วิทยานิพนธ์

การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อ การถ่ายยีนในปทุมมา

DEVELOPMENT OF CALLUS CULTURE SYSTEM FOR GENETIC TRANSFORMATION IN PATUMMA (*CURCUMA ALISMATIFOLIA* GAGNEP.)

นางกัลยา รัตนถาวรกิติ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชสวน	พืชสวน
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการถ่ายยีนในปทุมมา

Development of Callus Culture System for Genetic Transformation in Patumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

นามผู้วิจัย นางกัลยา รัตนถาวรกิติ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรวิช วรรณไกรโรจน์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิตราพรรณ พิลึก, วท.ม.)

กรรมการ .....

(อาจารย์อนวัช สุวรรณกุล, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์สุรียา ตันติวิวัฒน์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สุรศักดิ์ นิลนนท์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... **เดือน**..... **พ.ศ.**.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการถ่ายยีนในปทุมมา

Development of Callus Culture System for Genetic Transformation in Patumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

โดย

นางกัลยา รัตนถาวรกิติ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2550

กัลยา รัตนถาวรกิติ 2550: การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการถ่ายยีนในปทุมมา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรวิช วรรณไกรโรจน์, Ph.D. 86 หน้า

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนจากปลาย กลาง และโคนของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0, 0.25, 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพมืด แสงสีขาว แสงสีแดงหรือแสงสีน้ำเงิน นาน 12 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอด พบว่า เกิดต้นมากที่สุดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีขนาดใหญ่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงเกิดต้นซึ่งสูงมากที่สุด ในขณะที่สภาพแสงสีขาวมีผลให้เกิดขนาดของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด โดยตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกไม่มีผลต่อจำนวนต้นและความสูงต้น

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพมืด แสงสีขาว แสงสีแดงหรือแสงสีน้ำเงิน นาน 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 - 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน ขณะที่สภาพแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงส่งเสริมให้เกิดแคลลัสดีกว่าแสงสีขาวและสภาพมืด โดยที่ชิ้นพืชซึ่งเพาะเลี้ยงอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงสีแดงมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 91.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้อัตราที่แคลลัสเกิดยอดได้สูงที่สุดคือ 14.54 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเติบโตของแคลลัสปทุมมาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสสามารถเติบโตได้บนอาหารที่เติมซีโฟแทกซีม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการเติบโตของแคลลัสปทุมมา การทดลองถ่ายยีน *gus* เข้าสู่แคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA1305.1) พบว่า การบ่มแคลลัสร่วมกับ *Agrobacterium* นาน 30 นาที สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS assay

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Kanlaya Rattanathawornkiti 2007: Development of Callus Culture System for Genetic Transformation in Patumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.). Master of Science (Agriculture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Assistant Professor Surawit Wannakrairoj, Ph.D. 86 pages.

Distal, middle and proximal parts from young inflorescent of Patumma 'Chiang Mai' were cultured on modified MS medium supplemented with 10 mgl^{-1} BA and 0.1 mgl^{-1} IAA or supplemented with 0, 0.25, 0.5 or 1 mgl^{-1} TDZ with 4 mgl^{-1} IMA under dark, white light, red light or blue light condition. After 12 weeks, explants cultured on the medium containing 10 mgl^{-1} BA and 0.1 mgl^{-1} IAA gave the highest number of shoots. The media supplemented with 0.1-1 mgl^{-1} TDZ and 4 mgl^{-1} IMA yielded clumps of retarded multiple shoot of non-significant different size. Red light gave the tallest shoots while the white light gave the largest clumps of retarded multiple shoot. There was no significant effects of difference parts of inflorescent on number of shoots and shoot height.

Callus of Patumma were induced from pseudostem-base explants by cultured on modified MS media supplemented with 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 or 3.0 mgl^{-1} 2,4-D in combination with 0, 0.01 or 0.05 mgl^{-1} TDZ under dark, white light, red light or blue light condition. After 4 weeks, percentages of callus formation from explants cultured on medium containing 1.0-2.5 mgl^{-1} 2,4-D were no difference. Blue and red light were more effective on callus induction than white light or dark condition. Explants cultured on the medium supplemented with 1.5 mgl^{-1} 2,4-D and 0.05 mgl^{-1} TDZ under red light were best for callus induction of 91.67 %. When transferred the callus that initiaed on the medium supplemented with 0.5 mgl^{-1} 2,4-D and 0.01 mgl^{-1} TDZ to the medium supplemented with 0.05 mgl^{-1} TDZ, the highest frequency of shoot formation at 14.54 % was resulted.

A study on the effect of antibiotics on growth of the callus of Patumma was conducted for 4 weeks. The highest concentration of cefotaxime that callus could grow was 300 mgl^{-1}, while 150 mgl^{-1} hygromycin was sufficient for inhibition of callus growth. A *gus* gene transformation into the callus of Patumma by using *Agrobacterium tumefacience* strain LBA4404 (pCAMBIA1305.1) revealed that 30 minutes co-cultivation yield GUS-positive calli.

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุรวิช วรรณไกรโรจน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนกรุณาตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ.จิตราพรรณ พิลึก กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร.อนวัช สุวรรณกุล กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร.สุรียา ตันติวิวัฒน์ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ผศ.ดร.พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ศรปราชญ์ ธโนศวรรยางกูร และอาจารย์ กนกวรณ ถนอมจิตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวัดความยาวคลื่นแสงและความเข้มแสงที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณวิจิตร รัตนถาวรกิติ และ ด.ช. จิรายุส รัตนถาวรกิติ ที่ให้การช่วยเหลือสนับสนุนที่เป็นกำลังใจที่สำคัญระหว่างทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา ขอขอบคุณ คุณอิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร คุณสมนึก ชัยดรุณ คุณมณฑินี กมลธรรม ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ และพี่ชายที่มอบความรัก เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาเสมอมา

กัลยา รัตนถาวรกิติ

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลอง	21
วิจารณ์	60
สรุป	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สภาพการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 4 แบบ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 3 ชนิด ซึ่งมีความเข้มแสงที่ใช้สังเคราะห์แสงได้ (Photosynthetic Photron Flux) และความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ	17
2	อัตราการตายของเนื้อเยื่อ (เปอร์เซ็นต์) จากช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ หลังเพาะเลี้ยง บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้สภาพแสง 4 แบบ นาน 12 สัปดาห์	21
3	จำนวนต้น ความสูงต้นและจำนวนรากซึ่งเกิดจากชิ้นส่วนตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	23
4	จำนวนต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	24
5	จำนวนต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	24
6	จำนวนต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอกบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	25
7	ความสูงต้น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	27
8	ความสูงต้น (เซนติเมตร) ที่ได้จากชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	27
9	ความสูงต้น (เซนติเมตร) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอกบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	28
10	จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	30
11	จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ บนอาหาร 6 สูตร นาน 12 สัปดาห์	30

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	31
13	จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	32
14	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	34
15	ขนาดของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	35
16	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	36
17	ความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	38
18	ความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์	39
19	อัตราการเกิดแคลลัสของชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสง 4 แบบ นาน 4 สัปดาห์	44
20	อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่าง ๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาพมืด นาน 4 สัปดาห์	46
21	อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่าง ๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้แสงสีขาว นาน 4 สัปดาห์	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
22	อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่าง ๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสงสีแดง นาน 4 สัปดาห์	48
23	อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่าง ๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้แสงสีน้ำเงิน นาน 4 สัปดาห์	49
24	อัตราการเกิดยอดและไรซอยด์ (เปอร์เซ็นต์) จากแคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D และ TDZ นาน 5 สัปดาห์	51
25	อัตราการเกิดยอดและไรซอยด์ (เปอร์เซ็นต์) ของแคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 5 สัปดาห์	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ในระยะที่กลีบประดับยังหุ้มปิดสนิท	16
2	ลักษณะของต้นและ กลุ่มยอดที่แคระเกร็นของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้สภาพแสงต่าง ๆ นาน 12 สัปดาห์	40
3	ลักษณะของต้นและ กลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่เกิดจากชิ้นพืชจากตำแหน่งต่างๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงต่าง ๆ นาน 12 สัปดาห์	41
4	การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาการของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัส นาน 4 สัปดาห์	45
5	การพัฒนาเป็นยอดของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 1-5 สัปดาห์	53
6	การพัฒนาเป็นไรซอยด์ของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 1-5 สัปดาห์	53
7	การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็นยอดและไรซอยด์ของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ นาน 1-5 สัปดาห์	54
8	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมซีโฟแทกซีมระดับต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์	55
9	แคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมซีโฟแทกซีมระดับต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์	56
10	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมไฮโกรมัยซินระดับต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์	57
11	แคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมไฮโกรมัยซินระดับต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์	58
12	การติดสีน้ำเงินจากการแสดงออกยีน *gus* ของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
1	Spectrum ของแสงสีขาว จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ PHILIPS TL-D36/54 Day light	83
2	Spectrum ของแสงสีแดง จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ TOSHIBA FL40S.RE 40W	84
3	Spectrum ของแสงสีน้ำเงิน จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ T.F.C. FL40 SBT8/38 Blue	85

การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการถ่ายยีนในปทุมมา

Development of Callus Culture System for Genetic Transformation in Patumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

คำนำ

ปทุมมาเป็นไม้ดอกประเภทหัวเขตร้อนที่ได้รับความนิยมในต่างประเทศซึ่งปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถาง โดยมีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาไปยังหลายประเทศ ได้แก่ เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น โปรตุเกส เยอรมัน ยุโรป ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา จีน เกาหลี โดยมีปริมาณการส่งออกในปี 2541-2547 ไม่ต่ำกว่า 2 ล้านหัว มูลค่าตั้งแต่ 16-29 ล้านบาท ทั้งนี้แนวโน้มความต้องการหัวพันธุ์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ พื้นที่ปลูกปทุมมาในประเทศไทยมีประมาณ 400 ไร่ โดยมีแหล่งผลิตหัวพันธุ์ที่สำคัญอยู่ในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และพะเยา (อรวรรณ, 2548) แต่มีปัญหาในการควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลผลิตเนื่องจากโรคเหี่ยวหรือโรคหัวเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (เบ็ญจรงค์ และคณะ, 2542; กรมวิชาการเกษตร, 2545) ซึ่งเป็นโรคที่ร้ายแรงที่สุดสำหรับพืชสกุลนี้ การใช้พันธุ์ต้านทานเป็น แนวทางที่ดีที่สุดในการแก้ไขปัญหานี้

การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมพันธุ์ต้องใช้ทั้งระยะเวลาและแรงงานสูงในการปลูกและคัดเลือก นอกจากนี้การขาดเชื้อพันธุ์ที่ต้านทานโรคเหี่ยวยังเป็นอุปสรรคสำคัญในการผสมพันธุ์ปทุมมาให้ต้านทานโรค ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ถ่ายยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ สู่พืชเพื่อสร้างพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) กันอย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้พืชที่มีลักษณะที่ดีเพิ่มเติม 1-2 ลักษณะในเวลาอันรวดเร็ว เช่น การเพิ่มอายุการใช้งานและความต้านทานโรคเข้าสู่ Alstoemeria, Gladiolus, Hyacinth และ Lily การสร้างพืชให้มีสีและรูปแบบของพืชตามต้องการในพิทูเนียหรือการเพิ่มอายุการใช้งานของดอกใน Daylily (Deroles *et a*l., 2002) เป็นต้น

สำหรับปทุมมายังไม่มีข้อมูลการศึกษาถึงการชักนำให้เกิดแคลลัสและวิธีการถ่ายยีนที่เหมาะสมซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญในงานด้านพันธุวิศวกรรม ดังนั้นจึงทำการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ตลอดจนปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ปทุมมาต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำต้นจากช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

2. เพื่อหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

3. เพื่อเปรียบเทียบหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดจากแคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

4. เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงเงื่อนไขและสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ปทุมมาเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่มีเนื้อไม้อายุหลายปี อยู่ในสกุลขมิ้น (*Curcuma*) ของวงศ์ขิง (Zingiberaceae) พืชสกุลนี้มีลำต้นใต้ดินทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหาร เรียกว่า เหง้า (rhizome) ตาข้างของเหง้าจะเจริญเติบโตเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) อยู่เหนือดิน โดยลำต้นเทียมนั้นเกิดจากกาบใบที่ห่อตัวกันแน่น ก้านใบชูออกจากลำต้นเทียม ใบเป็นใบเดี่ยว มีลักษณะแผ่ตั้งแข็งแรงรูปร่างรีค่อนข้างกว้าง แผ่นใบสีเขียว เส้นกลางใบอาจมีสีม่วงแดง ช่อดอกเกิดจากส่วนปลายของลำต้นเทียมโดยมีลักษณะช่อดอกเป็นแบบช่อแน่น (compact spike) ประกอบด้วยกลีบประดับ (bract) และดอกจริง โดยมีกลีบประดับโอบรอบโคนช่อดอกย่อย ทั้งนี้กลีบประดับเรียงซ้อนกันเกิดเป็นช่อทรงกระบอก เอกลักษณ์อย่างหนึ่งของพืชสกุลนี้คือ ส่วนของโคนกลีบประดับส่วนล่างเชื่อมติดกันเกิดเป็นลักษณะคล้ายถ้วย ปทุมมามีกลีบประดับด้านล่างจำนวน 7-10 ใบ มีสีเขียว โดยอาจมีสีชมพูแต้มบริเวณด้านข้างเล็กน้อย สำหรับกลีบประดับส่วนบนของช่อนั้นจะไม่มีช่อดอกย่อย มีสีขาว ชมพู ม่วงแดง หรือ ม่วงน้ำเงิน ปลายกลีบประดับ มักมีสีเขียวมักจะยาวกว่ากลีบประดับส่วนล่างเล็กน้อยมีจำนวน 6-15 กลีบ และอาจจะปลายโค้งเข้าสู่แกนก้านช่อหรือปลายโค้งออก กลีบประดับส่วนบนนี้มีชื่อว่า coma bract หรือกลีบประดับชนิด coma ช่อดอกย่อยที่อยู่ในซอกกลีบประดับมีดอกจริงอยู่ประมาณ 2-7 ดอก ซึ่งเป็นดอกที่ไม่มีก้านดอก ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 3 กลีบ อยู่เหนือรังไข่เชื่อมกันเป็นหลอดหุ้มส่วนโคนของกลีบดอกไว้ซึ่งกลีบดอกเองนั้นก็มีโคนที่เชื่อมกันเป็นหลอดแต่ปลายแยกเป็นกลีบ 3 กลีบ เกสรเพศผู้วงนอกเป็นหมัน 3 อัน ถูกเปลี่ยนรูปเป็นกลีบ 3 กลีบ เรียกว่า กลีบสเตมิโนด (petaloid staminode) โดยมี 1 กลีบเปลี่ยนรูปเป็นปาก เกสรเพศผู้วงในมีก้านชูเกสรเพศผู้ 3 อันเชื่อมรวมกันโอบหุ้มก้านชูเกสรเพศเมียไว้ เกสรเพศผู้นี้ลดรูปไป 1 อัน เหลืออับละอองเรณู 2 อันที่อยู่ด้านเดียวกับปากเท่านั้น ซึ่งทำหน้าที่ตามปกติ รังไข่อยู่ใต้กลีบเลี้ยง ดอกในช่อย่อยเดียวกันจะบานห่างกัน 2-6 วัน โดยดอกในกลีบประดับบริเวณโคนช่อจะบานก่อน ดอกบานเพียง 1 วัน จำนวนดอกที่บานในแต่ละช่อ อาจมีเพียงดอกเดียวหรือหลายดอกต่อวัน ภายหลังการปฏิสนธิรังไข่ซึ่งเกิดจากผนังรังไข่ 3 ชิ้นเชื่อมกันจะเจริญเป็นผลที่มี 3 พู ภายในมีเมล็ดรูปร่างและขนาดคล้ายเมล็ดองุ่น ผลมีอายุประมาณ 1-2 เดือน ผลแก่มีผนังบางและเมล็ดแก่สีน้ำตาลเข้ม เมล็ดมักมีการพักตัวเหมือนกับการพักตัวของเหง้า หัวปทุมมามีสีน้ำตาล ผิวเปลือกเป็นร่องชั้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-3 เซนติเมตร ยาว 3-4 เซนติเมตร มีรากเป็นระบบรากฝอย ปลายรากส่วนหนึ่งจะบวมพองออกมี

ลักษณะเป็นตุ้มทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำและอาหาร เพื่อใช้ในช่วงพักตัวและช่วยในการงอก (สุรวิช, 2539; อรวรรณ, 2548)

ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าที่มีการปลูกและมีการส่งออกมากที่สุด และนิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์ มีลำต้นสูง 40-45 เซนติเมตร แตกกอจำนวน 10-15 หน่อต่อกอ ใบแผ่ตั้งแข็งแรงใบรีค่อนข้างกว้างขนาด 6x24 เซนติเมตร แผ่นใบสีเขียว เส้นกลางใบสีม่วงแดง ก้านช่อดอกตั้งตรงแข็งแรง ยาว 60-70 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร กลีบประดับส่วนบนมีสี กลีบกว้าง จำนวน 13-15 กลีบ เรียงเป็นวงสลับกันคล้ายดอกบัวตูม ดอกจริงมีสีขาว ปากล่างสีม่วง จำนวนดอก 5-8 ดอกต่อช่อ (กรมวิชาการเกษตร, 2545)

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 การชักนำแคลลัสในพืชวงศ์ Zingiberaceae

Malamug *et al.* (1991) สามารถชักนำแคลลัสจากส่วนยอดของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) พันธุ์ Kintoki บนอาหารที่มีธาตุอาหารหลักจากสูตร MS และธาตุอาหารรองจากสูตร Ringe and Skoog (1968) ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำให้เป็นต้นได้ในอาหารที่เติม BA เข้มข้น 1 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Mello *et al.* (2001) สามารถชักนำให้ส่วนของรากจากต้นปลอดเชื้อของขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoris* Roscoe) เกิดแคลลัสได้บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด และแคลลัสดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นตาได้ภายในระยะเวลา 70 วันในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน และพัฒนาเป็น nodular structure ภายใน 30 วัน เมื่อย้ายลงในอาหารแข็งที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพที่มีแสงจึงเกิดต้นที่สมบูรณ์

Prakash *et al.* (2004) ชักนำแคลลัสจากกาบใบของ *Curcuma amada* Roxb.ขนาด 50 ตร.มม. ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เริ่มเกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมหลังเพาะเลี้ยง 7-10 วัน โดยเกิดแคลลัสจำนวนมากเมื่อใช้ 2,4-D

เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกิดเป็นต้นได้ประมาณ 8 ± 0.32 ยอดต่อแคลลัสเมื่อย้ายลงอาหารที่มี BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Rahman *et al.* (2004) ชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วน leaf base ของเปราะหอม (*Kaempfer galangal* L.) ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 7 สัปดาห์ เมื่อย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดเป็นต้นได้ภายใน 5 สัปดาห์

Gayatri *et al.* (2005) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากตาของขมิ้น (*Curcuma longa* L.) พันธุ์ Suguna ที่มีขนาด 0.5-1 เซนติเมตร โดยใช้อาหารสูตร Linsmaier and Skoog's Basal Medium (LSBM) ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 15 วัน และสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ในอาหารสูตร LSBM ที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 35 วัน

Malabadi *et al.* (2005) เพาะเลี้ยงส่วนของเหง้าเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen) Sm.) ในอาหารสูตร B5 ที่เติมน้ำตาลทราย เข้มข้ม 30 กรัมต่อลิตร, p-aminobenzoic acid เข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร, biotin เข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร, folic acid เข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร, myo-inosital เข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร, L-glutamine เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร, casein hydrolysate เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ Triacontanol (TRIA) เข้มข้น 0, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TRIA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสสีเขียวภายใน 3 สัปดาห์ และพัฒนาเป็นโครงสร้างคล้ายตาใน 3 สัปดาห์ต่อมา และเมื่อเปลี่ยนอาหารใหม่อีก 2 สัปดาห์จึงเกิดต้นที่มีใบ 2-3 ใบ

2.2 ผลของแสงต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

Muleo and Morini (1990) เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Actinidia deliciosa* สายพันธุ์ Hayward ภายใต้แสงสีน้ำเงิน แสงสีแดง แสงสีขาว ที่มีความเข้มแสงเท่ากัน และแสงสีแดงที่มีความเข้มแสงต่ำอีก 2 ระดับ พบว่า แสงสีแดงที่ความเข้มสูงสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และเกิดรากได้ทุกสภาพแสง โดยภายใต้แสงสีแดงเกิดรากได้เร็วที่สุด

Morini *et al.* (2000) ศึกษาผลของการใช้ 2,4-D และคุณภาพของแสงที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ quince โดยเพาะเลี้ยงส่วนของใบบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 หรือ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซิลเวอร์ไนเตรต เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2, 4 และ 6 วันก่อนย้ายลงอาหารแข็งสูตรเดิมที่เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแสงต่างๆ กัน คือ แสงสีแดง แสงสีแดงร่วมกับแสงสีน้ำเงิน แสงสีขาว แสงสีน้ำเงิน แสงฟาร์-เรดร่วมกับแสงสีน้ำเงิน และสภาพมืด เป็นเวลา 25 วันก่อนนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเดิมในสภาพแสงสีขาว พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารเหลวที่เติม 2,4-D เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 วัน โดยมีเพียงการใช้แสงฟาร์-เรดร่วมกับแสงสีน้ำเงินเท่านั้นที่ทำให้อัตราการเกิดแคลลัสต่อพื้นที่ใบต่ำ

Islam *et al.* (2001) ศึกษาคุณภาพแสง ความเข้มแสงและแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นของกล้วยไม้ฟาแลนนอฟซีสลูกผสม พบว่า แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ภายใต้ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บนอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการใช้มอลโทสและซอบิทอล แคลลัสจะมีการเจริญเติบโตได้ดีในสภาพความเข้มแสงสูง คือ 100 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่วนการได้รับ แสงสีขาว แสงสีแดง แสงสีเหลือง แสงสีน้ำเงิน แสงสีเขียว พบว่า แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีภายใต้แสงสีแดงและแสงสีเหลืองบนอาหารที่เติมซูโครส และพัฒนาเป็น PLBs บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมมอลโทสหรือซอบิทอลภายใต้แสงสีแดงหรือแสงสีเหลืองได้ไม่แตกต่างกับการใช้แสงสีขาว และพบว่า ภายใต้สภาพแสงสีน้ำเงินและแสงสีเขียวมีผลยับยั้งการเกิด PLBs และไม่พบการพัฒนาเป็น PLBs จากแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใช้ซูโครส

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมา

Wannakrairoj (1992) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปทุมมาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 0, 6.67, 13.32, 19.98 และ 26.64 ไมโครโมลาร์ หรือ kinetin เข้มข้น 0.19, 0.56, 1.67 และ 5 ไมโครโมลาร์ พบว่า การผ่าเหง้าตามยาวก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 13.32 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้สูงถึง 4.83 เท่า

พรรณธิดา (2542) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงช่อดอกย่อยของปทุมมา คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น

0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถให้จำนวนต้นมากที่สุดจากชิ้นส่วนปลายช่อดอกในอัตรา 8 ยอดต่อชิ้นส่วน

พรรณี (2542) ศึกษาผลของสารชะลอการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ พาโคลบิวทาโซล (5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร) แอนซิมิดอล (1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) และดามิโนไซด์ (1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า พาโคลบิวทาโซลทุกความเข้มข้นทำให้จำนวนต้นเพิ่มขึ้น โดยได้จำนวนต้นมากที่สุด 18.6 ต้นต่อกอ เมื่อใช้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนดามิโนไซด์มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตด้านจำนวนต้นต่อกอ และความสูงของต้นลง ทั้งนี้แอนซิมิดอลสามารถเพิ่มจำนวนต้นต่อกอได้เมื่อใช้ในความเข้มข้นที่สูงขึ้นโดยลดความสูงของต้นเพียงเล็กน้อย

วิโรจน์ (2542) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมา ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพมืดและมีแสงในอาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลงที่เติม Na-FeEDTA เข้มข้น 35 มิลลิกรัมต่อลิตร, myo-inositol เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำตาลทราย เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และมีการเติม IAA เข้มข้น 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1, 5 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนตั้งต้นมีการพัฒนาออกเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ การเกิดเฉพาะต้น, เกิดทั้งต้นและช่อดอกย่อย และเกิดเฉพาะช่อดอกย่อย โดยที่ชิ้นพืชจากส่วนโคนช่อดอกพัฒนาเกิดเป็นต้นมากที่สุด ส่วนกลางของช่อดอกพัฒนาได้ทั้งต้นและช่อดอกย่อย ในขณะที่ส่วนปลายช่อดอกพัฒนาเป็นช่อดอกย่อย และพบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสงทำให้เกิดต้นมากที่สุดประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์ โดยมีพัฒนาเกิดทั้งต้นและช่อดอกย่อยประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์

ศิริรัตน์ (2542) ศึกษาการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกปทุมมา ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1, 5 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ต้นพัฒนามาจากส่วนของ floral primordia ซึ่งสามารถผันกลับได้อย่างสมบูรณ์เป็น leaf primordia และเนื้อเยื่อเจริญของต้น

นพมณี และคณะ (2545) รายงานการใช้อาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำช่อดอกย่อยของปทุมมาให้เกิดเป็นต้นเล็กจำนวนมาก เมื่อย้ายต้นขนาดเล็กลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม

Thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Imazalil (IMA) เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดต้นที่มีลักษณะเฉพาะที่เรียกว่า retarded shoot ซึ่งเป็นต้นคล้ายยอดย่อส่วนลง จำนวน 30-40 ยอดต่อชิ้นส่วน และเมื่อย้ายลงอาหารที่มี BA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงได้ต้นสมบูรณ์พร้อมย้ายปลูก

วิภาดา (2545) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ใน อาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แตกกอมากที่สุด และลดอาการ browning ได้

3. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยตรง และการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* (Puddephat, 2003 ; Herrera-Estrella *et al*, 2005)

3.1. การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยตรง ซึ่งอาศัยเทคนิคต่างๆ ที่ถูกนำมาใช้ตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิด ดังนี้

3.1.1 การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค (Microprojectile bombardment) โดยใช้เครื่องมือสำหรับถ่ายทอดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าสู่ละอองเกสร เซลล์ และอวัยวะหรือเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาดีเอ็นเอเคลือบบนอนุภาคทองหรือทังสแตนยิงเข้าสู่เซลล์หรืออวัยวะของพืชด้วยความเร็วสูงทำให้ดีเอ็นเอผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์แล้วสอดแทรกรวมตัวกับโครโมโซมพืช วิธีนี้ใช้ได้ผลดีทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ถั่วเหลือง ยาสูบ ข้าวโพด ข้าวและข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น (Walden and Wingender, 1995; Ignacimuthu, 1997)

3.1.2 การถ่ายยีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Eletroporation) สามารถทำได้ในระดับโพรโทพลาสต์หรือเซลล์ของพืช โดยนำสารแขวนลอยของเซลล์หรือโพรโทพลาสต์ของพืชและดีเอ็นเอภายนอกที่ต้องการถ่ายเข้าสู่เซลล์หรือโพรโทพลาสต์ ไปผ่านสนามไฟฟ้าเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดประจุไฟฟ้าบริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์หรือโพรโทพลาสต์และดีเอ็นเอมาเรียงตัวใกล้กัน เมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้ากระแสตรงแรงสูงและใช้ระยะเวลาที่สั้นหรือกระแสตรงแรงต่ำแต่ใช้ระยะเวลายาว (สุรินทร์, 2539) ส่งผลให้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หรือโพรโทพลาส์ของพืชที่สัมผัสกับดีเอ็นเอภายนอกเกิดช่องเล็กๆ ดีเอ็นเอจากภายนอกจึงเข้าสู่เซลล์หรือโพรโทพลาส์ของพืชได้

จากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการซ่อมแซมตัวเองจนเป็นปกติ (Puddephat, 2003) เป็นวิธีที่ใช้ได้ดีกับเนื้อเยื่อของทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ รายงานส่วนมากพบว่าทำในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ และข้าว ในพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น แครอต (นิตย์ศรี และสัมพันธ์, 2548)

3.1.3 การถ่ายยีนด้วยเข็มฉีด (Microinjection) โดยใช้เข็มเล็กๆฉีดดีเอ็นเอเข้าไปสู่นิวเคลียสของเซลล์ผู้รับซึ่งถูกตรึงอยู่กับที่ การฉีดต้องระมัดระวังไม่ทำให้แวคิวโอลแตก เนื่องจากแวคิวโอลเป็นที่เก็บเอ็นไซม์และสารพิษหลายชนิด อาจทำให้เซลล์ตายได้ (สุมนทิพย์, 2540 ข) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เข็มฉีดยาฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่ต้นพืช (Macroinjection) ซึ่งเป็นวิธีค่อนข้างง่าย แต่จะต้องหาระยะที่เหมาะสมที่จะใส่ดีเอ็นเอเข้าไป เช่น การฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในช่อดอกข้าวไรย์ ระยะที่เหมาะสมคือ 14 วัน ก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส ซึ่งเซลล์อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอเข้าไปได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีการฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในเอ็มบริโอของฝ้าย และส่วนอื่นๆ ของพืช เช่น ปลายยอด (นิตย์ศรี และสัมพันธ์, 2548)

3.1.4 การถ่ายยีนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) โดยใช้ความถี่ของคลื่นเสียง 20 kHz กับโพรโทพลาสต์ของยาสูบ และ sugarbeet (Hinchee *et al*, 1994) คลื่นเสียงความถี่สูงจะทำให้เกิดการสั่นสะเทือนเกิดขึ้นในสารละลายจนเกิดการเปลี่ยนแปลงในบริเวณของ boundary layer ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และภายใน cytosol ซึ่งมีผลต่ออัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์ การทำงานของเอ็นไซม์ การหมุนเวียนภายใน cytosol และออร์แกนเนลต่างๆ ภายในเซลล์พืช ซึ่งทำให้การผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์และเมตาโบลิซึมของเซลล์เพิ่มขึ้นช่วยให้การถ่ายยีนเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น มีรายงานว่า การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงสามารถช่วยกระตุ้นให้ยีนเข้าสู่โพรโทพลาสต์ suspension cell และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของพืชได้ดียิ่งขึ้น (Liu *et al*, 2006)

3.1.5 การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี (Chemical induced transformation) สามารถทำได้ระดับโพรโทพลาสต์ สารเคมีที่นิยมใช้คือ Polyethylene glycol (PEG) โดย PEG จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโพรโทพลาสต์อ่อนตัวลงจึงทำให้ดีเอ็นเอจากภายนอกสามารถเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น (สุรินทร์, 2539) ความเข้มข้นที่พอเหมาะ คือ 15-25 เปอร์เซ็นต์ การใช้ PEG ความเข้มข้นสูง ๆ จะทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อย แต่ถ้าใช้ PEG ความเข้มข้นต่ำจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนลดลง วิธีนี้ใช้ได้ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Puddephat, 2003)

3.2. การถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่พบในดิน เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้โคนต้นเกิดโรคปม (crown gall) และโรครากเป็นขน (hairy root)ในพืช

โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ *Agrobacterium* มีโครโมโซมและพลาสมิดของตัวเองซึ่งเป็นรูปวงแหวน (circular DNA) ชนิดที่ใช้ในการถ่ายยีนสู่พืช คือ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งมี tumor inducing (Ti) plasmid เป็นพลาสมิดที่อยู่ในไซโตพลาสซึมเป็นสาเหตุทำให้พืชเกิดโรค crown gall และ *Agrobacterium rhizogenes* ที่มี root inducing (Ri) plasmid ทำให้พืชเกิดโรค hairy root พลาสมิดประกอบด้วย transferred DNA (T-DNA) ซึ่งสามารถเคลื่อนย้ายและสอดแทรกเข้าไปอยู่ร่วมกับโครโมโซมของเซลล์พืชได้เมื่อเนื้อเยื่อพืชถูกแบคทีเรียเข้าทำลาย ทำให้เซลล์พืชมีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป (transformed cell) (Jeske, 1998; Lamp, 2000) ทั้งนี้ host ของ Agrobacterium คือ พืชใบเลี้ยงคู่แต่มีรายงานว่า Agrobacterium สามารถเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิดได้ เช่น ข้าว (Dai *et al*., 2001; Terada *et al*., 2004) กล้วยไม้ (Belarmino and Mii, 2000; Chai *et al*,. 2002; Men *et al*., 2003) และข้าวโพด (Zhang *et al*., 2005) เป็นต้น

การใช้ Ti- plasmid เป็นพาหะในการถ่ายยีนให้กับพืชโดยการแทนที่ยีนซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและสารโอปีนด้วยยีนที่ต้องการ มีการสร้างพาหะเพื่อถ่ายยีนผ่าน *Agrobacterium* แบบ Binary vector เป็นพาหะที่แยกเอาส่วนของ Right border (RB) และ Left border (LB) มาไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 10 กิโลเบสโดยส่วนของ *vir* gene ยังคงอยู่ในพลาสมิด Ti ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งระหว่าง RB และLB จะเป็นบริเวณที่มียีนต้องการฝากถ่ายและมียีนเครื่องหมาย สำหรับคัดเลือกในพืช ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside เช่น neomycin phosphotransferase II (*npt II*) ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน, hygromycin phosphotransferase (*hpt II*) ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เป็นต้น (McElroy and Brettell, 1994; Walden and Wingender, 1995)

การถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ได้รับความนิยมแพร่หลายในการสร้างพืชแปลงพันธุ์เนื่องจากทำได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและมีประสิทธิภาพสูงในพืชใบเลี้ยงคู่โดยเฉพาะพืชอาศัยของแบคทีเรียพาหะ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถประสบความสำเร็จในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด ซึ่งมีการใช้เทคนิคต่าง ๆ นำมาใช้เพื่อช่วยในการถ่ายยีนเข้าสู่ที่ไม่ใช่พืชอาศัยของ *Agrobacterium* โดยปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* คือ การเตรียมเนื้อเยื่อก่อนการถ่ายยีน ความเข้มข้นของแบคทีเรียพาหะ สายพันธุ์ของแบคทีเรียพาหะ สายพันธุ์พืช อุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียพาหะ อายุและชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีน สภาพอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียพาหะ (Cheng *et al.*, 2004; Saharan *et al.*, 2004; Kumar *et al*., 2005) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับแบคทีเรียพาหะ การใช้สารลดแรงตึงผิว สารปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตและฆ่าแบคทีเรีย

พาหะโดยไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะเวลาในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน การเลือกใช้ยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน (อารีย์, 2541; Mauro, 2000; Opabode, 2006) การใช้สาร Acetosyringone ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล เพื่อส่งเสริมให้ *vir* genes ทำหน้าที่ในการส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชได้ดีขึ้น (Belarmino and Mii , 2000; Men *et al*., 2003) เป็นต้น

4. การถ่ายยีนเข้าสู่ไม้ประดับและพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

มีรายงานการศึกษาการถ่ายยีนสู่ไม้ประดับและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดทั้งวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยตรง และการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* ได้แก่

Yu *et al.* (1999) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายโดยวิธียิง (Bombardment) พลาสมิดที่มียีนรายงานคือ *uidA* gene เพื่อศึกษาระดับไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม พบว่า การใช้ไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถคัดเลือกโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนออกได้โดยไม่เป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน

Belarmino and Mii (2000) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่ *Doritaenopsis* Coral Fantasy x *Phalaenopsis* (Baby Hat x Ann Jessica) โดยใช้ *Agrobacterium* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ EHA101 ที่มีเวคเตอร์ pIG121Hm และสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pTOK 233 ซึ่งทั้งสองเวคเตอร์นี้มียีน *gus* ซึ่งควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ β-glucuronidase และยีนที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน ทำการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ที่รวมกันเป็นก้อน (cell clumps) ของลูกผสมฟาแลนนอปซีสร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สองขั้นตอน คือ เริ่มต้นเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารกระตุ้นประสิทธิภาพการถ่ายยีนคือ Acetosyringone เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ กับ *Agrobacterium* ที่เจือจางในอาหารประมาณ 1: 10 โดยปริมาตร นาน 10 ชั่วโมงก่อนย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่เติม Acetosyringone เข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพมืด พบว่า Acetosyringone สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน โดยกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ที่เติม Acetosyringone เข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ เกิดจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงสุด 42.4 จุดต่อน้ำหนักกลุ่มเซลล์ 100 กรัม และพบว่าการใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 (pTOK233) ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าการใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA101 (pIG121Hm)

Lin *et al*. (2000) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอแคลลัสของ *Alstroemeria sp.* สายพันธุ์ VV021C และ BT207C ด้วยวิธีการยิงพลาสมิดที่มียีนรายงานคือ ยีน luciferase reporter (*luc*) หรือ *gus* และ *bar* โดยพบว่ายีน *bar* ช่วยในการตรวจสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Dai *et al.* (2001) พบว่า การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว *Oryza sativa japonica* สายพันธุ์ Taipei 309 โดยอาศัย *Agrobacterium* มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่ำกว่าการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค คือ 7 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จำนวน copy numbers เฉลี่ยของ ต้นแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* และโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค เท่ากับ 1.8 และ 2.7 ตามลำดับ นอกจากนี้ ความคงตัวของยีนและความสมบูรณ์พันธุ์ (Fertility) ของต้นแปลงพันธุ์จากวิธีการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* มีมากกว่าวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

Chai *et al.* (2002) ศึกษาความคงอยู่ของยีนหลังการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ฟาแลนนอปซีส 4 พันธุ์ โดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pTOK 233 โดยถ่ายยีนผ่านเนื้อเยื่อ protocorm-like bodies (PLBs) พบว่า ระดับความเข้มข้นของ *Agrobacterium* เหมาะสมอยู่ที่ OD_{600} เท่ากับ 0.2 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าที่ระดับ OD_{600} เท่ากับ 0.7 เมื่อใช้ระยะเวลาการเลี้ยง PLBs ร่วมกับ *Agrobacterium* ที่เติม Acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 30 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ PLBs ที่ทำให้เกิดบาดแผลด้วยเข็มฉีดยามีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงถึง 16.2 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่วิธีการลอกผิวด้านนอกออกมีประสิทธิภาพเพียง 8.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า การคัดเลือกในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือน จำนวน 4 ครั้งก่อนนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า สามารถตรวจสอบความคงอยู่ของการถ่ายยีนโดยให้ประสิทธิภาพสูงถึง 77.5 เปอร์เซ็นต์

Men *et al.* (2003) ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* โดยใช้ *Agrobacterium* สองสายพันธุ์ คือ AGL1 และ EHA105 ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์มีเวคเตอร์ pCAMBIA1301 พบว่า การเติม Acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนให้สูงขึ้น 3 เท่า และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโต-คอร์มร่วมกับ *Agrobacterium* คือ 30 นาที โดย *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL1 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ EHA105 เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ให้ประสิทธิภาพ

การถ่ายยีนได้สูงสุด คือ 18 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารคัดเลือกที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

Saharan *et al.* (2004) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวสองสายพันธุ์ คือ HKR-46 และ HKR-126 ด้วย *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีเวคเตอร์ pCAMBIA1301 พบว่า การเติม Acetosyringone เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ ระหว่างเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ในสภาพมืดช่วยให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพสูงที่สุด และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน นาน 3 วัน พบว่า ข้าวสายพันธุ์ HKR-126 มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงถึง 44.46 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ข้าวสายพันธุ์ HKR-46 มีการแสดงออกของยีน *gus* เพียง 28.9 เปอร์เซ็นต์

พิสิฐ (2546) ศึกษาวิธีการถ่ายยีน*Chalcone reductase* (*chr*) เข้าสู่กล้วยไม้หวายเอื้องแซะ (*Dendrobium scabrilingue* Lindl.) โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยระบบเวคเตอร์ 2 ชนิด คือ พลาสมิด pCHR 312 ประกอบด้วยยีน *Chalcone reductase* (*chr*) ที่กำหนดการสร้างเอ็นไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ไอโซฟลาโวนอยด์ และพลาสมิด pCAMBIA1301 ประกอบด้วยยีนรายงานผลคือ ยีน *gusA* โดยใช้ยีน *hygromycin phophotrasferase (hptII)* เป็นยีนคัดเลือก ภายหลังการคัดเลือกบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 5 เดือน พบต้นกล้วยไม้ที่มีความต้านทานต่อไฮโกรมัยซินแสดงถึงประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงสุดคือ 17.9 เปอร์เซ็นต์ และสามารถตรวจพบยีน *gusA* และ *hptII* แต่ไม่สามารถตรวจพบยีน *chr* เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี southern blot hybridization

ปาริสัชชา (2547) ทำการถ่ายยีน Ascorbate peroxidase (*APX*) เข้าสู่หญ้าเนเปียร์แคระ *(Pennisetum purpureum*) โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAPX คัดเลือกต้นซึ่งได้รับการถ่ายยีนบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมด 750 ยอด มี 17 ต้นที่มียีน *APX* แทรกอยู่ในจีโนม

Kumar *et al.* (2005) ชักนำให้เกิด embryogenic calli จากเมล็ดข้าวอายุ 2 เดือน สองสายพันธุ์ คือ IR 64 และ IR 72 บนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร, มอลโทส เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร, Phytagel เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ หรือวุ้น เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 โดยเติม Acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 3 วันในที่มืด แล้วทำ

การคัดเลือกบนอาหารที่มีซีโฟแทกซิม เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคาร์เบนนิซิลลิน เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนด้วยวิธี southern blot hybridization และวิธี PCR พบว่า ข้าวสายพันธุ์ IR72 มีประสิทธิภาพของการถ่ายยีน 6.4-7.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ข้าวสายพันธุ์ IR 64 มีประสิทธิภาพของการถ่ายยีน 4.6-5.5 เปอร์เซ็นต์

Nandakumar *et al.* (2005) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ *Typha latifolia* L. (Broadleaf cattail) ด้วย *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีเวคเตอร์ pCAMBIA1301 และสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pTOK233 โดยใช้เวลาบ่มร่วมกับแคลลัสนาน 10 นาที บนอาหารที่เติม Acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับ *Agrobacterium* ในที่มืดให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าสภาพมีแสง โดย *Agrobacterium*สายพันธุ์ EHA105 (pCAMBIA1301) มีการแสดงออกของยีน *gus* 27.6-34.3 ส่วน *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 (pTOK233) มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงถึง 30.6-36.4 เปอร์เซ็นต์ โดยที่สามารถคัดเลือกและชักนำให้เกิดต้นได้ดีในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

Zhang *et al.* (2005) ได้เปรียบเทียบวิธีการถ่ายยีน *Acetolactate synthase* (*als*) เข้าสู่ข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์ Qi319 พบว่า วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่หลอดละอองเรณูให้จำนวนต้นแปลงพันธุ์ที่มีลักษณะปกติสูงสุดแต่มีความคงตัวของยีนน้อยที่สุด ขณะที่วิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคมีอัตราการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดลสูงกว่า แต่ให้จำนวนชุดของยีนแทรกตัวในจีโนมข้าวโพดมากชุด ส่วนการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* มีความคงตัวของยีนมากที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

<u>การทดลองที่ 1 ผลของสภาพแสงและสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณต้นจากชิ้นส่วนตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่</u>

นำช่อดอกอ่อนของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จากแปลงปลูกของคุณพรสันติ พรสิริกาญจน์ ที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี โดยคัดเลือกช่อดอกซึ่งอยู่ในระยะที่กลีบประดับยังหุ้มปิดสนิท ความยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ทำการตัดแต่งส่วนของกลีบประดับออกให้เหลือส่วนของก้านช่อดอกและช่อดอกย่อย พ่นด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่จะนำลงไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต และแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ เนื้อสาร 65 เปอร์เซ็นต์ อย่างละ 10 กรัม ในน้ำอย่างละ 50 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมรวมกันตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนใสมาใช้) เข้มข้น 0.98 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่เข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ล้างน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนตัดแต่งชิ้นส่วนที่มีสีน้ำตาลทิ้ง ตัดตามขวางให้ชิ้นส่วนมีความยาว 1 เซนติเมตร ก่อนตัดแบ่งครึ่งตามยาวของช่อดอกโดยแบ่งช่อดอกตามตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้ ปลาย กลาง และโคนช่อดอก (ภาพที่ 1) นำชิ้นพืชวางแนวนอนให้รอยตัดสัมผัสอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม Thidiazuron (TDZ) (Dropp® 50% WP, บริษัท BayerCropScience) ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25, 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Imazalil (Fungaflor®, บริษัท ไดนามิคอะโกรเซอวิส จำกัด) เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย (บริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด) เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วุ้น (บริษัท พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพส์ จำกัด) เข้มข้น 6.5 กรัมต่อลิตร ปรับความค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.8 โดยมีอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA (บริษัท Fluka Biochemika) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA (บริษัท Sigma Chemical) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรเปรียบเทียบ อาหารทั้งหมดผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

วางแผนการทดลองแบบ 6x3x4 factorial in CRD ซึ่งมี 3 ปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ สูตรอาหาร ตำแหน่งของชิ้นส่วนของช่อดอก และสภาพการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 4 แบบ (ตารางที่ 1) ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำ 20 ซ้ำๆ ละ 1 ชิ้นส่วน นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงหลังเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ดังนี้

1. อัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของชิ้นพืชที่ตำแหน่งต่างๆ
2. จำนวนต้นต่อชิ้นพืช
3. ความสูงทรงพุ่ม วัดจากโคนต้นถึงปลายใบ
4. ขนาดของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น
5. ความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น วัดจากโคนกลุ่มยอดที่แคระเกร็นถึงปลายใบ
6. จำนวนราก

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

(ก) (ข)

<u>ภาพที่ 1</u> ช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ในระยะที่กลีบประดับยังหุ้มปิดสนิท

(ก) ก่อนตัดแต่งส่วนของกลีบประดับ (ซ้าย) หลังตัดแต่งส่วนของกลีบประดับ (ขวา)

(ข) ตำแหน่งต่าง ๆ บนช่อดอก ได้แก่ ปลาย (บน) กลาง (กลาง) และโคน (ล่าง)

ตารางที่ 1 สภาพการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 4 แบบ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 3 ชนิดซึ่งมีความเข้มแสงที่ใช้สังเคราะห์แสงได้ (Photosynthetic Photron Flux) และความยาวคลื่นแสงต่างๆ

สภาพแสง	หลอดฟลูออเรสเซนต์	ความเข้มแสง ($\mu molm^{-2}s^{-1}$)	ความยาวคลื่น (nm)
มืด[1/]	-	-	-
แสงสีขาว	PHILIPS TL-D 36/54 Day light	43	430-690
แสงสีแดง	TOSHIBA FL 40S.RE 40 W	42	630-710
แสงสีน้ำเงิน	T.F.C. FL 40 SBT8/38 Blue	45	450-550

[1/] : คลุมผ้าดำ

การทดลองที่ 2 ผลของสภาพแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

นำต้นปลอดเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 1 ตัดแต่งให้มีความยาวจากส่วนโคนของลำต้นประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D (บริษัท Fluka Biochemika) เข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติม Casein hydrolysate (บริษัท Fluka Biochemika) เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วุ้น เข้มข้น 6.5 กรัมต่อลิตร ปรับความค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.8 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที

วางแผนการทดลองแบบ 7 x 3 x 4 factorials in CRD โดยมีปัจจัยที่ต้องการศึกษา 3 ปัจจัย คือ 2,4-D, TDZ และ 4 สภาพแสงการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 3 ชิ้นส่วน นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงหลังเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ดังนี้ พัฒนาการของชิ้นส่วน 6 รูปแบบ ตามลำดับความสำคัญของพัฒนาการตามลักษณะที่ต้องการ โดย

1 = ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอดเท่านั้น (S)
2 = ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอดพร้อมราก ที่มีลักษณะเป็นต้นปกติ (SR)
3 = ชิ้นพืชพัฒนาเป็นรากก่อนและมีบางส่วนของรากพัฒนาเกิดแคลลัส (RC)
4 = ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอด ราก และแคลลัสพร้อมกัน (SRC)
5 = ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอด และแคลลัส (SC)
6 = ชิ้นพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเท่านั้น (C)

นอกจากนี้บันทึกอัตราการเกิดแคลลัส สีแคลลัส และลักษณะของแคลลัส แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

<u>การทดลองที่ 3 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ต่อการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น</u>

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Casein hydrolysate เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วุ้น เข้มข้น 6.5 กรัมต่อลิตร ปรับความค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.8 เพาะเลี้ยงจนเกิดกลุ่มแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Casein hydrolysate เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วุ้น เข้มข้น 6.5 กรัมต่อลิตร ปรับความค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.8 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 5 ซ้ำๆละ 3 กลุ่มแคลลัส นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนท์ PHILIPS TL-D 36/54 Day light ที่ให้ความเข้มแสง 43 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีความยาวคลื่น 430-690 นาโนเมตร นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ ได้แก่ ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส อัตราการเกิดยอดต่อกลุ่มแคลลัส และอัตราการเกิดไรซอยด์ต่อกลุ่มแคลลัส นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

การทดลองที่ 4 ผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

การทดลองที่ 4.1 ผลของซีโฟแทกซิม

เพาะเลี้ยงแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร Casein hydrolysate เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วุ้น เข้มข้น 6.5 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-เบสเป็น 5.8 และเติมซีโฟแทกซิมที่ผ่านการกรองเชื้อด้วยเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน (Mimisart®, Sartorius) ลงในอาหารที่กำลังเย็นหลังนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 หรือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 3 ก้อนแคลลัส นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพสีแสงขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนท์ PHILIPS TL-D 36/54 Day light ความเข้มแสง 43 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลโดยสังเกตอัตราการเจริญเติบโต และพัฒนาการของแคลลัส

การทดลองที่ 4.2 ผลของไฮโกรมัยซิน

เพาะเลี้ยงแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร Casein hydrolysate เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาล เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วุ้น เข้มข้น 6.5 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-เบสเป็น 5.8 และเติมไฮโกรมัยซินที่ผ่านการกรองเชื้อด้วยเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน (Mimisart®, Sartorius) ในอาหารที่กำลังเย็นหลังนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 50,100, 150, 200 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 3 ก้อนแคลลัส นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพแสงสีขาว จากหลอดฟลูออเรสเซนท์ PHILIPS TL-D 36/54 Day light ความเข้มแสง 43 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลโดยสังเกตอัตราการเจริญเติบโต และพัฒนาการของแคลลัส

การทดลองที่ 5 การถ่ายยีน *gus* สู่แคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

เพาะเลี้ยง *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA1305.1 ที่มียีน *gus*) ในอาหารเหลว LB ที่มีกานามัยซิน (Meiji® บริษัท ไทยเมจิฟาร์มาซิวติคัล จำกัด) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าแบบ orbital shaker ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 – 0.8 แล้วเติม Acetosyringone (Aldrich®) เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ นาน 3 ชั่วโมง ก่อนทำการบ่มร่วมกับแคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่เป็นเวลา 15, 30, 45 หรือ 60 นาที ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 5 ก้อนแคลลัส จากนั้นซับเชื้อ *A. tumefaciens* ออกด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ ก่อนย้ายลงอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงทำการกำจัด *A. tumefaciens* โดยล้างแคลลัสในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที แล้วซับให้แห้งบนกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ จากนั้นนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนลงอาหารสูตรเดิมที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพแสงสีขาว ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเซนติเมตรต่อวินาที จากหลอดฟลูออเรสเซนท์ PHILIPS TL-D ชนิด Day light นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน สุ่มแคลลัส 3 ก้อนแคลลัสต่อซ้ำมาตรวจการแสดงออกของยีนด้วยวิธี GUS assay โดยแช่แคลลัสในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronide, (X-gluc, บริษัทSigma Chemical) (ภาคผนวก) นำไปมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน (Jefferson, 1987) บันทึกผลโดยตรวจดูสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนก้อนแคลลัส

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการพัฒนาพันธุ์พืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และฝ่ายเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง กรกฎาคม 2548
สิ้นสุดการทดลอง เมษายน 2550

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของสภาพแสงและสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณต้นจากชิ้นส่วนตำแหน่งต่างๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของช่อดอกจากส่วนปลาย กลาง และโคนช่อดอก พบว่า มีอัตราปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันตามระยะห่างของชิ้นส่วนนั้นจากพื้นดิน กล่าวคือ ชิ้นพืชจากปลายช่อดอกมีอัตราการปนเปื้อนน้อยที่สุด คือ 13.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ส่วนกลางช่อดอกที่ 22.92 เปอร์เซ็นต์ และส่วนโคนช่อดอกมีการปนเปื้อนมากที่สุด คือ 32.08 เปอร์เซ็นต์ โดยพบเชื้อแบคทีเรียที่มีสีขาวขุ่นเติบโตด้านล่างของชิ้นพืชที่สัมผัสอาหาร

หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์ พบการตายของเนื้อเยื่อบริเวณกลีบดอกย่อยและหรือบริเวณก้านช่อดอกกับชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกสภาพแสงโดยพบมากที่สุด 61 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพแสงสีแดง ขณะที่พบการตายของเนื้อเยื่อ 32.91 เปอร์เซ็นต์ ของชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด ทั้งนี้ ไม่พบการตายของเนื้อเยื่อของชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกสภาพแสง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการตายของเนื้อเยื่อ (เปอร์เซ็นต์) จากช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้สภาพแสง 4 แบบ นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
TDZ 0 + IMA 4	52.41	27.31	61.11	16.67
TDZ0.1 + IMA 4	14.29	6.06	0.00	5.56
TDZ 0.25 + IMA 4	6.06	0.00	0.00	0.00
TDZ 0.5 + IMA 4	0.00	0.00	0.00	0.00
TDZ 1.0 + IMA 4	0.00	0.00	0.00	0.00
BA 10 + IAA 0.1	32.91	0.00	0.00	5.56

หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ชิ้นพืชสามารถพัฒนาเป็นต้น กลุ่มยอดที่แคระเกร็น (retarded multiple shoot) และเกิดรากได้ในปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ อิทธิพลของสูตรอาหาร สภาพแสง และตำแหน่งบนช่อดอก ดังนี้

จำนวนต้น สูตรอาหารมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อจำนวนต้นที่เกิดขึ้นโดย พบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดต้นมากที่สุด คือ 1.46 ต้นต่อชิ้น รองมาคืออาหาร สูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดต้นเท่ากับ 0.85 และ 0.90 ต้นต่อชิ้นพืช ตามลำดับ ส่วนการใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0, 0.1 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดจำนวนต้นไม่แตกต่างกันคือ 0.44, 0.76 และ 0.66 ต้นต่อชิ้นพืช ตามลำดับ สำหรับสภาพแสงนั้น พบว่า มีอิทธิพลต่อจำนวนต้นที่เกิดขึ้นเช่นกัน โดยการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดง ทำให้เกิดต้นมากที่สุดคือ 1.40 ต้นต่อชิ้นพืช ขณะที่แสงสีขาว แสงสีน้ำเงิน และสภาพมืด ทำให้เกิดต้นในจำนวนที่ไม่แตกต่างกันคือ 0.82, 0.74 และ 0.54 ต้นต่อชิ้นพืช ตามลำดับ ส่วนตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกนั้นไม่มีอิทธิพลทางสถิติต่อจำนวนต้นที่เกิดขึ้นโดยชิ้นส่วนพืชจากส่วนปลาย ส่วนกลาง และส่วนโคนช่อดอก เกิดต้นจำนวน 0.85, 0.77 และ 0.88 ต้นต่อชิ้นพืช ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพแสงต่อจำนวนต้น โดยพบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพแสงสีแดงมีจำนวนต้นสูงสุดคือ 3.18 ต้นต่อชิ้นพืช (ตารางที่ 4) และพบอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแสงกับตำแหน่งชิ้นพืชบนช่อดอก โดยพบว่า ชิ้นพืชจากส่วนโคนช่อดอกที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงมีจำนวนต้นมากที่สุด 1.83 ต้นต่อชิ้นพืช (ตารางที่ 5) ทั้งนี้ ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชบนช่อดอก และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหาร สภาพแสง ตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อจำนวนต้น (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 6)

ตารางที่ 3 จำนวนต้น ความสูงต้นและจำนวนรากซึ่งเกิดจากชิ้นส่วนตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

ปัจจัย		จำนวนต้น[1/]	ความสูงต้น[1/] (ซม.)	จำนวนราก[1/]
อาหาร	TDZ 0 + IMA 4	0.44b [2/]	2.42b	0.47bc
	TDZ0.1 + IMA 4	0.76b	1.66b	0.70b
	TDZ 0.25 + IMA 4	0.85ab	1.69b	0.13cd
	TDZ 0.5 + IMA 4	0.90ab	1.50b	0.23cd
	TDZ 1.0 + IMA 4	0.66b	1.31b	0.01d
	BA 10 + IAA 0.1	1.46a	4.81a	4.55a
สภาพแสง	มืด	0.54b	1.02c	0.22b
	แสงสีขาว	0.82b	2.57ab	0.87a
	แสงสีแดง	1.40a	3.37a	1.20a
	แสงสีน้ำเงิน	0.74b	2.24b	1.08a
ตำแหน่งบนช่อดอก	ส่วนปลาย	0.85	1.92	0.44b
	ส่วนกลาง	0.77	2.17	0.92a
	ส่วนโคน	0.88	2.28	0.97a
F-test				
อาหาร		**	**	**
สภาพแสง		**	**	**
ตำแหน่งบนช่อดอก		ns	ns	**
อาหาร x สภาพแสง		**	**	**
อาหาร x ตำแหน่งบนช่อดอก		ns	ns	**
สภาพ x ตำแหน่งบนช่อดอก		*	*	**
อาหาร x สภาพแสง x ตำแหน่งบนช่อดอก		ns	ns	**
C.V.(%)		39.64	46.24	43.77

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

[2] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับ

: ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 จำนวนต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงน้ำเงิน
TDZ 0 + IMA 4	0.30ef[1/]	0.84def	0.19f	0.48ef
TDZ0.1 + IMA 4	1.05b-f	0.67def	0.64def	0.62ef
TDZ 0.25 + IMA 4	0.34ef	0.97c-f	2.19ab	0.49ef
TDZ 0.5 + IMA 4	0.44ef	0.44ef	2.10abc	1.39b-e
TDZ 1.0 + IMA 4	0.91def	0.50ef	0.77def	0.48ef
BA 10 + IAA 0.1	0.43ef	1.78bcd	3.18a	1.10b-f
C.V.(%)	40.07			

[1/] : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 จำนวนต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

ตำแหน่ง	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
ส่วนปลาย	0.71bc[1/]	1.05abc	1.36ab	0.32c
ส่วนกลาง	0.44c	0.77c	1.04abc	1.04abc
ส่วนโคน	0.44c	0.62bc	1.83a	0.90bc
C.V.(%)	41.60			

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

: ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 จำนวนต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด			แสงสีขาว			แสงสีแดง			แสงสีน้ำเงิน		
	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน
TDZ 0 + IMA 4	0.18[1/]	0.49	0.22	0.94	1.10	0.55	0.14	0.14	0.29	0.26	0.62	0.58
TDZ0.1 + IMA 4	2.16	0.74	0.22	1.37	0.36	0.25	0.45	0.42	1.10	0.84	0.90	0.14
TDZ 0.25 + IMA 4	0.55	0.14	0.35	1.61	0.77	0.48	2.10	1.58	2.97	0.14	1.12	0.29
TDZ 0.5 + IMA 4	1.03	0.27	0.00	0.28	0.37	0.82	2.20	0.72	3.77	0.26	1.71	2.51
TDZ 1.0 + IMA 4	0.56	0.47	2.31	0.81	0.26	0.42	0.00	1.52	0.96	0.00	0.80	0.72
BA 10 + IAA 0.1	0.31	0.74	0.14	1.73	2.71	1.20	4.74	2.23	2.75	0.53	1.24	1.61
C.V.(%)	39.64											

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

ความสูงของต้น สูตรอาหารมีอิทธิต่อความสูงต้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้ต้นสูงที่สุดคือ 4.81 เซนติเมตร ส่วนการใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0, 0.1, 0.25, 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Imazalil เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้ต้นที่สูงไม่แตกต่างกันคือ 2.42, 1.66, 1.69, 1.50, 1.31 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับสภาพแสงมีอิทธิพลต่อความสูงของต้นที่เกิดขึ้นโดยชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงเกิดต้นสูงที่สูงสุดคือ 3.37 เซนติเมตร รองมาคือ แสงสีขาว แสงสีน้ำเงิน และสภาพมืด คือ 2.57, 2.24 และ 1.02 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่พบอิทธิพลทางสถิติของตำแหน่งชิ้นพืชบนช่อดอกต่อความสูงของต้นที่ได้โดยชิ้นพืชจากส่วนปลาย ส่วนกลาง และส่วนโคนช่อดอกมีความสูงของต้นคือ 1.92, 2.17 และ 2.28 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพแสงต่อความสูงของต้น โดยชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพแสงสีแดงทำให้ต้นสูงที่สุดคือ 9.70 เซนติเมตร (ตารางที่ 7) และพบอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแสงกับตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชบนช่อดอกต่อความสูงต้นโดยพบว่า การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงหรือแสงสีขาวกับส่วนปลาย ส่วนกลางและส่วนโคนของช่อดอกทำให้ได้ต้นที่สูงไม่แตกต่างกัน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีน้ำเงินกับส่วนกลางและส่วนโคนช่อดอก โดยทำให้ต้นมีความสูงอยู่ระหว่าง 2.30-3.82 เซนติเมตร (ตารางที่ 8) ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอก และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหาร สภาพแสงและตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชบนช่อดอกต่อความสูงต้น (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 9)

ตารางที่ 7 ความสูงต้น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงน้ำเงิน
TDZ 0 + IMA 4	1.25ef[1/]	5.72bc	1.48ef	2.23def
TDZ 0.1 + IMA 4	1.32ef	1.49ef	2.02def	2.05def
TDZ 0.25 + IMA 4	0.91f	2.10def	3.28cde	1.14ef
TDZ 0.5 + IMA 4	0.55f	1.10ef	3.91bcd	1.91def
TDZ 1.0 + IMA 4	0.97f	0.88f	1.74def	1.85def
BA 10 + IAA 0.1	1.11ef	6.38b	9.70a	4.64bc
C.V.(%)	47.31			

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

: ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 ความสูงต้น (เซนติเมตร) ที่ได้จากชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

ตำแหน่ง	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
ส่วนปลาย	1.12bc[1/]	2.83a	3.30a	0.87c
ส่วนกลาง	1.07bc	2.51a	2.97a	3.14a
ส่วนโคน	0.75c	2.30ab	3.82a	2.90a
C.V.(%)	51.46			

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

: ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 ความสูงต้น (เซนติเมตร) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด			แสงสีขาว			แสงสีแดง			แสงสีน้ำเงิน		
	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน
TDZ 0 + IMA 4	1.03[1/]	1.86	0.77	4.28	8.77	5.57	0.78	1.25	2.57	0.85	3.17	2.95
TDZ0.1 + IMA 4	1.50	1.91	0.59	3.11	0.61	0.88	1.73	1.14	3.41	2.42	2.80	0.99
TDZ 0.25 + IMA 4	1.41	0.38	1.07	3.14	1.85	1.23	4.76	3.47	1.86	0.46	1.78	1.30
TDZ 0.5 + IMA 4	1.23	0.36	0.00	0.83	1.45	1.12	6.40	1.70	4.21	0.54	3.71	1.90
TDZ 1.0 + IMA 4	0.61	0.91	1.57	1.08	0.50	1.05	0.00	3.77	2.17	0.00	4.15	2.23
BA 10 + IAA 0.1	0.77	1.65	0.78	6.82	8.02	4.90	10.14	8.29	10.75	1.41	3.54	10.85
C.V.(%)	46.24											

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

จำนวนราก สูตรอาหารมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อจำนวนรากที่เกิดขึ้น โดยพบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากมากที่สุดคือ 4.55 รากต่อชิ้นพืช ส่วนการใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0 หรือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากไม่แตกต่างกันคือ 0.47 และ 0.70 รากต่อชิ้นพืช ตามลำดับ ในขณะที่อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.25-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากลดลงตามความเข้นข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้น สำหรับสภาพแสงนั้นพบว่า การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีขาว แสงสีแดง แสงสีน้ำเงินเกิดรากไม่แตกต่างกันคือ 0.87, 1.20 และ 1.08 รากต่อชิ้นพืช ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงในสภาพมืดเกิดรากน้อยที่สุดคือ 0.22 รากต่อชิ้น ส่วนตำแหน่งช่อดอกนั้นพบว่า ส่วนกลางและส่วนโคนช่อดอกเกิดรากไม่แตกต่างกันคือ 0.92 และ 0.97 รากต่อชิ้น ในขณะที่ส่วนปลายช่อดอกเกิดรากน้อยที่สุดคือ 0.44 รากต่อชิ้นพืช (ตารางที่ 3)

นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพแสงต่อจำนวนราก โดยอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงมีจำนวนรากสูงสุดคือ 9.27 รากต่อชิ้นพืช (ตารางที่ 10) พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับตำแหน่งชิ้นพืชบนช่อดอกต่อจำนวนรากโดยพบว่า ชิ้นพืชจากส่วนโคนช่อดอกซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากมากที่สุดคือ 7.22 รากต่อชิ้นพืช (ตารางที่ 11) และพบอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแสงกับตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อจำนวนราก โดยพบว่า ชิ้นพืชจากส่วนโคนช่อดอกที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีน้ำเงินเกิดรากมากที่สุดคือ 2 รากต่อชิ้นพืช (ตารางที่ 12) นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมของสูตรอาหาร สภาพแสงและตำแหน่งชิ้นพืชบนช่อดอกต่อจำนวนราก โดยพบว่า ชิ้นพืชจากส่วนโคนช่อดอกซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพแสงน้ำเงินเกิดรากมากที่สุดคือ 16.31 รากต่อชิ้นพืช (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 10 จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงน้ำเงิน
TDZ 0 + IMA 4	0.10c[1/]	1.19c	0.64c	0.02c
TDZ0.1 + IMA 4	0.41c	1.12c	0.21c	1.01c
TDZ 0.25 + IMA 4	0.07c	0.07c	0.00c	0.53c
TDZ 0.5 + IMA 4	0.00c	0.21c	0.36c	0.53c
TDZ 1.0 + IMA 4	0.00c	0.00c	0.00c	0.05c
BA 10 + IAA 0.1	1.10c	4.42b	9.27a	6.02b
C.V.(%)	47.69			

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

: ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ บนอาหาร 6 สูตร นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	ตำแหน่ง		
	ส่วนปลาย	ส่วนกลาง	ส่วนโคน
TDZ 0 + IMA 4	0.37ed[1/]	0.72ed	0.36ed
TDZ0.1 + IMA 4	0.63ed	1.18ed	0.30ed
TDZ 0.25 + IMA 4	0.06e	0.04e	0.34ed
TDZ 0.5 + IMA 4	0.07e	0.37ed	0.14e
TDZ 1.0 + IMA 4	0.00e	0.00e	0.03e
BA 10 + IAA 0.1	2.29e	4.69b	7.22a
C.V.(%)	49.89		

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

: ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 12 จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมา พันธุ์เชียงใหม่ ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

ตำแหน่ง	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
ส่วนปลาย	0.10b[1/]	0.71ab	1.08ab	0.08ab
ส่วนกลาง	0.29b	1.29ab	1.13ab	1.43ab
ส่วนโคน	0.30b	0.74ab	1.17ab	2.00a
C.V.(%)	59.71			

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

: ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 จำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอกบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด			แสงสีขาว			แสงสีแดง			แสงสีน้ำเงิน		
	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน
TDZ 0 + IMA 4	0.00f[1/]	0.12f	0.00f	1.33ef	1.55ef	0.79ef	0.00f	1.89def	0.29f	0.00f	0.26f	0.36f
TDZ0.1 + IMA 4	0.53f	0.22f	0.46f	0.72f	2.14def	0.46f	0.70f	0.00f	0.00f	0.54f	2.59c-f	0.26f
TDZ 0.25 + IMA 4	0.00f	0.14f	0.25f	0.19f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.26f	1.54ef
TDZ 0.5 + IMA 4	0.00f	0.00f	0.00f	0.20f	0.40f	0.00f	0.00f	1.24ef	0.00f	0.00f	1.05ef	0.63f
TDZ 1.0 + IMA 4	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	0.14f
BA 10 + IAA 0.1	0.00f	2.02def	1.37ef	3.03c-f	6.68bc	4.16cde	10.22ab	5.59bcd	12.67ab	0.00f	6.78be	16.31a
C.V.(%)	43.77											

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

: ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ขนาดกลุ่มยอดที่แคระเกร็น ชิ้นพืชพัฒนาเป็นกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (retarded multiple shoot) ซึ่งเป็นลักษณะของกลุ่มยอดขนาดเล็กจำนวนมากที่อัดตัวกันแน่น โดยสูตรอาหารมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อขนาดกลุ่มยอดที่แคระเกร็น โดยพบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีขนาดไม่แตกต่างกัน คือ เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.41, 2.61, 2.68 และ 2.66 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างกับชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีขนาดเส้นผ่านกลางศูนย์กลางของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นเท่ากับ 1.53 และ 1.08 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สำหรับสภาพแสงมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อขนาดกลุ่มยอดที่แคระเกร็น คือ สภาพแสงสีขาวเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด 2.53 เซนติเมตร รองมาคือแสงสีแดงและแสงสีน้ำเงินทำให้เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.28 และ 2.07 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสภาพมืดเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีขนาดเล็กที่สุด 2.02 เซนติเมตร ส่วนตำแหน่งชิ้นส่วนบนช่อดอกมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อขนาดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นโดยพบว่า ชิ้นพืชจากส่วนปลายช่อดอกเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 2.50 เซนติเมตร รองมาคือ ส่วนกลางช่อดอกคือ 2.20 เซนติเมตร และส่วนโคนช่อดอกเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดคือ 1.88 เซนติเมตร (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 3)

นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแสงกับตำแหน่งชิ้นพืชบนช่อดอกต่อขนาดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นโดยพบว่า ชิ้นพืชส่วนปลายช่อดอกที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาวเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 2.89 เซนติเมตร (ตารางที่ 15) ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพแสง และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหาร กับตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอก และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารสภาพแสงและตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อขนาดของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (ตารางที่ 14 และ ตารางที่ 16)

ตารางที่ 14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

ปัจจัย		∅ของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น	ความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น
อาหาร	TDZ 0 + IMA 4	1.08c[1/]	1.12b[1/]
	TDZ0.1 + IMA 4	2.41a	1.70a
	TDZ 0.25 + IMA 4	2.61a	1.74a
	TDZ 0.5 + IMA 4	2.68a	1.63a
	TDZ 1.0 + IMA 4	2.66a	1.72a
	BA 10 + IAA 0.1	1.53b	1.54a
สภาพแสง	มืด	2.02c[1/]	1.41b[1/]
	สีขาว	2.53a	1.64a
	สีแดง	2.28b	1.72a
	สีน้ำเงิน	2.07bc	1.65a
ตำแหน่งบนช่อดอก	ปลาย	2.50a[1/]	1.52
	กลาง	2.20b	1.60
	โคน	1.88c	1.65
F-test			
อาหาร		**	**
สภาพแสง		**	**
ตำแหน่งบนช่อดอก		**	ns
อาหาร x สภาพแสง		ns	**
อาหาร x ตำแหน่งบนช่อดอก		ns	ns
สภาพแสง x ตำแหน่งบนช่อดอก		*	ns
อาหาร x สภาพแสง x ตำแหน่งบนช่อดอก		ns	*
C.V.(%)		39.77	29.99

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

[1/] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

สภาพแสง	ตำแหน่งช่อดอก		
	ส่วนปลาย	ส่วนกลาง	ส่วนโคน
มืด	2.46abc[1/]	1.84def	1.63f
แสงสีขาว	2.89a	2.41abc	2.21b-e
แสงสีแดง	2.34bcd	2.53ab	1.92c-f
แสงสีน้ำเงิน	2.20b-e	2.22b-e	1.77ef
C.V.(%)	48.20		

[1/] : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด			แสงสีขาว			แสงสีแดง			แสงสีน้ำเงิน		
	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน
TDZ 0 + IMA 4	1.19	0.74	0.88	1.47	1.00	1.00	1.20	0.98	0.68	1.10	1.78	0.82
TDZ0.1 + IMA 4	2.31	2.04	1.43	3.15	2.35	2.21	2.78	2.72	2.42	2.67	2.64	2.05
TDZ 0.25 + IMA 4	2.92	1.95	2.29	3.41	3.22	2.37	2.70	2.62	2.22	2.58	2.33	2.33
TDZ 0.5 + IMA 4	3.45	2.45	1.79	3.57	2.67	3.00	2.90	2.88	2.08	2.20	2.12	2.00
TDZ 1.0 + IMA 4	3.21	2.30	2.33	2.69	2.50	2.92	2.82	3.58	2.28	2.75	2.80	1.92
BA 10 + IAA 0.1	2.20	1.49	0.97	0.67	1.73	1.20	1.67	2.17	1.00	1.72	1.25	1.10
C.V.(%)	39.77											

ความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น สูตรอาหารมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นโดยพบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นคล้ายต้นที่มีความสูงไม่แตกต่างกันคือ 1.70, 1.74, 1.63, 1.72 และ 1.54 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นน้อยที่สุดคือ 1.12 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับสภาพแสงนั้น พบว่ามีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่เกิดขึ้นโดยพบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพแสงสีขาว แสงสีแดงหรือแสงสีน้ำเงินเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีความสูงไม่ต่างกันคือ 1.64, 1.72 และ 1.65 เซนติเมตร ตามลำดับ และไม่พบอิทธิพลทางสถิติของตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 14)

นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพแสงต่อความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นโดยพบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 หรือ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพแสงสีแดงเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีความสูงไม่แตกต่างกันคือ 1.96, 1.91 และ 1.93 เซนติเมตร ตามลำดับ หรือการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพแสงสีน้ำเงินเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีความสูงเท่ากับ 1.94 เซนติเมตร (ตารางที่ 17) นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหาร สภาพแสงและตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอก พบว่า ชิ้นพืชส่วนโคนของช่อดอกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงสีแดงเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีความสูงมากที่สุดคือ 2.45 เซนติเมตร (ตารางที่ 18) ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอก และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแสง ตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (ตารางที่ 14)

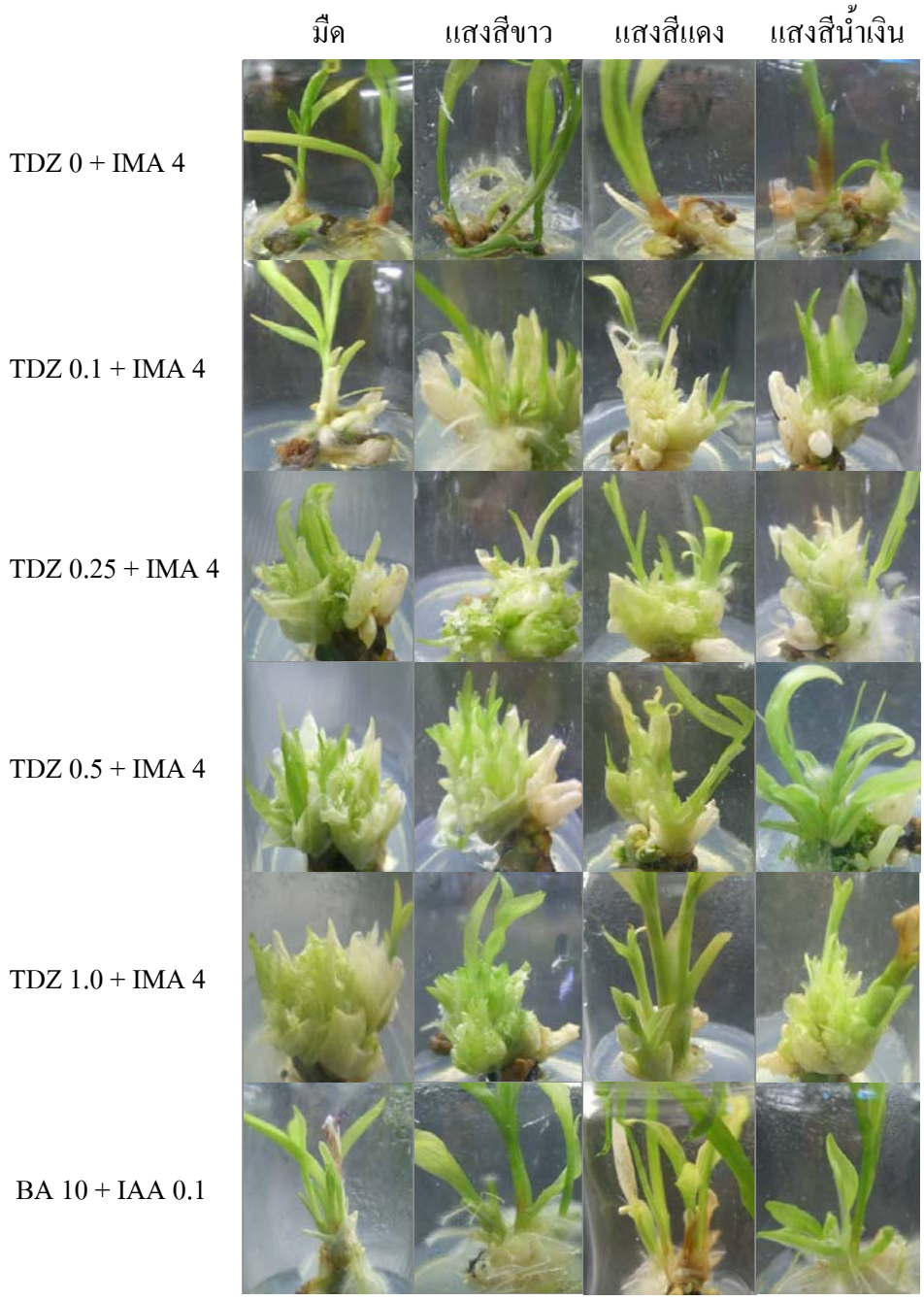
ตารางที่ 17 ความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
TDZ 0 + IMA 4	1.10f[1/]	1.07f	1.09f	1.23ef
TDZ0.1 + IMA 4	1.41b-f	1.66a-e	1.96a	1.86ab
TDZ 0.25 + IMA 4	1.15a-f	1.78abc	1.91a	1.94a
TDZ 0.5 + IMA 4	1.61a-e	1.85ab	1.57a-e	1.40b-f
TDZ 1.0 + IMA 4	1.56a-e	1.78abc	1.87ab	1.71a-d
BA 10 + IAA 0.1	1.29def	1.31c-f	1.93a	1.74a-d
C.V.(%)	30.32			

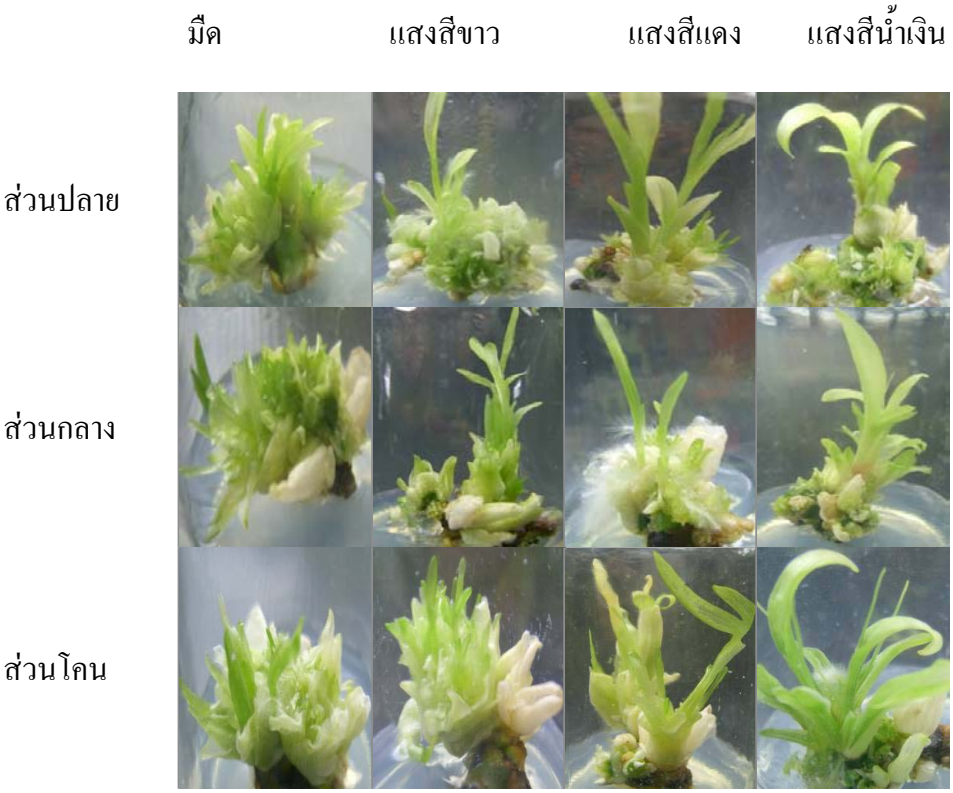
[1/] : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 18 ความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็น (เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่จาก 3 ตำแหน่งของช่อดอก บนอาหาร 6 สูตร ภายใต้ 4 สภาพแสง นาน 12 สัปดาห์

อาหาร	มืด			แสงสีขาว			แสงสีแดง			แสงสีน้ำเงิน		
	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน	ปลาย	กลาง	โคน
TDZ 0 + IMA 4	1.16h-n[1/]	1.08k-n	1.02mn	1.07k-n	1.03lmn	1.12j-n	1.20g-n	1.02mn	1.02mn	1.12j-n	1.25f-n	1.30e-n
TDZ0.1 + IMA 4	1.42d-n	1.33d-n	1.47d-n	1.70b-m	1.78b-j	1.44d-n	1.42d-n	2.00a-d	2.45a	2.00a-d	1.63b-n	2.00a-d
TDZ 0.25 + IMA 4	1.55c-n	1.55c-n	1.36d-n	1.75b-k	1.87a-g	1.73b-k	1.73b-k	1.83a-h	2.17abc	1.68b-m	2.17abc	1.97a-e
TDZ 0.5 + IMA 4	1.70b-m	1.55c-n	1.59b-n	1.90a-f	1.68b-m	1.97a-e	1.57b-n	1.55c-n	1.58b-n	1.13i-n	1.55c-n	1.52c-n
TDZ 1.0 + IMA 4	1.29e-n	1.59b-n	1.83a-h	1.71b-l	1.75b-k	1.88a-g	1.87a-g	1.80a-j	1.95a-e	1.63b-n	1.82a-i	1.67b-m
BA 10 + IAA 0.1	1.04lmn	1.45d-n	1.37d-n	0.97n	1.33d-n	1.50c-n	1.83a-h	2.25ab	1.25f-n	1.63b-n	1.38d-n	2.25ab
C.V.(%)	29.99											



ภาพที่ 2 ลักษณะของต้น และกลุ่มยอดที่แคระเกร็นของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร ภายใต้สภาพแสงต่าง ๆ นาน 12 สัปดาห์



ภาพที่ 3 ลักษณะของต้น และกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่เกิดจากชิ้นพืชจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงต่าง ๆ นาน 12 สัปดาห์

<u>การทดลองที่ 2 ผลของสภาพแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่</u>

หลังจากนำชิ้นส่วนบริเวณโคนต้นของปทุมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม2,4-D เข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด แสงสีขาว แสงสีแดงหรือแสงสีน้ำเงิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นพืชตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ TDZ แตกต่างกันโดยเกิดพัฒนาการ 6 รูปแบบ ได้แก่ ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอดเท่านั้น ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอดพร้อมรากที่มีลักษณะเป็นต้นปกติ ชิ้นพืชพัฒนาเป็นรากก่อนและมีบางส่วนของรากพัฒนาเกิดแคลลัส ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอด ราก และแคลลัสพร้อมกัน ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอด และแคลลัส และชิ้นพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเท่านั้น (ภาพที่ 4) โดยแคลลัสที่ได้ทั้งหมดมีลักษณะเกาะกันอย่างแน่นเป็นก้อนมนนูนสีขาวหรือสีน้ำตาล

เมื่อนำข้อมูลอัตราการเกิดแคลลัสมาวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่า ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D มีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัส โดยอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 หรือ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันคือ 60.34, 60.23, 62.26 และ 63.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองมาคือการใช้ 2,4-D เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 52.08 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีอัตราการเกิดแคลลัสที่ 41.63 ทั้งนี้ไม่พบอิทธิพลของการใช้ TDZ ต่อการเกิดแคลลัส ส่วนสภาพแสงที่เพาะเลี้ยงนั้นมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัส โดยสภาพแสงสีน้ำเงินทำให้เกิดแคลลัสดีที่สุดคือ 56.32 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือแสงสีแดง 50.07 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแสงสีขาวและสภาพมืดมีอัตราการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันคือ 43.45 เปอร์เซ็นต์ และ 44.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัส (ตารางที่ 16)

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะของแคลลัสที่ต้องการคือ ลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะตัวกันอย่างแน่น (compact callus) เป็นก้อนมนนูนสีขาวนวลหรือสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อเจริญบริเวณโคนต้นเท่านั้น พบว่า ในสภาพมืดนั้นชิ้นพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเพียงอย่างเดียวมากที่สุดคือ 10 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชิ้นพืชสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสสูงถึง 93.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 17)

สภาพแสงสีขาว ชิ้นพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเพียงอย่างเดียวมากที่สุดคือ 20 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชิ้นพืชสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสสูงถึง 91.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 18)

สภาพแสงสีแดง ชิ้นพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเพียงอย่างเดียวมากที่สุดคือ 33.33 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชิ้นพืชสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสสูงสุดถึง 91.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 19)

สภาพแสงสีน้ำเงิน ชิ้นพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเพียงอย่างเดียวมากที่สุดคือ 26.67 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชิ้นพืชสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 19 อัตราการเกิดแคลลัสของชิ้นพืชซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสง 4 แบบ นาน 4 สัปดาห์

ปัจจัย		การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
2,4-D (มก./ล.)	0.0	0.00[1/]c
	0.5	41.63b
	1.0	60.34a[2/]
	1.5	60.23a
	2.0	62.26a
	2.5	63.01a
	3.0	52.08ab
TDZ (มก./ล.)	0.0	46.35
	0.01	49.06
	0.05	50.77
สภาพแสง	มืด	44.45b
	สีขาว	43.45b
	สีแดง	50.07ab
	สีน้ำเงิน	56.32a
F-test		
2,4-D		**
TDZ		ns
สภาพแสง		*
2,4-D x TDZ		ns
2,4-D x สภาพแสง		ns
TDZ x สภาพแสง		ns
2,4-D x TDZ x สภาพแสง		ns
C.V.(%)		63.07

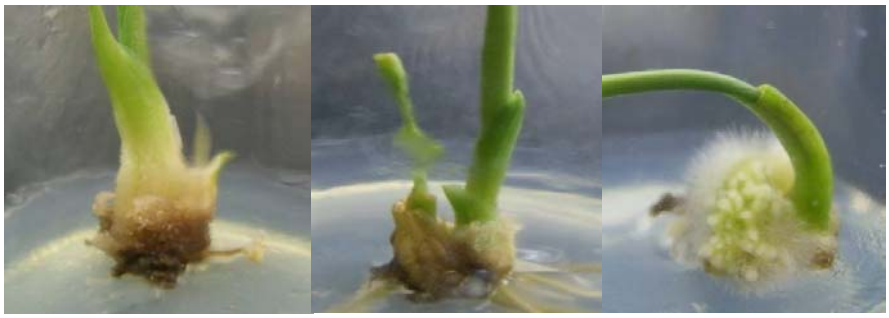
[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่า arcsin $\sqrt{\text{percentage}}$ ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

[2/] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)

ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาการของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสนาน 4 สัปดาห์

(ก) ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอดเท่านั้น (S)

(ข) ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอดพร้อมราก ที่มีลักษณะเป็นต้นปกติ (SR)

(ค) ชิ้นพืชพัฒนาเป็นรากก่อนและมีบางส่วนของรากพัฒนาเกิดแคลลัส (RC)

(ง) ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอด ราก และแคลลัสพร้อมกัน (SRC)

(จ) ชิ้นพืชพัฒนาเป็นยอด และแคลลัส (SC)

(ฉ) ชิ้นพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเท่านั้น (C)

ตารางที่ 20 อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่างๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาพมืดนาน 4 สัปดาห์

2,4-D (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวนชิ้นส่วน[1/]	การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของชิ้นส่วน (เปอร์เซ็นต์)						แคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
			S	SR	RC	SRC	SC	C	
0.0	0.00	15	46.67	53.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.01	15	66.67	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.05	12	58.33	41.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	11	30.00	60.00	0.00	0.00	10.00	0.00	10.00
0.5	0.01	14	13.33	53.33	0.00	20.00	13.33	0.00	33.33
0.5	0.05	11	54.17	29.17	0.00	16.67	0.00	0.00	16.67
1.0	0.00	11	23.33	0.00	0.00	0.00	76.67	0.00	76.67
1.0	0.01	14	40.00	0.00	6.67	6.67	46.67	0.00	60.00
1.0	0.05	9	20.83	0.00	0.00	0.00	79.17	0.00	79.17
1.5	0.00	13	13.33	0.00	20.00	13.33	53.33	0.00	86.67
1.5	0.01	10	29.17	0.00	0.00	37.50	33.33	0.00	70.83
1.5	0.05	9	55.56	0.00	0.00	0.00	44.44	0.00	44.44
2.0	0.00	11	54.17	0.00	0.00	0.00	45.83	0.00	45.83
2.0	0.01	10	20.00	10.00	0.00	0.00	70.00	0.00	70.00
2.0	0.05	8	50.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	50.00
2.5	0.00	10	20.00	0.00	20.00	10.00	40.00	10.00	80.00
2.5	0.01	11	36.67	0.00	0.00	0.00	63.33	0.00	63.33
2.5	0.05	15	40.00	0.00	0.00	0.00	60.00	0.00	60.00
3.0	0.00	11	36.67	10.00	0.00	0.00	53.33	0.00	53.33
3.0	0.01	12	6.67	0.00	0.00	0.00	93.33	0.00	93.33
3.0	0.05	13	53.33	0.00	0.00	6.67	40.00	0.00	46.67

[1/] : จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตจากชิ้นส่วนเริ่มต้น 15 ชิ้นส่วน

S = ยอด SR = ยอด+ราก RC = ราก+แคลลัส

SCR = ยอด+แคลลัส+ราก SC = ยอด และแคลลัส C = แคลลัส

ตารางที่ 21 อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่าง ๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้แสงสีขาว นาน 4 สัปดาห์

2,4-D (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวนชิ้นส่วน[1/]	การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของชิ้นส่วน (เปอร์เซ็นต์)						แคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
			S	SR	RC	SRC	SC	C	
0.0	0.00	15	60.00	40.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.01	15	53.33	46.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.05	12	75.00	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	15	46.67	46.67	0.00	6.67	0.00	0.00	6.67
0.5	0.01	12	8.33	0.00	0.00	25.00	66.67	0.00	91.67
0.5	0.05	12	25.00	16.67	0.00	16.67	41.67	0.00	58.33
1.0	0.00	12	46.67	0.00	10.00	20.00	23.33	0.00	53.33
1.0	0.01	15	60.00	6.67	0.00	0.00	33.33	0.00	33.33
1.0	0.05	12	16.67	0.00	0.00	16.67	66.67	0.00	83.33
1.5	0.00	14	33.33	0.00	0.00	0.00	66.67	0.00	66.67
1.5	0.01	12	36.67	0.00	0.00	10.00	53.33	0.00	63.33
1.5	0.05	12	40.00	0.00	0.00	20.00	20.00	20.00	60.00
2.0	0.00	11	50.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	50.00
2.0	0.01	12	20.00	0.00	6.67	10.00	63.33	0.00	80.00
2.0	0.05	14	30.00	0.00	0.00	13.33	56.67	0.00	70.00
2.5	0.00	11	16.67	0.00	0.00	41.67	41.67	0.00	83.33
2.5	0.01	10	50.00	0.00	0.00	10.00	40.00	0.00	50.00
2.5	0.05	15	40.00	0.00	0.00	6.67	53.33	0.00	60.00
3.0	0.00	10	66.67	20.00	0.00	0.00	13.33	0.00	13.33
3.0	0.01	9	60.00	0.00	0.00	0.00	40.00	0.00	40.00
3.0	0.05	11	20.00	0.00	0.00	6.67	53.33	20.00	80.00

[1/] : จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตจากชิ้นส่วนเริ่มต้น 15 ชิ้นส่วน

S = ยอด SR = ยอด+ราก RC = ราก+แคลลัส

SCR = ยอด+แคลลัส+ราก SC = ยอด และแคลลัส C = แคลลัส

ตารางที่ 22 อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่าง ๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TD Z ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้แสงสีแดงนาน 4 สัปดาห์

2,4-D (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวนชิ้นส่วน[1/]	การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของชิ้นส่วน (เปอร์เซ็นต์)						แคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
			S	SR	RC	SRC	SC	C	
0.0	0.00	15	53.33	46.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.01	15	60.00	40.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.05	12	41.67	58.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	14	26.67	13.33	0.00	33.33	26.67	0.00	60.00
0.5	0.01	13	33.33	0.00	0.00	26.67	40.00	0.00	66.67
0.5	0.05	14	13.33	6.67	0.00	13.33	66.67	0.00	80.00
1.0	0.00	11	23.33	0.00	0.00	10.00	66.67	0.00	76.67
1.0	0.01	15	33.33	13.33	0.00	46.67	6.67	0.00	53.33
1.0	0.05	11	54.17	0.00	0.00	33.33	12.50	0.00	45.83
1.5	0.00	12	41.67	0.00	0.00	8.33	50.00	0.00	58.33
1.5	0.01	15	33.33	0.00	0.00	6.67	53.33	6.67	66.67
1.5	0.05	11	8.33	0.00	0.00	37.50	20.83	33.33	91.67
2.0	0.00	12	60.00	0.00	0.00	10.00	30.00	0.00	40.00
2.0	0.01	10	20.00	0.00	0.00	16.67	43.33	20.00	80.00
2.0	0.05	12	10.00	0.00	0.00	26.67	63.33	0.00	90.00
2.5	0.00	13	20.00	0.00	0.00	20.00	60.00	0.00	80.00
2.5	0.01	11	20.00	0.00	0.00	10.00	50.00	20.00	80.00
2.5	0.05	15	26.67	0.00	0.00	0.00	66.67	6.67	73.33
3.0	0.00	13	33.33	0.00	0.00	0.00	66.67	0.00	66.67
3.0	0.01	10	60.00	0.00	0.00	0.00	30.00	10.00	40.00
3.0	0.05	11	63.33	10.00	0.00	0.00	26.67	0.00	26.67

[1/] : จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตจากชิ้นส่วนเริ่มต้น 15 ชิ้นส่วน

S = ยอด SR = ยอด+ราก RC = ราก+แคลลัส

SCR = ยอด+แคลลัส+ราก SC = ยอด และแคลลัส C = แคลลัส

ตารางที่ 23 อัตราการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบต่าง ๆ ของชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงซึ่งเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้แสงสีน้ำเงิน นาน 4 สัปดาห์

2,4-D (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวนชิ้นส่วน[1/]	การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของชิ้นส่วน (เปอร์เซ็นต์)						แคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
			S	SR	RC	SRC	SC	C	
0.0	0.00	12	50.00	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.01	15	53.33	46.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.0	0.05	12	66.67	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	9	50.00	6.67	0.00	30.00	13.33	0.00	43.33
0.5	0.01	12	36.67	0.00	0.00	53.33	10.00	0.00	63.33
0.5	0.05	15	53.33	6.67	0.00	26.67	13.33	0.00	40.00
1.0	0.00	12	26.67	0.00	0.00	26.67	46.67	0.00	73.33
1.0	0.01	9	0.00	0.00	26.67	26.67	20.00	26.67	100.00
1.0	0.05	10	26.67	0.00	0.00	46.67	26.67	0.00	73.33
1.5	0.00	12	6.67	0.00	0.00	10.00	73.33	10.00	93.33
1.5	0.01	15	60.00	6.67	0.00	13.33	13.33	6.67	33.33
1.5	0.05	11	25.00	0.00	0.00	0.00	75.00	0.00	75.00
2.0	0.00	13	13.33	0.00	0.00	6.67	70.00	10.00	86.67
2.0	0.01	10	20.00	0.00	0.00	16.67	53.33	10.00	80.00
2.0	0.05	9	20.00	0.00	0.00	20.00	50.00	10.00	80.00
2.5	0.00	8	25.00	0.00	0.00	0.00	75.00	0.00	75.00
2.5	0.01	12	25.00	0.00	0.00	0.00	66.67	8.33	75.00
2.5	0.05	14	20.00	0.00	0.00	13.33	66.67	0.00	80.00
3.0	0.00	9	20.00	0.00	0.00	0.00	80.00	0.00	80.00
3.0	0.01	11	30.00	0.00	0.00	6.67	46.67	16.67	70.00
3.0	0.05	11	13.33	0.00	0.00	0.00	76.67	10.00	86.67

[1/] : จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตจากชิ้นส่วนเริ่มต้น 15 ชิ้นส่วน

S = ยอด SR = ยอด+ราก RC = ราก+แคลลัส

SCR = ยอด+แคลลัส+ราก SC = ยอด และแคลลัส C = แคลลัส

การทดลองที่ 3 ผลของ 2, 4-D ร่วมกับ TDZ ต่อการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพได้รับแสงสีขาว นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า แคลลัสมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณแคลลัสบริเวณผิวรอบ ๆ ก้อนแคลลัสเดิม แคลลัสที่เกิดใหม่มีลักษณะค่อนข้างกลมมนขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกัน มีสีขาวหรือขาวนวลบางส่วนเริ่มพัฒนาเป็นไรซอยด์หลังเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์และเริ่มพัฒนาเป็นยอดสีเขียวขนาดเล็กหลังเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์

เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการเกิดยอดบนก้อนแคลลัสในปริมาณแตกต่างตามระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ TDZ (ภาพที่ 5) โดยการไม่ใช้หรือใช้ 2,4-D อัตรา 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดยอดของแคลลัส แต่การใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้การเกิดยอดมากที่สุด (ตารางที่ 21) ทั้งนี้อิทธิพลของ TDZ ขึ้นกับการใช้ 2,4-D ด้วย โดยการใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวทำให้เกิดแคลลัสที่มีอัตราการเกิดยอดสูงที่สุดคือ 14.54 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 22)

นอกจากนี้ แคลลัสพัฒนาเป็นไรซอยด์เกิดขึ้นบนก้อนแคลลัสในปริมาณแตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ TDZ (ภาพที่ 6) โดยไม่มีพบอิทธิพลของ 2,4-D หรือ TDZ ต่ออัตราการเกิดไรซอยด์ (ตารางที่ 21) แต่มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2,4-D กับ TDZ ต่ออัตราการเกิดไรซอยด์ โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดไรซอยด์ไม่ต่างกันคือ 39.45 และ 31.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

สำหรับรูปแบบการเจริญเติบโตของแคลลัส พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตแคลลัสพัฒนาเกิดไรซอยด์ได้เล็กน้อย ขณะที่แคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พัฒนาเป็นเกิดไรซอยด์จำนวนมากปกคลุมก้อนแคลลัสและเกิดยอดสีเขียวบริเวณด้านบนก้อนแคลลัส ส่วนแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร พัฒนาเป็นยอดที่มีแผ่นใบค่อนข้างเรียวยาวชัดเจนและเกิดไรซอยด์ค่อนข้างยาว แคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มากนัก บางส่วนของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล พัฒนาเป็นไรซอยด์และเกิดยอดสีเขียวบนก้อน

แคลลัสได้เล็กน้อย ส่วนแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เกิดยอดขนาดเล็กมีสีเขียวหรือสีขาวด้านบนของก้อนแคลลัสและเกิดไรซอยด์ค่อนข้างมาก ส่วนแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร พัฒนาเป็นยอดขนาดเล็กมีสีเขียวหรือสีขาวและเกิดไรซอยด์ปกคลุมก้อนแคลลัส (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 24 อัตราการเกิดยอดและไรซอยด์ (เปอร์เซ็นต์) จากแคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D และ TDZ นาน 5 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		ยอด[1/]	ไรซอยด์[1/]
2,4-D	0	7.14	15.13
	0.5	4.84	24.67
TDZ	0	1.82b[2/]	12.27
	0.01	6.26ab	26.55
	0.05	11.49a	21.39
F-test			
2,4-D		ns	ns
TDZ		**	ns
2,4-D x TDZ		**	**
C.V.(%)		39.56	40.97

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

[2] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

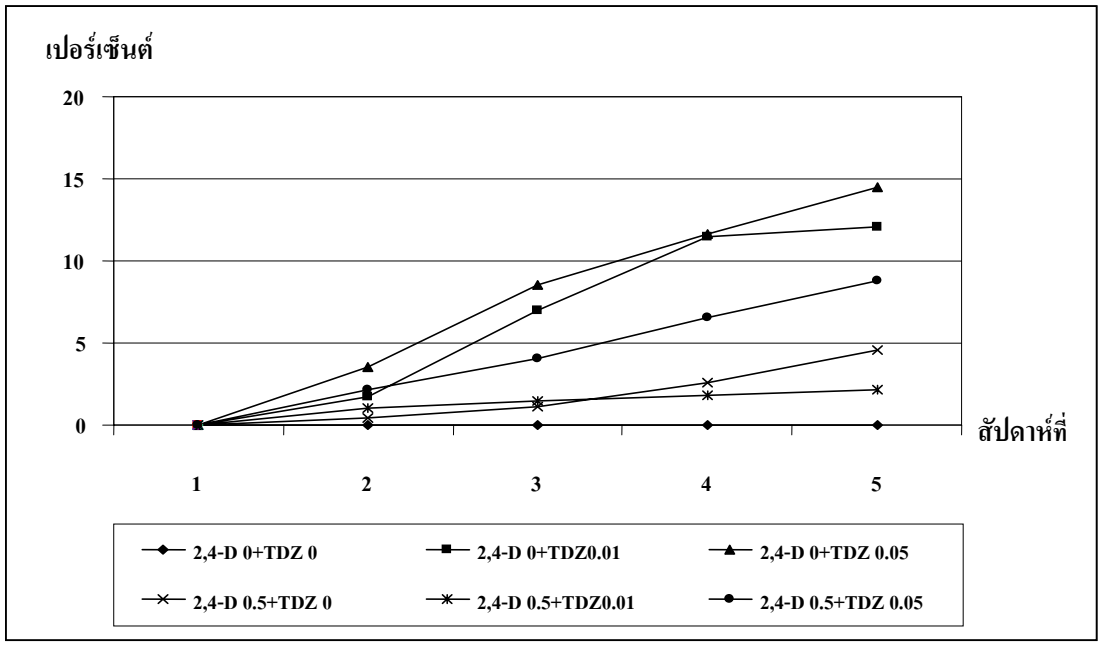
** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 25 อัตราการเกิดยอดและไรซอยด์ (เปอร์เซ็นต์) ของแคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 5 สัปดาห์

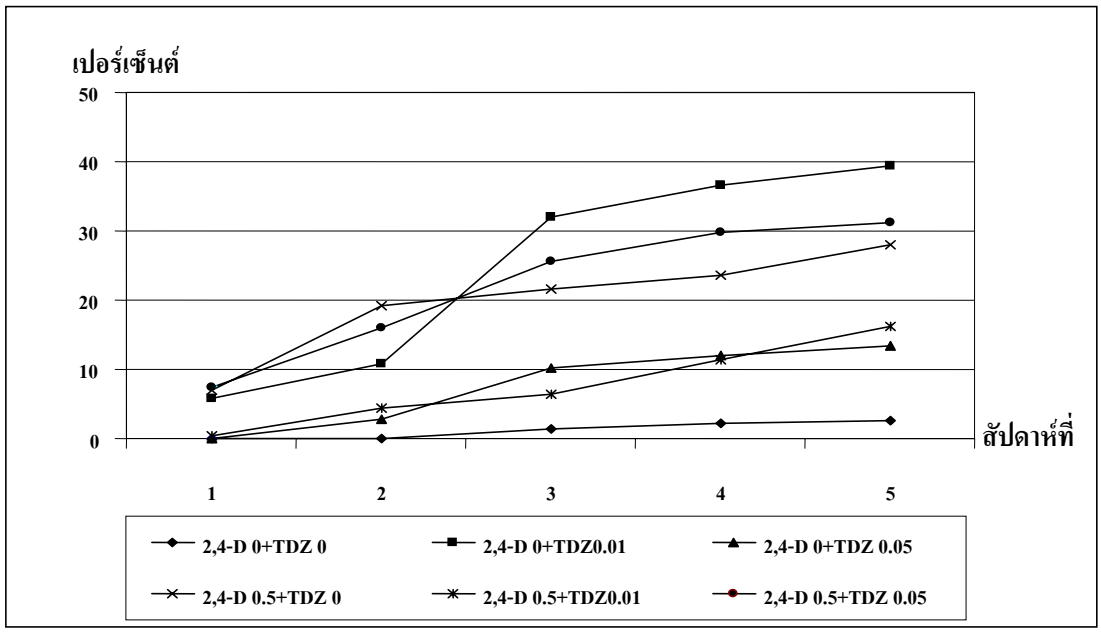
2,4-D (มก/ล)	TDZ (มก./ล.)	ยอด[1/]	ไรซอยด์[1/]
0	0	0.00c[2/]	2.58b
0	0.01	12.09ab	39.45a
0	0.05	14.54a	13.41ab
0.5	0	4.55abc	28.10ab
0.5	0.01	2.13bc	16.12ab
0.5	0.05	8.77ab	31.13a
C.V.(%)		39.56	40.97

[1/] : มีการแปลงข้อมูลโดยใช้ค่ารากที่สองของ X+1 ก่อนนำข้อมูลมาวิเคราะห์

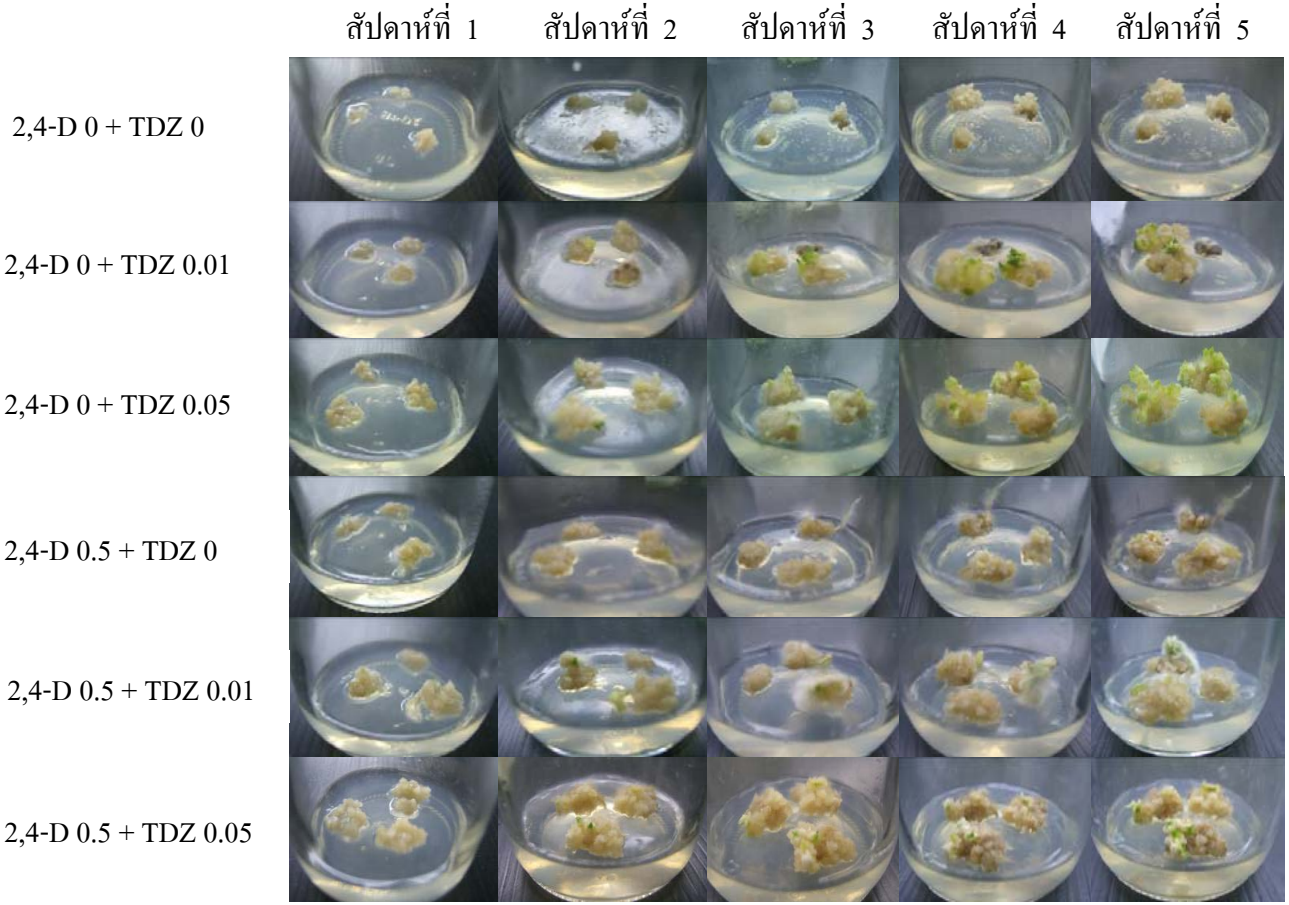
[2/] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย วิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 การพัฒนาเป็นยอดของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 1-5 สัปดาห์



ภาพที่ 6 การพัฒนาเป็นไรซอยด์ของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 1-5 สัปดาห์

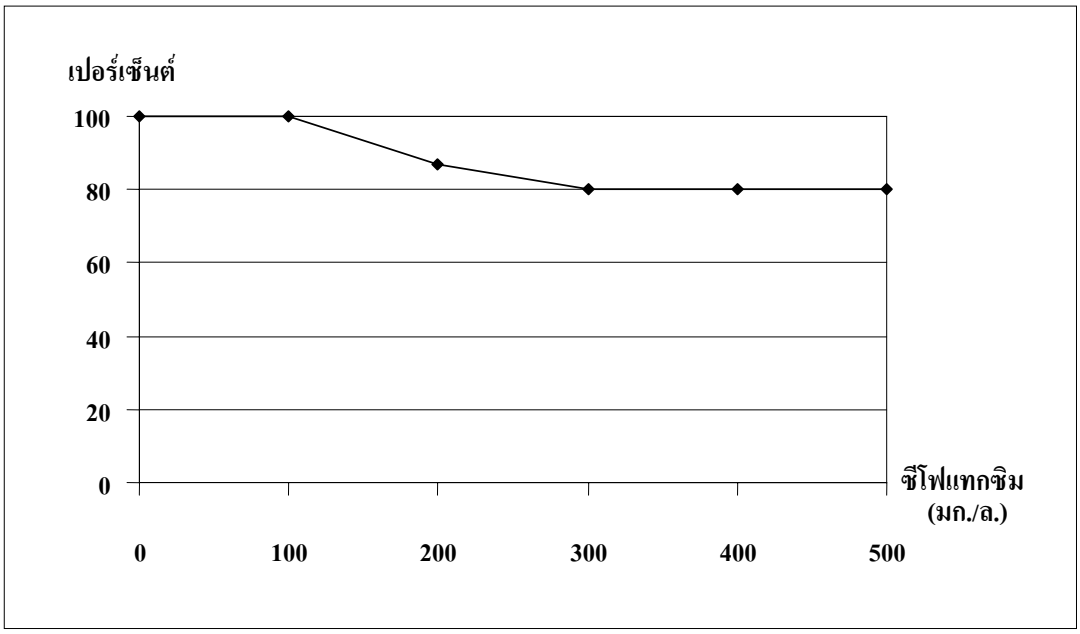


<u>ภาพที่ 7</u> การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็นยอดและไรซอยด์ของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ นาน 1-5 สัปดาห์

การทดลองที่ 4 ผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

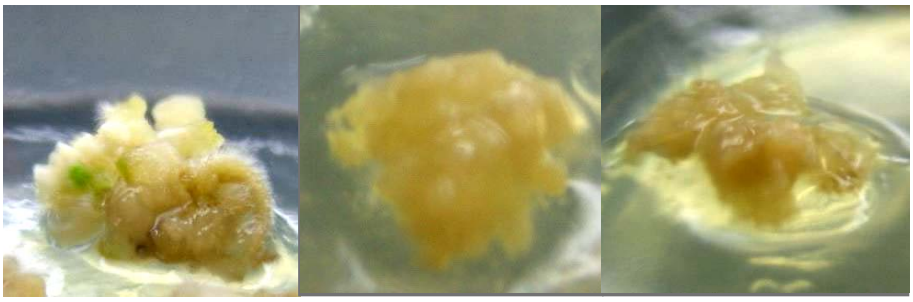
การทดลองที่ 4.1 ผลของซีโฟแทกซิม

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 หรือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีอัตรารอดชีวิตของแคลลัสเท่ากับ 100, 100, 86.67, 80, 80 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 8) ทั้งนี้แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารทุกสูตรโดยที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 100, 200 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเกิดยอดหรือไรซอยด์ได้ ในขณะที่อาหารที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้ม 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสไม่พัฒนาเกิดยอดหรือไรซอยด์ และค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล.ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างๆ นาน 4 สัปดาห์

0 100 200 มก./ล.

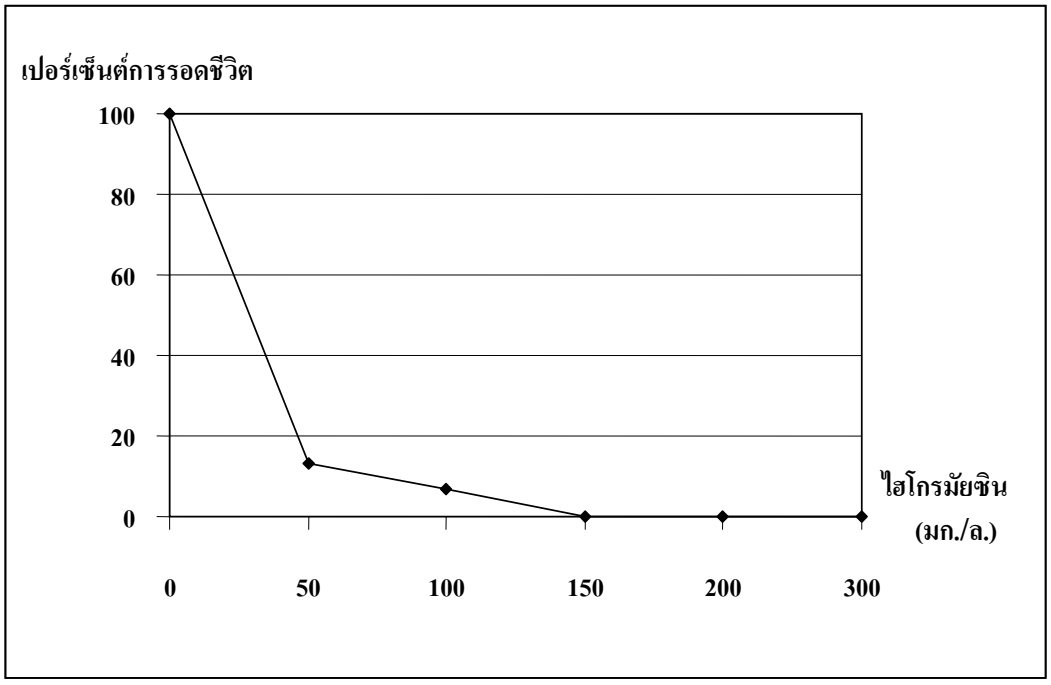


300 400 500 มก./ล.

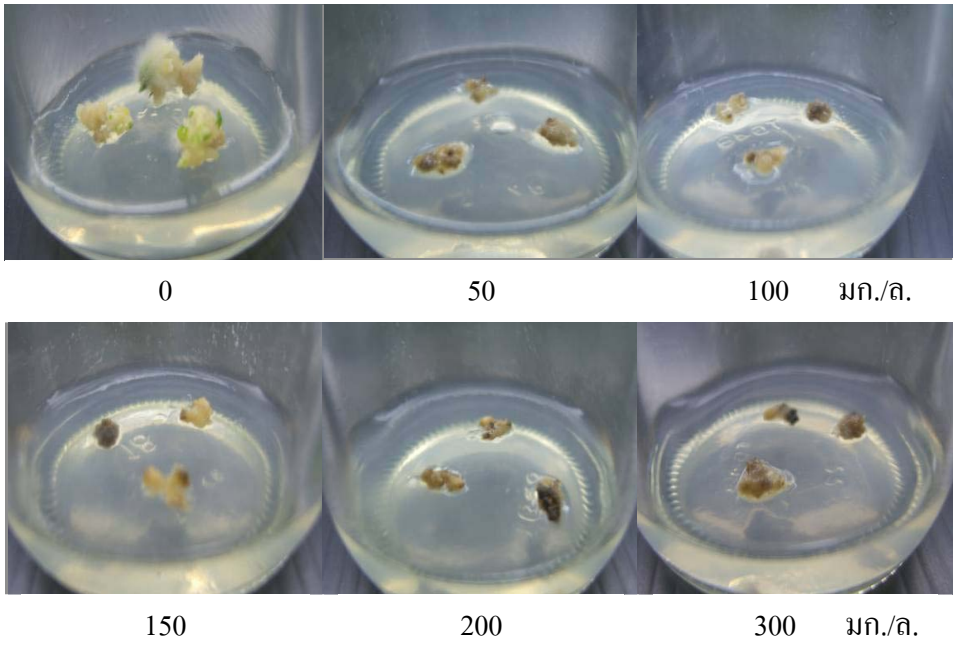
ภาพที่ 9 แคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างๆ นาน 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 4.2 ผลของไฮโกรมัยซิน

หลังเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนตั้งแต่สัปดาห์แรกและมีบางส่วนของก้อนแคลลัสเริ่มตายในสัปดาห์ที่ 2-4 โดยไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้แคลลัสตายได้ ทั้งนี้แคลลัสมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 100, 13.33, 6.67, 0, 0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 10) อนึ่งแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมไฮโกรมัยซินสามารถพัฒนาเป็นยอดและไรซอยด์ได้ (ภาพที่ 11)



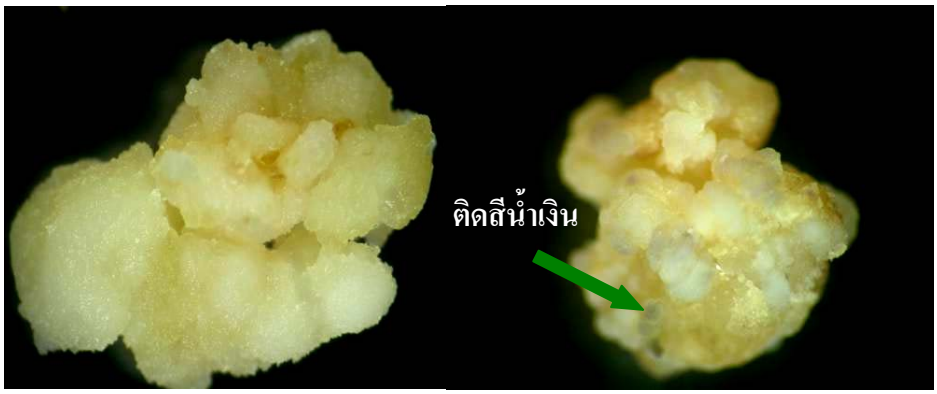
ภาพที่ 10 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์



ภาพที่ 11 แคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล.ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มก./ล. ซึ่งเติมไฮโกรมัยซินระดับต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 5 การถ่ายยีน *gus* สู่แคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

หลังจากบ่มแคลลัสปทุมมาร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1) ที่มียีน *gus* เป็นเวลา 15, 30, 45 หรือ 60 นาที แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเติม Acetosyringone เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน พบว่า มี *A. tumefaciens* เจริญบนอาหารและรอบๆ ก้อนแคลลัส เมื่อกำจัด *A. tumefaciens* ออกโดยล้างแคลลัสในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนลงอาหารสูตรเดิมที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่า แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลและสามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อสุ่มแคลลัสมาตรวจการแสดงออกของยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่า การบ่มแคลลัสร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 30 นาทีเท่านั้นที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* (ภาพที่ 12)



(ก) (ข)

ภาพที่ 12 การติดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่
(ก) แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
(ข) แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน *gus*

วิจารณ์

<u>การทดลองที่ 1 ผลของสภาพแสงและสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณต้นจากตำแหน่งต่าง ๆ ของช่อดอกอ่อนของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่</u>

การที่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียกับชิ้นพืชจากตำแหน่งปลาย กลางและโคนช่อดอกที่กลีบประดับยังหุ้มปิดสนิท ทั้งนี้เนื่องจากช่อดอกที่นำมาใช้ในงานทดลองเก็บมาจากแปลงปลูก ซึ่งมีการให้น้ำโดยระบบสปริงเกอร์ก่อนตัดช่อดอก ทำให้มีน้ำขังบริเวณซอกกาบใบที่ช่อดอกอ่อนโผล่ขึ้นมาซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อได้ ส่วนการที่พบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากไซโตไคนินมีอัตราการตายของเนื้อเยื่อสูงในทุกสภาพแสงที่เพาะเลี้ยง ทั้งนี้เนื่องจากไซโตไคนินมีอิทธิพลต่อการเคลื่อนย้ายสารอาหาร ได้แก่ วิตามิน และแร่ธาตุ โดยส่วนของพืชที่มีไซโตไคนินสามารถดึงอาหารมาจากส่วนอื่นๆได้ จากรายงานของ Sokolova *et al.* (2002) ที่ศึกษาการเคลื่อนย้ายของน้ำตาลซูโครสที่ติดฉลากด้วย ^{14}C (^{14}C-sucrose) ในใบบีทรูท (*Beta vulgaris* L.) พบว่า ใบที่ได้รับ BA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลมีการสะสมของ ^{14}C-sucrose ในใบสูงถึง 55.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบที่ได้รับน้ำไม่มีการสะสม ^{14}C-sucrose แต่มีการเคลื่อนย้ายของ ^{14}C-sucrose ที่เส้นกลางใบในปริมาณสูงมาก ส่วนการที่พบว่า ชิ้นพืชซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพมืดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการตายของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของไซไตไคนินที่สามารถชะลอการชราภาพ (senescense) ของใบและควบคุมการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ และเอ็นไซม์ต่างๆที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์แสงได้ (สุมนทิพย์, 2540 ก) เมื่ออยู่ในสภาพมืด แต่อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังคงมีอัตราการตายของเนื้อเยื่อสูง น่าจะแสดงให้เห็นว่า TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชะลอการชราของใบและควบคุมการพัฒนาของคลอโรพลาสต์สูงกว่าการใช้ BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มากถึง 20 เท่า (10 : 0.5)

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่นาน 12 สัปดาห์ ชิ้นพืชสามารถพัฒนาเกิดต้นได้โดยพบว่า การใช้ BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นที่มีจำนวนต้นและความสูงมากกว่าการใช้ TDZ เข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นไปตามรายงานของนพมณี และคณะ (2545) ที่ระบุว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งเติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ร่วมกับ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับชักนำช่อดอกให้เกิดต้น ส่วนการใช้ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะที่จะชักนำต้นอ่อนให้เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็น และสอดคล้องกับการทดลองของ Velcheva *et al.* (2005) ซึ่งศึกษาการชักนำต้นจากช่อดอกอ่อนของ *Aloe arboresens* โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไซโตไคนินชนิดต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 44.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Dithiothreitol เข้มข้น 480 ไมโครโมลาร์ เกิดต้นได้ดีที่สุดคือ 8 ต้นต่อชิ้นพืช ในขณะที่อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Dithiothreitol เข้มข้น 480 ไมโครโมลาร์ เกิดต้นเพียง 3.56 ต้นต่อชิ้นพืช

เมื่อพิจาณาถึงผลของสภาพแสงที่เพาะเลี้ยงต่อจำนวนต้นที่ได้ พบว่า แสงสีแดงส่งเสริมต่อการเกิดต้นมากที่สุด และให้ต้นมีความสูงมากที่สุด ขณะที่การทดลองของวิโรจน์ (2542) พบว่า การเพาะเลี้ยงช่อดอกปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสงสีขาวสามารถชักนำให้เกิดต้นมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพมืด จากการทดลองพบอิทธิพลร่วมของสูตรอาหารและสภาพแสงโดยพบว่าแสงสีแดงมีบทบาทส่งเสริมให้เกิดต้นกับชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มากที่สุดคือ 3.18 ต้นต่อชิ้นพืช ผลของงานทดลองนี้ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Goins *et al.* (1997) ที่พบว่า ข้าวสาลีที่ปลูกภายใต้แสงสีแดงมีผลทำให้ใบมีความยาวมากที่สุดเมื่อเทียบกับใบที่ได้รับแสงสีขาวหรือแสงสีแดงร่วมแสงสีน้ำเงิน 10 เปอร์เซ็นต์หรือแสงสีแดงร่วมกับแสงสีน้ำเงิน 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าแสงสีแดงมีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของต้นและคุณภาพของเมล็ดข้าวสาลีด้วย เนื่องจากมีช่วงคลื่นที่จำเป็นในการสังเคราะห์แสงและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช เช่นเดียวกับรายงานของ Hunter and Burritt (2004) พบว่า ใบเลี้ยงผักกาดที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด ในขณะที่แสงสีน้ำเงินมีผลยับยั้งการเกิดต้น

การที่พบว่า สภาพแสงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของต้นและใบ โดยต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงมีลำต้นที่สูง แผ่นใบสีเขียวค่อนข้างเรียวยาว ในขณะที่ต้นได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีน้ำเงินมีลำต้นอวบสั้น แผ่นใบสีเขียวค่อนข้างสั้นและแผ่นใบแผ่กว้างกว่าใบของต้นที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีขาวหรือแสงสีแดง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aksenova *et al.* (1994) ที่เพาะเลี้ยงมันฝรั่งในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ภายใต้สภาพแสงสีแดงลำต้นของมันฝรั่งมีลักษณะผอม ยืดยาว ใบมีขนาดเล็กและเกิดหัวขนาดเล็กเพียงเล็กน้อย ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีน้ำเงินมีลำต้นอวบสั้น

ใบที่มีขนาดใหญ่ และสามารถสร้างหัวขนาดเล็กได้มาก และสอดคล้องกับรายงานของ Saebo *et al.* (1995) ที่ศึกษาผลของคุณภาพแสงที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสงและโครงสร้างของใบ birch พบว่า แสงสีน้ำเงินมีผลต่อการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสง และมีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อพื้นที่ใบสูงสุด โครงสร้างของใบที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีน้ำเงินมีเนื้อเยื่อชั้น epidermis และ palisade ที่มีขนาดใหญ่แตกต่างจากโครงสร้างของใบที่ได้การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดงซึ่งมีชั้น epidermis และ palisade มีขนาดเล็ก จึงมีผลทำให้ลักษณะใบที่เลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีน้ำเงินมีขนาดใหญ่กว่าใบที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดง

ส่วนการที่ไม่พบอิทธิพลของตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อการเกิดต้นหรือความสูงของต้นนั้นแตกต่างจากรายงานของวิโรจน์ (2542) ที่พบว่า ชิ้นพืชส่วนโคนช่อดอกของปทุมมาเกิดต้นดีกว่าชิ้นพืชจากตำแหน่งส่วนปลายช่อดอก และจากรายงานของทิพย์สุดา (2540) ที่พบว่า ชิ้นพืชจากส่วนยอดและส่วนกลางช่อดอกอ่อนกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 เหมาะสมในการพัฒนาเป็นยอดมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากมาจากเนื้อเยื่อส่วนโคน และส่วนกลางช่อดอกมีพัฒนาการและมีสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินภายในชิ้นพืชสูงกว่าส่วนปลายช่อดอก ในขณะที่ส่วนปลายช่อดอกนั้นมีเนื้อเยื่อที่กำลังมีการแบ่งเซลล์ได้ดี (ลิลลี่, 2546) ดังนั้นเมื่อได้รับไซโตไคนินจากอาหารเพาะเลี้ยงจึงสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อิทธิพลของตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชบนช่อดอกน่าจะสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตของช่อดอกด้วย

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนราก พบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากมีออกซินในระดับที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากได้ ในขณะที่อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดรากได้ค่อนข้างน้อยซึ่งเกิดจากชิ้นพืชสามารถสร้างออกซินได้เอง นอกจากนี้ TDZ ซึ่งเป็นไซโตไคนินที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดยอด ดังนั้นจึงส่งเสริมต่อการเกิดยอดหรือกลุ่มยอดที่แคระแกรน แต่เมื่อชิ้นพืชมีระดับของไซโตไคนินลดลงต่ำกว่าระดับออกซินที่พืชสร้างได้เองก็จะทำให้ชิ้นพืชนั้นพัฒนาเกิดรากได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tefera and Wannakrairoj (2004) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงกระวานบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0, 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เกิดรากลดลงตามความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้นคือ 4.82, 3.15 และ 1.78 ราก ตามลำดับ

การที่พบว่า แสงสีขาว แสงสีแดง หรือแสงสีน้ำเงินสามารถชักนำให้เกิดรากได้ไม่แตกต่างกัน แต่สภาพมืดมีผลทำให้เกิดรากลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มแสงมีผลต่อการสร้างออกซินของชิ้นพืช โดยพืชสามารถสร้างออกซินเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสงมากขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจึงคงที่ (พีรเดช, 2537) ซึ่งจากการทดลองนี้ความเข้มแสงของแสงสีขาว แสงสีแดงและแสงสีน้ำเงินมีค่าใกล้เคียงกันคือ 43, 42 และ 45 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ตามลำดับ ซึ่งอาจมีผลทำให้ชิ้นพืชเกิดรากได้ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับรายงานของ Anotonopoulou *et al.* (2004) ที่ศึกษาผลของแสงต่อการเกิดรากของพืชสายพันธุ์ GF677 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพมืด สภาพแสงสีขาว แสงสีแดง แสงสีน้ำเงิน แสงสีเหลืองหรือแสงสีเขียว พบว่า ชิ้นพืชเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงต่างๆ เกิดรากได้ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่สภาพมืดเกิดรากน้อยที่สุด

จากการทดลองพบอิทธิพลของตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อการเกิดราก โดยส่วนโคนและส่วนกลางเกิดรากดีกว่าปลายช่อดอกช่อดอก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนโคนและส่วนกลางช่อดอกพัฒนาการและมีระดับของออกซินน้อยกว่าส่วนปลายช่อดอก นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหาร สภาพแสงและตำแหน่งของชิ้นพืชบนช่อดอกต่อการเกิดรากโดยพบว่า ส่วนโคนช่อดอกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงสีน้ำเงินเกิดรากมากที่สุดคือ 16.31 รากต่อชิ้น

การที่พบว่า ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นได้มากกว่าชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 11) เนื่องจาก TDZ เป็นไซโตไคนินที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า BA ดังนั้น การใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นได้ดีกว่าการใช้ BA ที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งจากการทดลองของ Lin *et al.* (2005) ที่ทำการเพาะเลี้ยงช่อดอกไผ่ พบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนช่อดอกไม่แตกต่างจากการใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีขาวเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีขนาดใหญ่กว่าสภาพแสงสีแดง แสงสีน้ำเงินหรือสภาพมืด ทั้งนี้เนื่องจากแสงสีขาวมีความยาวช่วงคลื่น 430-690 นาโนเมตร ซึ่งมีทั้งความยาวช่วงคลื่นของแสงน้ำเงินและแสงสีแดงอยู่ร่วมกัน ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของชิ้นส่วนได้ดีกว่าช่วงคลื่นแสงสีแดงหรือ

แสงสีน้ำเงินเพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับรายงานของ Burritt and Leung (2003) ที่ศึกษาการเกิดยอดจากก้านใบบีโกเนียลูกผสมในสภาพแสงต่างๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงในสภาพแสงสีขาวมีอัตราการเกิดยอดต่อชิ้นส่วนได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีแดง และพบว่า แสงสีน้ำเงินทำให้ชิ้นพืชมีการแบ่งเซลล์และขยายขนาดได้อย่างรวดเร็ว

ส่วนการที่พบว่า ส่วนปลายช่อดอกเกิดขนาดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีขนาดใหญ่ที่สุด อาจเนื่องจากชิ้นพืชบริเวณปลายช่อดอกมีจำนวนช่อดอกย่อยต่อชิ้นมากกว่าชิ้นพืชจากบริเวณส่วนกลางและส่วนโคนของช่อดอก และพบว่า ส่วนปลายช่อดอกที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีขาวเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 2.89 เซนติเมตร นอกจากนี้ พบว่าอาหารที่เติม TDZ หรือ BA เกิดกระจุกต้นมีความสูงไม่แตกต่างกัน และการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงสีขาว แสงสีแดง หรือแสงสีน้ำเงินมีผลต่อความสูงของกลุ่มยอดที่แคระเกร็นไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละแสงมีความเข้มข้นแสงใกล้เคียงกันจึงทำให้การเจริญเติบโตและตอบสนองต่อไซโตไคนินไม่แตกต่างกัน

<u>การทดลองที่ 2 ผลของแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่</u>

การชักนำแคลลัสจากชิ้นพืชส่วนโคนต้นบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Casein hydrolysate เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร วุ้น เข้มข้น 6.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตหรืออาหารที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว พัฒนาเป็นยอดหรือยอดพร้อมรากในทุกสภาพแสงที่เพาะเลี้ยง ส่วนชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดแคลลัสได้แตกต่างกันตามสภาพแสงที่เพาะเลี้ยง โดยพบอิทธิพลของระดับความเข้มข้น 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัส เช่นเดียวกับรายงานการชักนำแคลลัสในพืชวงศ์เดียวกันบนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ดังมีรายงานการใช้ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสจากกาบใบของ *Curcuma amada* ได้ดีที่สุด (Prakash *et al.*, 2004) การใช้ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำตาขมิ้นให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (Gayatri *et al.*, 2005) การใช้ 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนโคนต้นกระเจียวทั้งหมดสร้างแคลลัสได้

(สุพัตรา, 2541) หรือการใช้ 2,4-D เข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนโคนต้นหงส์เหินเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (ธิดา, 2544) ทั้งนี้เนื่องจาก 2,4-D เป็นออกซินซึ่งมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสสูง สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ ทำให้ภายในเซลล์มีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคและโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่การที่ไม่พบอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของ TDZ ต่ออัตราการเกิดแคลลัสนั้น น่าจะเป็นเพราะระดับความเข้มข้นที่ใช้ค่อนข้างต่ำจึงไม่มีผลต่ออัตราส่วนของออกซินกับไซโตไคนินในเนื้อเยื่อส่วนโคนต้น การที่ชิ้นพืชพัฒนาเกิดแคลลัสได้ 4 รูปแบบ คือ ชิ้นพืชที่พัฒนาเป็นแคลลัสเท่านั้น ชิ้นพืชที่พัฒนาทั้งยอดพร้อมแคลลัส ชิ้นพืชที่พัฒนาเป็นยอด รากและแคลลัสหรือชิ้นพืชพัฒนาเป็นรากก่อนแล้วเกิดแคลลัสบนราก นั้นน่าจะขึ้นอยู่กับ สัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินจากอาหารเพาะเลี้ยงและระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในชิ้นพืชเอง ตลอดจนตำแหน่งเนื้อเยื่อเจริญที่ตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต จึงทำให้ชิ้นพืชมีพัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสได้หลายรูปแบบบนอาหารสูตรเดียวกัน

นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลของสภาพแสงที่เพาะเลี้ยงต่ออัตราการเกิดแคลลัส โดยพบว่าแสงสีน้ำเงินส่งเสริมให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด รองมาคือแสงสีแดง ส่วนสภาพมืดหรือสภาพแสงสีขาวเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับรายงานของ ธิดา (2544) ที่พบว่า การชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนโคนต้นหงส์เหินบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืดและสภาพมีแสงเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันคือ 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และจากรายงานของ Islam *et al.* (2001) ที่พบว่า แคลลัสของกล้วยไม้ฟาแลนนอฟซีสสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดภายใต้แสงสีแดงและแสงสีเหลืองเมื่อเทียบกับแสงสีขาว

จากการทดลองไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของ 2,4-D, TDZ และสภาพแสงที่เพาะเลี้ยง ดังนั้นการพิจารณาว่าควรใช้สูตรอาหาร หรือสภาพแสงเพาะเลี้ยงแบบไหนที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัสจากชิ้นพืชส่วนโคนต้นปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่นั้น ขึ้นอยู่กับลักษณะแคลลัสที่ต้องการและอัตราการเกิดแคลลัส จากการทดลองนี้พบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงเหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำแคลลัสในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสเท่ากับ 91.67 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชิ้นพืชที่พัฒนาเกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียวสูงสุด คือ 33.33 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ต่อการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น

หลังจากย้ายแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0, 0.01 หรือ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็นยอดหรือไรซอยด์ในอัตราที่ต่างกันโดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็น TDZ อัตราที่สูงที่สุดเกิดยอดได้ดีที่สุดคือ 14.54 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดยอดได้ 12.09 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ทั้งนี้เนื่องจากสัดส่วนของออกซินกับไซโตไคนินที่เปลี่ยนแปลงไปมีผลต่อการพัฒนาของแคลลัส โดยถ้าออกซินมีสัดส่วนที่สูงกว่าไซโตไคนินแคลลัสจะพัฒนาเป็นราก แต่ถ้าออกซินมีสัดส่วนต่ำกว่าไซโตไคนินแคลลัสจะพัฒนาเป็นยอด (รังสฤษดิ์, 2540)

การที่ 2,4-D ไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดยอด แต่มีแนวโน้มลดการเกิดยอดของแคลลัส ในขณะที่ TDZ มีผลทำให้แคลลัสเกิดยอดเพิ่มขึ้น เมื่อสัดส่วนของออกซินกับไซโตไคนินน้อยลง แต่พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวสามารถพัฒนาเกิดยอดได้ 4.55 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากแคลลัสเหล่านี้ย้ายมาจากอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นอาจได้รับอิทธิพลของ TDZ จากอาหารเดิมโดยแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอดได้นั้นเป็นแคลลัสที่อยู่บริเวณด้านบนของก้อนแคลลัสซึ่งไม่ได้สัมผัสอาหารโดยตรง อย่างไรก็ตาม 2,4-D มีผลทำให้แคลลัสส่วนใหญ่พัฒนาการเป็นไรซอยด์ในอัตราที่สูงคือ 28.10 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังพบว่า 2,4-D หรือ TDZ ไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดไรซอยด์ แต่พบอิทธิพลร่วมระหว่าง 2,4-D กับ TDZ ซึ่งมีผลทำให้แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นไรซอยด์ไม่แตกต่างกันคือ 39.45 และ 31.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนที่เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจได้รับอิทธิพลของ 2,4-D จากอาหารเดิมซึ่งสังเกตได้จากการที่ไรซอยด์เกิดขึ้นด้านบนก้อนแคลลัสซึ่งไม่ได้สัมผัสอาหารโดยตรง ไม่ต่างจากแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น อาจเนื่องจากได้รับ 2,4-D จาก

อาหารต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน (4 รอบ) จึงทำให้มีระดับออกซินในเซลล์สูงจึงพัฒนาเป็นไรซอยด์ได้มากกว่าการเกิดยอด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแคลลัสปทุมมาจึงควรใช้อาหารที่มีออกซินต่ำ นอกจากนี้การที่ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของแคลลัสซึ่งพัฒนาเป็นยอดและไรซอยด์ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงคือ 39.56 และ 40.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นควรเพิ่มจำนวนซ้ำในการศึกษาครั้งต่อไป

จากการทดลองสามารถเห็นได้ว่าแคลลัสเกิดยอดได้ เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีออกซินหรือเพิ่มระดับของไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับรายงานของ Arunyanart and Chaitrayagum (2005) ที่พบว่า แคลลัสบัวหลวงซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถเกิดต้นได้ เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ หรืออาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เช่นเดียวกับแคลลัสซึ่งได้จากอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีเมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณออกซินซึ่งลดลงมีผลแคลลัสพัฒนาเกิดยอดได้ เช่นเดียวกับ Al-juboory *et al.* (1998) ที่พบว่า แคลลัสจากใบต้นพุดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

<u>การทดลองที่ 4 ผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่</u>

การทดลองที่ 4.1 ผลของซีโฟแทกซิม

ซีโฟแทกซิมเป็นสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการกำจัด *A. tumefacience* ออกจากเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยซีโฟแทกซิมจะเข้าไปจับกับเอ็นไซม์ peptiglycan transpeptidase ทำให้ไม่มีการเชื่อมต่อของสาย peptidoglycan จึงมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยไม่มีผลต่อเซลล์พืช มีรายงานการใช้ซีโฟแทกซิมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิดมีผลกระทบต่อการเจริญของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน โดยอาจส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัส กระตุ้นการเกิดยอดหรือไรซอยด์ และยับยั้งการเกิดยอดหรือไรซอยด์ได้

จากการทดลองนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมซีโฟแทกซิมเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 หรือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 100, 200 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแคลลัสใหม่ได้ รวมทั้งมีพัฒนาการเป็นยอดและไรซอยด์ได้ ในขณะที่การใช้ซีโฟแทกซิม เข้มข้น 400 หรือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและพัฒนาเกิดยอดหรือไรซอยด์น้อยมาก นอกจากนี้สังเกตพบว่าแคลลัสมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นยอดหรือไรซอยด์ได้ดีบนอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่เติมซีโฟแทกซิม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ d'Utra Vaz *et al*. (1993) ที่พบว่าซีโฟแทกซิม เข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ช่วยให้โพรโทพลาสต์แบ่งเซลล์ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่เติมซีโฟแทกซิม นอกจากนี้ Caboni *et al.* (1999) ยังได้พบว่า การเติมซีโฟแทกซิมในอาหารเพาะเลี้ยงใบแพร์ช่วยเพิ่มอัตราการยอดและช่วยเพิ่มจำนวนยอดต่อชิ้นพืชได้ดีกว่าอาหารที่ไม่เติมซีโฟแทกซิม และจากรายงานของ Danilova and Kolgikh (2004) พบว่า แคลลัสข้าวโพดสายพันธุ์ A188 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่าอาหารที่ไม่เติมซีโฟแทกซิม 2 เท่า แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของซีโฟแทกซิมเป็น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเกิดยอดลง 33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติมซีโฟแทกซิม ทั้งนี้เนื่องจากซีโฟแทกซิมสลายตัวให้สารที่มีฤทธิ์คล้ายออกซินจึงมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตหรือพัฒนาการของแคลลัสได้ แต่หากมีมากเกินไปก็มีผลกระทบต่อพัฒนาการของแคลลัสได้เช่นกัน โดยสารดังกล่าวมีผลทำให้ไรโบโซมเกิดการสลายตัว ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และรบกวนการเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรน (Zhang *et al*., 1999) ดังนั้น การเติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสปทุมมาจึงน่าจะสามารถใช้ในการกำจัด *A. tumefaciens* หลังได้รับการถ่ายยีนโดยไม่มีผลกระทบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของแคลลัสปทุมมา

การทดลองที่ 4.2 ผลของไฮโกรมัยซิน

ไฮโกรมัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรียและใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยไฮโกรมัยซินเข้าไปเกาะกับ binding site ของ elongation factor2 (EF2) ยับยั้ง peptide chain elongation ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนที่มียีน *hpt* ซึ่งเป็นยีนต้านทานไฮโกรมัยซินจาก *Escherichia coli* โดยยีนดังกล่าวมีรหัสสำหรับสร้างเอ็นไซม์ hygromycin phosphotransferase ซึ่งมีฤทธิ์ต้านทานไฮโกรมัยซิน โดยมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่หมู่ไฮดรอกซิล

ของไฮโกรมัยซิน (สุมนทิพย์, 2540 ข) ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *hpt* ขึ้นอยู่กับ ชนิดของเนื้อเยื่อ อาหาร สภาพการเพาะเลี้ยง และ cell metabolic rate

หลังเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์แล้วพบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้นตั้งแต่ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไปสามารถฆ่าแคลลัสได้ ขณะที่อาหารซึ่งไม่เติมไฮโกรมัยซินทำให้แคลลัสสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเกิดยอดได้ ดังนั้นอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มน่าจะสามารถใช้ในการคัดเลือกแคลลัสของปทุมมาที่ได้รับการถ่ายยีน *hpt* ซึ่งต้องทำการทดลองหาระดับความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวอีกครั้งเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้การถ่ายยีนเมื่อใช้ระยะเวลาคัดเลือกที่ยาวนานขึ้น จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเป็นระดับความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น กล้วยไม้ (Yu *et al.* ,1999), กล้วยไม้หวายเอื้องแซะ (พิสิฐ, 2546), หญ้าเนเปียร์ (ปาริสัชชา, 2547), ข้าว (เกศสุดนธ์, 2548) ซึ่งใช้ไฮโกรมัยซินในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ระดับความเข้มข้น 50, 30, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

<u>การทดลองที่ 5 การถ่ายยีน *gus* สู่แคลลัสปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่</u>

หลังจากบ่มแคลลัสของปทุมมาร่วมกับแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA1305.1 ที่มียีน *gus*) เป็นเวลา 0, 15, 30, 45 หรือ 60 นาที ในอาหารที่เติม Acetosyringone เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ แล้วย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารชักนำแคลลัสเป็นเวลา 2 วันก่อนกำจัด *Agrobacterium* ออกจากเนื้อเยื่อและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมนาน 7 วันแล้วคัดเลือกแคลลัสบางส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS assay พบว่า การบ่มแคลลัสปทุมมาร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นเวลานาน 30 นาที สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ได้ ส่วนการบ่มแคลลัสเป็นเวลา 15 นาที ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* เนื่องมาจากระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มแคลลัสร่วมกับ *Agrobacterium* ที่สั้นเกินไปมีผลทำให้แคลลัสนั้นได้รับเชื้อ *Agrobacterium* น้อยโอกาสที่เกิดการถ่ายยีนจึงน้อยลงด้วย ขณะที่พบว่า การใช้ระยะเวลาในการบ่มแคลลัสร่วมกับ *Agrobacterium* นาน 45 และ 60 นาที มีผลทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอ่อนและมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งน่าจะเป็นเพราะเมื่อแคลลัสสัมผัสกับเชื้อ *Agrobacterium* จะผลิตสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งการบุกรุกและการ

เจริญเติบโตของเชื้อ *Agrobacterium* (Henrique *et al*., 2004) การที่แคลลัสสัมผัสกับเชื้อ *Agrobacterium* ปริมาณมากจึงมีการสร้างสารทุติยภูมิมากจนเกิดผลกระทบต่อการรอดชีวิตและพัฒนาการแคลลัสเอง

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี GUS assay พบว่า เกิดสีน้ำเงินได้ดีกับแคลลัสที่เกิดขึ้นใหม่มากกว่าแคลลัสเดิมบนก้อนเดียวกัน ดังนั้น อายุของแคลลัสน่าที่จะมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการถ่ายยีน เช่นการทดลองของ เกศสุคนธ์ (2548) พบว่า แคลลัสของข้าวที่มีอายุ 5 วันสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ได้มากกว่าแคลลัสที่มีอายุ 7 วัน เนื่องจากมีลักษณะอ่อนนุ่มและมีแบ่งเซลล์ดีกว่าแคลลัสที่มีอายุมากทำให้ *Agrobaterium* ส่งถ่ายยีนเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมได้มากกว่า

ดังนั้นควรศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น อายุและลักษณะของแคลลัส ความเข้มข้นของ Acetosyringone ที่เหมาะสม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* รวมทั้งสภาพการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่อย่างถาวรในการศึกษาครั้งต่อไป

สรุป

ช่อดอกอ่อนปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่สามารถพัฒนาเกิดเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดต้นมากที่สุด คือ 1.46 ต้นต่อชิ้นพืชได้หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ โดยอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็น ซึ่งส่วนปลายช่อดอกเกิดกลุ่มยอดที่แคระเกร็นที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 2.50 เซนติเมตร ต่อชิ้นพืช ภายใต้แสงสีขาว

ชิ้นส่วนโคนต้นปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่สามารถเกิดแคลลัสได้บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 - 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงสีแดงเหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสจากชิ้นพืชส่วนโคนต้นของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่มากที่สุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียวสูงสุด คือ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้แคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 5 สัปดาห์ สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเกิดยอดได้สูงสุด 14.54 เปอร์เซ็นต์ ต่อก้อนแคลลัส หลังเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์

แคลลัสของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นยอดหรือไรซอยด์ได้เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ บนอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถกำจัด *Agrobacterium* ได้ ขณะที่ไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสปทุมมาในเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนการบ่มแคลลัสปทุมมาร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1) ที่มียีน *gus* ในอาหารที่เติม Acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2545. **เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับปทุมมา**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

เกศสุคนธ์ มณีวรรณ. 2548. **การส่งถ่ายยีนไคทิเนสสู่ข้าว (*Oryza sativa* L.)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธิดา ชยุติมันต์กุล. 2544. **การเกิดยอดและแคลลัสของหงส์เหินดอกขาวในสภาพปลอดเชื้อ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นพมณี โทปุญญานนท์, ศิริรัตน์ จงแสง, สินีธร สมสืบและปวีณา นวมเจริญ. 2545. ระบบการผลิตต้นปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.), น. 14. *ใน* **การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 2.** โรงแรมเจริญธานีปริ๊นเซส, ขอนแก่น.

นิตย์ศรี แสงเดือน และ สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2548. **เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เบ็ญจรงค์ จิรเศวตกุล, ปาริชาติ นุกูลการ, นุชญา ณ สงขลา, เศรษฐพงษ์ เลขะวัฒนะ และทวีพงศ์ สุวรรณโร. 2542. **เอกสารวิชาการ เรื่อง การผลิตปทุมมาครบวงจร.** โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ.

ปาริสัชชา แสงสุวรรณ. 2547. **การโคลนยีน *glutamine synthetase* และการถ่ายยีน *ascorbate peroxidase* เข้าสู่หญ้าเนเปียร์แคระ *(Pennisetum purpureum* cv. Mott).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณี ปัญญารส. 2542. **ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของปทุมมา.** ปัญหาพิเศษเพื่อประกอบการทำปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

พรรณธิดา แพทยานันท์. 2542. **การเลือกตำแหน่งบนช่อดอกปทุมมาที่เหมาะสมต่อการเป็นชิ้นส่วนตั้งต้นในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** ปัญหาพิเศษเพื่อประกอบการทำปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

พิสิฐ ชัยประเดิมศักดิ์. 2546. **การศึกษาวิธีการถ่ายยีน Chalcone reductase (*chr*) และ Dihydroflavonol-4-reductase (*dfr*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยอะโกรแบคทีเรียม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ออกซิน, น. 1-12 *ใน* **เอกสารประกอบการฝึกอบรม การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทางการเกษตร.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ. 2546. **การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการของพืช.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิภาดา ทองทักษิณ, สุปัน ไม้ดัดจันทร์ และ บุญแถม ถาคำฟู. 2545. โครงการผลิตปทุมมาปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, น. 33. *ใน* **การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 2.** โรงแรมเจริญธานีปริ๊นเซส, ขอนแก่น.

วิโรจน์ มหายศนันท์. 2542. **การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดต้นใหม่จากช่อดอกปทุมมาโดยวิธีเพาะเนื้อเยื่อ.** ปัญหาพิเศษเพื่อประกอบการทำปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ศิริรัตน์ จงแสง. 2542. **การเจริญเติบโต การพัฒนา และการผันกลับของช่อดอกปทุมมาในสภาพขวดแก้ว.** ปัญหาพิเศษเพื่อประกอบการทำปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ทิพย์สุดา อนันกุล. 2540. **การขยายพันธุ์กระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 ในสภาพปลอดเชื้อ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุพัตรา สระธรรม. 2541**. การเจริญเติบโตของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่ได้จากลำต้นของกระเจียวที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุมนทิพย์ บุนนาค. 2540 ก. **การเจริญเติบโตและฮอร์โมนพืช.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

_____. 2540 ข. **เทคโนโลยีการส่งถ่ายจีนสู่พืชชั้นสูง.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. **ปทุมมาและกระเจียว.** อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. **เอกสารวิชาการ เรื่อง ปทุมมา.** โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** โรงพิมพ์อติสรรค์, กรุงเทพฯ.

Aksenova, N.P., T.N. Konstantinova, L.I. Sergeeva, I. Machackova and S.A. Golyaovskaya. 1994. Morphogenesis of potato plants in vitro. I. Effect of light quality and hormones. **Plant Growth Regulation** 13: 143-146.

Al-Juboory, K.H., R.M. Skirvin and D.J. Williams. 1998. Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. **Scientia Horticulturae** 72: 171-178.

Antonopoulou, C., K. Dimassi, I. Therios and C. Chatzissavvidis. 2004. The influence of radiation quality on the in vitro rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum** 48: 549-553.

Arunyanart, S. and M. Chaitrayagun. 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo mucifera* Geartn.). **Scientia Horticulturae** 105: 411-420.

Belarmino, M.M. and M. Mii. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. **Plant Cell Reports** 19: 435-442.

Burritt, D. J. and D.W.M. Leung. 2003. Adventitious shoot regeneration from *Begonia x erythrophylla* petiole sections is developmentally sensitive to light quality. **Physiologia Plantarum** 118: 289-296.

Caboni, E., M.G. Tomelli, P. Lauri, S.D'Angeli and C. Damiano. 1999. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 59: 1-7.

Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y. Kim and D.H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Scientia Horticulturae** 96: 213-224.

Cheng, M., B.A. Lowe, T.M. Spencer, X. Ye and C.L. Armstrong. 2004. Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of monocotyledonous species. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant** 40: 31-45.

Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen , R.N. Beachy and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding** 7: 25-33.

Danilova, S.A. and Y.I. Dolgikh. 2004. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. **Russian Journal of Plant Physiology** 51: 559-562.

Deroles, S.C., M.R. Boase, C.E. Lee and T.A. Peters. 2002. Gene transfer to plants, pp.155-196. *In* A. Vainstein, ed. **Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches.** Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

d'Utra Vas., F.B., A.V.P. dos Santos, G. Manders, E.C. Cocking, M.R. Davey and J.B. Power. 1993. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv flavicarpa Degener.) : The importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports** 12: 220-225.

Gayatri, M. C., V. Roopa darshini and R. Kavyashree. 2005. Selection of turmeric callus for tolerant to culture filtrate of *Pythium graminicolum* and regeneration of plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 83: 33-40 .

Goins, G.D., N.C. Yorio, M.M. Sanwo and C.S. Brown. 1997. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and withoutsupplemental blue lighting. **Journal of Experimental Botany** 48: 1407-1413.

Henrique, C., S. Carvalho, U.B. Zehr, N. Gunaratna, J. Anderson, H.H Kononowicz, T.K. Hodges and J.D. Axtell. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect trans formation efficiency. **Genetics and Molecular Biology** 27: 259-269.

Herrera-Estrella, L., J. Simpson and M. Marti′nez-Trujillo. 2005. Transgenic plants : An historical perspective, pp. 1-31. *In* L. Pena, ed. **Transgenic plants : methods and protocols**. Humana Press Inc., New Jersey.

Hinchee, M.A.W., D.R. Corbin, Ch. L. Armstrong, J.E. Fry, S.S. Sato, D.L. DeBoer, W.L. Peteson, T.A. Armstrong, D.V. Connor-Ward, J.G. Layton and R.B. Horsch. 1994. Plant transformation, pp. 231-270. *In* I.K. Vasil and T.A. Thorpe, eds. **Plant Cell and Tissue Culture.** Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Hunter, D.C. and D.J. Burritt. 2004. Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). ***In Vitro*** **Cellular and Developmental Biology-Plant** 40: 215-220.

Ignacimuthu S.,S.j. 1997. **Plant Biotechnology.** Science Publishers Inc., USA.

Islam, M.O., S. Matsui, K. Iwao and S. Ichihashi. 2001. Effect of light intensity and quality on the growth of callus and callus derived plantlets in *Phalaenopsis*. **Proceedings of APOC7**, Nagoya, Japan.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biological Reporter** 5: 387-405.

Jeske, H. 1998. Pathogens and symbionts as growth modulators, pp. 236-243. *In* P.Westhoff, ed. **Molecular plant development form gene to plant**. Oxford University Press, New York.

Kumar, K.K., S. Maruthasalam, M. Loganathan, D. Sudhakar and P. Balasubramanian. 2005. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite *indica* rice cultivars. **Plant Molecular Biology Reporter** 23:67-73.

Lamp, B.C. 2000. **The Applied Genetic of Plant, Animal, Humans and Fungi.** Imperial College Press, London.

Liu, Y., H. Yang and A. Sakanishi. 2006. Ultrasound : Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. **Biotechnology Advances** 24: 1-16.

Lin, H.S., C. van der Toorn, K.J.J.M. Raemakers, R.G.F.Visser, M.J. De Jue and E. Jacobesen. 2000. Genetic transformation of *Alstroemeria* using particle bombardment. **Molecular Breeding** 6: 369-377.

Lin, C.S., M.J. Cheng, H.W. Hsiao, P.I. Hong, F.Y. Jheng, C.C. Lin and W.C. Chang. 2000. Stamen-less inflorescence proliferation of *Bambusa edulis.* **Scientia Horticulturae** 107: 76-80.

Malabadi, R.B., G.S. Mulgund and K. Nataraja. 2005. Effect of triacontanol on the micropropagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. using rhizome thin sections. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant** 41: 129-132.

Malamug, J.J.F., H. Inden and T. Asahira. 1991. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. **Scientia Horticulturae** 48: 89-97.

Mauro, A.O., J.C.M. Nobrega, S.M.Z. Mauro and G.B. Collins. 2000. Interactions in the *Agrobacterium*-soybean and capability of some Brazilian soybean cultivars to produce somatic embryos. **Genetics and Molecular Biology** 23: 217-220.

McElroy, D. and R.I.S. Brettell. 1994. Foreign gene expression in transgenic cereals. **Trends in Biotechnology** 12: 62-68.

Mello, M. O., M. Melo and B. Appezzato-da-Glo′ria. 2001. Histological analysis of the callogenesis and organogenesis from root segments of *Curcuma zedoaris* Roscoe. **Brazilian archives of Biology and Technology** 44: 197-203.

Men, S., X. Ming, R. Liu, C. Wei and Y. Li. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75: 63-71.

Morini, S., C. D'Onofrio, G. Billocchi and M. Fisichella. 2000. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 63: 47-55.

Muleo, R. and S. Morini, 1990. Effect of light quality on regeneration from callus of *Actinidia deliciosa*. **Acta Horticulturae** 280: 155-158.

Nandakumar, R., L. Chen and S.M.D Rogers. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L.(Broadleaf cattail). **Plant Cell Reports** 23: 744-750.

Opabode, J.T. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. **Biotechnology and Molecular Biology Review** 1: 12-20.

Prakash, S.; R. Elangomathavan, S. Seshadri, K. Kathiravan and S. Ignacimuthu. 2004. Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. plantlets from rhizome and leaf sheath explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 78: 159-165.

Puddephat, I. 2003. Plant genetic engineering, pp. 82-133. *In* H.J. Newbury, ed. **Plant Molecular Breeding.** Sheffield Academic Press, UK.

Rahman, M.M., M.N. Amin, T. Ahamed, M.R. Ali and A. Habib. 2004. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf base-derived callus of *Kaempferia gulangal* L. **Asian Journal of Plant Scienecs** 3: 675-678.

Saebo, A., T. Krekling and M. Appelgren. 1995. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 41: 177-185.

Saharan, V., R.C. Yadav, N.R. Yadav and K. Ram. 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology 3: 572-575.

Sokolova, S.V., N.O. Balakshina and M.S. Krasavina. 2002. Activation of soluble acid invertase accompanies the cytokinin-induced source-sink leaf transition. Russian Journal of Plant Physiology 49: 98-104.

Tefera, W. and S. Wannakrairoj. 2004. Micropropagation of krawan (*Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep). **ScienceAsia** 30: 9-15.

Terada, R., H. Asao and S. Iida. 2004. A large-scale *Agrobacterium*-mediated transformation procedure with a strong positive-negative selection for gene targeting in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports** 22: 653-659.

Velcheva, M., Z. Faltin, A. Vardi, Y. Eshdat and A. Perl. 2005. Regeneration of *Aloe arborescens* via somatic organogenesis from young inflorescences. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 83: 293-301.

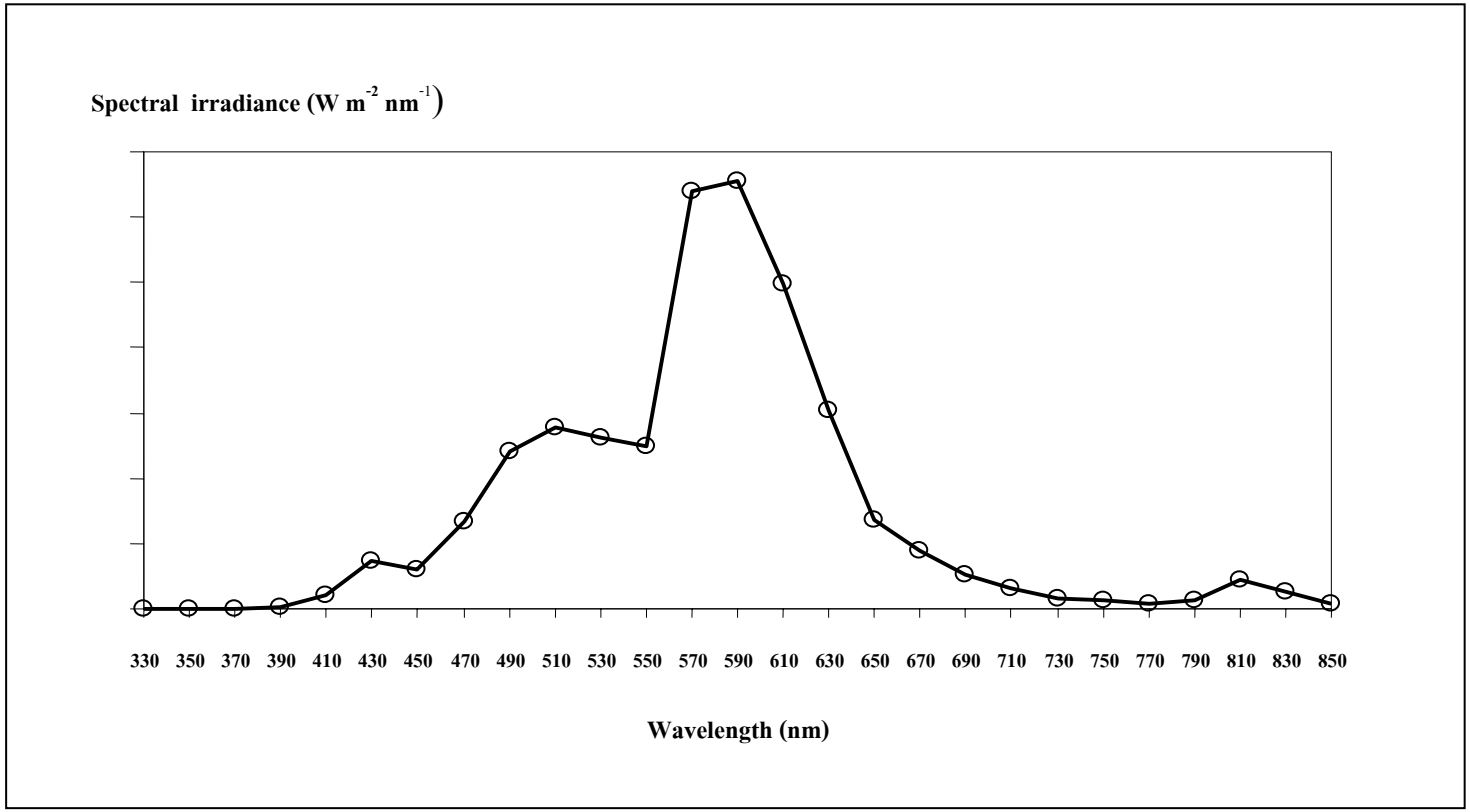
Walden R. and R. Wingender. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. **Trends in Biotechnology** 13: 324-331.

Wannakrairoj, S. 1992. *In vitro* propagation of patumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.). **HortScinece** 27: 97.

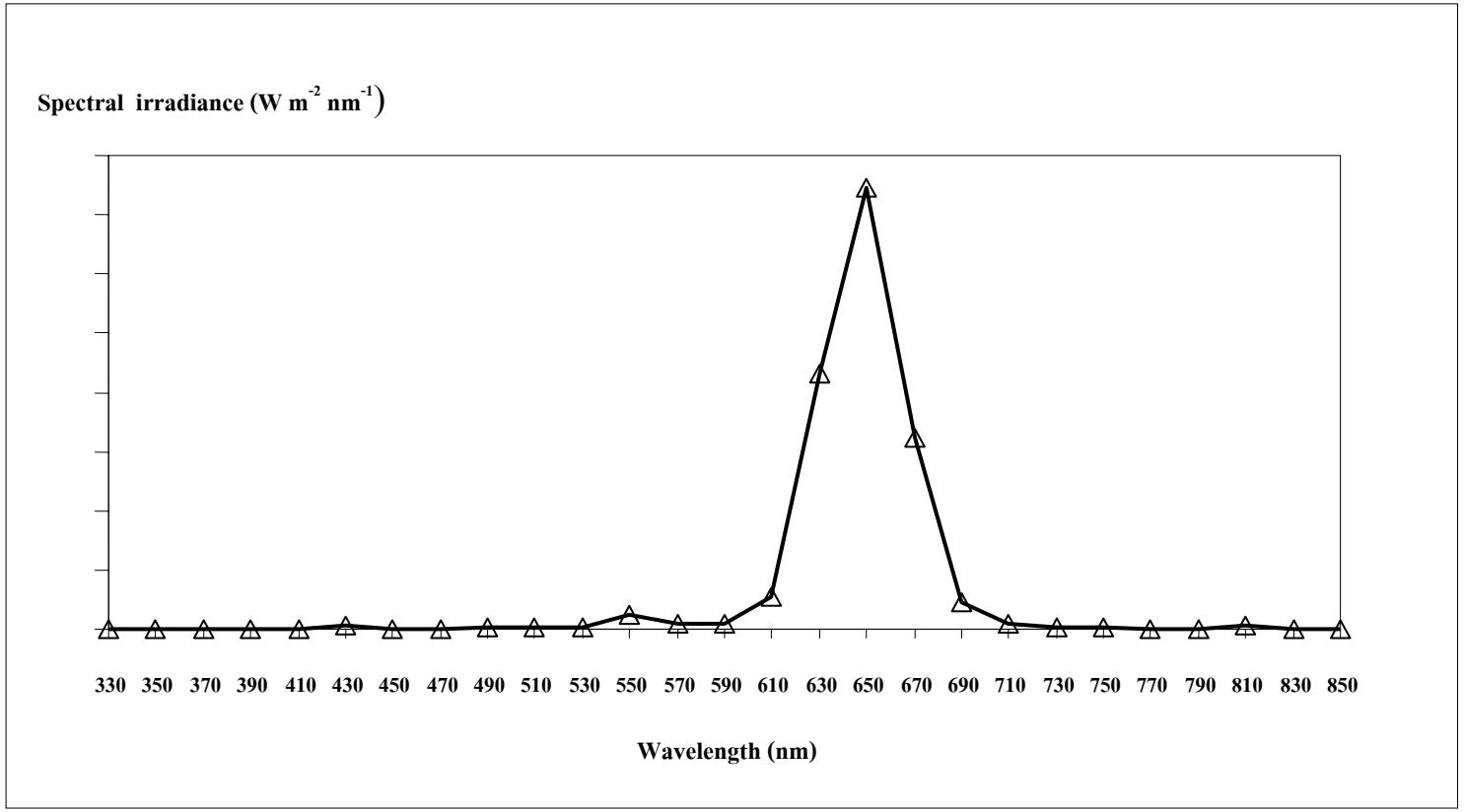
Yu, Z., M.Chen, L.Nie, H. Lu, X Ming. and H. Zheng. 1999. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 58: 87-192.

Zhang, Y., X.Yin, A.Yang, G. Li and J Zhang. 2005. Stability of inheritance of transgenes in maize (*Zea mays* L.) lines produced using different transformation methods. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 144: 11-22.

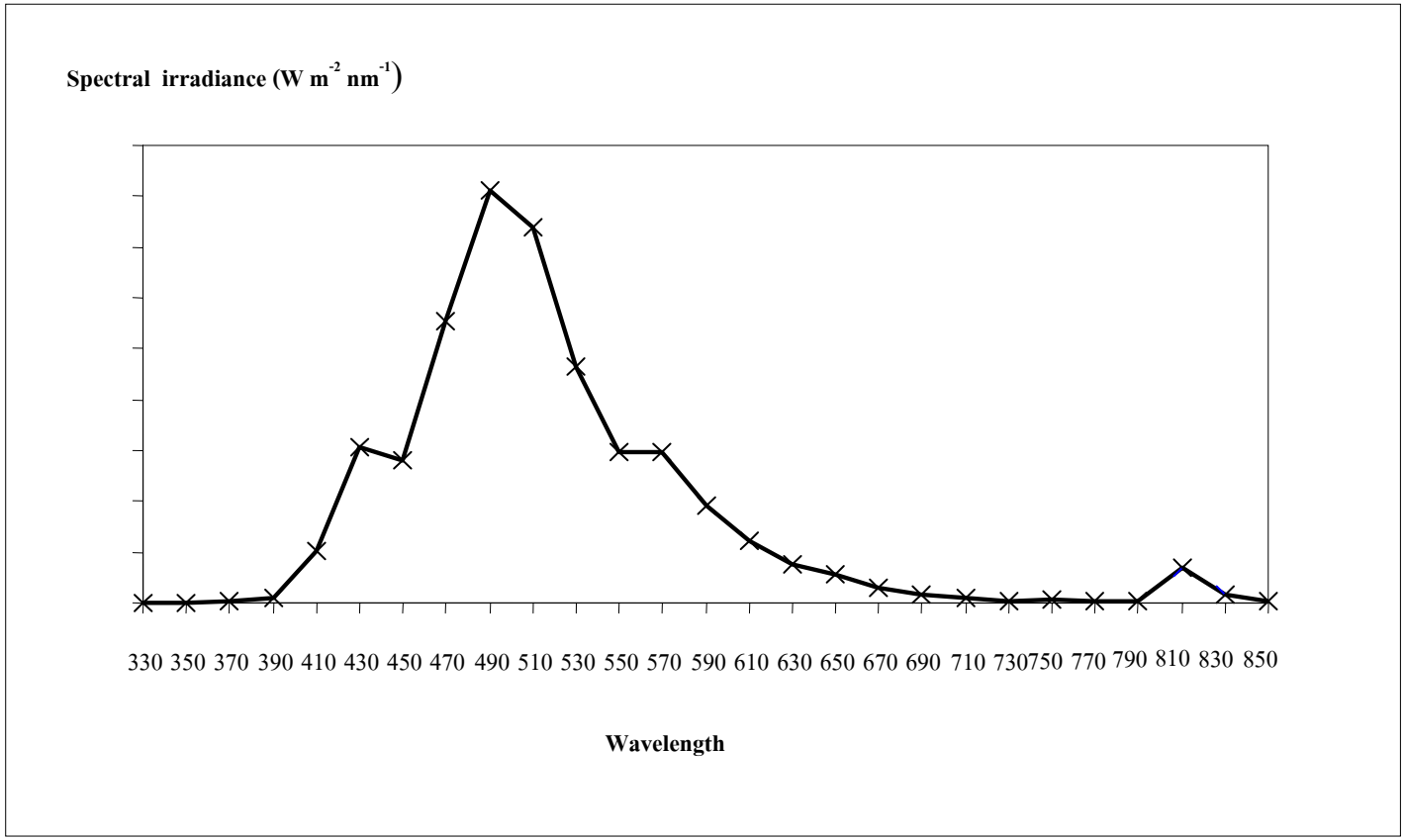
ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 Spectrum ของแสงสีขาว จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ PHILIPS TL-D 36/54 Day light



ภาพผนวกที่ 2 Spectrum ของแสงสีแดง จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ TOSHIBA FL 40S.RE 40 W



ภาพผนวกที่ 3 Spectrum ของแสงสีน้ำเงิน จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ T.F.C. FL 40 SBT8/38 Blue

อาหารสูตร LB (LB Broth)

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

ปรับ pH 7.0-7.2

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารละลาย X-gluc (X-gluc assay buffer)

Phosphate buffer	94	มิลลิลิตร
Triton/ethanol	1	มิลลิลิตร
X-gluc stock	5	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ Phosphate buffer

KH_2PO_4	100	มิลลิโมลาร์
K_2HPO_4	100	มิลลิโมลาร์

ผสมกันในอัตราส่วน 1: 1 ปรับ pH 7.0

ส่วนประกอบของ Triton/ ethanol

Triton X-100	10	มิลลิลิตร
100 % ethanol	40	มิลลิลิตร
น้ำ	50	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ X-gluc stock

X-gluc	10	มิลลิกรัม
DMSO (dimethylsulfoxide)	1	มิลลิลิตร