สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน ANTISENSE DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ บุณฑริกโดยวิธีการยิงอนุภาค

TISSUE CULTURE AND TRANSFORMATION OF ANTISENSE DFR GENE INTO *Nelumbo nucifera* Gaertn. CV. BUNTHARIK BY PARTICLE BOMBARDMENT

T117029

รวีวธู บัวทอง

RAVEEVATOO BUATHONG

เลขหมู่ ตN
ร166ท
2554
เลขทะเบียน 117029
วัน.เดือน.ปี 21 มี.ค. 2554

b. 12331673
i.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2554

KMITL-2011-AG-M-101-081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TISSUE CULTURE AND TRANSFORMATION OF ANTISENSE DFR GENE INTO *Nelumbo nucifera* Gaertn. CV. BUNTHARIK BY PARTICLE BOMBARDMENT

RAVEEVATOO BUATHONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2011

KMITL-2011-AG-M-101-081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2011

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยวิธีการยิงอนุภาค
นักศึกษา	นางสาววรวีวรฐ บัวทอง
รหัสประจำตัว	50065810
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2554
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.สุเม อรัญนารถ ดร.ศาลักษณ์ พรรณศิริ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะ ตายอดจากคัภพะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ มาเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสได้ โดยเอมบริโอจีนิคแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสได้ 43.33 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.43 คะแนน

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจิญเติบโตต่อการเกิดยอด จากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนเอมบริโอจีนิคแคลลัสที่เคยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ มาเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงที่สุด 8.67 ยอด มีค่าเฉลี่ยขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูงที่สุด 1.19 เซนติเมตร และมีค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงที่สุด 4.84 ใบ

การศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคชนิด Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (BioRad) เพื่อถ่ายพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR ที่มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล ยีน *NPTII* เป็นยีนคัดเลือกที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin และยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) เป็นยีนที่สนใจ โดยชิ้นส่วนยอดที่ใช้ได้มาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ นาน 8 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาค โดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม ขนาด 1,100 และ 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 9 เซนติเมตร พบว่าชิ้นส่วนยอดที่ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ให้จำนวนจุดสีน้ำเงิน 4.80 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิค GUS histochemical assay แบบ transient expression ส่วนการใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ให้ผลการถ่ายยีนแบบถาวรได้ (stable transformation) โดยยืนยันการเข้ารวมตัวของยีนที่ถ่ายเข้าไปกับจีโนมของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction และ Reverse transcription polymerase chain reaction พบว่ามีการเข้ารวมตัวของยีนรายงานผล ยีนคัดเลือก และยีนที่สนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Tissue Culture and Transformation of antisense DFR gene into *Nelumbonucifera* Gaertn. cv. Buntharik by Particle Bombardment
Student	Miss Raveevatoo Buathong
Student ID	50065810
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2011
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanjana Saetiew
Thesis Co Advisor	Assoc. Prof. Dr. Sumay Arunyanart Dr. Salak Punsiri

ABSTRACT

Effect of explants and plant growth regulators on callus induction of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik was studied. The petioles from embryos, the apical buds from embryos (size 3.00 mm) and shoot tips (size 0.5 mm) were cultured on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium containing several plant growth regulators for 8 weeks under 16-h photoperiods. It was found that apical buds from embryos (size 3.00 mm) formed embryogenic callus. However, the best score of growth (2.43) and the maximum percentage of explants formed embryogenic callus (43.33) were achieved from medium supplemented with 40 µM NAA and 0.5 µM TDZ when cultured for 8 weeks of incubation.

Effect of plant growth regulators on induction of plant regeneration from callus was studied. The embryogenic callus was cultured on MS medium containing 40 µM NAA and 0.5 µM TDZ for 8 weeks under 16-h photoperiods. After 8 weeks of incubation, all embryogenic calluses were transferred to MS medium supplemented BA 0, 40, 50 and 60 µM for 8 weeks. It was found that embryogenic calluses formed shoots. The number of shoots (8.67), embryogenic callus length (1.19 cm) and number of leaves (4.84) were achieved from medium supplemented with 50 µM BA when cultured for 8 weeks of incubation.

The transformation of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik by particle bombardment device model Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (BioRad) was optimized using two explants, the shoot cluster and apical buds from embryos (size 3.00 mm). The plasmid pCAMBIA2301anti-DFR contained *GUS* as a reporter gene, *NPTII* as a selectable marker gene (kanamycin resistance) and Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) as an

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

interesting gene. The shoot cluster developed from the apical buds from embryo (size 3.00 mm) were cultured on MS medium containing 40 µM NAA and 0.5 µM TDZ for 8 weeks for embryogenic callus induction. All embryogenic calluses were transferred to MS medium supplemented BA 50 µM for 8 weeks. Biolistic transformation condition for the shoot cluster and apical buds from embryos (size 3.00 mm) was bombarded under pressure of 1,100 and 1,350 psi at the target distance of 6 and 9 cm. The result of particle bombardment procedure demonstrated that the helium gas pressure of 1,100 psi and the target distance of 6 cm yielded the number of blue spots (4.8 spots/shoot cluster). Stable transformation of particle bombardment procedure demonstrated that the helium gas pressure of 1,100 psi and the target distance of 9 cm were confirmed by polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction techniques. The results confirmed that the integration of the reporter gene, selectable marker gene and interesting gene could insert into plant genome.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถประสบความสำเร็จได้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สุเม อรัญนารถ และ ดร.ศาลักษณ์ พรรณศิริ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ศาลักษณ์ พรรณศิริ ที่ให้คำปรึกษา และ เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ตลอดจนการอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างการทำงานวิจัยของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอขอบคุณ คุณสุนิสา บุญใช้ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช หลักสูตรพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ คุณวิทิดา สาธิตโกวิตชัย และคุณวิลาสินี ลีทวีทรัพย์ ที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษา แนะนำวิธีการศึกษาทางอณูชีววิทยา ให้ความช่วยเหลือ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณกำลังใจจากคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย ตลอดจนเพื่อนๆ น้องๆ นักศึกษาทุกคน ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนช่วยเหลือต่างๆเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

รวีวฐ บัวทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.................... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.................... III

กิตติกรรมประกาศ.................... V

สารบัญ.................... VI

สารบัญตาราง.................... IX

สารบัญภาพ.................... XII

คำย่อและสัญลักษณ์.................... XIV

บทที่ 1 บทนำ.................... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.................... 1

1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา.................... 2

1.3 ขอบเขตการศึกษา.................... 2

1.4 ขั้นตอนการศึกษา.................... 2

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.................... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.................... 4

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.................... 4

2.2 ความรู้เกี่ยวกับแคลลัสเอมบริโอจีนีซิส.................... 6

2.2.1 แคลลัส.................... 6

2.2.2 เอมบริโอจีนีซิส.................... 7

2.3 ยีนควบคุมสีดอก dihydroflavonal 4-reductase (DFR).................... 9

2.4 การถ่ายยีนเข้าสู่พืช.................... 11

2.4.1 เทคนิคการถ่ายยีน.................... 11

2.4.2 ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช.................... 12

2.4.3 การตรวจสอบพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant).................... 13

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.................... 13

2.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.................... 11

2.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมสีดอก.................... 19

2.5.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยวิธีการยิงอนุภาค....................

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 24

3.1 เครื่องมือและวิธีการ 24

3.2 สถานที่ดำเนินงาน 26

3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง 26

3.4 วิธีการดำเนินงาน 26

3.4.1 การเตรียมอาหาร 26

3.4.2 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 26

3.4.3 วิธีการทดลอง 27

3.4.4 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด pCAMBIA2301DFR 32

3.4.5 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชทดลองด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He 34

3.4.6 การตรวจสอบการถ่ายยีนเข้าสู่พืช 38

3.5 การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล 42

บทที่ 4 ผลการทดลอง 43

4.1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 43

4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 56

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 60

4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง 86

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 91

บรรณานุกรม 93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก... 101

ภาคผนวก ก.. 102

ภาคผนวก ข.. 103

ประวัติผู้เขียน... 106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า

3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบยีน anti-DFR ยีน *NPTII* และยีน *GUS* 40

3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อตรวจสอบยีน anti-DFR และยีน *NPTII*........ 41

4.1 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ........ 45

4.2 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์........ 49

4.3 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์........ 50

4.4 ขนาดของแคลลัส จำนวนยอด และความยาวยอด จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ........ 53

4.5 คะแนนการเจริญเติบโตและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ........ 55

4.6 ขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และความยาวใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอมบริโอจีนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ........ 59

4.7 การแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression ของเนื้อเยื่อส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He........ 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.8	จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) 50 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์..........................	65
4.9	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์...............	69
4.10	การแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression ของเนื้อเยื่อส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He..	70
4.11	จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์..	74
4.12	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์..	78
4.13	จำนวนต้นบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอดและตายอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He..............................	82
4.14	ผลการตรวจสอบยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ที่ชักนำได้ จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He....................................	82
4.15	ผลการตรวจสอบยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ที่ชักนำได้ จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อตายอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He.................	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.16	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He	84
ก.1	สูตรอาหาร Murashige and skoog (1962)	102

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการสังเคราะห์ Flavonoids	10
3.1	การตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	27
3.2	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	28
3.3	การตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	29
3.4	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	30
3.5	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	31
3.6	แสดงโครงสร้างพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR	34
3.7	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	38
4.1	ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (5.00X)	44
4.2	ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (2.85X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์	47
4.3	ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ (3.29X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์	47
4.4	ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 12.4 ไมโครโมลาร์ (2.56X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์	54
4.5	ลักษณะแคลลัสที่เลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม Picloram 24.8 ไมโครโมลาร์ (3.9X)	56
4.6	ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ a คือลักษณะกลุ่มยอดเล็กๆสีเขียวอ่อนที่เกิดขึ้น (3.33X) b คือยอดสีเขียวที่มีใบเกิดขึ้น (2.78X)	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.7 ตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ในพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR........ 61

4.8 การตรวจสอบพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR หลังจากการเชื่อมต่อด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI *และ Hin*dIII........ 62

4.9 การแสดงออกของยีน *GUS* บนชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน........ 63

4.10 การแสดงออกของยีน *GUS* บนชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงบุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน........ 64

4.11 ตำแหน่งการเข้าจับของคู่ไพรเมอร์ต่างๆของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์........ 79

4.12 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ GUS และไพรเมอร์ NPTII........ 80

4.13 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ CaMV35S และ NOS........ 81

4.14 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ NPTII และไพรเมอร์ DFR........ 85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

α	alpha
IAA	indole-3-acetic acid
NAA	α-napthalene acetic acid
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
2iP	N^6-isopentenylamino purine
BA	benzyladenine
TDZ	1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea
μM	micromolar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Garetn.) เป็นพืชน้ำ อยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา เลขะกุล. 2535) อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม อรัญนารถ. 2537) จีน ไทย ทิเบต (Core. 1995) เป็นพันธุ์ไม้น้ำที่มีการเจริญเติบโตอยู่ใต้น้ำบางส่วนและเหนือน้ำบางส่วน หรือ emerged plant (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542) ลักษณะใบชูพ้นน้ำ ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว ปัจจุบันนิยมปลูกเป็นการค้า นอกจากนี้ส่วนอื่นของบัวยังนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ใบใช้ห่อของแทนใบตอง ไหลนำมาประกอบอาหาร เกสรตัวผู้ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ กลีบดอกชั้นในใช้เป็นยาแก้ท้องร่วง เป็นต้น (เสริมลาภ วสุวัต. 2537) เป็นบัวหลวงพันธุ์หนึ่งที่นิยมใช้ในพิธีกรรมทางศาสนา และยังสามารถนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆได้เช่นเดียวกับบัวหลวงพันธุ์อื่นๆ ซึ่งในประเทศไทยมีบัวหลวงเพียงชนิดเดียว มี 4 สายพันธุ์ คือ บุณฑริก มีดอกแหลมสีขาว กลีบดอกไม่ซ้อน ปทุม มีดอกแหลมสีชมพู กลีบดอกไม่ซ้อน สัตตบงกช มีดอกป้อมสีชมพู กลีบดอกซ้อนมาก และสัตตบุษย์ ดอกป้อมสีขาวกลีบดอกซ้อนมาก ซึ่งมีเพียง 2 สีเท่านั้นคือสีขาวและชมพู นอกจากนี้ยังมีรูปทรงเพียง 2 แบบเท่านั้น (ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และเสริมลาภ วสุวัต. 2547) ถึงอย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีประโยชน์ในหลายๆด้านแต่ยังมีปัญหาบางประการ เช่น กลีบดอกจะเหี่ยวและร่วงเร็ว (สายชล เกตุษา. 2531) ทำให้มีปัญหาในด้านการใช้ประโยชน์ได้น้อยวัน (จินตนา ไทยลิ้มทอง และลาวัลย์ สุธนมนตรี. 2536) รูปทรงของดอกและสีสันมีให้เลือกจำกัด (จารีย์ หอยทอง. 2519) ทำให้ไม่สามารถพัฒนาสายพันธุ์บัวหลวงให้มีดอกสีอื่นๆด้วยวิธีการผสมพันธุ์ในธรรมชาติได้ (conventional breeding) จากปัญหาด้านคุณภาพและปริมาณการผลิตดังกล่าว จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์บัวหลวงให้มีคุณภาพด้านสีสัน รูปทรงดอก เพื่อตอบสนองต่อความต้องการในการปลูกเป็นการค้าของเกษตรกร

จากสภาพปัญหาที่กล่าวมาจึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นหนึ่งในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่สามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้ เนื่องจากแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสม สำหรับนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการถ่ายยีนต่อไปในอนาคต แต่การชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องด้วยกันหลายอย่างจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสและชักนำยอด เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นการเลือกใช้เทคโนโลยีชีวภาพ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยในการตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม flavonoid ที่ชื่อ aurone ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างรงควัตถุสีเหลืองของพืชหลายชนิด (Nakayama *et al.* 2000) เข้าสู่บัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก เพื่อให้บัวหลวงสีขาวสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลือง งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาวิธีการถ่ายยีนที่ได้รับการตัดแต่งพันธุกรรมเข้าไปในบัวหลวงโดยวิธีการยิงอนุภาคเพื่อสร้างพืชพันธุ์ใหม่

1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำการเกิดแคลลัสและการเกิดยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีน antisense Dihydroflavonal-4-Reductase (anti-DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยวิธีการยิงอนุภาค

1.2.3 เพื่อตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน anti-DFR ที่ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ชิ้นส่วนก้านใบ ตายอดจากคัพภะ และเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด จากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก นอกจากนี้ยังทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีน antisense Dihydroflavonal-4-Reductase (anti-DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยวิธีการยิงอนุภาค และคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน anti-DFR ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

1.4.1 ศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.4.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นต้นจากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.4.3 ศึกษาชิ้นส่วนและวิธีการที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.4.4 ศึกษาการแสดงออกของยีน anti-DFR ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบชิ้นส่วนและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.5.2 ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.5.3 ทราบชิ้นส่วนและวิธีการที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.5.4 ทราบผลของการแสดงออกของยีน anti-DFR ที่ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

บัวหลวงเป็นพืชในอันดับ (Order) Ranales วงศ์ (Family) Nymphaeaceae (ณพพร ดำรงศิริ. 2530) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. ซึ่งเป็นวงศ์ของพืชล้มลุกพืชในวงศ์นี้มีทั้งหมด 8 สกุล (Genus) 50 ชนิด (Species) ประเทศไทยมีเพียง 3 สกุล คือ Nelumbo, Nymphaea และ Victoria (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530 ; เสริมลาภ วสุวัต. 2537)

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Nelumbo* Adans. (Backer and Bakhuizen. 1963) พืชในสกุลนี้พบได้ทั่วไป มีทั้งหมด 2 ชนิดคือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. และ *Nelumbo lutea* Pers. (Core. 1995 ; Burkill. 1966) แต่ที่พบในประเทศไทย มีเพียงชนิดเดียว คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530 ; ไชยา-ลาวัลย์. 2533)

Nelumbo nucifera Gaertn. หรือ *Nelumbium speciosum* Willd. หรือ *Nelumbo indica* Pers. หรือ *Nelumbium nelumbo* (L.) Druce มีชื่อสามัญว่า Sacred lotus, Egyptian lotus (สมาคมไม้ดอกไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา เลขะกุล. 2535) อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม อรัญนารถ. 2537) จีน ไทย ทิเบต (Core. 1995) และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย (Gilbert. 1982) สำหรับในประเทศไทยตามรายงานพบพืชสกุลบัวหลวงเพียงชนิดเดียวคือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. ซึ่งเรียกโดยทั่วไปว่า “บัวหลวง หรือปทุมชาติ” (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530 ; ไชยา-ลาวัลย์. 2533) บัวสกุลนี้อาจจำแนกได้เป็น 8 พันธุ์ โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของวิชาพฤกษ-อนุกรมวิธาน และพันธุศาสตร์ ดังนี้ (สมาคมไม้ดอกไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520 ; ณพพร ดำรงศิริ. 2530)

พันธุ์ที่ 1 มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู ปทุม ประทุม ปทุมมาลย์ โกกระณต โกกนุท บัวแหลมแดง บัวหลวงแดง หรือ ปัทมา ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว ดอกรา กลีบสีชมพู

พันธุ์ที่ 2 มีชื่อว่า บุณฑริก ปุณฑริก บัวหลวงขาว หรือบัวแหลมขาว ดอกมีขนาดใหญ่ ลักษณะใบและรูปทรงดอกเหมือนบัวปทุมแต่กลีบสีขาว

พันธุ์ที่ 3 มีชื่อว่า สัตตบงกช บัวหลวงชมพูซ้อน บัวหลวงป้อมแดง บัวฉัตรแดง หรือบัวฉัตรชมพู ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมทรงป้อมเวลาดอกบานจะเห็นกลีบเล็กๆสีขาวปนชมพูซ้อนอยู่ข้างในใกล้ฝัก

พันธุ์ที่ 4 มีชื่อว่า สัตตบุษย์ บัวหลวงขาวซ้อน บัวฉัตรขาว หรือบัวป้อมขาว ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมทรงป้อมเช่นเดียวกับสัตตบงกช กลีบดอกสีขาว

พันธุ์ที่ 5 มีชื่อว่า บัวเข็มสีชมพู ดอกขนาดกลาง ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ที่ 6 มีชื่อว่า บัวเข็มสีขาว ดอกขนาดกลาง ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีขาว

พันธุ์ที่ 7 มีชื่อว่า บัวหลวงจีน บัวหลวงจีนสีชมพู บัวปักกิ่งชมพู ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีชมพู กลีบน้อย บานแบะ และโรยเร็ว

พันธุ์ที่ 8 มีชื่อว่า บัวปักกิ่งขาว บัวไต้หวัน หรือบัวหลวงจีนขาว ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีขาว กลีบน้อย บานแบะ และโรยเร็ว

Nelumbo lutea Pers. มีแหล่งกำเนิดในอเมริกาเหนือ ลักษณะดอกคล้ายดอกบัวหลวงในประเทศไทยแต่ดอกมีสีเหลืองอ่อนขนาด 6-10 นิ้ว ดอกจะชูขึ้น 3 ฟุตจากพื้นน้ำ ใบมีสีน้ำเงินอมเขียว และกว้าง 1-2 ฟุต ผลย่อยลักษณะค่อนข้างกลม (Gilbert. 1982 ; คณิตา เลขะกุล. 2535) เคยมีผู้พยายามนำมาปลูกในเมืองไทย แต่ปรากฏว่าทนสภาพแวดล้อมไม่ได้จึงสูญพันธุ์ไป (กสิน สุวตะพันธุ์. 2500 ; คณิตา เลขะกุล2535.)

การจำแนกอนุกรมวิธานของบัวหลวงโดย Singh (2004)

Class Magnolipophyta (ใบเลี้ยงคู่)

Subclass Nelumboniadae

Order Nelumbonales

Family Nelumbonaceae

Genus Nelumbo

ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (เสริมลาภ วสุวัต. 2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Nelumbo nucifera* Gaertn.

ชื่อสามัญ HINDU LOTUS

ชื่อวงศ์ NYMPHAEACEAE

ชื่อไทย บุณฑริก ปุณฑริก บัวหลวงขาว บัวแหลมขาว

ลักษณะทั่วไป (วาสนา มิตรานนท์. 2527)

ลำต้น มีลักษณะเป็นเหง้า (rhizome) อยู่ใต้ดินลึกประมาณ 5-15 เซนติเมตร มีช่องอากาศ (air canal) ตามความยาวของเหง้า ตรงข้อมีกาบใบลักษณะเป็นแผ่นเล็กๆ บางๆ ในลำต้นมีน้ำยางสีขาวขุ่น

ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกจากข้อของลำต้นแบบสลับ ตั้งตรงชูขึ้นเหนือน้ำโดยจะชูใบเหนือน้ำหลายระดับ ผิวใบมีนวล ใบอ่อนม้วน ใบที่โตเต็มที่มีรูปร่างเกือบกลม (suborbicular) เป็นแบบ peltate leaf ขอบใบเรียบ หรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ่อน ไม่มีหูใบ ก้านใบแข็งมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปราย ในก้านใบมีน้ำยางสีขาวเมื่อถูกอากาศจะเหนียวเป็นเส้น เส้นใบออกจากจุดกึ่งกลางที่ติดกับก้านใบ

ราก เป็นแบบรากฝอย เกิดตรงบริเวณส่วนข้อของลำต้น รากอ่อนมีสีขาว หมวกรากใหญ่เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ดอก เป็นดอกเดี่ยว ขนาดใหญ่ ก้านดอกมีลักษณะใกล้เคียงกับก้านใบ แข็ง และมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปราย และจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านดอก โดยทั่วไปก้านดอกมีสีเขียว แต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำมีสีจางลง เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลิ่นหอม กลีบดอกชั้นนอกมี 4-5 กลีบเรียงตัวเป็น 2 ชั้นสับหว่างกัน ด้านนอกของกลีบมีสีเขียวปนขาว มีเส้นกลีบจำนวนมากแต่ไม่นูนเด่นชัด มีรูปร่างโค้งป้อม กลีบดอกชั้นกลางมีขนาดใหญ่รูปไข่เห็นเส้นบนกลีบใบชัดเจนมีสีขาวนวลทั้งด้านนอกและด้านใน ยกเว้นส่วนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีเหลือง กลีบดอกชั้นในเรียงตัวเป็นชั้นประมาณ 8 ชั้น รอบฐานรองดอก มีเกสรตัวผู้อยู่เหนือกลีบดอกชั้นใน ก้านเกสรเรียวเล็กมีสีเหลืองนวล ตอนบนมีอับเรณูสีเหลืองสดติดตามความยาวของแกนเหนืออับเรณูขึ้นไปมีส่วนปลายสีขาวขุ่น ความยาว 0.25-0.30 เซนติเมตร เกสรตัวผู้มีกลิ่นหอม รังไข่มีสีเหลืองนวลผนังหนาฝังอยู่ส่วนบนของฐานรองดอก ลักษณะเป็นรูปกรวย ก้านชูเกสรตัวเมียสั้น เกสรตัวเมียกลมแบน สีเหลืองเป็นมันแข็ง ในหนึ่งดอกจะมี carpel 15-30 อัน อยู่กระจายไม่ติดกัน ภายในแต่ละรังไข่จะมีไข่อยู่ 1 อัน (จารีย์ หอยทอง. 2519)

กลีบเลี้ยง มี 4-5 กลีบหรือมากกว่า ลักษณะเป็นรูปไข่รีสีขาวอมเขียว เหี่ยวและร่วงง่าย กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปร่างคล้ายกันมาก แบ่งแยกกันได้ยาก

ผล เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) มักเรียกว่าฝัก ประกอบด้วยผลย่อยๆ ผลย่อยแต่ละผลเมื่อแก่แล้วไม่แตก เปลือกแข็ง (nut) มีรูปร่างคล้ายรูปไข่

เมล็ด มีเปลือกหุ้มบางๆสีขาวเป็นเปลือกชั้นนอกที่อ่อนนุ่มห่อหุ้ม ภายในมีใบเลี้ยงสีขาวนวล 2 ใบ ไม่มี endosperm ต้นอ่อนสีเขียวเข้มมักเรียกกันว่าดีบัว

2.2 ความรู้เกี่ยวกับแคลลัสและเอมบริโอจีนีซิส

2.2.1 แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เป็นเนื้อเยื่อถาวรเชิงเดี่ยวที่มีชีวิต และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ สามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง ภายในเซลล์มีแวคคิวโอ (vacuole) จำนวนมาก เซลล์มีรูปร่างไม่แน่นอน มีรูปร่างหลายแบบแตกต่างกันไปตามตำแหน่งที่อยู่และหน้าที่พิเศษ (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540 ; ภูวดล บุตรรัตน์. 2538) ลักษณะของแคลลัสแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ แคลลัสชนิดที่เซลล์เกาะกันอยู่หลวมๆ แยกจากกันได้ง่าย เรียกว่า friable callus, soft callus หรือ non-embryogenic callus ซึ่งมีการเจริญรวดเร็ว และอีกแคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่น แยกจากกันได้ยากเรียกว่า compact callus,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hard callus เป็นแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตช้า และสามารถที่จะมีการพัฒนาโครงสร้างเป็นออร์กาโนจีนีซิสและเอมบริโอจีนีซีสได้ต่อไป (Dixon and Gonzales. 1994) ทุกส่วนที่มีชีวิตของพืชสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยส่วนที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในพืชใบเลี้ยงคู่คือ คัพภะ (embryo) ใบเลี้ยง (cotyledon) ลำต้น (stem) ส่วนเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ส่วนใต้ใบเลี้ยง (hopocotyls) และราก (root) ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวส่วนที่นำมาเลี้ยงให้ประสบความสำเร็จคือ แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้ (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540 ; บุญยืน กิจวิจารณ์. 2540) และส่วนหัวของพืช เช่น มันเทศ แครอท ก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Dodds and Roberts. 1995)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540)

1. ขนาดและรูปร่างของชิ้นส่วน (size and shape) ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และมีขนาดพอเหมาะ เช่น ขนาดแครอทที่มีน้ำหนักประมาณ 3.8 กรัม สามารถเกิดแคลลัสได้ดี

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) การพัฒนาเป็นแคลลัสขึ้นอยู่กับความสมดุลของออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ถ้าออกซินสูงไซโตไคนินต่ำชิ้นส่วนจะพัฒนาไปเป็นรากหรือแคลลัส ถ้าออกซินต่ำไซโตไคนินสูงชิ้นส่วนจะพัฒนาไปเป็นยอด ออกซินที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือ 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากส่วนประกอบทั่วไปในสูตรอาหารแล้ว พวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามีน (glutamine) แอสปาราจีน (asparagines) อาร์จินีน (arginine) พิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) และน้ำมะพร้าว (coconut milk) มีส่วนสำคัญต่อการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส

4. แหล่งคาร์บอน (carbon source) ได้แก่น้ำตาลกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) และแมนนิทอล (mannitol) ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์

5. สิ่งแวดล้อม (environmental factor) แคลลัสเจริญเติบโตในอาหารเหลวได้ดีกว่าอาหารแข็ง

2.2.2 เอมบริโอจีนีซิส (Embryogenesis) เป็นการพัฒนาชิ้นส่วนเริ่มต้นไปเป็นคัพภะ ซึ่งเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ คัพภะที่ได้จากไข่ที่ได้รับการผสม (zygotic embrto) มีโคโมโซม 2n และคัพภะที่ไม่ได้รับการผสม หรือเกิดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ (non-zygotic embryo) ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ คัพภะที่ได้จากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (egg) ที่ไม่ได้รับการผสม (parthenogenetic embryo) คัพภะที่ได้จากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (androgenetic embryo) และคัพภะที่ได้จากเซลล์ร่างกาย (somatic cell) เรียกว่า adventive embryo (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540) สำหรับการเกิดเอมบริโอจีนีซีสในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกได้ 2 แบบ คือการเกิดคัพภะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส (direct embryogenesis) และการเกิดคัพภะโดยพัฒนาเป็นแคลลัสก่อนแล้วจึงเจริญไปเป็นคัพภะ (indirect embryogenesis) (สุเม อรัญนารถ. 2536 ; อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541) หลังจากนั้นคัพภะจะมีการพัฒนาอีก 5 ระยะ คือ proembryo globular shape torpedo shape และ mature embryo (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. ; Pollard and Walker.1990)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเอมบริโอจีนีซีสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ชนิดพืช (plant type) พืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์มีความยากง่ายในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เช่น ใบอ่อนพืชใบเลี้ยงคู่จะประสบความสำเร็จในการเกิดโซมาติกเอมบริโอสูง แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะเกิดโซมาติกเอมบริโอไม่แน่นอน (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540)

2. ชิ้นส่วนเริ่มต้น (explant) โดยทั่วไปส่วนที่เหมาะสมต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอ คือส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง ใบอ่อน (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540 ; Pollard and Walker. 1990) เอมบริโอจีนิคแคลลัส (embryogenic callus) (อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541) และช่อดอกอ่อน ก้านใบ และส่วนเหนือใบเลี้ยงจากต้นกล้าอ่อน (Dixon and Gonzales. 1994)

3. ธาตุอาหาร (nutrients) พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์ หรือแต่ละอวัยวะต้องการอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ จึงจำเป็นต้องเลือกใช้สูตรอาหารให้เหมาะสม ธาตุอาหารบางตัวมีความสำคัญต่อการชักนำการเกิดโซมาติกเอมบริโอ เช่น แคลเซียม (อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541) โปตัสเซียม หรือไนโตรเจนที่อยู่ในรูปแอมโมเนียมและไนเตรทร่วมกัน และปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่างความเข้มข้น 12-40 ไมโครโมลาร์ (Street. 1977) นอกจากนี้ยังมีน้ำมะพร้าวและน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2-3 เปอร์เซ็นต์ ช่วยส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอมบริโอได้เช่นเดียวกัน (รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540)

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) คือสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือได้รับการสังเคราะห์ขึ้น อีกทั้งสารนี้ไม่ใช่ธาตุอาหารพืช แต่เมื่อพืชได้รับจะมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของพืช (นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2536) กลุ่มของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสและเอมบริโอจีนีซีสมีดังนี้

4.1 ออกซิน (Auxin) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

4.1.1 Natural auxin ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 Synthetic auxin ได้แก่ NAA (napthalene acetic acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid), picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid), dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid), triacontanol (1-hydroxytriacontane) เป็นสารที่นิยมใช้เพื่อประโยชน์ในการกระตุ้นให้เกิดการเร่งการเจริญเติบโตของพืชตามธรรมชาติ (Ries *et al.* 1997) โดยมีผลเพิ่มการแบ่งเซลล์ของพืช (พีรเดช ทองอำไพ. 2529)

4.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin) ได้แก่

4.2.1 Natural Cytokinin ได้แก่ 2iP (N^6-isopentenylamino purine)

4.2.2 Synthetic Cytokinin ได้แก่ kinetin (6-furfurylamino purine), BA (N^6-benzyladenine), TDZ [1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea]

5. สิ่งแวดล้อม (environment) มีดังนี้ (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540)

5.1 แสง การเกิดโซมาติกเอมบริโอต้องการความเข้มของแสงต่ำ หรือไม่ต้องการแสงเลย ยกเว้นพืชบางชนิด

5.2 อุณหภูมิ ต้องการอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียสเล็กน้อย

5.3 ออกซิเจน ต้องการออกซิเจนสูงเพื่อใช้ในกระบวนการหายใจ

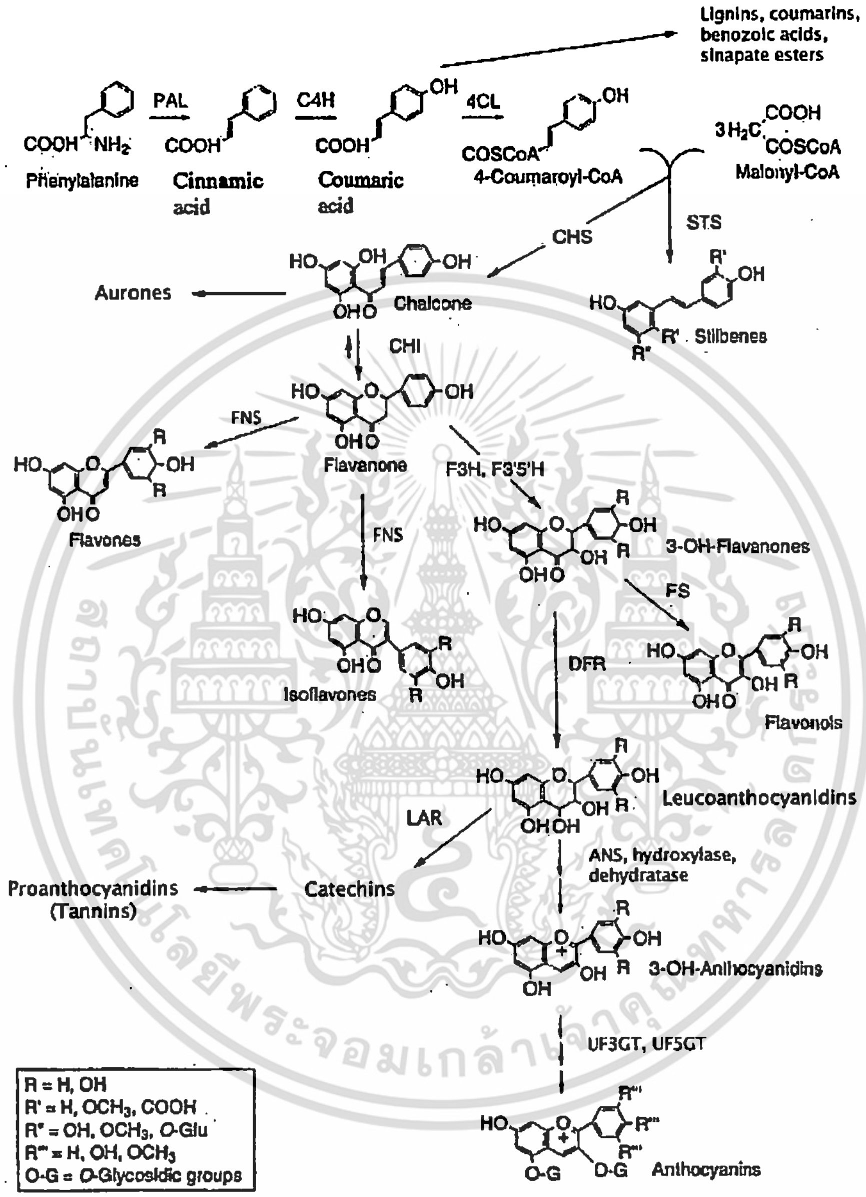
5.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ขึ้นอยู่กับชนิด อายุและระยะการพัฒนาของพืช

2.3 ยีนควบคุมสีดอก dihydroflavonal 4-reductase (DFR)

การปรับปรุงสีดอกไม้นั้น เริ่มจากการแยกสกัดและโคลนยีนจากสิ่งมีชีวิตที่เป็นแหล่งของยีน แล้วผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) เพื่อใช้ตรวจหาหรือตรวจสอบยีนนั้นๆ เมื่อวิเคราะห์รายละเอียดต่างๆ ของยีนแล้ว จึงตัดต่อยีนหรือ ดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดพาหะของพืช (plant vector) ที่จะเป็นเครื่องมือนำยีนเข้าสู่เซลล์พืชและทำให้ยีนสามารถสอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมพืชได้ (พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2545) Davies and Schwinn (1997) ได้รายงานยีนที่โคลนได้จากดอกไม้และพืชชนิดต่างๆ จากนั้นจึงคัดเลือกชนิดของโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมเพื่อให้ยีนที่โคลนได้สามารถแสดงออกได้ในพันธุ์พืช และส่วนของเนื้อเยื่อพืชนั้น ในบางครั้งเป็นการสร้างพืชแปลงพันธุ์ให้เกิดการข่มการแสดงออกของยีนนั้น ซึ่งยีนดังกล่าวจะถูกกดการแสดงออกโดยการใช้โคลนที่เป็นลักษณะ antisense หรือ sense ของยีนที่สนใจ ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ประกอบด้วยสามขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือ การโคลนยีน และศึกษารายละเอียดของยีนที่ต้องการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Gene cloning and identification) และจัดทำพลาสมิดสำหรับถ่ายยีน ขั้นที่สองคือพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืช ให้เป็นต้นพืช (Plant regeneration) ซึ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่ถ่ายยีนแล้วให้เป็นต้นพืช และขั้นสุดท้ายเป็นการถ่ายยีน (หรือดีเอ็นเอ) เข้าสู่โครโมโซมพืช (Gene transfer to plant) ด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับชิ้นส่วนเริ่มต้น (พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2545) โดยมียีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ flavonoids และ anthocyanins ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2. 1 กระบวนการสังเคราะห์ Flavonoids (Neill, 2002)

เริ่มสังเคราะห์จากกระบวนการหลักสองกระบวนการคือ phenylpropanoid pathway โดยผ่านกระบวนการ shikimic acid pathway และ malonic acid pathway ซึ่ง shikimic acid pathway จะสร้าง aromatic acids ที่ได้จากสารตั้งต้นคาร์โบไฮเดรตอย่างง่ายจาก glycolysis และ pentose phosphate pathway เริ่มจาก phenylalanine ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของ primary และ secondary

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

metabolism ที่ได้จาก phenylpropanoid pathway ซึ่งนำไปสู่การสังเคราะห์ phenolic compounds โดย phenylalanine ammonia lyase (PAL) จะกระตุ้นการเปลี่ยน phenylalanine เป็น trans-cinnamic acid จากนั้นหนึ่งโมเลกุลของ 4-coumaroyl-CoA ที่ได้จาก phenylpropanoid pathway และสามโมเลกุลของ malonyl-CoA จาก Krebs tricarboxylic acid cycle จะถูกเปลี่ยนเป็น naringenin chalcone (2',4,4',6'-tetrahydroxy-chalcone) โดยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการเริ่มต้นกระบวนการสังเคราะห์ flavonoids สาร naringenin chalcone ที่มีสีเหลืองสามารถเปลี่ยนเป็นสารประกอบ aurone ที่มีสีเหลืองมากกว่าได้ แต่โดยปกติแล้วจะเปลี่ยนเป็น naringenin หรือ flavanone ที่ไม่มีสีโดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ isoflavones โดยเอนไซม์ flavone synthase (FNS) นอกจากนี้ dihydroflavonols จะถูกสังเคราะห์ขึ้นระหว่างการสร้าง flavonols โดยเอนไซม์ flavonol synthase (FS) จากนั้นเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จะเปลี่ยน dihydroflavonols เป็น leucoanthocyanidins (flavan-3,4-cis-diols) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ anthocyanidins โดยการทำงานของเอนไซม์ anthocyanin synthase (ANS)

2.4 การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

วัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ประการแรก ได้แก่ ความต้องการนำยีนที่ ควบคุมลักษณะบางอย่างที่เป็นประโยชน์ เข้าสู่โครโมโซมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพืชที่มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภค ทั้งพืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับ ประการที่สอง เพื่อการศึกษาให้เกิดความเข้าใจในกลไก หรือ การทำงานของยีน (gene function) หรือกระบวนต่างๆ ในทางชีววิทยา (biological process) โดยเมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้ว และยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในต้นพืช ก็จะสามารถอธิบายหรือแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีนและกระบวนการที่เกิดขึ้นในพืชได้ พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจากแหล่งอื่นเข้าไปในส่วนของจีโนมและสามารถแสดงลักษณะทางพันธุกรรมที่ยีนนั้นควบคุม เรียกว่า พืชแปลงพันธุ์ (transgenic plants)

2.4.1 เทคนิคการถ่ายยีน การส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชสามารถปฏิบัติได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดและเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาใช้ในการส่งถ่ายยีน อาจแบ่งออกเป็น 2 วิธีการใหญ่ๆ คือ

2.4.1.1 การส่งถ่ายยีนโดยตรง เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเป้าหมายโดยตรง เช่น การส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าทะลวงเซลล์ในระยะเวลาสั้นๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอสามารถผ่านเข้าไป การส่งถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีด (microinjection) เป็นการใช้เข็มที่มีสารละลายดีเอ็นเอฉีดเข้าไป การส่งถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) เป็นวิธีการที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยวิธียิงยีนเข้าสู่เซลล์ ยีนที่ใช้จะถูกเคลือบบนอนุภาคโลหะขนาดเล็ก เช่น อนุภาคทองคำ หรืออนุภาคทังสเตน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์ โดยใช้แรงผลักดันจากแหล่งแรงดันของก๊าซเป็นตัวผลักดันอนุภาคเข้าสู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อเป้าหมายผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้สภาวะสูญญากาศและนำยีนที่ต้องการเข้าเชื่อมต่อกับโครโมโซมของเซลล์เป้าหมาย การถ่ายยีนวิธีนี้นิยมทำกันมาก เนื่องจากข้อดีคือสามารถใช้ได้กับเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิด ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ ยกเว้นเนื้อเยื่อนั้นเป็นเนื้อเยื่อบริเวณเล็กๆ ที่อยู่บนเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ เช่น บริเวณยอดอ่อนที่อยู่ระหว่างใบเลี้ยง เนื่องจากการยิงอนุภาคให้ตรงเป้าหมายทำได้ยาก ข้อเสียของวิธีนี้คือ เครื่องมือราคาแพง และมีความเที่ยงตรงต่ำถึงปานกลาง (สนธิชัย จันทร์เปรม. 2453) การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นการถ่ายยีนที่อาศัยแรงจากภายนอกทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชจึงมีปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคมาเกี่ยวข้อง ทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีน (biotic parameters) ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกิดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีน ได้แก่ แหล่งที่มาของเนื้อเยื่อ (tissue source) อายุของเนื้อเยื่อ (tissue age) และสภาพแรงดันภายในของเซลล์ (osmotic condition of cells) รวมถึงปัจจัยทางกายภาพที่ใช้ในการถ่ายยีน (abiotic parameters) ซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค นอกเหนือไปจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ใช้ในการยิงยีนได้แก่ ชนิดของอนุภาคโลหะที่ใช้ (particle composition) ขนาดของอนุภาค (particle diameter) ปริมาณดีเอ็นเอต่อปริมาณอนุภาคที่ใช้ (DNA load per unit mass of particle) อัตราเร็วในการยิงยีน (velocity) และสภาวะสูญญากาศ (vacuum) ที่ใช้ เป็นต้น (Birch and Bower.1994) การพัฒนาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนให้เหมาะสมกับชนิดและเนื้อเยื่อของพืชเป้าหมายจะส่งผลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคให้สูงขึ้น

2.4.1.2 การส่งถ่ายยีนโดยใช้พาหะ เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการ โดยส่งถ่ายเข้าไปในพาหะ เช่น แบคทีเรีย หรือไวรัส แล้วอาศัยกลไกของพาหะนำพายีนที่ต้องการเข้าสู่ เนื้อเยื่อพืชเป้าหมาย เช่น การส่งถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย Agrobacterium (agrobacterium mediated gene transfer)

2.4.2 ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

2.4.2.1 ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker genes) เป็นยีนที่สร้างความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชแก่เนื้อเยื่อเป้าหมายที่ทำการถ่ายยีน เพื่อใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีน เช่น ยีน *HPTII* (hygromycin phosphotransferase) ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และยีน *NPTII* (neomycin phosphotransferase) ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2548)

2.4.2.2 ยีนรายงานผล (reporter genes) เป็นยีนที่ใช้ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเทคนิคในการถ่ายยีน และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะความต้านทาน สามารถตรวจสอบการแสดงออกได้โดยตรงบนเนื้อเยื่อเป้าหมาย ยีนรายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้แก่ *GUS* gene (β-glucuronidase gene) จากแบคทีเรีย *E. coli* (ปรีชา ประเทพา. 2543)

2.4.3 การตรวจสอบพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant)

2.4.3.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยใช้ polymerase chain reaction (PCR) โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมาทำการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นหายีนที่ต้องการทราบ โดยใช้เทคนิค PCR และวิเคราะห์ขนาดชนิดของยีน

2.4.3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *GUS* มาแช่ในสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glucuronide) จากนั้นนำมาตรวจสอบการแสดงออกของ GUS โดยสังเกตจากการเกิดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วน

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สุเมธ อินทมาตย์ (2536) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยชักนำชิ้นส่วนให้เกิดตาจากเนื้อเยื่อส่วนตาไหลของบัวหลวง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็ง พบว่าอาหารสูตร ½ MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดตาได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

พรทิพย์ จิรกิตยางกูร (2537) ศึกษาการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตาไหลไปเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็ง สูตร ½ MS (1962) พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำชิ้นส่วนให้เกิดรากได้ดี ส่วนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 7.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำชิ้นส่วนให้เกิดตาได้มากที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 16 สัปดาห์

ศิรศักดิ์ สุนทรยาตร (2537) ศึกษาการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ โดยนำชิ้นส่วนตาไหลไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็ง สูตร ½ MS (1962) ที่เติม IAA ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ และ 2iP ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดตาเฉลี่ย 0.78 ตา ตามีขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร จำนวนใบเฉลี่ย 0.82 ใบ ความกว้างของใบเฉลี่ย 0.93 เซนติเมตร ความยาวรากเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 สัปดาห์

ธนพรรณ พร้อมมูล (2538) ศึกษาผลของ IAA และ 2iP ต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนตาไหลไปเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็ง สูตร ½ MS (1962) ที่เติม IAA ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ และ 2iP ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่าเป็นวิธีการที่ดีที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิดตาเฉลี่ย 9.56 ตา จำนวนใบเฉลี่ย 10.93 ใบ ขนาดใบเฉลี่ย 4.30 เซนติเมตร ความยาวก้านในเฉลี่ย 25.74 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ย 31.56 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 3.01 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย (2539) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงในสภาพหลอดทดลอง โดยนำเมล็ดบัวอายุ 7 วันหลังดอกบาน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ทำการศึกษาผลของออกซิน 3 ชนิด ได้แก่ NAA 2,4-D และ dicamba ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า NAA สามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่า dicamba แต่ปริมาณแคลลัสที่ได้ยังน้อยมาก ส่วน 2,4-D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อใช้ออกซินแต่ละชนิดร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ออกซินร่วมกับ TDZ ชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ออกซินเพียงอย่างเดียว โดยที่ NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสง สามารถชักนำแคลลัสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณแคลลัสสูงสุด ลักษณะแคลลัสเกาะกันหลวมๆ ใส ฉ่ำน้ำ และมีสีน้ำตาลปนเขียว

กุลวรา จารุพันธุ์ และจันทิมา วรสัมปุรณะ (2543) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช โดยนำชิ้นส่วนตาไหลไปเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS (1962) โดยทำการทดสอบผลร่วมของ IAA และ 2iP และผลร่วมของ NAA และ TDZ พบว่า การใช้ NAA ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.005 ไมโครโมลาร์ ให้ผลดีที่สุด โดยมีคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโต 4.85 คะแนน มีคะแนนเฉลี่ยการพัฒนาการเกิดยอด 3.25 คะแนน และมีเปอร์เซนต์การเกิดยอด 80 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ NAA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.005 ไมโครโมลาร์ ทำให้ตาไหลมีการเกิดแคลลัส โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 80 เปอร์เซ็นต์

จิตเกษม เที่ยงจิตต์ (2545) ศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่าชิ้นส่วนยอดจากคัพภะมีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ ส่วนการใช้คัพภะอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.15 ไมโครโมลาร์

มนทิรา ไชยตะญากูร (2545) ทำการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัส และโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสในบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช พบว่าการเพาะเลี้ยงส่วนเหนือใบเลี้ยง ในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส โดยแคลลัสจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ ฉ่ำน้ำสีขาวใส และมีขนาดใหญ่ แต่ชิ้นส่วนตาไหลที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ จะให้แคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภัควดี ภักดีงาม (2545) ศึกษาผลของแสงร่วมกับ α-napthalene acetic acid และ benzyladenine ต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์ และเก็บไว้ในที่มีแสงสว่าง มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจิญเติบโตของแคลลัสดีที่สุด

ภัควดี ภักดีงาม (2548) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสโดยนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะ ตายอดจากคัพภะและตาจากไหลของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีส พบว่าชิ้นส่วนก้านใบจากคัพะที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด

วิลาสินี ลีทวีทรัพย์ (2550) ศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและปัจจัยแสงที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก และการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีน โดยใช้ชิ้นส่วนตายอดและก้านใบจากคัพภะมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว พบว่าชิ้นส่วนตายอดและชิ้นส่วนก้านใบ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน โดยชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุด 3.80 คะแนน ส่วนการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอและเอมบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกสองสัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอมีสีน้ำตาลทั้งหมด ชิ้นส่วนเอมบริโอทั้งชิ้นนั้น ยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ

ดวงนภา นิติกรวราภุล (2552) ศึกษาผลของสูตรอาหารพื้นฐานและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเอื้องพร้าว *Phaius tancarvilliae* (Bank ex I' Heritier) Blume ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมสาร triacontanol ความเข้มข้น 0.004 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด protocorm like bodies (PLB) และชักนำให้เกิดยอด

Al-Juboory and Williams (1990) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Algerian Ivy *(Hedera canariensis* L.) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Visser *et al.* (1992) ศึกษาการชักนำโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสจากส่วนของต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ของเจอราเนียม (geranium) โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่มี TDZ พบว่า TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด

Compton and Gray (1993) ศึกษาการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสจากใบเลี้ยงอ่อนของแตงโม (watermelon) พบว่าโซมาติกเอมบริโอเกิดสูงสุดในอาหารสูตร MS (1962) ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงสว่าง

Gill and Saxena (1993) ศึกษาการชักนำโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสจากใบยาสูบ พบว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้นระหว่าง 0.25-15 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนใบมากกว่าการใช้ NAA ร่วมกับ BA

Tantos *et al.* (1999) ศึกษาผลของ triacontanol ใน *Melissa officinalis* โดยใช้ triacontanol ความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่า triacontanol ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดได้ดี และ triacontaol ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี

Neuman (1993) ศึกษาการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงของต้น Eastern black walnut พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็งร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 และ 5.0 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด

Murthy (1996) ศึกษาการชักนำโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสจากใบเลี้ยงของเจอราเนียม พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุดและสามารถเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

Murthy and Saxena (1998) ศึกษาการชักนำโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสจากเมล็ดของต้น neem โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่มี TDZ พบว่า TDZ ในระดับความเข้มข้น 1-50 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อโซมาติกเอมบริโอจีนีซีส โดยสามารถเกิดได้โดยตรงจากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 20 ไมโครโมลาร์

Sunnichan (1998) ศึกษาการชักนำโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของ gum karaya (*Sterculia ureus*) โดยชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต้นใต้ใบบนอาหารสูตร MS (1962) ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 8.90 ไมโครโมลาร์ ต่อมาเมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด

Lin *et al.* (2000a) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจาก friable embryogenic callus ของ Alstroemeria โดยใช้ชิ้นส่วนก้านใบมาเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดเป็น soft callus แล้วเมื่อเปลี่ยนมาสู่อาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวจะเกิด compact callus จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม picloram 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิด friable embryogenic calli แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดเป็น proembryo

Dipali (2001) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงส่วนใต้ใบเลี้ยงของต้น cumin (*Cuminum cyminum*) พบว่าเกิดแคลลัสสีเขียวแบบ compact ในทุกระดับความเข้มข้นของ TDZ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 10 วัน

Przetakiewicz *et al.* (2003) ศึกษาผลของออกซินต่อการชักนำให้เกิดต้นของ wheat, barley และ triticale โดยศึกษาอิทธิพลของออกซิน 3 ชนิดคือ 2,4-D, picloram และ dicamba ที่ใช้เดี่ยวๆหรือใช้ร่วมกันต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสและการ regeneration ของธัญพืช พบว่าประสิทธิภาพในการเกิดยอดของข้าวบาร์เลย์ พันธุ์ต่างๆได้จากการเลี้ยงบนอาหารที่มี dicamba หรือ dicamba ร่วมกับ 2,4-D ส่วนในข้าวสาลี พบว่า อาหารที่มี dicamba หรือ picloram ความเข้มข้นต่ำเพียงอย่างเดียวจะเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสดีที่สุดและมีการ regeneration ในอาหารที่มี picloram ความเข้มข้นต่ำ ร่วมกับ 2,4-D หรือ picloram ร่วมกับ dicamba ส่วนใน triticale มีการ regeneration ในอาหารที่มี picloram เพียงอย่างเดียวหรือ picloram ร่วมกับ dicamba

Giridhar *et al.* (2004) ศึกษาอิทธิพลของ triacontanol ในการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของ *Coffea arabica* L. และ *C. canephora* P. โดยใช้ชิ้นส่วนใบและลำต้น นำมาเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ที่ประกอบด้วย triacontanol ความเข้มข้น 11.38 หรือ 4.55 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.1 ไมโครโมลาร์ และ IAA ความเข้มข้น 2.28 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถเกิด direct embryogenesis ได้ จำนวน 260±31.8 และ 59.2±12.8 ชิ้นส่วนตามลำดับ และชิ้นส่วนเอมบริโอสามารถเกิดยอดได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½ MS (1962) ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.57 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์

Kaur and Kothari (2004) ศึกษาการเกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นของ kodo millet จากอิทธิพลของ 2,4-D หรือ picloram ร่วมกับ kinetin ซึ่งการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสและโซมาติกเอมบริโอจีนีซีส สามารถเกิดได้ทั้งจาก 2,4-D หรือ picloram เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ kinetin จากชิ้นส่วนก้านช่อดอก โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารที่เติม picloram ความเข้มข้นต่ำ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดเป็น organogenic callus ที่มีตายอด ส่วน direct somatic embryo เกิดบนอาหารที่เติม picloram ความเข้มข้นสูง 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.5, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะพัฒนาเป็นต้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
117029

Ravindra *et al.* (2005) ศึกษาการเพิ่มปริมาณ *Dendrobium nobile* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด โดยเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต triacontanol พบว่ามีการเพิ่มปริมาณ PLB จากการเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหาร Mitra *et al.* (1976) ที่มี triacontanol 4 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิด PLB สูงที่สุด 93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหาร Mitra *et al.* (1976) ที่มี triacontanol 2 ไมโครกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดและรากได้ดีที่สุด

Stefanello *et al.* (2005) ศึกษาการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสจากเนื้อเยื่อดอกของ *Feijoa sellowiana* Berg. โดยเพาะเลี้ยงส่วนของกลีบดอก เกสรตัวผู้ และรังไข่ บนอาหาร LPm (Arnold and Eriksson.1981) พบว่าเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูงที่สุดบนอาหารที่เติม picloram ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2-iP ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 60 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วันจะเกิด globular somatic embryo

Jheng *et al.* (2006) ศึกษาการเจริญเติบโตและการเกิดยอดของเอมบริโอจีนิคแคลลัสของกล้วยไม้ Oncidium (*Gower ramsey*) โดยการเติมแหล่งคาร์โบไฮเดรต จากการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จนเกิดเป็นเอมบริโอจีนิคแคลลัสแล้วย้ายไปสู่อาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตต่างๆ เพื่อการชักนำให้เกิดต้น ได้แก่ sucrose, maltose และ trehalose พบว่าอาหารสูตร ½ MS (1962) ที่เติม maltose หรือ trehalose มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญมากกว่า sucrose เกิดการพัฒนาเป็น protocorm-like body และพัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารที่เติม trehalose 20 กรัมต่อลิตร

Karami *et al.* (2006) ศึกษาการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของคาร์เนชั่นบนอาหารที่เติม Picloram โดยใช้วิธีการ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกสร้างเนื้อเยื่อเอมบริโอจีนิคจากกลีบดอกบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย sucrose 9 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ ส่วนในขั้นตอนที่สองย้ายเนื้อเยื่อเอมบริโอจีนิคที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหาร MS (1962) ที่ประกอบด้วย sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ และ picloram จนพัฒนาเป็น cotyledony somatic embryos แล้วจึงย้ายไปบนอาหารสูตร ½ MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อพัฒนาเป็นต้นต่อไป

Kim *et al.* (2006) ศึกษาการชักนำการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของ Alstroemeria โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 0.5 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส 40 เปอร์เซนต์ จากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 20.8 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้หลังจากเพาะเลี้ยงไป 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shou *et al.* (2008) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้น ฤดูการเก็บเกี่ยว อุณหภูมิ (20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส) และช่วงแสงต่อการเกิดยอดของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) พบว่าชิ้นส่วนตาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดมากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Kozak and Stelmaszcauk (2009) ศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำการเกิดยอดของ *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess' ในสภาพปลอดเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 5, 10, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ พบว่าอาหารที่มี BA 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวน axillary shoots สูงที่สุด ส่วนอาหารที่มี BA 10 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดรากได้ดีที่สุด

2.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมสีดอก

Van der Krol *et al.* (1990) ศึกษายีนฟลาโวนอยด์ในพิทูเนียโดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ พบว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีนมีผลต่อการเกิดสีของดอก ยีน *DFR* และ *CHS* ได้ถูกถ่ายเข้าไปในพิทูเนีย พบว่า 25 เปอร์เซนต์ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการลดการเกิดสีของดอก ซึ่งเกิดจากการลดลงของการแสดงออกของยีน *DRF* หรือ *CHS* ตามลำดับ การลดการแสดงออกของยีนเกิดจากโปรโมเตอร์ที่ขับเคลื่อนให้เกิดการถอดรหัสของยีนที่ถ่ายเข้าไปและมีผลต่อทั้ง endogenous gene และ homologous transgene ทำให้สูญเสียความเฉพาะเจาะจงของยีนในการแสดงออกของยีนนั้นๆ

Rosati *et al.* (2003) ศึกษาพันธุวิศวกรรมของสีดอกใน forsythia (*Forsythia x intermedia* cv 'Spring Glory')โดยการแสดงออกของยีน *DFR* และ *ANS* ในกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ การดัดแปลงสีดอกใน forsythia โดยชักนำการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในกลีบดอกด้วยการถ่ายยีน *DFR* จาก *Antirrhinum majus (AmDFR)* ร่วมกับยีน *ANS Matthaiola incana* (*MiANS*) พบว่ากลีบดอกเกิดสีส้มทอง แต่การถ่ายยีน *AmDFR* หรือ *MiANS* เพียงอย่างเดียวจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีดอก

Tsuda *et al.* (2004) ศึกษาการดัดแปลงสีดอกของ *Petunia hybrida* โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ด้วยการยับยั้งยีน endogenous flavonoid biosynthetic และการแสดงออกของยีน heterologous flavonoid biosynthetic พบว่าสีดอกเปลี่ยนจากสีม่วงจนเกือบเป็นสีขาวหรือเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีแดงโดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน endogenous และเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มโดยการลดการควบคุมของยีน flavonoid 3-hydroxylase (F3'H) และการแสดงออกของยีน *DFR* จากกุหลาบ และเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนโดยการแสดงออกของ flavonol synthase (FLS) หรือยีน *FNS*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim *et al.* (2004) ศึกษาการไม่ทำงานของยีน *DFR* มีผลต่อการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของหัวหอมสีเหลือง (*Allium cepa*) โดยนำ full-length cDNA ของยีนโครงสร้างทั้ง 5 ยีน ได้แก่ ยีน *CHS*, *F3H*, *DFR*, *ANS* และ *FLS* มาตรวจสอบโดยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างหัวหอมสีเหลืองและหัวหอมสีแดง โดยพบว่าจะมีการแสดงออกของยีน *DFR* ในหัวหอมสีแดงเท่านั้น แสดงว่าในหัวหอมสีเหลือง จะไม่มีการแสดงออกของยีน *DFR*

Lee *et al.* (2008) ศึกษาการโคลนยีนและการวิเคราะห์ชีวเคมีของยีน *DFR* จาก *Brassica rapa* ssp. *pekinesis* (Chinese cabbage) โดยใช้ระบบ heterologous โดยทำการสกัดยีน *DFR* จาก *Brassica rapa* ssp. *pekinesis* (Chinese cabbage) แล้วถ่ายเข้าไปในยาสูบ โดยใช้พลาสมิด pGEM-T พบว่ากระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบลดลงเนื่องจาก heterologous DFR_{Bra} gene จากการทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) แสดงให้เห็นว่าพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีดอกผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งการตอบสนองขึ้นอยู่กับระดับการถอดรหัสของ DFR_{Bra}

Yong and Abdullah (2009) ศึกษาการถ่ายยีน sense และ antisense ของ *DFR* เข้าสู่ *Melastoma malabathricum* และ *Tibouchina semidecandra* โดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม โดยใช้ชิ้นส่วนข้อและยอด โดยเตรียม plasmids pBETD10 และ pBETD11 ที่ประกอบด้วย sense และ antisense *DFR* ตามลำดับ และยีนคัดเลือก *NPTII* ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และทำการตรวจสอบโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และ nucleotide sequence alignment และยืนยันด้วย Southern analysis พบว่า จากการใช้ถ่ายยีนทั้ง sense และ antisense *DFR* มีการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นเขียวเกิดขึ้นในระยะตาดอกและมีกลีบดอกเพียง 4 กลีบ จากปกติ 5 กลีบ

2.5.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยวิธีการยิงอนุภาค

กิริยา สังข์ทองวิเศษ (2547) ศึกษาระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่ว *S. hamata* พันธุ์ Verano โดยทำการชักนำให้เกิด compact callus เพื่อใช้เป็นเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีน จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ ใบเลี้ยงและ hypocotyls พบว่าเนื้อเยื่อส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด compact callus มากที่สุด จากการชักนำให้เกิดยอดพบว่าอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ 40 เปอร์เซนต์ บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและได้ทำการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัส 2 วิธี คือ การใช้เครื่องยิงอนุภาคชนิด PDS-1000/He เพื่อถ่ายพลาสมิด pGN ที่มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และมียีน *NPTII* เป็นยีนคัดเลือก และวิธีการใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pCAMBIA1301 ที่มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และมียีน *HPT* เป็นยีนคัดเลือก เป็นพาหะ พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคนั้น การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตรให้จำนวนจุดสีน้ำเงินมากที่สุด 6.4 จุดต่อแคลลัส และการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ใช้สารแขวนลอยเชื้อเจือจาง 1:50 ร่วมกับการทำบาดแผลโดยใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 5 วินาที แล้ว co-cultivation เป็นเวลา 2 วัน ให้จำนวนจุดสีน้ำเงิน 4.0 จุดต่อแคลลัส จากนั้นยืนยันการเข้ารวมตัวของยีนที่ถ่ายเข้าไปกับจีโนมของถั่ว *S. hamata* โดยเทคนิค Southern PCR hybridization และ dot blot hybridization พบว่า มีการเข้ารวมตัวของยีนรายงานผลและยีนคัดเลือกในจีโนมของถั่ว *S. hamata*

Yao *et al.* (1996) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เอมบริโอจีนิคเซลล์ของ tangelo โดยวิธีการยิงอนุภาค ซึ่งเอมบริโอจีนิคเซลล์ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย และถูกนำมาใช้ในการถ่ายยีนด้วยอนุภาคทังสเตนที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยยีน *uidA* ซึ่งถอดรหัสให้ *β*-glucuronidase (GUS) และยีน *NPTII* ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และทำการปรับสภาพ osmotic ของเซลล์โดยการนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วย MS salt, MT vitamins (Murashige and Tucker. 1962) bacteriological agar 0.7 กรัมต่อลิตร malt extract 0.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร ที่เติม sorbitol และ mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 0.2+0.2, 0.3+0.3 M พบว่าอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม sorbitol 0.3 M ร่วมกับ mannitol 0.3 M ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุด และยืนยันการเข้ารวมตัวของยีนที่ถ่ายเข้าไปกับจีโนมของส้มพันธุ์ tangelo โดยเทคนิค PCR และ Southern analysis

Lin *et al.* (2000b) ศึกษาการถ่ายยีนของ Alstroemeria โดยวิธีการยิงอนุภาค จากชิ้นส่วน embryogenic callus โดยมีพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีนคัดเลือกและยีนรายงานผลที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ชนิดแรกพลาสมิดประกอบด้วย luciferase reporter gene ของหิ่งห้อยซึ่งทำงานโดย ubiquitin promoter (*Ubi l*) ของข้าวโพด ถูกยิงเข้าไปในทั้ง Friable embryogenic callus และ proembryos ทำการคัดเลือกโดยใช้ luminometer และการวิเคราะห์ PCR และ Southern hybridization ชนิดที่สองพลาสมิด ประกอบด้วยยีน *BAR* ร่วมกับยีน *uid A* ทั้งคู่ทำงานโดย *Ubi l* promoter ถูกยิงเข้าไปใน proembryos และทำการคัดเลือกบนอาหารที่มี phosphinotricin (PPT) 5 mg/l และยีน *GUS* ตรวจสอบโดย histochemical staining assay และการวิเคราะห์ PCR พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *BAR* ร่วมกับยีน *uid A* เข้าสู่ชิ้นส่วน proembryos และตรวจสอบโดยการต้านทานต่อ PPT มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีที่สุด

Kuai *et al.* (2001) ศึกษาการถ่ายยีนของข้าวโอ๊ต และการถ่ายทอดลักษณะการแสดงออกของยีน *BAR* ในข้าวโอ๊ต (*Avena sativa* L.var.Melys) โดยวิธีการยิงอนุภาค เข้าสู่ชิ้นส่วน primary embryogenic calli จาก immature embryos โดยใช้ 2 พลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *BAR* และ *β*-glucuronidase (*uid A*) ทำการคัดเลือกด้วย phosphinothricin และยืนยันการเข้ารวมตัวของยีนที่ถ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้าไปเทคนิค PCR และ Southern and dot blot hybridization พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิดที่มียีน *uid A* ไม่มีชิ้นส่วนรอดจากอาหารคัดเลือก ส่วนการถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิดที่มียีน *BAR* มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีที่สุด

Visarada and Sarma. (2004) ศึกษาการถ่ายยีนของ indica rice โดยวิธีการยิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิด pCambia1301 ที่มียีน *HPH* เป็นยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin และยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล พบว่าเอมบริโอจีนิคแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ และมีขนาดเล็ก (ขนาด 3 มิลลิเมตร) มีการแสดงออกของยีน *GUS* ดีที่สุด จากการนำชิ้นส่วน mature seed มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และทำการคัดเลือกด้วย hygromycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ glufosinate ammonium 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

Benítez *et al.* (2007) ศึกษาการถ่ายยีนของ *Agave salmiana* โดยวิธี *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ และวิธีการยิงอนุภาค โดยมียีน *uid A* เป็นยีนรายงานผล สำหรับทั้งสองวิธีการ ในขณะที่ยีน *NPTII* และยีน *BAR* ใช้เป็นยีนคัดเลือก ในการถ่ายยีนด้วย A. *tumefaciens* และการยิงอนุภาค ตามลำดับ โดยใช้ชิ้นส่วนใบและเอมบริโอจีนิคแคลลัส และยืนยันการเข้ารวมตัวของยีนที่ถ่ายเข้าไปด้วยเทคนิค PCR การถ่ายยีนผ่านทาง co-cultivation ของชิ้นส่วนเริ่มต้นด้วย *Agrobacterium* ที่อาศัยอยู่ใน *pBI* 121 binary vector สามารถผลิตพืชที่ถ่ายยีนได้ 32 ต้น และมีประสิทธิภาพการถ่ายยีน 27 % ในทางตรงกันข้าม วิธีการยิงอนุภาคที่ผลิต transgenic calli นั้นทดสอบ GUS assay ได้เป็นผลบวก ในขณะที่ไม่มีการ regeneration แต่ชิ้นส่วนยังคงเป็นสีเขียวบนอาหารคัดเลือกจึงไม่ได้นำมาตรวจสอบการเข้ารวมตัวของยีนที่ถ่ายเข้าไปด้วยเทคนิค PCR

Um *et al.* (2007) ศึกษาการถ่ายยีนของข้าวบาร์เลย์โดยวิธีการยิงอนุภาคด้วย cDNA ของ Arabidopsis NDPK2 จากการนำชิ้นส่วน mature embryos มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส จากนั้นนำมายิงด้วยความดัน 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างจากเป้าหมาย 6 เซนติเมตร การรวมกันของ cDNA Arabidopsis nucleoside diphodphate kinase 2 (AtNDPK2) กับจีโนมของข้าวบาร์เลย์ถูกยืนยันโดยเทคนิค PCR และ Southern blot analysis

Gondo *et al.* (2009) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ multiple-shoot clumps (MSCs) ของ rhodesgrass (*Chloris gayana*) โดยวิธีการยิงอนุภาค จากการนำชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เวคเตอร์ pAHC25 ที่ประกอบด้วยยีน *BAR* ที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืช และยีน *GUS* พบว่าประสิทธิภาพในการคัดเลือกการต้านทานต่อยาปราบวัชพืช bialaphos จะดีที่สุดเมื่อนำ MSCs หลังจากการยิงอนุภาคมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสาร bialaphos เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะนำมาเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารคัดเลือกที่มีสาร bialaphos และยืนยันการเข้ารวมตัวของยีนที่ถ่ายเข้าไปด้วยเทคนิค DNA gel blot hybridization analysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและวิธีการ

3.1.1 เมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

3.1.2 พลาสมิดทดลอง

pCAMBIA2301anti-DFR (วิลาสินี ลีทวีทรัพย์. 2554) ขนาด 12,303 bp ที่มียีน *NPTII* เป็นยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin ยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และยีน anti-DFR truncated ขนาด 670 bp เป็นยีนที่สนใจ ที่ได้มาจาก pTZDFR ของดอกปทุมมา (โดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก รศ.ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็ง และเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) (ภาคผนวก ก ตารางที่ 1)

3.1.3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ได้แก่ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid), BA (benzyladenine), NAA (α-napthalene acetic acid), TDZ [1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea], IAA (indole-3-acetic acid), kinetin (6-furfurylaminopurine), picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid), dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid), triacontanol (1-hydroxytriacontane), 2iP (N^6-isopentenylamino purine)

3.1.3.3 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เอธานอล, Clorox (NaOHCl 5.25 %) และ tween-20 (polyoxyethylene sorbitan)

3.1.3.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการถ่ายยีน

3.1.3.5 สารเคมีสำหรับเตรียมเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารแข็ง และอาหารเหลวสูตร LB (Lulia-bertani agar)

- Tryptone
- yeast extract
- sodium chloride (NaCl)
- agar

3.1.3.6 สารปฏิชีวนะ

- kanamycin

3.1.3.7 สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากบัวหลวง

- liquid nitrogen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- tris–hydroxymethyl-methylamine (Tris base)

- ethylenediaminetetra acetic acid di-sodium salt, dehydrate (EDTA)

- sodiumchloride (NaCl)

- sodium dodecyl sulfate (SDS)

- β – mercaptoethanol

- potassium acetate (CH_3COOK)

- isopropanol or absolute ethanol

- 70% ethanol

- steriled distilled water

3.1.3.8 สารเคมีสำหรับการทำพีซีอาร์

- 10x Taq buffer + $(NH_4)_2SO_4$

- 25mM $MgCl_2$

- dNTP (deoxy nucleotide triphosphate) mix

- primer

3.1.3.9 สารเคมีสำหรับเตรียมเจล

- agarose (SeaKem)

- 10X TBE buffer (Tris base, boric acid, disodium EDTA) หรือ 10X TAE buffer (Tris base, gracial acetic acid, EDTA)

- gel loading buffer (6X gel loading, ethidium bromide)

3.1.3.10 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบ *GUS*

- buffer ($NaPO_4$, potassium ferricyanide, potassium ferrocyanide, Na_2EDTA, H_2O)

- X-gluc substrate

- Triton-X 100 (Tween 20)

- เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบและแบบละเอียด เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ เตาแก๊ส ตู้ไมโครเวฟ ตู้บ่มเชื้อ (incubator) กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องเขย่า เครื่องยิงอนุภาคแบบ Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (BioRad)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.2 อุปกรณ์ที่ใช้เตรียมอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและย้ายชิ้นส่วนพืช ได้ แก่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต จานเลี้ยงเชื้อ ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดรูปชมพู่ ปากคีบ มีดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮออล์

3.1.5 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 25±องศาเซลเซียส แสงจากหลอด cool white ความเข้มแสง 2,500 lux ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ

3.2 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช งานเทคโนโลยีชีวภาพ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองระหว่าง เมษายน 2551 – มีนาคม 2554

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารแข็งสูตร MS (1962) ปริมาตร 1 ลิตร จาก Stock solution โดยเตรียม Macroelements ให้มีความเข้มข้นของ stock เป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ ส่วน Microelements จะเตรียม stock ให้มีความเข้มข้น 100 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ สำหรับ final solution ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร stock ของ Macroelements ซึ่งมีความเข้มข้น 10 เท่าจะใช้ 100 มิลลิลิตร และ Microelements ซึ่งมีความเข้มข้น 100 เท่าจะใช้ 10 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล 30 กรัม จากนั้นเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ทำการปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำมาปรับ pH 5.5-5.7 ด้วย NaOH หรือ HCl 1 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 8 กรัม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4.2 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำเมล็ดบัวหลวงมาผ่านน้ำไหลนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วตามด้วย Clorox 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween- 20 จำนวน 2 หยด นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยมีวิธีการตัดชิ้นส่วนก้านใบดังภาพที่ 3.1 มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 10 treatments 6 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วนต่อ treatment อาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ มีดังนี้

วิธีการที่ 1 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)

วิธีการที่ 2 NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ (ภัควดี ภักดีงาม. 2548)

วิธีการที่ 3 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ (Jheng *et al.* 2006)

วิธีการที่ 4 2,4-D 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 0.5 ไมโครโมลาร์ (มนทิรา ไชยตะญากูร. 2545)

วิธีการที่ 5 2,4-D 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 0.8 ไมโครโมลาร์ (Karami *et al.* 2006)

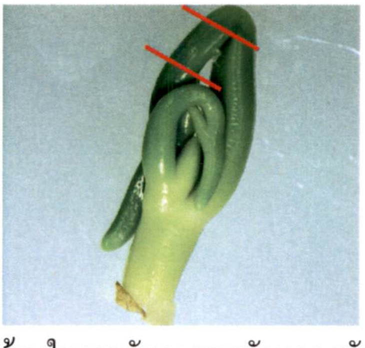
วิธีการที่ 6 2,4-D 18.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 2.22 ไมโครโมลาร์ (Lin *et al.* 2000)

วิธีการที่ 7 picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ (Stefanello *et al.* 2005)

วิธีการที่ 8 picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ (Kaur and Kothari 2004)

วิธีการที่ 9 dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ (Przetakiewicz *et al.* 2003)

วิธีการที่ 10 triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ (Giridhar *et al.* 2004)



ภาพที่ 3.1 การตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (4.40X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การบันทึกข้อมูล

1.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

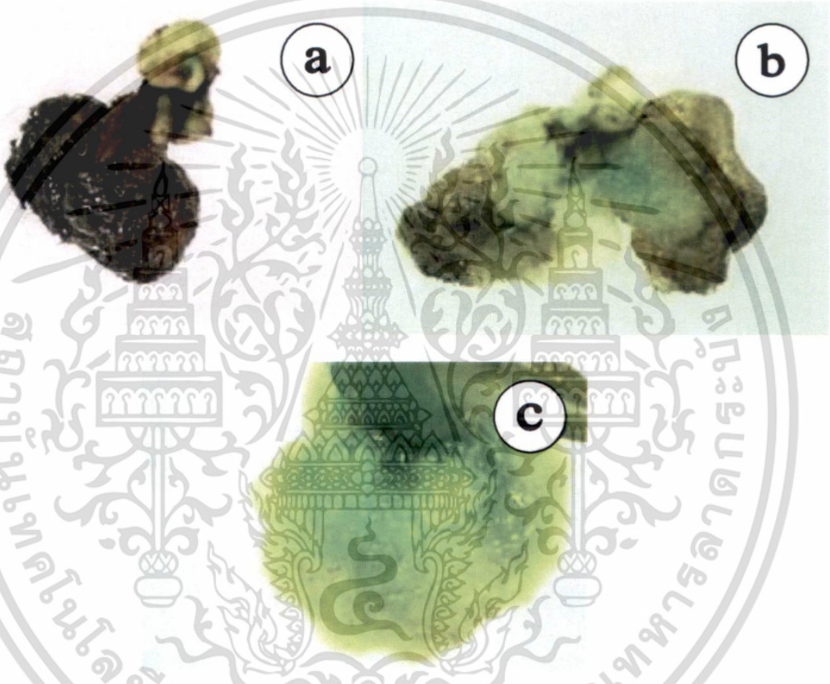
1.2 ขนาดของแคลลัส

1.3 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 3 ระดับดังนี้

คะแนน 1 ชิ้นส่วนตายหรือไม่เกิดแคลลัส (ภาพที่ 3.2a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีแคลลัสเกิดขึ้น แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนเกาะกันแน่น สีเขียวอมน้ำตาล (ภาพที่ 3.2b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนมีแคลลัสเกิดขึ้น แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนเกาะกันแน่นสีเขียว (ภาพที่ 3.2c)



ภาพที่ 3.2 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน (2.80X) b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน (2.67X)
c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน (5.00X)

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RCBD มี 5 treatments 6 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน อาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ มีดังนี้

วิธีการที่ 1 NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ (ภัควดี ภักดีงาม. 2548)

วิธีการที่ 2 picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ (Stefanello *et al.* 2005)

วิธีการที่ 3 picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ (Kaur and Kothari 2004)

วิธีการที่ 4 dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ (Przetakiewicz *et al.* 2003)

วิธีการที่ 5 triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ (Giridhar *et al.* 2004)

ภาพที่ 3.3 แสดงการตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (4.40X)

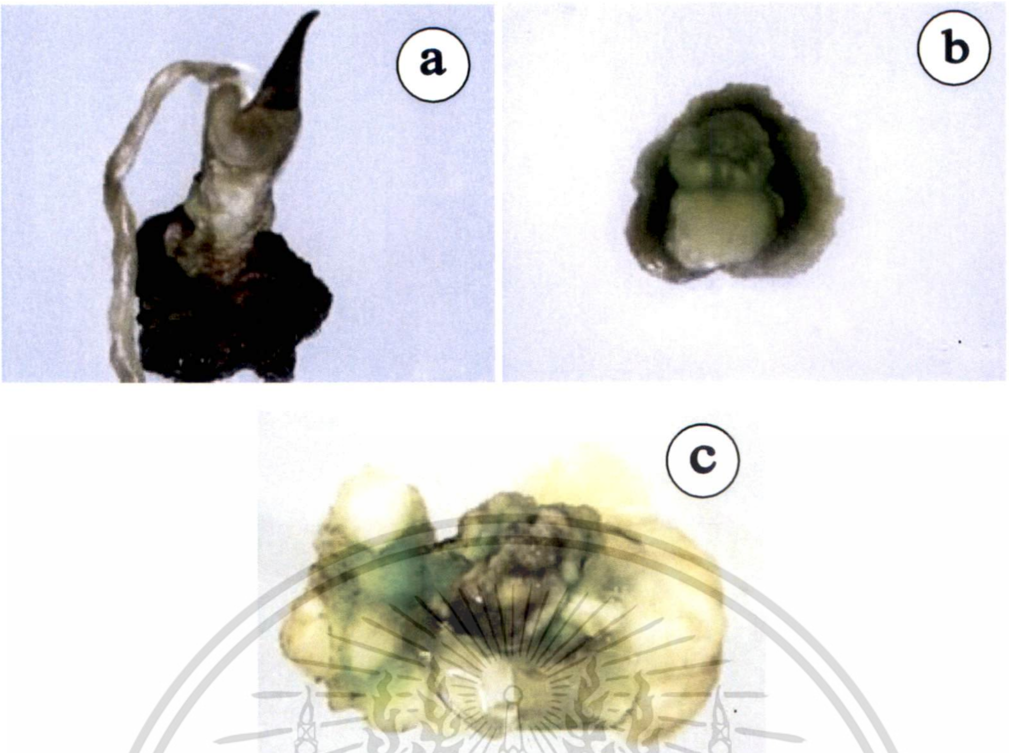
1. การบันทึกข้อมูล
   1.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
   1.2 ขนาดของแคลลัส
   1.3 จำนวนยอด
   1.4 ความยาวยอด
   1.5 จำนวนราก
   1.6 ความยาวราก
   1.7 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 3 ระดับดังนี้

คะแนน 1 ชิ้นส่วนตายหรือไม่เกิดแคลลัส (ภาพที่ 3.4a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนเกิดแคลลัส ลักษณะเกาะตัวกันแน่นสีเขียว (ภาพที่ 3.4b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส ลักษณะเกาะตัวกันแน่นเป็นก้อนสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 3.4c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.4 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน (2.50X) b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน (3.50X) c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน (2.85X)

การทดลองที่ 1.2.2 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 11 treatments 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

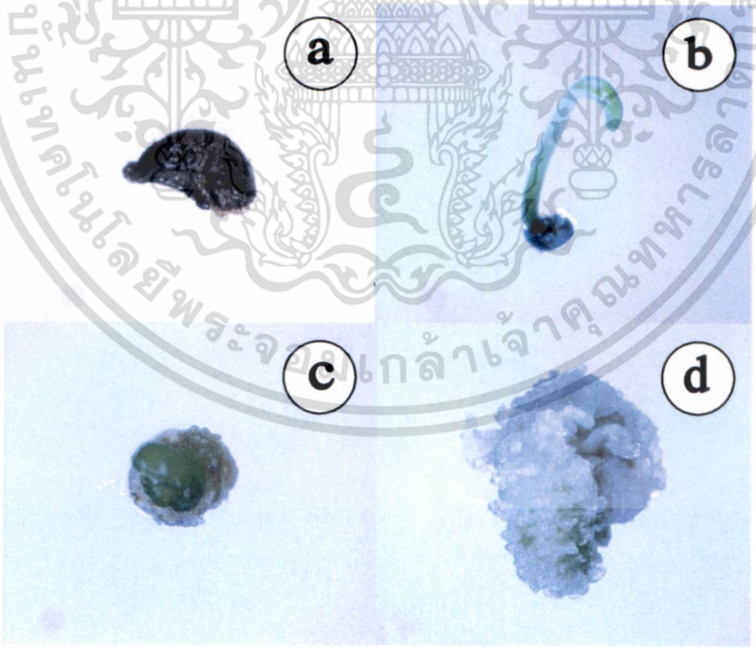
1. การบันทึกข้อมูล
   1.1 ขนาดของแคลลัส
   1.2 จำนวนยอด
   1.3 ความยาวยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 1.2.3 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 11 treatments 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ชิ้นส่วน

1. การบันทึกข้อมูล
   1.1 ขนาดของแคลลัส
   1.2 จำนวนยอด
   1.3 ความยาวยอด
   1.4 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 4 ระดับดังนี้
      คะแนน 1 ชิ้นส่วนตาย (ภาพที่ 3.5a)
      คะแนน 2 ชิ้นส่วนเกิดยอดสีเขียว (ภาพที่ 3.5b)
      คะแนน 3 ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเกาะตัวกันแน่นสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 3.5c)
      คะแนน 4 ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีขาวปนเขียว (ภาพที่ 3.5d)



ภาพที่ 3.5 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน (3.6X) b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน (3.5X)
c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน (3X) d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน (3.9X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภัควดี ภักดีงาม. 2548) ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2.1 แล้วนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 4 treatment 15 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้นส่วน และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้มาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในการทดลองที่ 3.1

1. การบันทึกข้อมูล
   1.1 ขนาดแคลลัส
   1.2 ความยาวยอด
   1.3 จำนวนยอด
   1.4 จำนวนใบ
   1.5 ความยาวใบ

3.4.4 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

3.4.4.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5α

โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5α บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Lulia-bertani agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจาก 1 โคโลนี มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (starter) ด้วยเครื่องเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารขนาด 200 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.3-0.4 จึงถ่ายเชื้อลงหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แช่หลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.1 M $MgCl_2$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายอย่างเบามือ นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์อีกครั้ง ด้วยสารละลาย 0.1 M $MgCl_2$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ใส่หลอดละ 1 มิลลิลิตร รวม 2 หลอดเข้าด้วยกัน เติมกลีเซลรอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แบ่ง competent cell ที่ได้ ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (microcentrifuge) หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.4.2 การถ่ายพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่ competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5α

นำพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR (ภาพที่ 3.4) ที่เป็นดีเอ็นเอสายผสมมาชักนำเข้าสู่ competent cell (*E. coli* DH5α) ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาละลายโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR ความเข้มข้น 100-300 นาโนกรัม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน competent cell ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ลงในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง 850 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อละลายตะกอนเซลล์ นำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อาหารคัดเลือก) โดยดูดเชื้อในปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 -16 ชั่วโมง

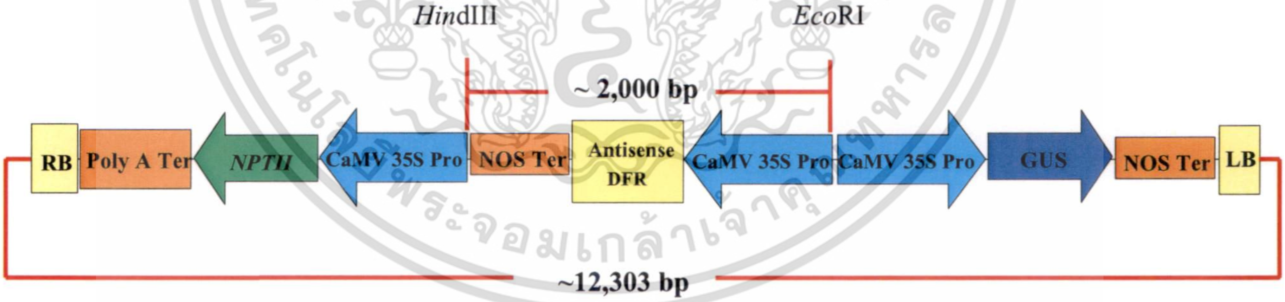
3.4.4.3 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม

สุ่มเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5α ที่สามารถเติบโตบนอาหารคัดเลือก มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิด โดยใช้ FlavoPrepTM Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Flavogen™) โดยดูดอาหารเหลวที่มีเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนของอาหารด้านบนทิ้ง เติม FAPD1 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นเติม FAPD2 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์ จากนั้นเติม FAPD3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบน ปริมาตร 700

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ใส่ใน FAPD column ที่รองรับด้วย collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง เติม W1 buffer ลงใน FAPD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer ลงใน FAPD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง แล้วจึงย้าย FAPD column ไปใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน FAPD column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้มาตรวจสอบความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และทำการทดสอบการมีอยู่ของชิ้นยีน anti-DFR ในพลาสมิดลูกผสม โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII (Fermentas®) เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *DFR* ที่มีส่วนของ CaMV35S promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส ออกจากพลาสมิด pCAMBIA2301 ขนาด 11,623 คู่เบส นำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที



ภาพที่ 3.6 โครงสร้างพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

3.4.5 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชทดลองด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS 1000/He (BioRad) (กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547)

การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยทำการปรับสภาพ osmotic ของเซลล์ โดยการนำชิ้นส่วนที่เตรียมไว้มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม mannitol และ sorbitol ความเข้มข้นอย่างละ 2 โมลาร์ ก่อนการถ่ายยีนเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าว มาวางเรียงกันเป็นรูปวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร บนกระดาษกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอเคลือบอนุภาคทองคำ ทำความสะอาดและเคลือบอนุภาคทองคำ โดยชั่งอนุภาคทองคำ ปริมาณ 60 มิลลิกรัม ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วล้างด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำตกตะกอน แล้วดูดน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนการล้างด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการเขย่าให้ตะกอนของทองคำกระจายตัวในน้ำ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ตกตะกอน แล้วดูดน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม glycerol 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เมื่อจะทำการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอเคลือบอนุภาคทองคำ นำอนุภาคทองคำที่เตรียมไว้มาเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำมีการกระจายตัว หลังจากนั้นเติมพลาสมิดดีเอ็นเอ ปริมาณ 5 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากัน และเติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม spermidine free base (Sigma®) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าหลอดไมโครเซนติฟิวจ์เบาๆ เป็นระยะๆ หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำใสทิ้งแล้วเติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่าเบาๆ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำใสทิ้งแล้วเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่าเบาๆ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำใสทิ้งแล้วเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมโดยการเขย่าเบาๆให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้อนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน

การยิงอนุภาคเคลือบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS 1000/He (BioRad) โดยทำการเช็ดทำความสะอาดตู้ยิง ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน macrocarriers และ plastic insertion tool นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ส่วนแผ่นกั้นความดันแก๊ส (rupture disks) แช่ในไอโซโพรพานอล แล้วนำขึ้นมารอให้แห้ง จากนั้นใส่แผ่นกั้นความดันแก๊ส ตามขนาดความดันที่ต้องการลงใน holder ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยการทดลองนี้เลือกใช้ขนาด 1,100 และ 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แล้วนำเข้าประกอบกับเครื่องตรงส่วนปลายของ gas acceleration tube ภายในตู้ยิง ประกอบ macrocarriers ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกสีเหลือง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร เข้ากับ holder ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปิเปตหยดอนุภาคที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอแล้ว 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่น macrocarriers รอให้แห้งพอประมาณ ใช้ปากคีบหยิบตะแกรงลวด (stopping screen) มาวางบน macrocarriers launch assembly ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

macrocarriers ที่แห้งแล้วมาวางบน macrocarriers holder ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ในลักษณะคว่ำลง ปิดฝา macrocarriers launch assembly แล้วนำไปวางในช่องตำแหน่งบนสุดของเครื่องยิงอนุภาค นำจานเพาะเลี้ยงที่มีเนื้อเยื่อเป้าหมายที่เตรียมไว้วางบนชั้นวาง (petri dish holder) ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ คือ ต่ำลงมาจาก macrocarriers launch assembly 6 และ 9 เซนติเมตร ซึ่งเป็นระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target distance) พร้อมเปิดฝาจานเพาะเลี้ยงไว้ ปิดฝาตู้ยิงให้สนิท เปิดวาวล์ใหญ่บนถังแก๊สฮีเลียม หมุนปุ่มปรับความดันแก๊สไปเกินระดับที่ต้องการประมาณ 200 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เปิด main switch บนส่วนควบคุมข้างตู้ยิง กดปุ่ม vac เพื่อทำให้ภายในตู้ยิงเป็นสุญญากาศจนถึงระดับ 26-28 นิ้วปรอท กดปุ่มเดิมไปที่ hold สังเกตว่าไฟสีแดงจะติดที่ปุ่ม Fire ที่อยู่ข้างๆ จึงกดปุ่ม Fire ค้างไว้จนกว่าจะได้ยินเสียงดังคล้ายเกิดการระเบิดภายในตู้ยิงจึงปล่อยมือจากปุ่ม Fire กดปุ่ม vac ไปที่ vent เพื่อปล่อยอากาศเข้าไปภายในตู้ยิง เมื่อไม่มีสภาพสุญญากาศก็สามารถเปิดฝาตู้ได้ ปิดฝาและนำจานเพาะเลี้ยงที่มีเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ถูกยิงแล้วออกมา และนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนแล้วมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารปรับสภาพ osmotic ของเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) เป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบการถ่ายยีน *GUS* แบบ transient expression ด้วยวิธี histochemical assay และคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามความเข้มข้นที่ทดสอบโดย วิลาสินี ลีทวีทรัพย์ (2550) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกสองสัปดาห์

การทดลองที่ 3 การศึกษาการถ่ายยีน antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) ที่อยู่ในพลาสมิด pCAMBIA2301DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การถ่ายยีนเข้าสู่ยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ที่ได้จากการทดลองที่ 2 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบ 2X2 Factorial in randomized complete block design มี 4 treatments 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วน โดยมี

ปัจจัย A ได้แก่ Rupture disks 2 ขนาด

a_1 ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

a_2 ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ปัจจัย B ได้แก่ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย (Microcarrier Launch Assembly)

b_1 ระยะห่าง 6 เซนติเมตร

b_2 ระยะห่าง 9 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยชิ้นส่วนยอดได้มาจาก การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ (ภัควดี ภักดีงาม. 2548) จากการทดลองที่ 1.2.1 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ที่ได้จากการทดลองที่ 2 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ นำไปปรับสภาพ osmotic ของเซลล์ แล้วนำไปถ่ายยีน ตามวิธีการข้างต้น

จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ที่ได้จากการทดลองที่ 2 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 3.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยวางแผนการทดลองแบบ 2X2 Factorial in randomized complete block design มี 4 treatments 3 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ชิ้นส่วน โดยมีปัจจัยในการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1

หลังจากขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ทำการตัดชิ้นส่วนบริเวณตายอดของคัพภะ ที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร แล้วนำมาปรับสภาพ osmotic ของเซลล์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 แล้วนำไปถ่ายยีน

จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์

1. การบันทึกผล

    1.1 จำนวนยอด

    1.2 ความยาวยอด

    1.3 เปอร์เซ็นต์การตายบนอาหารคัดเลือกของชิ้นส่วน

    1.4 จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อแคลลัสหรือยอด

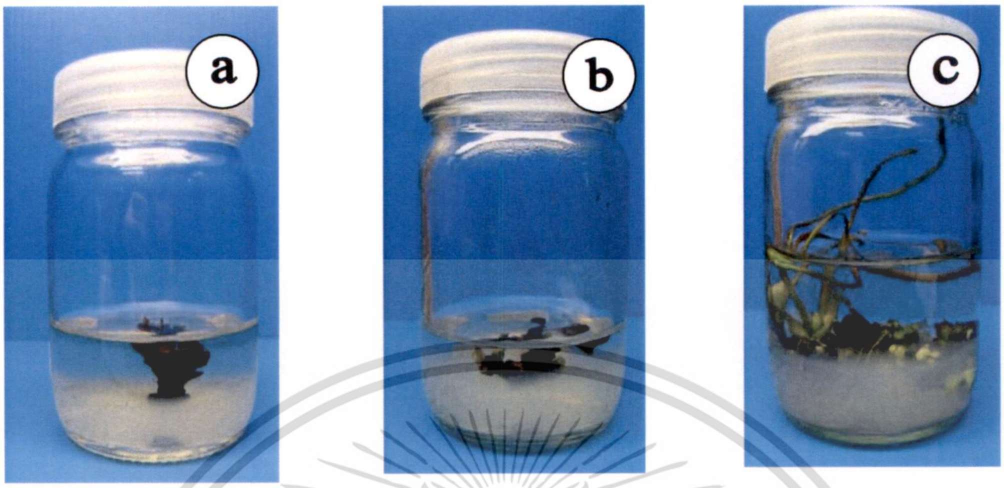
    1.5 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 3 ระดับดังนี้

        คะแนน 1 ชิ้นส่วนตาย (ภาพที่ 3.7a)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คะแนน 2 ชิ้นส่วนเกิดยอดสีเขียวปนน้ำตาล (ภาพที่ 3.7b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนเกิดยอดสีเขียว (ภาพที่ 3.7c)



ภาพที่ 3.7 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน (0.5X) b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน (0.8X)
c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน (0.56X)

3.4.6 การตรวจสอบการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

3.4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression ด้วยวิธี Gus histochemical assay

โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GUS* มาแช่ในสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ β-glucuronidase บ่มในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาตรวจสอบการแสดงออกของ GUS โดยสังเกตจากการเกิดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วน

3.4.6.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

3.4.6.2.1 การสกัด genomic DNA จากพืช

โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เริ่มจากการบดตัวอย่างในโกร่ง (ผ่านการฆ่าเชื้อ) ที่เย็นจัด (ใช้ในโตรเจนเหลวกับการบดตัวอย่าง) จากนั้นตักตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่แช่ในโตรเจนเหลว แล้วเติม EB buffer (ภาคผนวก ข) 500 ไมโครลิตร (ก่อนเติมต้องนำ EB buffer ไปอุ่นที่ 65 องศาสเซลเซียส) นำไปบ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเติม 5M K-Acetate ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา แช่บนน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ นาน 20 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปริมตรเท่ากับส่วนใสที่ดูดขึ้นมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ นาน 2 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บส่วนของตะกอน เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ นาน 2 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บส่วนของตะกอน ทิ้งให้แห้ง เติมน้ำปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำมาตรวจด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* ยีน *GUS* และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ของยีน anti-DFR (ตารางที่ 3.1)

3.4.6.2.2 การเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 20 นาโนกรัม, 0.125 mM dNTPmix, 2.5 mM $MgCl_2$, 1X *Taq* Buffer + $(NH_4)_2SO_4$, ชุดไพรเมอร์ CaMV35S, NOS (ตารางที่ 3.1) และ 0.1 unit ของ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Canada) สำหรับตรวจสอบยีน anti-DFR จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ (T personal : Biometra) โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ดังนี้

Predenaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	
Denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	34 รอบ
Annealing	ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที	
Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	
Final extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	

สำหรับตรวจสอบยีน *NPTII* ใช้ชุดไพรเมอร์ NPTII และชุดไพรเมอร์ GUSA สำหรับตรวจสอบยีน *GUSA* (ตารางที่ 3.1) โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ดังนี้

Predenaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	
Denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	30 รอบ
Annealing	ที่ 64 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที	
Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	
Final extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที	

หลังจากที่เครื่องพีซีอาร์ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามที่กำหนด นำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.4.6.2.3 เตรียมเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะกาโรสเจล 1 กรัม เติม 1X TAE buffer ให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ให้เจลละลายจนใส จากนั้นเทใส่ชุดถาดพลาสติกต้นแบบสำหรับเตรียมเจล รอจนเจลแข็งตัว ถอด comb ออก จากนั้นนำไปใส่ใน electrophoresis chamber

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบยีน anti-DFR ยีน *NPTII* และยีน *GUS*

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาดของ product
1. anti-DFR	CaMV35s to NOS (F)	5'-AGGGATGACGCACAATCCCACT-3'	~800 bp
	CaMV35s to NOS (R)	5'-TCGCAAGACCGGCAACAGGA-3'	
2. *NPTII*	NPTII (F)	5'-CCATGATATTCGGCAAGCAGGCAT-3'	254 bp
	NPTII (R)	5'-ATCCATCATGGCTGATGCAATGCG-3'	
3. *GUS*	GUSA (F)	5'-ATTGATGAAACTGCTGCTGTCGGC-3'	563 bp
	GUSA (R)	5'-ACGCGGTGATACATATCCAGCCAT-3'	

3.4.6.2.4 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis

วางแผ่นเจลลงบน electrophoresis chamber เท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นผสม gel loading buffer 1 ไมโครลิตร กับผลผลิตพีซีอาร์ 9 ไมโครลิตร บนแผ่นพาราฟิน ดูดสารทั้งหมดใส่ลงในหลุม เจลตามที่ได้กำหนดไว้ โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder (Fermentas) ชนิด 100 bp ladder เป็นแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องถ่ายรูปเจล (SynGene, UK)

3.4.6.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

หลังจากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน anti-DFR และยีน *NPT*II ด้วยวิธี PCR แล้ว เพื่อเป็นการยืนยันการแสดงออกของยีน anti-DFR จึงทำการตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR โดยการสกัดอาร์เอ็นเอของบัวในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน และไม่ได้รับการถ่ายยีน แล้วอาศัยการเปลี่ยน mRNA เป็น complementary DNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วทำการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการทำพีซีอาร์หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ

3.4.6.3.1 การสกัด total RNA จากพืช (Provost *et al.*, 2007)

เริ่มจากการบดตัวอย่างในโกร่ง (ผ่านการฆ่าเชื้อ) ที่เย็นจัด ใช้ไนโตรเจนเหลวกับการบดตัวอย่าง จากนั้นตักตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่แช่ไนโตรเจนเหลว แล้วเติมเม็ดบีดลงไป 2 เม็ด จากนั้นเติม EB buffer 1 มิลลิลิตร (ก่อนเติมต้องนำ EB buffer ไปอุ่นที่ 65 องศา

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 15 วินาที นำไปบ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยพลิกหลอดไปมาทุก 3 นาที แล้วเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ลงไปปริมาตร 1 เท่าของสารที่มีอยู่ พลิกหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบ นาน 10 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ลงไป 1 เท่าของสารที่ดูดขึ้นมา พลิกหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบ นาน 10 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 10 M LiCl ปริมตร ¼ เท่า พลิกหลอดไปมา นำไปบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 รอบ นาน 20 นาที 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บส่วนของตะกอน ทิ้งให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย STE buffer 500 ไมโครลิตร (ก่อนเติมต้องนำ STE buffer ไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส) และเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) 450 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบ นาน 15 นาที 4 องศาเซลเซียส ดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แช่บนน้ำแข็งแล้วเติม STE buffer 150 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบ นาน 15 นาที 4 องศาเซลเซียส ดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 5M NaCl 100 ไมโครลิตร และเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที พลิกหลอดไปมา นำไปบ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบ นาน 20 นาที 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำทิ้ง แล้วเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 400 ไมโครลิตร ที่แช่ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบ นาน 10 นาที 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บส่วนของตะกอน ทิ้งให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย DEPC water 30 ไมโครลิตร

3.4.6.3.2 การทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำตัวอย่างพืชที่สกัด RNA ได้มาทำการเปลี่ยนจาก mRNA เป็น complimentary DNA (cDNA) โดยใช้ SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) จากนั้นนำมาตรวจด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีการเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เหมือนกับข้อ 3.4.6.2.2 โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรโมเตอร์ และเทอร์มิเนเตอร์ของยีน anti-DFR ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อตรวจสอบยีน anti-DFR และยีน *NPTII*

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาดของ product
1. anti-DFR	DFR (F)	5'-ACACGAAGTACATCCATCCGGTCA -3'	~600 bp
	DFR (R)	5'- TTCTTGGCTGGTCATGAAGCTCCT-3'	
2. *NPTII*	NPTII (F)	5'-CCATGATATTCGGCAAGCAGGCAT-3'	254 bp
	NPTII (R)	5'-ATCCATCATGGCTGATGCAATGCG-3'	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 บันทึกผลลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน ได้แก่ จำนวนการเกิดยอด ความยาวยอด เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนหลังจากย้ายออกจากอาหารคัดเลือก

3.5.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR ด้วยวิธีพีซีอาร์

หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้ว (standard size marker)

3.5.3 การตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน anti-DFR และยีน *NPTII* ด้วย Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

หลังจากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน anti-DFR และยีน *NPTII* ด้วยวิธี PCR แล้ว เพื่อเป็นการยืนยันการแสดงออกของยีน จึงทำการตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR โดยการสกัด RNA ของบัวในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน และไม่ได้รับการถ่ายยีน แล้วอาศัยการเปลี่ยน mRNA เป็น complementary DNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค gel electrophoresis วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้ว (standard size marker)

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดยใช้ตาราง Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

การทดลองที่ 1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ตามวิธีการทดลองนาน 12 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน

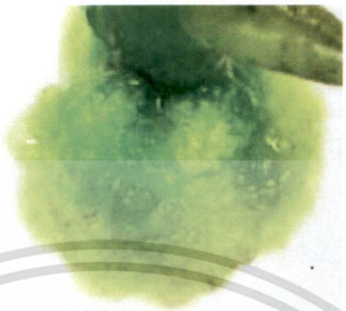
จากการนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.1) และพบว่าชิ้นส่วนก้านใบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุดทุกสัปดาห์ของการทดลอง โดยในสัปดาห์ที่ 4 แคลลัสมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.43 คะแนน ในอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ในสัปดาห์ที่ 8 แคลลัสมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.50 คะแนน และพบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 คะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่นแยกกันได้ยาก สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.1)

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าทุกสัปดาห์เปอร์เซ็นต์การเกิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) และชิ้นส่วนก้านใบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากันโดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 90 เปอร์เซ็นต์

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการสังเกตพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมีค่าคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 12 ชิ้นส่วนก้านใบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) และอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม dicamba ความเข้มข้น 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram ความเข้มข้น 4.14 ไมโครโมลาร์ ไม่เกิดแคลลัส



ภาพที่ 4.1 ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (5.00X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ขนาดแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.1) โดยในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า การใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 1.15 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 พบว่า การใช้ NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ทำให้แคลลัสมีขนาดมากที่สุดเฉลี่ย 1.20 และ 1.27 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 1.17 เซนติเมตร และการใช้ dicamba ความเข้มข้น 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram ความเข้มข้น 4.14 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสน้อยที่สุดเฉลี่ย 1.00 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์)			คะแนนการเจริญเติบโต±S.E.[1] อายุ (สัปดาห์)			เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส±S.E.[1] อายุ (สัปดาห์)			ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)±S.E.[1] อายุ (สัปดาห์)		
			4	8	12	4	8	12	4	8	12
Control			1.00±0.00 d	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	1.00±0.00 c	1.00±0.00 d	1.00±0.00 d
NAA 40	TDZ 0.5		2.17±0.12 ab	2.13±0.28 b	1.13±0.11 a	90.00±6.72 a	90.00±6.72 a	90.00±6.72 a	1.12±0.03 ab	1.20±0.03 a	1.27±0.04 a
2,4-D 4.52	TDZ 0.45		2.43±0.18 a	2.50±0.15 a	1.10±0.11 ab	90.00±6.72 a	90.00±6.72 a	90.00±6.72 a	1.15±0.02 a	1.17±0.02 a	1.17±0.04 b
2,4-D 10	BA 0.5		1.03±0.03 d	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b	3.33±3.27 d	3.33±3.27 d	3.33±3.27 d	1.01±0.01 c	1.01±0.01 d	1.01±0.01 d
2,4-D 9	BA 0.8		1.50±0.27 c	1.03±0.03 c	1.00±0.00 b	30.00±9.83 c	30.00±9.83 c	30.00±9.83 c	1.03±0.01 c	1.03±0.01 d	1.03±0.01 cd
2,4-D 18.1	BA 2.22		1.77±0.18 bc	1.03±0.14 c	1.00±0.00 b	53.33±8.29 b	53.33±8.29 b	53.33±8.29 b	1.08±0.01 b	1.08±0.01 bc	1.08±0.01 c
picloram 10	kinetin 1		1.10±0.11 d	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b	6.67±4.14 d	6.67±4.14 d	6.67±4.14 d	1.01±0.01 c	1.01±0.01 d	1.01±0.01 d
picloram 4.14	kinetin 4.64		1.77±0.15 bc	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b	46.67±7.89 bc	46.67±7.89 bc	46.67±7.89 bc	1.09±0.02 b	1.09±0.06 b	1.09±0.02 c
dicamba 11.27	picloram 4.14		1.00±0.00 d	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	1.00±0.00 c	1.00±0.00 d	1.00±0.00 d
triacontanol 11.38	BA 1.1	IAA 2.85	1.53±0.20 c	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b	26.67±9.27 c	26.67±9.27 c	26.67±9.27 c	1.03±0.01 c	1.04±0.02 cd	1.03±0.01 cd
F-test			**	**	*	**	**	**	**	**	**
CV (%)			21.7472	19.3515	7.3416	48.1159	48.1159	48.1159	3.6429	3.6122	4.8084

*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาชักนำการเกิดแคลลัสอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตของแคลลัสดังนี้

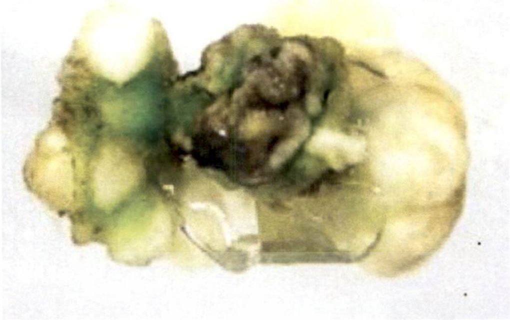
คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าชิ้นส่วนเกิดเป็นแคลลัสก่อนแล้วจึงเริ่มพัฒนาเป็นเอมบริโอจีนิคแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2 โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นที่บริเวณฐานของชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.2) เอมบริโอจีนิคแคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติในทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.2-4.3) โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.33 และ 2.43 คะแนน ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรที่มี picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตเท่ากันคือ 1 คะแนน

เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าแคลลัสเริ่มเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง และเปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.2-4.3) โดยสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสได้ในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูงที่สุด 36.67 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรที่มี picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส แต่มีการเจริญเติบโตขึ้นเป็นยอดสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ใช้ในการศึกษาเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ลักษณะเอมบริโอจีนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (2.85X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ (3.29X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จำนวนยอด

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 จำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.7) โดยในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนยอดในอาหารสูตรที่มี NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ เท่ากันคือ 1 ยอด และในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่เกิดขึ้นสูงที่สุด 2.43 ยอด ในอาหารอาหารสูตรที่มี triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์

ความยาวยอด

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.8) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ ทำให้ชิ้นส่วนมีความยาวยอดเพิ่มขึ้นมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงที่สุด 1.83 เซนติเมตร และการใช้ picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.40 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงที่สุด 2.92เซนติเมตร และการใช้ dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.57 เซนติเมตร

จำนวนราก

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าจำนวนรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.9) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ ทำให้ชิ้นส่วนมีรากเกิดขึ้น โดยเริ่มเกิดรากขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยจำนวนรากสูงที่สุด 0.33 และ 3.70 ราก ตามลำดับ ส่วนในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่มีรากเกิดขึ้น

ความยาวราก

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าความยาวรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ ทำให้ชิ้นส่วนมีความยาวรากเพิ่มขึ้น และในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยความยาวรากสูงที่สุด 0.04 และ 0.20 เซนติเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก จากการเพาะ เลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์)			คะแนนการเจริญเติบโต±S.E.[1]	เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส±S.E.[1]	จำนวนยอด±S.E.[1]	ความยาวยอด (เซนติเมตร)±±S.E.[1]	จำนวนราก±S.E.[1]	ความยาวราก (เซนติเมตร)±±S.E.[1]
NAA 40	TDZ 0.5		2.33±0.06 a	36.67±0.06 a	1.00±0.00	1.00±0.00 c	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
picloram 10	kinetin 1		1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	1.00±0.00	1.40±0.03 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
picloram 4.14	kinetin 4.64		1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	1.00±0.00	1.36±0.02 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
dicamba 11.27	picloram 4.14		1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	1.00±0.00	1.35±0.02 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
triacontanol 11.38	BA 1.1	IAA 2.85	1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	1.00±0.00	1.83±0.15 a	0.33±0.04 a	0.04±0.01 a
F-test			**	**	ns	**	**	**
CV (%)			3.6464	51.0672	0.0002	13.7079	4.4965	0.6117

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.3 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์)			คะแนนการเจริญเติบโต±S.E.[1]	เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส±S.E.[1]	จำนวนยอด±S.E.[1]	ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E.[1]	จำนวนราก±S.E.[1]	ความยาวราก (เซนติเมตร)±S.E.[1]
NAA 40	TDZ 0.5		2.43±0.09 a	43.33±0.08 a	1.00±0.00 b	1.00±0.00 c	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
picloram 10	kinetin 1		1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	1.00±0.00 b	1.46±0.03 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
picloram 4.14	kinetin 4.64		1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	1.00±0.00 b	1.55±0.04 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
dicamba 11.27	picloram 4.14		1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	1.00±0.00 b	1.57±0.03 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
triacontanol 11.38	BA 1.1	IAA 2.85	1.00±0.00 b	0.00±0.00 b	2.43±0.21 a	2.92±0.13 a	3.70±0.22 a	0.20±0.01 a
F-test			**	**	**	**	**	**
CV (%)			6.8346	60.5211	17.8135	8.9091	20.5754	1.4201

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 1.2.2 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์ และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

ขนาดแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.4) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่า การใช้ picloram ความเข้มข้น 12.4 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 0.78 และ 0.84 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 0.7 และ 0.72 เซนติเมตร ตามลำดับ และการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 67.8 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.31 และ 0.36 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแคลลัสจะเริ่มเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ที่บริเวณรอยตัดที่ส่วนฐานของชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นเม็ดเกาะกันแน่นจากนั้นจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลือแต่ส่วนยอดที่เป็นสีเขียวในสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 4.4)

จำนวนยอด

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีจำนวนยอดในอาหารสูตรที่มี 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์ และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ เท่ากันคือ 1 ยอด ซึ่งมีความคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนยอด และมีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่เกิดขึ้นสูงที่สุด 1.6 ยอด ในอาหารอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.4 ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 12.4 ไมโครโมลาร์ (2.56X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความยาวยอด

จากการนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.4) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ picloram ความเข้มข้น 37.2 ไมโครโมลาร์ ทำให้ชิ้นส่วนมีความยาวยอดเพิ่มขึ้นมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงที่สุด 1.40 เซนติเมตร และการใช้ picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.37 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงที่สุด 1.51 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.44 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ขนาดของแคลลัส จำนวนยอด และความยาวยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์)		ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)±S.E.[1]		จำนวนยอด±S.E.[1]		ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E.[1]	
		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)	
		4	8	4	8	4	8
Control		0.536±0.02e	0.63±0.02cd	1.60±0.18a	1.60±0.18a	0.94±0.03ef	1.44±0.07ab
2,4-D	13.5	0.57±0.02de	0.62±0.03d	1.00±0.00b	1.00±0.00b	0.97±0.04de	1.22±0.05de
	27.1	0.47±0.02f	0.52±0.03e	1.00±0.00b	1.00±0.00b	0.96±0.03de	1.23±0.08cde
	40.7	0.38±0.00g	0.44±0.01f	1.00±0.00b	1.00±0.00b	0.83±0.03fg	1.00±0.05f
	54.2	0.38±0.01g	0.44±0.04f	1.00±0.00b	1.00±0.00b	0.84±0.04f	1.13±0.09ef
	67.8	0.31±0.01h	0.36±0.03g	1.00±0.00b	1.00±0.00b	0.73±0.03g	0.96±0.01f
picloram	12.4	0.78±0.03a	0.84±0.01a	1.00±0.00b	1.00±0.00b	1.20±0.02c	1.30±0.05b-e
	24.8	0.70±0.02b	0.72±0.02b	1.00±0.00b	1.00±0.00b	1.37±0.04ab	1.40±0.05a-d
	37.2	0.58±0.02de	0.62±0.02d	1.00±0.00b	1.00±0.00b	1.40±0.04a	1.51±0.06a
	49.6	0.67±0.02bc	0.70±0.02bc	1.00±0.00b	1.00±0.00b	1.28±0.04bc	1.42±0.09abc
	62.1	0.63±0.02cd	0.66±0.03bcd	1.00±0.00b	1.00±0.00b	1.05±0.05d	1.14±0.08ef
F-test		**	**	**	**	**	**
CV (%)		8.2609	9.3076	11.6315	11.6315	7.4636	11.4235

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิต

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 1.2.3 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์ และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ และเพาะ เลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

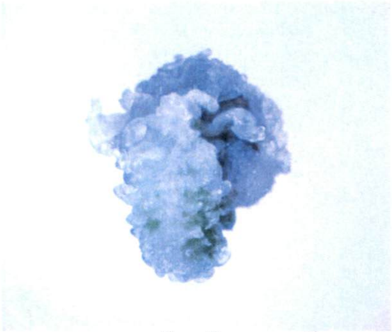
คะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าชิ้นส่วนเริ่มเกิดแคลลัสขึ้นที่บริเวณฐานของชิ้นส่วนในในสัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มมากขึ้นจนทั่วทั้งชิ้นส่วนจนมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.5) แคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารสูตรที่มี picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติในทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.5) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากันคือ 3.66 คะแนน ส่วนอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตต่ำที่สุด 1.43 คะแนน โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นสีเขียวจนถึงสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย

ขนาดแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.5) จากการสังเกต พบว่าขนาดแคลลัสมีความคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขนาดขึ้นอีก โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่า การใช้ picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.52 เซนติเมตร ส่วนการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 40.7 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.33 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีขนาดแคลลัสน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.09 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 24.8 ไมโครโมลาร์ (3.9X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.5 คะแนนการเจริญเติบโตและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์)		คะแนนการเจริญเติบโต±S.E.[1]		ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)±S.E.[1]	
		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)	
		4	8	4	8
Control		1.43±0.40g	1.43±0.40g	0.09±0.01f	0.09±0.01f
2,4-D	13.5	2.44±0.21de	2.44±0.21de	0.22±0.06de	0.22±0.06de
	27.1	2.29±0.29e	2.29±0.29e	0.26±0.02b-d	0.26±0.02b-d
	40.7	2.49±0.36cde	2.49±0.36cde	0.33±0.07b	0.33±0.07b
	54.2	2.65±0.21bcd	2.65±0.21bcd	0.31±0.01bc	0.31±0.01bc
	67.8	2.76±0.20bc	2.76±0.20bc	0.29±0.01bcd	0.29±0.01bcd
picloram	12.4	2.80±0.21bc	2.80±0.21bc	0.23±0.01cd	0.23±0.01cd
	24.8	3.66±0.21a	3.66±0.21a	0.52±0.05a	0.52±0.05a
	37.2	2.96±0.07b	2.96±0.07b	0.25±0.03b-e	0.25±0.03b-e
	49.6	2.31±0.35e	2.31±0.35e	0.17±0.02ef	0.17±0.02ef
	62.1	1.75±0.23f	1.75±0.23f	0.22±0.01de	0.22±0.01de
F-test		**	**	**	**
CV (%)		5.3815	5.3815	14.3034	14.3034

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

การทดลองที่ 2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภัควดี ภักดีงาม. 2548) ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2.1 แล้วนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

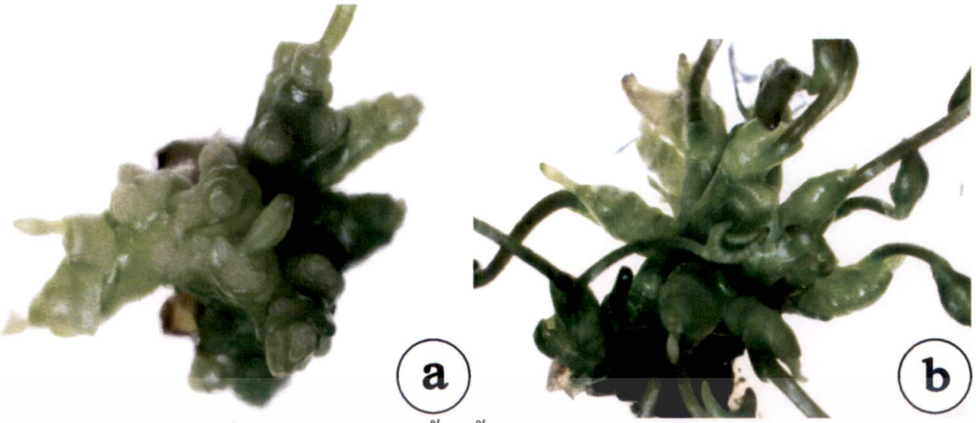
ขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัส

จากการนำเอมบริโอจีนิคแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ โดยเริ่มเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง แล้วจึงเริ่มพัฒนาเป็นยอด พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 4.6) โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 1.19 เซนติเมตร ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 0.81 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 1.32 เซนติเมตร ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 1.19 เซนติเมตร

จำนวนยอด

จากการนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 4.6) โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.33 ยอด ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 4 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 8.67 ยอด ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 5.07 ยอด โดยเริ่มเกิดยอดขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งยอดที่เกิดขึ้นจะเริ่มมีลักษณะเป็นกลุ่มยอดเล็กๆ จำนวนมากสีเขียวอ่อน และมีการพัฒนาเป็นยอดสีเขียวที่มีใบเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอมบริโอจีนิคแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ a คือลักษณะกลุ่มยอดเล็กๆสีเขียวอ่อนที่เกิดขึ้น (3.33X) b คือยอดสีเขียวที่มีใบเกิดขึ้น (2.78X) เมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ

ความยาวยอด

จากการนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.6) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ย 0.96 และ 1.02 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.58 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.78 เซนติเมตร

จำนวนใบ

จากการนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนใบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.6) โดยในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าการใช้อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 3.67 ใบ ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนใบรองลงมาเฉลี่ย 3.22 ใบ ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 4.84 ใบ ส่วนการใช้อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตมีจำนวนใบรองลงมาเฉลี่ย 3.22 ใบ

ความยาวใบ

จากการนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของความยาวใบมีความแตกต่างกันอย่างมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่4.6) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่า การใช้อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความยาวใบมากที่สุดเฉลี่ย 1.49 และ 2.08 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีความยาวใบรองลงมาเฉลี่ย 0.57 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีความยาวใบรองลงมาเฉลี่ย 0.84 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และความยาวใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

ความเข้มข้นของ BA (ไมโครโมลาร์)		ขนาดเอมบริโอจีนิคแคลลัส (เซนติเมตร)±S.E.[1]		จำนวนยอด±S.E.[1]		ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E.[1]		จำนวนใบ±S.E.[1]		ความยาวใบ (เซนติเมตร)±S.E.[1]	
		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)	
		4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
BA	0	0.63±0.03b	0.64±0.09b	1.00±0.00	1.40±0.16c	0.96±0.15a	1.02±0.09a	3.67±0.61	3.22±0.12	1.49±0.28a	2.08±0.03a
	40	0.81±0.06b	1.19±0.11a	4.00±0.85	5.07±0.57b	0.58±0.03b	0.77±0.07b	2.71±0.77	2.55±1.12	0.57±0.12b	0.69±0.28b
	50	1.19±0.14a	1.32±0.10a	4.33±1.00	8.67±0.77a	0.56±0.05b	0.78±0.03b	3.22±0.79	4.84±0.68	0.47±0.14b	0.84±0.08b
	60	0.79±0.03b	0.82±0.06b	3.13±0.69	3.78±0.70b	0.50±0.04b	0.63±0.02b	2.16±0.12	2.33±0.41	0.41±0.09b	0.57±0.06b
F-test		*	**	ns	**	*	*	ns	ns	**	**
CV (%)		18.1496	17.4148	38.4311	22.6594	19.2252	12.5675	24.0603	34.7109	21.4322	35.4563

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

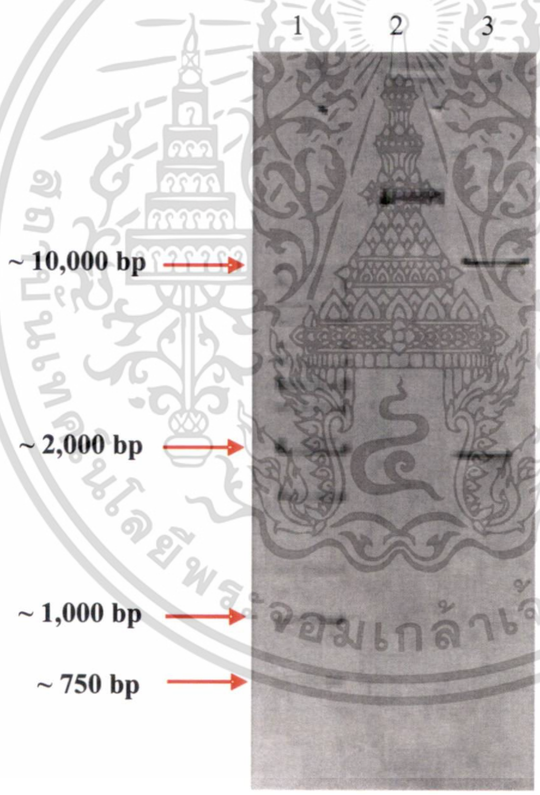
[1] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

4.3.1 ผลของการเพิ่มปริมาณพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

4.3.1.1 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301anti-DFR โดยใช้ FlavoPrep TM Plasmid DNA Extraction Mini Kit

นำพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301anti-DFR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาสกัดพลาสมิดตามวิธีการ 3.4.4.3 โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI *และ* *Hin*dIII (ภาพที่ 3.6) เมื่อนำมาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดังภาพที่ 4.7 พบว่าช่องที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นคือ ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส แสดงว่าในพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR มียีน anti-DFR ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ต้องการ



ภาพที่ 4.7 การตรวจสอบพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR หลังจากการเชื่อมต่อด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI *และ* *Hin*dIII

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

ช่องที่ 3 พลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI *และ* *Hin*dIII ได้แถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 2,000 คู่เบส และขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 การศึกษาการถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) ด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การถ่ายยีน anti-DFR ด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่ชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจีนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ที่ได้จากการทดลองที่ 2

4.3.2 การตรวจสอบต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี Gus histochemical assay แบบ Transient expression

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) เป็นการวัดประสิทธิภาพการถ่ายยีนเบื้องต้น ทำตามข้อ 3.4.6.1 ทำการตรวจสอบหลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน โดยนับจำนวนจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ถูกยิงด้วยอนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA2301anti-DFR พบว่าสภาพการถ่ายยีนที่ทำให้จำนวนจุดสีน้ำเงินมากที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดคือ การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร โดยมีค่าการแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression เฉลี่ย 4.8 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนยอดที่เกิดจุดสีน้ำเงิน 35.71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสภาพอื่นๆ พบว่าไม่มีการติดสีน้ำเงินของชิ้นส่วน (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.7 การแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression ของเนื้อเยื่อส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

แรงดันก๊าซฮีเลียม (ปอด์ต่อตารางนิ้ว)	ระยะห่างของเนื้อเยื่อ (เซนติเมตร)	เปอร์เซนต์ของจำนวนชิ้นที่เกิดจุดสีน้ำเงิน	จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน
1,100	6	37.1	4.8
	9	0	0
1,350	6	0	0
	9	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 การแสดงออกของยีน *GUS* บนชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงบุณฑริก ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน

หลังจากการถ่ายยีนจึงย้ายชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

จำนวนยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่า จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.9) ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 4.33 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 3.58 ยอด

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 4.58 ยอด ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 3.33 ยอด

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซนติเมตร มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 4.83 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 4.33 ยอด

ความยาวยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.9) ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.53 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.39 เซนติเมตร

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.50 เซนติเมตร ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.42 เซนติเมตร

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.54 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.52 เซนติเมตร

เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนบนอาหารคัดเลือก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ (ตารางที่ 4.9) ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ย 30 เปอร์เซนต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 28.33 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 28.33 เปอร์เซ็นต์

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชิ้นส่วนจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มหยุดการเจริญเติบโตหลังจากสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร และการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 26.67 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นการตายของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์

Treatment		จำนวนยอด±S.E.[1]		ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E.[1]		เปอร์เซ็นต์การตาย±S.E.[1]
		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)
		4	8	4	8	8
Rupture disk	1,100	4.33±0.02a	4.33±0.02a	0.53±0.02	0.53±0.02	30.00±12.25
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi)	1,350	3.58±0.01b	3.58±0.01b	0.39±0.01	0.39±0.01	28.33±11.57
F-test		**	**	ns	ns	ns
ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย	6	3.33±0.01b	3.33±0.01b	0.42±0.01	0.42±0.01	30.00±12.25
เซนติเมตร (cm)	9	4.58±0.02a	4.58±0.02a	0.50±0.02	0.50±0.02	28.33±11.57
F-test		**	**	ns	ns	ns
Rupture disk 1,100 psi	ระยะห่าง 6 cm	3.83±0.17c	3.83±0.17c	0.52±0.15	0.52±0.15	26.67±8.82
	ระยะห่าง 9 cm	4.83±0.17a	4.83±0.17a	0.54±0.04	0.54±0.04	33.33±17.64
Rupture disk 1,350 psi	ระยะห่าง 6 cm	2.83±0.17d	2.83±0.17d	0.31±0.04	0.31±0.04	33.33±6.67
	ระยะห่าง 9 cm	4.33±0.17b	4.33±0.17b	0.46±0.05	0.46±0.05	23.33±8.82
F-test		**	**	ns	ns	ns
CV (%)		6.3158	6.3158	29.7741	29.7741	55.9241

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.3.3 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008)

นำชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

การเจริญเติบโตของยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่าในช่วงสัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ชิ้นส่วนมีความคงที่ไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มเติมจากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และมิลลิ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากสัปดาห์ที่ 12 อย่างช้าๆ

เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.65 คะแนน ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.25 คะแนน

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.73 คะแนน ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.17 คะแนน

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง โดยในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ชิ้นส่วนส่วนใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและมีการเจริญเติบโตช้ามาก ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.87 คะแนน ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีคะแนนการเจริญเติบโตรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.60 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนยอด

จากการนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ในสัปดาห์ที่ 12 จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.10) พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.33 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 3.58 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 จำนวนยอดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 6.48 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 5.43 ยอด

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย ในสัปดาห์ที่ 12 จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.58 ยอด ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 3.33 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 6.75 ยอด ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 5.17 ยอด

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย ในสัปดาห์ที่ 12 จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดมากที่สุด 4.83 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 4.33 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดมากที่สุด 6.87 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 6.63 ยอด

ความยาวยอด

จากการนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ย 0.53 และ 0.64 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.39 และ 0.44 เซนติเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ย 0.50 และ 0.59 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.42 และ 0.49 เซนติเมตร ตามลำดับ

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 12 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดมากที่สุด 0.54 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.52 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร มีความยาวยอดมากที่สุด 0.65 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.62 เซนติเมตร

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน

จากการนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.10) ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดเฉลี่ย 56.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรองลงมาเฉลี่ย 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดเฉลี่ย 63.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรองลงมาเฉลี่ย 38.33 เปอร์เซ็นต์

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร และการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมีมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 63.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรองลงมาเฉลี่ย 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นการรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์

Treatment		คะแนนการเจริญเติบโต±S.E.[1]		จำนวนยอด±S.E.[1]		ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E.[1]		เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต±S.E.[1]
		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)
		12	16	12	16	12	16	16
Rupture disk	1,100	1.65±0.07	1.65±0.07	4.33±0.02a	6.48±0.65	0.53±0.02	0.64±0.26	56.67±23.14
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi)	1,350	1.25±0.05	1.25±0.05	3.58±0.01b	5.43±0.22	0.39±0.01	0.44±0.18	45.00±18.37
F-test		ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย	6	1.17±0.05b	1.17±0.05b	3.33±0.01b	5.17±0.11	0.42±0.01	0.49±0.20	38.33±15.65
เซนติเมตร (cm)	9	1.73±0.07a	1.73±0.07a	4.58±0.02a	6.75±0.11	0.50±0.02	0.59±0.24	63.33±25.85
F-test		*	*	**	ns	ns	ns	ns
Rupture disk 1,100 psi	ระยะห่าง 6 cm	1.43±0.09	1.43±0.09	3.83±0.17c	6.10±0.83	0.52±0.15	0.65±0.22	50.00±10.00
	ระยะห่าง 9 cm	1.87±0.33	1.87±0.33	4.83±0.17a	6.87±0.39	0.54±0.04	0.62±0.05	63.33±20.28
Rupture disk 1,350 psi	ระยะห่าง 6 cm	0.90±0.06	0.90±0.06	2.83±0.17d	4.23±0.79	0.31±0.04	0.33±0.04	26.67±6.67
	ระยะห่าง 9 cm	1.60±0.12	1.60±0.12	4.33±0.17b	6.63±0.33	0.46±0.05	0.55±0.05	63.33±6.67
F-test		ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
CV (%)		22.8444	22.8444	6.3158	21.0386	29.7741	37.9292	42.364

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ * มีความแตกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 3.2 การถ่ายยีน anti-DFR ด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่ชิ้นส่วนตายยอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

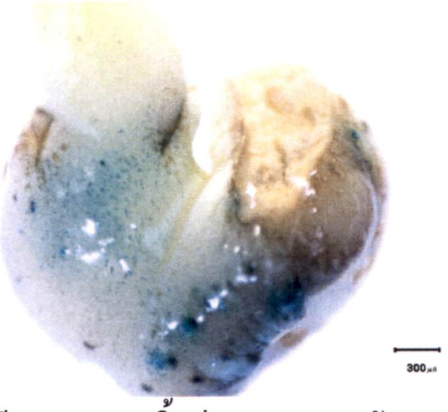
4.3.4 การตรวจสอบต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี Gus histochemical assay แบบ Transient expression

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) ทำตามข้อ 4.3.2 พบว่าสภาพการถ่ายยีนที่ทำให้จำนวนจุดสีน้ำเงินมากที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนตายยอดจากคัพภะ คือ การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร โดยมีค่าการแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression เฉลี่ย 26.11 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตายยอดจากคัพภะที่เกิดจุดสีน้ำเงิน 90 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ สภาพการใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร โดยมีค่าการแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression เฉลี่ย 3.56 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตายยอดจากคัพภะที่เกิดจุดสีน้ำเงิน 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสภาพการใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 9 เซนติเมตร มีค่าการแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression เฉลี่ย 2 และ 1.67 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตายยอดจากคัพภะที่เกิดจุดสีน้ำเงิน 40 และ 30 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.10 การแสดงออกของยีน *GUS* แบบ transient expression ของเนื้อเยื่อส่วนตายยอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม (ปอด์ต่อตารางนิ้ว)	ระยะห่างของเนื้อเยื่อ (เซนติเมตร)	เปอร์เซนต์ของจำนวนชิ้นที่เกิดจุดสีน้ำเงิน	จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน
1,100	6	90	26.11
	9	50	3.56
1,350	6	40	2.00
	9	30	1.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 การแสดงออกของยีน *GUS* บนชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงบุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน

หลังจากการถ่ายยีนได้ย้ายชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

จำนวนยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่า จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.11) ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.17 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.92 ยอด

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.11 ยอด ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.98 ยอด

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซนติเมตร มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.19 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.15 ยอด

ความยาวยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.11) ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.83 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.76 เซนติเมตร

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.86 เซนติเมตร ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.73 เซนติเมตร

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.88 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.83 เซนติเมตร

เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนบนอาหารคัดเลือก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ (ตารางที่ 4.11) ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ย 58 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 56 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ย 58 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 56 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชิ้นส่วนจะเริ่มหยุดการเจิญเติบโตหลังจากสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ย 62.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 58 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นการตายของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์

Treatment		จำนวนยอด±S.E.[1]		ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E.[1]		เปอร์เซ็นต์การตาย±S.E.[1]
		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)
		4	8	4	8	8
Rupture disk	1,100	1.17±0.05a	1.17±0.05a	0.83±0.03	0.83±0.03	58.00±3.68
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi)	1,350	0.92±0.04b	0.92±0.04b	0.76±0.03	0.76±0.03	56.00±2.86
F-test		*	*	ns	ns	ns
ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย	6	0.98±0.04	0.98±0.04	0.73±0.03b	0.73±0.03b	58.00±3.68
เซนติเมตร (cm)	9	1.11±0.05	1.11±0.05	0.86±0.04a	0.86±0.04a	56.00±2.86
F-test		ns	ns	*	*	ns
Rupture disk 1,100 psi	ระยะห่าง 6 cm	1.19±0.05	1.19±0.05	0.78±0.01	0.78±0.01	62.67±3.53
	ระยะห่าง 9 cm	1.15±0.07	1.15±0.07	0.88±0.04	0.88±0.04	53.33±2.67
Rupture disk 1,350 psi	ระยะห่าง 6 cm	0.77±0.12	0.77±0.12	0.68±0.09	0.68±0.09	53.33±10.91
	ระยะห่าง 9 cm	1.07±0.15	1.07±0.15	0.83±0.03	0.83±0.03	58.67±4.81
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)		16.5642	16.5642	9.2362	9.2362	12.3778

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.3.5 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008)

โดยนำชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

การเจริญเติบโตของยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่าในช่วงสัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ชิ้นส่วนมีความคงที่ไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มเติมจากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 ต่อลิตร และมิลลิกรัม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากสัปดาห์ที่ 12 อย่างช้าๆ

เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.12) ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.25 คะแนน ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.05 คะแนน

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.27 คะแนน ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีคะแนนการเจริญเติบโตรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.03 คะแนน

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง โดยในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ชิ้นส่วนส่วนใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและมีการเจริญเติบโตช้ามาก ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.33 คะแนน ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีคะแนนการเจริญเติบโตรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 1.20 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนยอด

จากการนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าในสัปดาห์ที่ 12 จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.12) พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 1.17 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.92 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 1.65 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 1.17 ยอด

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 1.11 และ 1.55 ยอด ตามลำดับ ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.98 และ 1.26 ยอด ตามลำดับ

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 12 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร มีจำนวนยอดมากที่สุด 1.19 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 1.15 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดมากที่สุด 1.65 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 1.64 ยอด

ความยาวยอด

จากการนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 12 (ตารางที่ 4.12) พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ย 0.83 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.76 เซนติเมตร ส่วนสัปดาห์ที่ 16 พบว่าความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ย 0.94 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 12 และ 16 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ย 0.86 และ 0.95 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.73 และ 0.84 เซนติเมตร ตามลำดับ

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 12 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดมากที่สุด 0.88 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.83 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดมากที่สุด 0.97 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.92 เซนติเมตร

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน

จากการนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.12) ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรองลงมาเฉลี่ย 21.33 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดเฉลี่ย 30.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรองลงมาเฉลี่ย 20.67 เปอร์เซ็นต์

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมีมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรองลงมาเฉลี่ย 25 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นการรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์

Treatment		คะแนนการเจริญเติบโต±S.E.[1]		จำนวนยอด±S.E.[1]		ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E.[1]		เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต±S.E.[1]
		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)		อายุ (สัปดาห์)
		12	16	12	16	12	16	16
Rupture disk	1,100	1.25±0.05a	1.25±0.05a	1.17±0.05a	1.65±0.07	0.83±0.03	0.94±0.04a	30.00±2.25a
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi)	1,350	1.05±0.04b	1.05±0.04b	0.92±0.04b	1.17±0.05	0.76±0.03	0.85±0.04b	21.33±3.71b
F-test		*	*	*	ns	ns	*	**
ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย	6	1.03±0.04b	1.03±0.04b	0.98±0.04	1.26±0.05	0.73±0.03b	0.84±0.04b	20.67±4.40b
เซนติเมตร (cm)	9	1.27±0.05a	1.27±0.05a	1.11±0.05	1.55±0.06	0.86±0.04a	0.95±0.04a	30.67±2.52a
F-test		**	**	ns	ns	*	*	**
Rupture disk 1,100 psi	ระยะห่าง 6 cm	1.16±0.02b	1.16±0.02b	1.19±0.05	1.64±0.01	0.78±0.01	0.91±0.03a	24.00±2.31b
	ระยะห่าง 9 cm	1.33±0.01a	1.33±0.01a	1.15±0.07	1.65±0.21	0.88±0.04	0.97±0.06a	36.00±0.00a
Rupture disk 1,350 psi	ระยะห่าง 6 cm	0.89±0.07c	0.89±0.07c	0.77±0.12	0.88±0.16	0.68±0.09	0.77±0.10b	17.33±2.41c
	ระยะห่าง 9 cm	1.20±0.04b	1.20±0.04b	1.07±0.15	1.45±0.29	0.83±0.03	0.92±0.03a	25.33±3.53b
F-test		**	**	ns	ns	ns	*	**
CV (%)		5.7261	5.7261	16.5642	26.4258	9.2362	6.3355	12.987

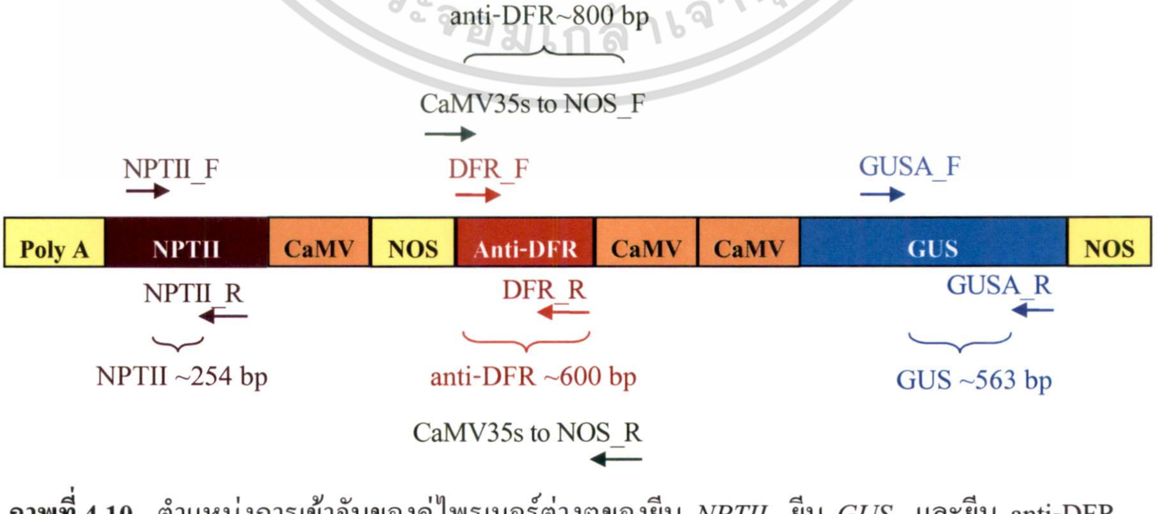
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ * มีความแตกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

[1]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.3.6 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR หลังจากการถ่ายยีน ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

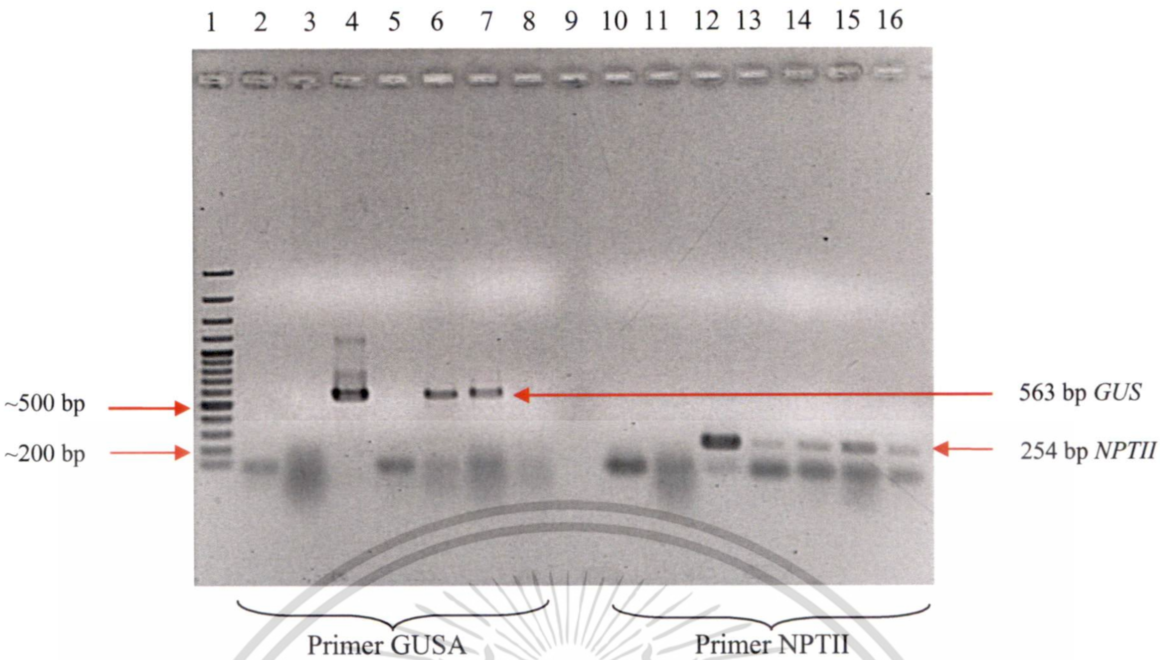
หลังจากการถ่ายยีน antisense Dihydroflavonal 4-Reductase (anti-DFR) โดยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He โดยมีพลาสมิดทดสอบคือ พลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR โดยผ่านการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ kanamycin แล้ว นำต้นบัวหลวงที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือก และต้นบัวหลวงปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาและอุณหภูมิของปฏิกิริยาตามรายละเอียดในข้อ 3.4.6.2.2 โดยมีตำแหน่งการจับของคู่ไพรเมอร์ของทั้ง 3 ยีน ดังแสดงในภาพที่ 4.10 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NPTII* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *GUS* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 563 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR (ภาพที่ 4.11)

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน anti-DFR ตั้งแต่บริเวณโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน anti-DFR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.10 ตำแหน่งการเข้าจับของคู่ไพรเมอร์ต่างๆของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ GUS และไพรเมอร์ NPTII

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder

ช่องที่ 2 Negative control dH_2O

ช่องที่ 3 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ช่องที่ 4 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR

ช่องที่ 5-8 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

ช่องที่ 10 Negative control dH_2O

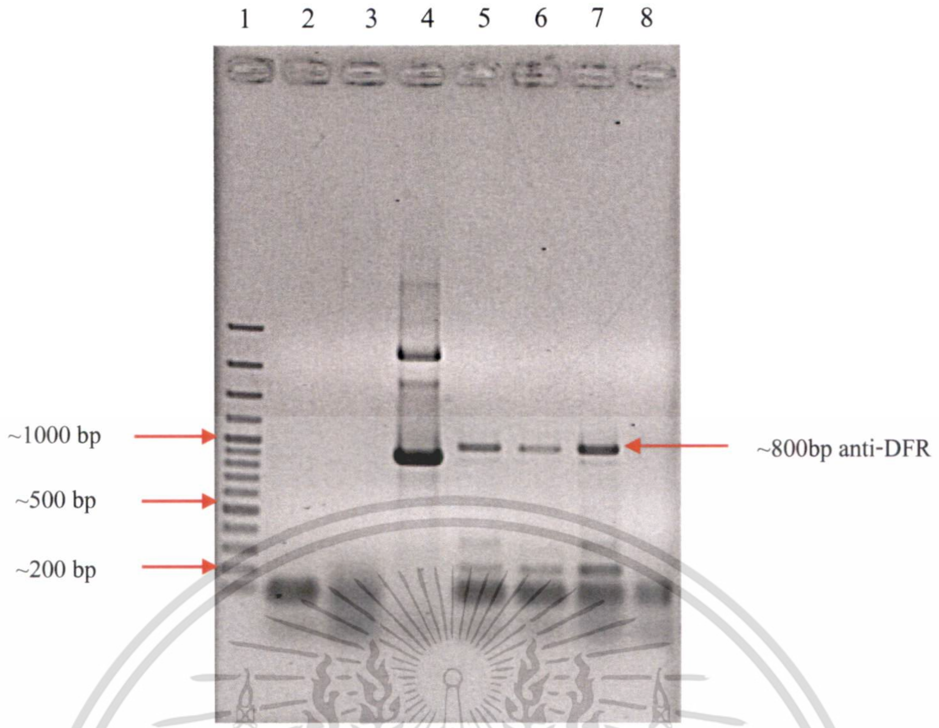
ช่องที่ 11 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ช่องที่ 12 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR

ช่องที่ 13-16 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน anti-DFR ตั้งแต่บริเวณโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน anti-DFR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR (ภาพที่ 4.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ CaMV35S และ NOS

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder

ช่องที่ 2 Negative control dH_2O

ช่องที่ 3 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ช่องที่ 4 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

ช่องที่ 5-8 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน โดยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

จากการตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ จากชิ้นส่วนยอด มีจำนวนทั้งสิ้น 29 ต้น จากทั้งหมด 38 ต้น ที่ชักนำได้บนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 4.13) จากนั้นนำยอดที่เกิดขึ้นบนอาหารคัดเลือกมาทำการตรวจสอบ จำนวน 44 โคลน (1 โคลน มาจาก 1 ยอด) พบว่าต้นที่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* มีจำนวน 32 โคลน จากทั้งหมด 26 ต้น (ตารางที่ 4.14) ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของยีน *NPTII* มีจำนวน 34 โคลน จากทั้งหมด 28 ต้น ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของยีน anti-DFR จำนวน 31 โคลน จากทั้งหมด 21 ต้น โดยในจำนวนนี้มี 3 โคลน ที่พบ 1 ยีน คือยีน *NPTII* จำนวน 2 โคลน และยีน anti-DFR จำนวน 1 โคลน และมีจำนวน 2 โคลนที่พบการมีอยู่ของยีน 2 ยีน คือยีน *GUS* และ *NPTII* ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของยีนทั้ง 3 ยีน คือยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR มีจำนวน 30 โคลน จากทั้งหมด 24 ต้น และมีต้นที่ไม่พบทั้ง 3 ยีน จำนวน 10 โคลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากการตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร จากต้นที่สามารถเจริญเป็นยอดได้บนอาหารคัดเลือก จำนวน 6 ต้น ซึ่งมาจากวิธีการถ่ายยีนที่แตกต่างกันคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 9 เซนติเมตร อย่างละ 2 ต้น และการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร จำนวน 2 ต้น เมื่อนำทั้ง 6 ต้นมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบทั้ง 3 ยีน ในทั้งหมด 6 ต้น (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.13 จำนวนต้นบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด และตายอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)	ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร)	จำนวนต้นที่ชักนำได้บนอาหารคัดเลือก	
		ยอด	ตายอดจากคัพภะ
1,100	6	8	2
	9	16	2
1,350	6	5	0
	9	11	2
รวม		38	6

ตารางที่ 4.14 ผลการตรวจสอบยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)/ ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร)	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน *GUS*	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน *NPTII*	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน anti-DFR
1,100/6	5	4	5	4
1,100/9	13	12	13	10
1,350/6	3	3	3	3
1,350/9	8	7	7	8
รวม	29	26	28	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ผลการตรวจสอบยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อตายอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)/ ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร)	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน *GUS*	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน *NPTII*	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน anti-DFR
1,100/6	2	2	2	2
1,100/9	2	2	2	2
1,350/6	0	0	0	0
1,350/9	2	2	2	2
รวม	6	6	6	6

4.3.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธี Reversr transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

หลังจากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน anti-DFR และยีน *NPTII* ด้วยวิธีพีซีอาร์แล้ว เพื่อเป็นการยืนยันการแสดงออกของยีน anti-DFR จึงทำการตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR โดยการสกัด อาร์เอ็นเอของบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน และไม่ได้รับการถ่ายยีน แล้วอาศัยการเปลี่ยน mRNA เป็น complementary DNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วทำการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการทำพีซีอาร์ ตามข้อ 3.4.6.3.2 หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอโดยแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีตำแหน่งการเข้าจับของคู่ไพรเมอร์ NPTII และ DFR ดังภาพที่ 4.10

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NPTII* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน anti-DFR ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน anti-DFR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR (ภาพที่ 4.14)

และจากต้นบัวหลวงที่ได้รับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR จากชิ้นส่วนยอด และสามารถนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ทั้งสิ้น 4 ต้น พบว่าต้นที่พบการแสดงออกของยีน *NPTII* มีจำนวน 3 ต้น ส่วนต้นที่พบการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

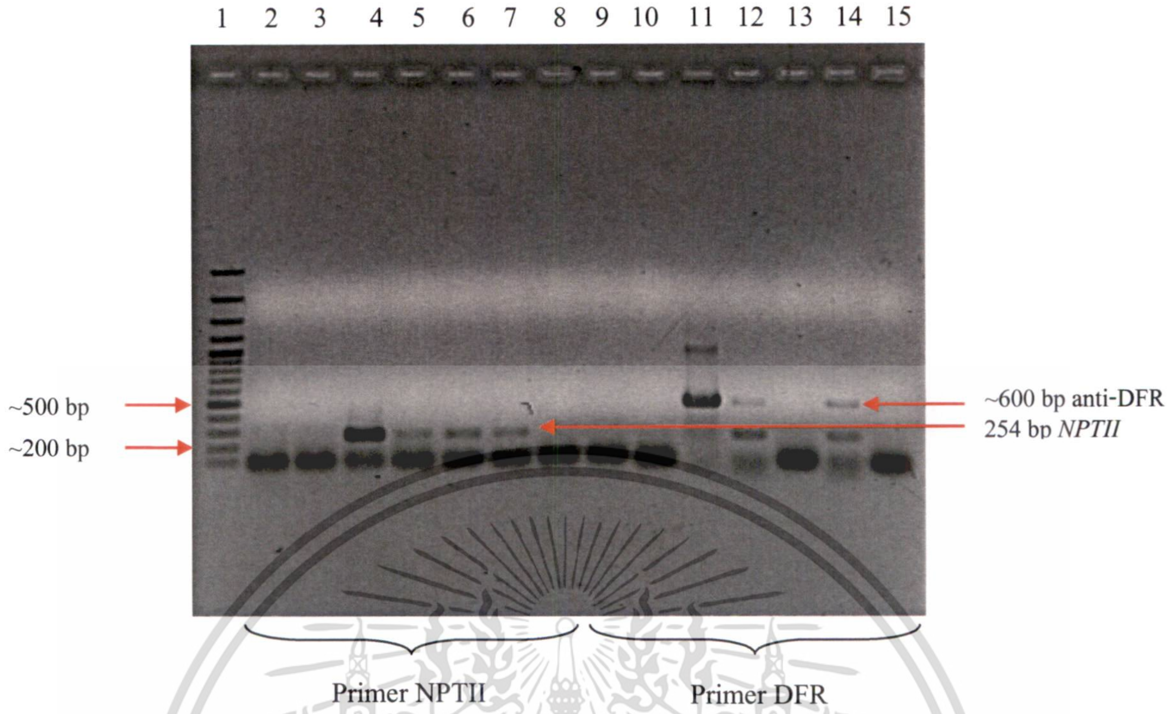
แสดงออกของยีน anti-DFR จำนวน 2 ต้น โดยในจำนวนนี้มี 1 ต้นที่พบการแสดงออกเพียง 1 ยีน คือยีน *NPTII* และมีจำนวน 2 ต้นที่พบการแสดงออกของยีน 2 ยีน คือยีน *NPTII* และยีน anti-DFR และมีต้นที่ไม่มีการแสดงออกของยีนเลย จำนวน 1 ต้น โดยสรุปเป็นตารางผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธี RT-PCR ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)/ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร)	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน *NPTII*	จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน anti-DFR
1,100/6	-	-	-
1,100/9	2	2	1
1,350/6	1	0	0
1,350/9	1	1	1
รวม	4	3	2

-ไม่ได้ตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ NPTII และไพรเมอร์ DFR

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder

ช่องที่ 2 Negative control dH_2O

ช่องที่ 3 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ช่องที่ 4 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

ช่องที่ 5-8 ต้นบัวหลวงที่มีการแสดงออกของยีน *NPTII*

ช่องที่ 9 Negative control dH_2O

ช่องที่ 10 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ช่องที่ 11 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

ช่องที่ 12-15 ต้นบัวหลวงที่มีการแสดงออกของยีน anti-DFR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

4.4.1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ผลการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะ ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าส่วนชิ้นส่วนก้านใบจากคัพะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับการศึกษาการเจริญเติบโต และการเกิดยอดของเอมบริโอจีนิคแคลลัส ของกล้วยไม้ Oncidium (*Gower Ramsey*) (Jheng *et al.* 2006) พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS (1962) ที่เติม 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสได้

ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด มีขนาดและคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยแคลลัสจะมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน สีขาว ซึ่งมีลักษณะตรงข้ามกับการศึกษาของ ภัควดี ภัคดีงาม (2548) ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด แต่ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกุหลาบพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Carl Red และ *Rosa canina* ในอาหารสูตร MS (1962) ที่มี NAA 1.3-26.8 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.23 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสได้ดีที่สุด (Visessuwan *et al.* 1997) และสอดคล้องกับการศึกษาของ จิตเกษม เที่ยงจิตต์ (2545) ที่พบว่าชิ้นส่วนยอดจากคัพภะมีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ วิลาสิณี ลีทวีทรัพย์ (2550) ที่พบว่าชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ มีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุด พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะนาน 4 สัปดาห์ชิ้นส่วนจะสร้างแคลลัสขึ้นที่บริเวณรอยตัด เนื่องจากบริเวณรอยตัดมีการตอบสนองต่อสารต่างๆได้ก่อนบริเวณอื่น และมีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีกว่าเซลล์ข้างใน (คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542) และยังใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yang *et al.* (2009) ที่ศึกษาผลของ mannitol, abscisic acid (ABA) และอายุของชิ้นส่วนเริ่มต้น (ขนาด) โดยใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นส่วนเอมบริโอขนาด น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร, 4-5 มิลลิเมตร, 6-8 มิลลิเมตร และ มากกว่า 8 มิลลิเมตร ที่มีผลต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสและการเกิดยอดของ Chinese soybean (*Glycine max* L. Merr.) พบว่าชิ้นส่วนเอมบริโอที่มีขนาดน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร มีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสและโซมาติกเอมบริโอต่ำกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาด 4-5 มิลลิเมตร ที่สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด บนอาหารสูตร MS (1962) ที่มี mannitol 3 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ ABA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็กที่สุดที่มีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งที่ควรพิจารณา เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจโตช้า และไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเท่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540)

ส่วนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร นั้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี picloram 24.8 ไมโครโมลาร์ โดยมีขนาดและคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วน และมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีเขียวอ่อนซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นสีเขียวจนถึงสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ซึ่งมีลักษณะตรงข้ามกับ การศึกษาการชักนำการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซิสของ Alstroemeria พบว่าแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม IAA 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อนำไปเพาะเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 20.8 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดโซมาติกเอมบริโอได้ (Kim *et al.* 2006)

4.4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ผลของการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้มาจากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าชิ้นส่วนแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ โดยมีขนาดแคลลัสและจำนวนยอดสูงที่สุด และสอดคล้องกับการศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำการเกิดยอดของ *Zantedeschia aethiopica* (Green Goddess) (Kozak and Stelmaszczuk. 2009) พบว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอด (axillary shoots) ได้มากที่สุด ซึ่ง BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ที่นิยมใช้มากในการแก้ไข apical dominance ของหน่อข้าง และในการเพิ่มจำนวนยอด พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับฮอร์โมน 2 กลุ่มคือ ออกซิน และไซโตไคนิน ทั้งนี้ผันแปรขึ้นกับชนิดพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช และระดับหรือสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในสูตรอาหาร คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนินมากกว่าออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด ยกเว้นในพืชบางชนิดที่ต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว แต่ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซินมากกว่าไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนา เพื่อกำเนิดราก (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540)

4.4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ผลของการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้น และวิธีการที่เหมาะสม ต่อการถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ที่มีพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR ในชิ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร โดยชิ้นส่วนยอดได้จากการนำชิ้นส่วนแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay พบว่า ชิ้นส่วนยอดที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินสูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 4.8 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร และการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 9 เซนติเมตร ไม่เกิดจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดที่เจริญเติบโตได้หลังจากเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 8 สัปดาห์มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ กลับพบว่า พบยีน *GUS* ในทุกวิธีการ ซึ่งไม่ตรงกับผลการตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ทั้งนี้เนื่องจากชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay มีจำนวนน้อย จึงมีโอกาสให้ชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบนั้นจะเป็นชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay ของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร พบว่า มีจุดสีน้ำเงินเกิดขึ้นในทุกวิธีการทดลอง และชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินสูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 26.11 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่า พบยีน *GUS* ในทุกวิธีการ เช่นเดียวกัน

เมื่อนำชิ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนยอดที่มีสภาพการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร มีการเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ดีที่สุด ส่วนชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะหลังจากถ่ายยีนนำมาเลี้ยงบนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ และ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอดจากคัภะที่มีสภาพการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร มีการเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ดีที่สุด จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่าชิ้นส่วนยอดที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตมากที่สุดเช่นเดียวกัน แต่เนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและตายหลังจากที่เพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ จากการทดลองนี้การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่าสามารถทำให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นยอดของชิ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะภายหลังการถ่ายยีนเพียง 31.67 และ 2 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ข้อมูลดังกล่าวได้มาจากการนำจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้คูณหนึ่งร้อยและหารด้วยจำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ทั้งหมด) ซึ่งนับว่าน้อยทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลสำเร็จต่อการถ่ายยีน เช่น ขนาดและชนิดของอนุภาค ระดับของ stopping screen ระยะของ gap width เป็นต้น (กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547) นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการคัดเลือกการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจะเพิ่มขึ้น เมื่อนำชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะเพื่อลดการตายของชิ้นส่วนที่ยังมีขนาดเล็ก (Gondo *et al.* 2009)

ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR ด้วยวิธีพีซีอาร์ จากต้นบัวหลวงที่เกิดยอดภายหลังการคัดเลือกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารที่ไม่มีสารคัดเลือกเป็นเวลา 16สัปดาห์ จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NPTII* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบส จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *GUS* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 563 คู่เบส และจากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน anti-DFR ตั้งแต่บริเวณโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน anti-DFR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ซึ่งพบการมีอยู่ของยีน *NPTII* เพียงอย่างเดียว จำนวน 2 ตัวอย่าง พบการมีอยู่ของยีน anti-DFR เพียงอย่างเดียว จำนวน 1 ตัวอย่าง พบการมีอยู่ของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR แต่ไม่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* จำนวน 2 ตัวอย่าง อาจเนื่องจากการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคอาจทำให้บางส่วนของยีนขาดออกจากกัน ส่งผลให้ไม่มีบริเวณลำดับเบสที่ไพรเมอร์ของยีนนั้นสามารถเข้าไปจับ จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ และพบตัวอย่างที่ไม่พบยีน *NPTII* แต่เซลล์มีชีวิตรอดบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารคัดเลือกและสามารถพัฒนาเป็นต้นได้นั้น อาจเนื่องจากมีบางเซลล์ในชิ้นส่วนแคลลัส ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนแต่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ เนื่องจากแคลลัสประกอบด้วยเซลล์หลายชั้น และเมื่อนำมาคัดเลือกบนอาหารแข็งที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin จะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้บางส่วน ซึ่งจะได้รับสารkanamycin เต็มที่ แต่เนื้อเยื่อส่วนที่อยู่เหนือขึ้นไปซึ่งไม่สัมผัสกับอาหารโดยตรง จะได้รับสารปฏิชีวนะ kanamycin โดยการเคลื่อนย้ายขึ้นไปไม่ใช่การสัมผัสโดยตรง และความเข้มข้นของ kanamycin ที่เคลื่อนย้ายเข้าไปในเนื้อเยื่ออาจมีการเจือจางลง ทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านในของแคลลัส และส่วนของเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านบนของแคลลัสไม่ได้สัมผัสกับสารคัดเลือกในความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงมีการเจริญเติบโต และแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ (Caltin, 1990)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และ ยีน anti-DFR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธี RT-PCR จากต้นบัวหลวงที่เกิดยอด ภายหลังการคัดเลือกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารที่ไม่มีสารคัดเลือกเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน anti-DFR ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน anti-DFR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR พบว่าการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร พบการแสดงออกของทั้ง 2 ยีน คือยีน *NPTII* และยีน anti-DFR จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยเป็นการให้ผลการถ่ายยีนแบบถาวรได้ (stable transformation) จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบการแสดงออกของยีน *NPTII* เพียงอย่างเดียว จำนวน 1 ตัวอย่าง และ ไม่พบการแสดงออกของของทั้ง 2 ยีน จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งยีน anti-DFR ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนครั้งนี้ได้มาจากดอกปทุมมา เนื่องจากยังไม่มีลำดับเบสของยีน *DFR* ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกจึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน anti-DFR ได้ ในการทำ RT-PCR จึงให้ผลผลิตพีซีอาร์จากยีน anti-DFR ของดอกปทุมมาที่ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ไม่ใช่ยีน *DFR* ที่มีอยู่ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก จึงสรุปผลได้เพียงว่ามีการแสดงออกของยีน anti-DFR คือการถ่ายยีนประสบความสำเร็จ หากต้องการตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน anti-DFR ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการออกแบบคู่ไพร์เมอร์ของยีน *DFR* จากบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก และเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อที่จะทราบปริมาณของยีน *DFR* ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป ซึ่งถ้าพบว่ายีน *DFR* ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีน anti-DFR มีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่ายีน *DFR* มีการแสดงออกลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้น และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนก้านใบ ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุด จากชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสได้ 43.33 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.43 คะแนน

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเอมบริโอจีนิคแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนมากที่สุด โดยจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 8.67 ยอด เอมบริโอจีนิคแคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 1.19 เซนติเมตร และมีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 4.84 ใบ ส่วนการใช้อาหาร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีผลต่อการเพิ่มความยาวยอดและความยาวใบมากที่สุดเฉลี่ย 1.02 และ 2.08 เซนติเมตร ตามลำดับ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) เข้าสู่ชิ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He (BioRad) พบว่าชิ้นส่วนยอดที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) คือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 4.8 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีโคลนที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำนวน 4 โคลน ส่วนการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ไม่เกิดจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว แต่มีโคลนที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำนวน 10 โคลน และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิค RT-PCR มีโคลนที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR จำนวน 1 โคลน โดยให้ผลการถ่ายยีนแบบถาวรได้ (stable transformation) จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ส่วนชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

expression) สูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 26.11 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีโคลนที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำนวน 2 โคลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กสิน สุวตะพันธุ์. 2500. **บัวนานาพันธุ์.** พฤกษชาติ. 1(1): 40-47

กิริยา สังข์ทองวิเศษ .2547 .**"ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano."** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ,

กุลวรา จารุพันธุ์ และ จันทิมา วรสัมปุรณะ. 2543. **"ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชในสภาพปลอดเชื้อ."** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คณิตา เลขะกุล และคณะ. 2535. **บัวราชินีแห่งไม้น้ำ :** มูลนิธิสวนหลวง ร.9. กรุงเทพฯ : ด่านสุทธาการพิมพ์.

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

จารีย์ หอยทอง. 2519. **"การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย."** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิตเกษม เที่ยงจิตต์. 2545. **"การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อ การชักนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จินตนา ไทยลิ้มทอง และ ลาวัลย์ สุธนมนตรี. 2536. **"การใช้ซิลเวอร์ไธโอซัลเฟตก่อนเก็บเกี่ยวเพื่อยืดอายุการปักแจกันของดอกบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก."** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ไชยา-ลาวัลย์ (นามแฝง). 2533. **การปลูกบัว.** พิมพ์ครั้งที่ 2. ม.ป.ท.

ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย. 2539. **"ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง."** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณพพร ดำรงศิริ. 2530. **พฤกษอนุกรมวิธาน.** กรุงเทพฯ : น่ำกังการพิมพ์.

ดวงนภา นิติกรวรากุล. 2552. **"ผลของสูตรอาหารพื้นฐานและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเอื้องพร้าว *Phaius tancarvilliae* (Bank ex I' Heritier) Blume ใน**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพปลอดเชื้อ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธนพรรณ พร้อมมูล. 2538. **“ผลของ IAA และ 2iP ต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ.”** ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2540. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** ขอนแก่น : โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และ เสริมลาภ วสุวัต .2547. **บัวประดับในประเทศไทย** .กรุงเทพฯ.เนชั่นบุ๊ค .

ปรีชา ประเทพา .2543. **เทคโนโลยีชีวภาพ : การปรับแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรทิพย์ จิรกิตยางกูร. 2537. **“ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ.”** ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2545. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร:เทคนิคการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม** .ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ : วิชัยการพิมพ์.

ภัควดี ภักดีงาม. 2545. **“การศึกษาผลของแสงร่วมกับ α-Napthalene acetic acid และ Benzyladenine ต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.”** ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ภัควดี ภักดีงาม. 2548. **“การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและแสงต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.”** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ภูวดล บุตรรัตน์. 2538. **โครงสร้างภายในพืช.** กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.

มณฑิรา ไชยตะญากูร. 2545. **“การชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอมบริโอจีนีซีสของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช.”** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540 **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วาสนา มิตรานนท์. 2527. **"การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง (*Nelumbo Adams*) ในประเทศไทย."** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาสินี ลีทวีทรัพย์. 2550. **"การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและปัจจัยแสงที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก และการทดสอบความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีน."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิลาสินี ลีทวีทรัพย์. 2554. **"การถ่ายยีน Antisense ของ Dihydroflavonal 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ."** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2543. "เทคนิคการถ่ายยีนกับการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย." หน้า 109-111. **การสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชครั้งที่ 13 : เทคโนโลยีใหม่พันธุ์พืชใหม่.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520. **ทะเบียนพันธุ์ไม้ประดับ.** กรุงเทพฯ : บพิธการพิมพ์.

สายชล เกตุษา. 2531. **เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวดอกไม้.** กรุงเทพฯ : บริษัทสารมวลชน.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. **พรรณไม้น้ำ.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542. **พรรณไม้น้ำในประทศไทย.** กรุงเทพฯ : อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล .2548. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุเม อรัญนารถ. 2536. **เอกสารประกอบการสอน : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชเพื่อการเกษตร.** ภาควิชา พืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

สุเมธ อินทมาตย์. 2536. **"การศึกษาเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เสริมลาภ วสุวัต. 2537. **บัว : ไม้ดอกไม้ประดับ.** กรุงเทพฯ : อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร.2537. **"การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเพิ่มปริมาณ บัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ในสภาพปลอดเชื้อ."** ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Arnold, V.S. and T. Eriksson. 1989. "*In vitro* syudies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta.*" **Canadian Joural of Botany.** 58: 870-874.

Al-Juboory, H.K. and J.D. Williams. 1990. "*In vitro* propagation of Algerain Ivy (*Hedera canariensis* L.)." **HortScience.** 25(9) : 1123-1124.

Backer, C.A. and R. C. Bakhuizen Van Den Brink. 1963. **Flora of Java.** Netherland (Groningen): N.V.P. Noordhoff.

Benítez, S.F., J.F.J. Bremont, S.R. Mendoza, G.R.A. Astorga, R.C. Collazo and A.G.A. Solís. 2007. "Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobavterium tumefaciens* and particle bombardment." **Plant Cell Tissue Organ Culture.** 91 : 215-224.

Birch, R. G. and R. Bower. 1994. "Principle of Gene Transfer using Partiple Bombardment." 4-37. in Yang, N.S. and P. Christou. **Particle Bombardment Technology for Gene Transfer.** Oxford : Oxford University Press

Burkill, I.H. 1996. **A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula.** Vol. 11. Ministry of Agriculture and Cooperative. Kuala Lumpur.

Caltin, D.W. 1990. "The effect of antibiotics on the inhibition of induction and plant regeneration from cotyledons of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) **Plant Cell Report.** 9: 285-288.

Compton, M.E. and D.J. Gray.1993. "Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Cotyledons of Watermelon." **Plant Cell Reports.** 12(2) : 61-65.

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

Davies, K.M. and K.E. Schwinn. 1997. "Flower colour pp." 259-294. in Geneve, R.L., J.E. Preece and S.A. Merkle. **Biotechnology of Ornamental Plants.** UK University Press

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

Dixon, R.A. and R.A. Gonzales. 1994. **Plant Cell Culture : A Practical Approach.** New York : TRL Press.

Dodds, M.S. and W.R. Roberts. 1995. **Experiments in Plant Tissue Culture.** New York : Cambridge University Press.

Gill, R. and P.K. Saxena. 1993. "Somatic embryogenesis in *NicotianaTabacum* L. : Induction by Tridiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs." **Plant Cell Reports.** 12 : 154-159.

Gillbert, S. 1982. "The culture of Water Lilies and Water Lotuses." **Horticulture.** August : 16-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Giridhar, P., E.P. Indu, G.A. Ravishankar, and A. Ghandrasekar. 2004. "Influence of Triacontanol on somatic embryogenesis in *Coffea Arabica* L. And *Coffea Canephora* P. EX FR. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant.** 40 : 200-203.

Gondo, T., J. Matsumoto, S.I. Tsuruta, M. Yoshida, A. Kawakami, F. Terami, M. Ebina, T. Yamada and R. Akashi. 2009. "Particle Inflow gun-mediated transformation of multiple-shoot clumps in rhodes grass)*Chloris gayana*." **Plant Phiology.** 166 : 435-441.

Jheng, F.Y., Y.Y. Do, Y.W. Liauh, J.P. Chung and P.L. Huang.2006. "Enchancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of oncidium (Gower Ramsey) by Adjusting Carbohydrate Sources." **Plant Science.** 170 : 1133-1140.

Karami, O., A. Deljou, and A.M. Pour. 2006. "Repettitive Somatic Embryogenesis in Carnation on Picloram Supplemented Media." **Plant Growth and Development.**

Kaur, P. and S.L. Kothari. 2004. "*In vitro* culture of Kodo Millet : Influence of 2,4-D and Picloram in Combination with Kinetin on Callus Initiation and Regeneration." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 77 : 73-79.

Kim, S., M.L. Binzel, S. Park, K.S. Yoo and L.M. Pike. 2004. "In activation of *DFR* (Dihydroflavonol 4-reductase) gene transcription result in blockage of anthocyanin production in onions (*Allium cepa*)." **Molecular breeding.** 14 : 253-263.

Kim, J.B., C.J.J.M. Raemakers, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 2006. "Efficient somatic embryogenesis in *Alstroemeria*." **Plant Cell and Organ Culture.** 86(2): 233-238.

Kozak, D. and M. Stelmaszczuk. 2009. "The effect of benzyladenine on shoot regeneration *in vitro* of *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddes'." **Horticultura.** 19(1): 14-18

Kuai, B., S. Perret, S.M. Wan, S.J. Dalton, A.J.E Bettany and P. Morris. 2001. "Transformation of oat and inheritance of bar gene expression." **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 66 : 79-88 .

Lee, W.S., J.A. You, H. Chung, Y.H. Lee, N.I. Baek, J.S. Yoo and Y.D. park. 2008. "Molecular cloning and biochemical analysis of dihydroflavovol 4 –reductase (DFR) from *Brassica rapa* ssp. *pekinesis* (Chinese cabbage) using a heterologus system." **Plant Biology.** 51(1): 42-47.

Lin, H.S., C. Van der Toorn, K.J.J.M. Raemakers, R.G.F. Visser, M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 2000a. "Development of a plant regeneration system based on Friable Embryogenic Callus in the Ornamental Alstroemeria." **Plant Cell Reports.** 19 : 529-534.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin, H. S., C.V.D. Toorn, K.J.J.M. Raemakers, R. G.F. Visser, M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 2000b. "Genetic transformation of *Alstroemeria* using particle bombardment." **Molecular Breeding.** 6 : 369-377.

Mitra, G.C., R.N. Prasad and R.A. Choudhury. 1976. "Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed callus of orchid correlative changes in its free amino acid content." **Indain Journal Experimental Biology.** 14 : 350-351.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum.** 15(3) : 473-497.

Murashige, T. and D.P.H. Tucker. 1962. "Growth factor requirement of citrus tissue culture." **Proceedings of the first international citrus symposium.** 3 : 1155-1161.

Murthy, B.N.S. 1996. "Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) Cotyledonary Cultures." **Plant Cell Reports.** 15(6) : 423-426.

Murthy, B.N.S. and Saxena, P.K. 1998. "Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Jass)." **Plant Cell Reports.** 17(6-7) : 469-475.

Nakayama. T., K. Yonekura-Sakakibara, T. Sato, S. Kikuchi, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, T. Ueda, M. Nakao, Y. Tanaka, T. Kusumi and T. Nishino. 2000. "Aureusidin synthase : a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration." **Science.** 290(5490): 1163-6.

Neuman, C.M. 1993. "Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern Black Walnut." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 32 : 9-18.

Neill, S. O. 2002. **"The functional role of anthocyanin in leaves."** Ph.D. Thesis of University of Auckland.

Provost, G.L., R. Herrera, J.A. Paiva, P. Chaumeil, F. Salin and C. Plomion. 2007. "A micromethod for high throughput RNA extraction in Forest trees." **Biological Research.** 40: 291-297.

Przetakiewicz, A., Orczyk, W. And Nadolska-Orczyk, A. 2003."The effect of auxin on plant regeneration of Wheat, Barley and Triticale." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 73 : 245-256.

Ravindra, B.M., S.M. Gangadhar and K. Nataraja. 2005. "Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections." **Journal of Plant Physiology.** 162 : 473-478.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ries, S.K., V.F. Wert, C.C. Sweeley and R.A. Leavitt. 1977. "Triacontanol : A new natural occurring plant growth regulator." **Science.** 195 : 1339-1341.

Rosati, C., P. Simoneau, D. Treutter, P. Poupard, Y. Cadots, A. Cadic and M. Duroni. 2003. "Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway." **Molecular Breeding**. 12 : 197-208.

Sambrook, J., E.F. Fritschi and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual.** New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Singh, G. 2004. **Plant System and Intergrated Approach.** United Kingdom: Science Publishers.

Shou, S.Y., L.X. Miao, W.S. Zai, X.Z. Huang and D.P. Guo. 2008. "Factors influencing shoot multiplication of lotus (*Nelumbo nucifera*.)" **Biologia Plantarum.** 52(3): 529-532.

Stefanello, S. Dal Vesco, L.L., Ducroquet, J.P.H.J., Nodari, R.O. and Guerra, M.P. 2005. "Somatic embryogenesis from floral tissues of Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.) **Scientia Horticulturae.** 105 : 117-126.

Sunnichan, V.G. 1998. "Micropropagation of Gum Karaya (*Sterculia urens*) by adventitious shoot formation and somatic embryogenesis." **Plant Cell Reports.** 17(12) : 951-956.

Tantos, A., A. Meszaros and J. Kissimon. 1999."The effect of triacontanol on micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L." **Plant Cell Reports.** 19 : 88-91.

Tsuda, S., Y. Fukui, N. Nakamura, Y. Katsumoto, K. Y. Sakakibara, M.F. Mizutani, K. Ohira, Y. Ueyama, H. Ohkawa, T.A. Holton, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2004. "Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering." **Plant Biotechnology.** 21(5): 377-386.

Um, M.K., T.I. Park, Y.K. Kim, H.Y. Seo, J.G Kim, S.Y. Kwon, S.S. Kwak, D.J. Yun and S.J. Yun. 2007. "Particle bombardment-mediated transformation of barley with an *Arabidopsis* NDPK2 cDNA." **Plant Biotechnology Report.** 1 :71-77.

Van der Krol. A.R., L. A. Mur, M. Beld, J.N.M. Mol and A.R. Stuitje. 1990. "Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." **The Plant Cell.** 2 : 291-299.

Visessuwan, R., Kawai, T and Mii, M. 1997. "Plant regeneration system from leaf segment culture through embryogenic callus formation of Rosa Hybrida and R. *canina*." **Breeding Science.** 47 : 217-222.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Visser, C., Qureshi ,J.A., Gill, R and Saxena, P.K. 1992. "Morphoregulatory role of tridiazuron substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis hypocotyl cultures." **Plant Physiology.** 99 : 1704-1707.

Visarada, K.B.R.S. and N.P. Sarma. 2004. "Transformation of indica rice through particle bombardment : factors influencing transient expression and selection." **Biologia Plantarum.** 1 : 25-31.

Yao, J.L., J.H. Wo, A.P. Gleave and B.A.M. Morris. 1996. "Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos." **Plant Science.** 113 : 175-183.

Yang C., T. Zhao, D. Yu and J. Gai. 2009. "Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* L. Merr.) impacts of mannitol, abscisic acid and explants age." **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.** 45 : 180-188.

Yong, W.T.L. and J.O. Abdullah. 2009. "Agrobacterium-mediated transformation of *Melastoma malabathricum* and *Tibouchina semidecandra* with sense and antisense dihydroflavonol 4-reductase (DFR) genes." **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 96 : 59-67.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 ปริมาณสารเคมีในสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSo_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSo_4.4H_2O$	22.3
$ZnSo_4.7H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSo_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6\ H_2O$	0.025
$FeSo_4.7H_2O$	27.8
Na_2EDTA	37.8
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Glycine	2.0
Sucrose	30,000
pH	5.5-5.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	10	กรัมต่อลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัมต่อลิตร)

2. Histochemical staining for GUS activity

การเตรียม GUS staning solution

80 mM sodium phosphate buffer [pH 7.0]

0.4 mM potassium ferricyanide

0.4 mM potassium ferrocyanide

8 mM EDTA

0.05% Triton X-100

0.8 mg/l 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide

2.1 การเตรียม stock

0.1 M $NaPO_4$	ปริมาตร 100 ml	ชั่งสาร 13.799 g
0.1 M potassium ferricyanide	ปริมาตร 10 ml	ชั่งสาร 3.2925 g
20 mM potassium ferrocyanide	ปริมาตร50 ml	ชั่งสาร 4.2239 g
0.2 M Na_2EDTA	ปริมาตร 10 ml	ชั่งสาร 3.7224 g

2.2 การเตรียมสารละลาย Buffer

H_2O	ปริมาตรดูดจากstock 8.4 ml
50 mM NaH_2(PO4)	ปริมาตรดูดจากstock 10 ml
0.5 mM	ปริมาตรดูดจากstock 0.1 ml
0.5 mM potassium ferrocyanide	ปริมาตรดูดจากstock 0.5 ml
10 M Na_2EDTA	ปริมาตรดูดจากstock 1.0 ml
total	ปริมาตรดูดจากstock 20 ml

Filter-sterilize using 0.2 micro filter. เก็บไว้ในที่มืด 4^0c

2.3 เตรียม X-gluc substrate โดยชั่งสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide จำนวน 5 mg ละลายใน dimethylformamide 50 µl เตรียมใหม่ทุกครั้งหรือเก็บ stock ไว้ที่ -20^0c

2.4 เติม X-gluc substrate ที่ได้จากข้อ 3 ลงในสารละลาย buffer ในข้อ 2 ปริมาตร 8 ml

2.5 เติม Triton X-100 ปริมาตร 2 µl ลงในสารละลายที่เตรียมได้ เก็บไว้ในที่มืดในน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 นำมาทดสอบในเนื้อเยื่อโดยหยดสารละลายให้ท่วมเนื้อเยื่อที่ทดสอบ บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเกิดสีน้ำเงิน

2.7 ล้างเนื้อเยื่อด้วย 70% ethanol

3. ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

3.1 บัฟเฟอร์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

Extraction buffer 50 ml

Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA	50 mM
NaCl	500 mM
20% SDS	3.5 ml
β-mercaptoethanol	35 µl

3.2 บัฟเฟอร์สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอจากพืช

2% CTAB

2% polyvinylpurrolidone (PVP) K-30 (soluble)

Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	2 M
Spermidine (free base)	0.5 g/l

2% β-mercaptoethanol

3.3 STE buffer

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

4. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

นำไปสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel extraction kit (Geneaid) โดยตัดเจลตามขนาดที่ต้องการ แล้วนำไปชั่งปริมาณ 300 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโคร เซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด จากนั้นปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน DF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใน DF column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube เติมบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย DF column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที จึงเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววรวีวรฐ บัวทอง
วัน/เดือน/ปี เกิด	1 สิงหาคม 2527
ที่อยู่	880 จรัญสนิทวงศ์ 57 แขวงบางบำหรุ เขตบางพลัด กทม. 10700
ปี พ.ศ. 2546-2549	ศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. สาขาวิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปี พ.ศ. 2550-2553	ศึกษาระดับปริญญาโท วท.ม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้