissue and Organ Culture.** 33: 105 – 119.

Jordan, M. and E. Oyanedel. 1992. "Regeneration of Pouteria Lucuma. (Sapotacceae) plant *in vitro*." **Plant cell, Tissue and Organ Culture.** 31: 249 – 252.

Karam, N.S. and M.A. Majathoub. 2002. "*In Vitro* Shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill." Faculty of Agriculture Jordan University of Science and Technology.

Kintzios, S.,A. Nikolaou and M. Skoula. 1999. "Somatic Embryogenesis and *In Vitro* Rosmarinic Acid Accumulation in *Sulvia offcinalis* and S. *fruticosa* Leaf Callus Culture." **Plant Cell Reports.** 18: 462 – 466.

Kim, T. and Y. Kim. 2000. Heterologous expression of *AmAl* gene encoding sorage protein of amaranthus in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). Faculty of Biological Science, Chonbuk National University, 41 (5): 495 – 498.

Lakshmanan, P. 1994. "*In Vitro* Establishment and Multiplication of *Nymphaea* Hybrid 'James Brydon'." **Plant cell, Tissue and Organ Culture.** 36: 145 – 148.

Lo, S. 1996. "*In vitro* plant regeneration from cultured leaves of sweet potato." **Journal of Agricultural Research of China.** 45(3): 241 – 249.

Mahadtanapuk, S., N. Topoonyanont, T. Handa, M. Sanguansermsri and S. Anuntalabhochai. 2005. Genetic transformation of Curcuma alismatifolia Gagnep. Using retarded shoots. **Plant Biotechnology.** 23 : 233–237.

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

Neuman, C.M., J.E. Preece, J.W. Van Sambeek and G.R. Gaffney. 1993. "Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut." **Plant cell, Tissue and Organ Culture.** 32: 9 – 18.

Nyochembeng, L.M. and S. Garton. 1998. "Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles." **Plant cell, Tissue and Organ Culture.** 53(2): 127 134.

Onofrio, C.D., S. Morini and G.Bellocchi. 1998. "Effect of Light Quality on Somatic Embryogenesis of Quince Leaves." **Plant cell, Tissue and Organ Culture.** 53: 91 – 98.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paiva, D.o. 1997. "*In vitro* propagation of gloxinia." **Revista Brasileira de Horticulturae Onamental.** 3(2): 29 – 41.

Rojas, R.V.D. and S.L. Kitto. 1991. "Regeneration of Babaco (*Carica pentagona*) from Ovular Callus." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 116(4): 747 – 752.

Sankhla, D., T.D. Davis and N. Sankhla. 1994. "Thidiazuron-induced *in vitro* shoot formation from root of intact seedling of *Albizzia Julibrissin*." **Plant Growth Regulation**. 14: 267 – 272.

Seung, H.K. and K.K. Seon. 2002 "Effect of Auxins and Cytokinins on Callus Induction from Leaf Blade, Petiole and Stem Segments of *In Vitro*-grown 'Sheridan' Grape Shoots." **Plant Biotechnology**. 4(1):17-21.

Torne, J.M. 1997. "Embryogenic Induction in Petals of *Araujia sericifera*." **Plant cell, Tissue and Organ Culture**. 51: 95 – 102.

Torne, J.M., M. Luisa, C. Inmaculada and S. Esther. 1996. "Photocontrol of Somatic Embryogenesis and Polyamine Content in *Araujia sericifera* Petals." **Physiologia Plantarum**. 98: 413 - 418.

Xiaomei, L. and P.M. Pijut. 2006. Adventitious shoot regeneration and genetic transformation of *Prunus serotina* (black cherry) for reproduction sterility. Purdue University.

Zhou, J., H. Ma, F. Guo and X. Luo. 1994. "Effect of Thidiazuron on somatic embryogenesis of Cayratia japonica." **Plant cell, Tissue and Organ Culture**. 36: 73 – 79.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้