การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) จากตาข้าง และแคลลัส

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

โดย

นายรัฐพล สุขัมศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) จากตาข้างและแคลลัส

โดย

นายรัฐพล สุขัมศรี

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

MULTIPLE SHOOT INDUCTION OF ASPARAGUS (*ASPARAGUS OFFICINALIS* L.) FROM AXILLARY BUD AND CALLUS

By

Ratapon Sukumsaie

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Biology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2007

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) จากตาข้าง และแคลลัส” เสนอโดย นายรัฐพล สุขัมศรี เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตังกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา
2. รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ทองภักดี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิไลภรณ์ บุญญกิจจินดา)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา)

...../...../.....

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ทองภักดี)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ดร.ชบา จำปาทอง)

...../...../.....

46303202 : สาขาวิชาชีววิทยา
คำสำคัญ : หน่อไม้ฝรั่ง/การขยายพันธุ์/การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

รัฐพล สุขัมศรี : การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) จากตาข้าง และแคลลัส. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร. โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และ รศ.ดร. อารีย์ ทองภักดี. 77 หน้า.

ศึกษาการขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) สายพันธุ์ Brocked Improve โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน โดยการนำข้อเดี่ยวเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม α-Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.27–2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kinetin (Kn) ความเข้มข้น 0.23–2.32 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.27–0.54 ไมโครโมลาร์ และ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ ให้ผลดีที่สุด คือให้จำนวนยอด 1 ยอด จำนวนข้อ 6.1–7.7 ข้อ ความยาวยอด 7.35–7.94 ซม. และมีเส้นมีผ่านศูนย์กลาง 2.20–2.65 มม. จากนั้นนำข้อเดี่ยวของยอดที่ได้จากตาข้างของหน่ออ่อนเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า การเลี้ยงในอาหารเหลวให้ผลการเจริญเติบโตดีกว่าบนอาหารแข็ง โดยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 4.4 ยอด ความยาวยอด 6.62 ซม. และจำนวนข้อ 17.86 ข้อ ส่วนการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยการนำส่วนข้อเดี่ยวของยอดที่ได้จากตาข้างของหน่ออ่อน เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-DichloroPhenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0–18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0–18.60 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็งทุกสูตรให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น อาหารแข็งที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ ให้ผลในการเกิดแคลลัสดีที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส 2.59 ซม. และแคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มกันหลวม ๆ สำหรับการชักนำให้เกิดยอดและรากจากกลุ่มแคลลัส โดยการเลี้ยงกลุ่มแคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ซม. (จากการทดลองที่ให้ผลดีที่สุด) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS และ 1/2MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ ให้ผลดีที่สุด คือมีจำนวนยอด 4 ยอด ความยาวยอด 1.3 ซม. จำนวนข้อ 15.79 ข้อ และจำนวนรากต่อกลุ่มแคลลัส 4.6 ราก แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดและรากมีน้อยมาก ดังนั้นจึงนำแคลลัสที่ได้จากอาหารแข็งทั้งหมด 15 สูตร ย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายลงบนอาหารแข็งสูตรที่ชักนำให้เกิดยอดและราก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มแคลลัสที่ได้จากอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ ให้ผลในการเกิดยอดและรากดีที่สุด เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ โดยให้จำนวนยอด 17.0 ยอด ความยาวยอด 2.08 ซม. จำนวนข้อ 2.55 ข้อ และจำนวนรากต่อกลุ่มแคลลัส 8 ราก ตามลำดับ

ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ..... 2. .....

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

46303202 : MAJOR : BIOLOGY
KEY WORD : ASPARAGUS/PROPAGATION/TISSUE CULTURE

RATAPON SUKUMSAIE : MULTIPLE SHOOT INDUCTION OF ASPARAGUS (*ASPARAGUS OFFICINALIS* L.) FROM AXILLARY BUD AND CALLUS. THESIS ADVISORS : ASST. PROF. CHOCKPISIT THEPSITHAR, Ph. D. AND ASSOC. PROF. AREE THONGPUKDEE, Ph. D. 77pp.

Micropropagation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cv. Brocked Improve was studied. For shoot induction from axillary bud of young spear, single nodes were cultured as initial explants on solid Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.27–2.69 μM α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.23–2.32 μM Kinetin (Kn) for 4 weeks. It was found that solid MS medium supplemented with 0.27–0.54 μM NAA and 0.23 μM provided the best results 1 shoot per explant, 6.1–7.7 nodes per explant, 7.35–7.94 cm shoot length and 2.20–2.65 mm in diameter. Then, single nodes of shoots derived from axillary buds of young spear were transferred to solid and liquid MS medium for 6 weeks. Cultures in liquid medium showed better growth than in solid medium. The maximum number of shoots (4.4 shoots), shoots length (6.62 cm) and number of nodes (17.86 nodes) were obtained from liquid MS medium supplemented with 0.27 μM NAA and 0.23 μM Kn. For callus induction, single nodes of shoots derived from axillary buds of young spear were cultured for 12 weeks on in 15 treatments of solid MS medium added with 0–18.08 μM 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0–18.60 μM Kn. Callus was formed on solid medium contained 2,4-D Kn with 100 percent of explant except for the medium without plant growth regulator. MS medium supplemented with 4.52 μM 2,4-D and 2.32 μM Kn provided the maximum diameter of friable callus with 2.59 cm. Calli about 2 cm in diameter best treatment, were cultured for 8 weeks. Callus clusters about 2 cm in diameter, obtained from the best treatment, were cultured for 8 weeks on full-strength and half-strength solid MS medium in the presence and absence of 0.23 μM Kn for shoot and root regeneration. Number of shoots, shoot length, number of nodes and number of roots per callus cluster were 4 shoots, 1.3 cm, 15.79 nodes and 4.6 roots was observed on full-strength MS medium added with 0.23 μM Kn. However, shoot and root regeneration were poor. Therefore, callus cluster obtained from 15 treatments of callus induction medium were cultured on solid MS medium for 8 weeks, then transferred onto shoot and root regeneration medium for 8 weeks. It was found that callus from solid MS medium containing 9.04 μM 2,4-D and 9.90 μM Kn provided the maximum shoots and roots when cultured on full-strength solid MS medium with 0.23 μM Kn. Number of shoots, shoot length, number of nodes and number of roots per callus cluster were 17.0 shoots, 2.08 cm, 2.55 nodes and 8 roots, respectively.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Department of Biology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2007
Student's signature .....
Thesis Advisors' signature 1. ..... 2. .....

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยครั้งนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และรองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ทองภักดี ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขปรับปรุงข้อผิดพลาดในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิไลภรณ์ บุญกิจจินดา และ ดร. ชบา จำปาทอง ที่ได้กรุณาแนะนำ และตรวจแก้ไข พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ ทำให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ คุณสุลักษณ์ อยู่คง คุณณรงค์ สามงามนิ่ม และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยาทุกคนที่ให้ความสะดวกในด้านต่างๆ ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจเป็นอย่างดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฎ

คำอธิบายคำย่อ ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ 1

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

3. ขอบเขตของการศึกษา 2

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

1. ลักษณะทั่วไปของหน่อไม้ฝรั่ง 4

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 7

3. การขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 9

3.1 การเพาะเลี้ยงอับเรณู 9

3.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด 9

3.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดเหง้า 10

3.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ และราก 10

3.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิด embryogenic callus 12

3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง 15

1. อุปกรณ์และสารเคมี 15

2. วิธีการทดลอง 17

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน 17

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า

2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน 19
2.3 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน 21
2.4 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส 23
2.4.1 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส 23
2.4.2 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 15 สูตร 24
เวลาที่ใช้ในการทดลอง..... 25
4 ผลการทดลอง 26
1. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน 26
2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน 26
3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน..... 37
4. ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส 42
4.1 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส 42
4.2 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 15 สูตร 45
4.2.1 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS (MS-P1) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก..... 45
4.2.2 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2MS (MS-P2) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก..... 49

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า

4.2.3 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก 53

4.2.4 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก 57

5 วิจารณ์ผลการทดลอง 62

1. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน 62

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน 63

3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน..... 64

4. ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส 65

6 สรุปผลการทดลอง 67

1. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน 67

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน 67

3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน..... 68

4. ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส 68

4.1 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส 68

4.2 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 15 สูตร 68

บรรณานุกรม 70

ภาคผนวก 75

ภาคผนวกองค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige and skoog 76

ประวัติผู้วิจัย 77

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์	27
2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	32
3	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 12 สัปดาห์	39
4	ผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส ที่เจริญจากตาข้างที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ และ Kn ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	43
5	ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS (MS-P1) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	46
6	ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2 (MS-P2) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็น เวลา 8 สัปดาห์	50
7	ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	54
8	ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	58

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของหน่อไม้ฝรั่ง.....	6
2	ผลของของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	29
3	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์.....	34
4	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารเหลวสภาพนิ่งสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์.....	36
5	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	41
6	ผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส ที่เจริญจากตาข้างที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์และ Kn ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา8 สัปดาห์.....	44
7	ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS (MS-P1) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	48
8	ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2 (MS-P2) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็น เวลา 8 สัปดาห์.....	52
9	ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	56

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่		หน้า
10	ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	60

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ		**คำเต็ม**
$^{\circ}C$	=	Degree celsius
μM	=	Micromolar
$\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.	=	Micromole per square meter per second
2,4-D	=	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2iP	=	Isopentenyl adenine
BA	=	N^6-benzyladenine
BAP	=	6-Benzylaminopurine
cm.	=	centrimeter
GA_3	=	Gibberellic acid
HCl	=	Hydrochloric acid
HF	=	Hydrofluoric acid
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
Kn	=	Kinetin
KOH	=	Potassium hydroxide
LS	=	Linsmaier and Skoog (1965)
MES	=	morpholinoethane sulfonic acid
MS	=	Murashige and Skoog (1962)
NAA	=	α - Naphthalene acetic acid
w/v	=	weight by volume

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) อยู่ในวงศ์ Liliaceae จัดเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและได้รับความสนใจมากในปัจจุบันรวมทั้งมีแนวโน้มความต้องการของตลาดสูง การผลิตหน่อไม้ฝรั่งทั่วโลกมีปริมาณสูงขึ้นทุกปีโดยในปี 2002 การผลิตหน่อไม้ฝรั่ง 5.1 ล้านตันซึ่งเป็นปริมาณที่เพิ่มขึ้นจากปี 1992 ถึง 70% (United states department of agriculture 2004) ดังนั้นเกษตรกรจึงเริ่มหันมาปลูกหน่อไม้ฝรั่งกันมากขึ้น หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชที่ต้องใช้เวลาปลูกจนถึงการเก็บเกี่ยวนานประมาณ 1–3 ปี ทำให้ในปัจจุบันเกิดปัญหาด้านการผลิตโดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งมีพื้นที่จำกัดและมีค่าแรงงานสูง นอกจากนี้ การปลูกหน่อไม้ฝรั่งในประเทศที่มีอากาศหนาวเย็นทำให้มีระยะเวลาเพื่อใช้สำหรับการเก็บเกี่ยวสั้นอันเนื่องมาจากสภาพอากาศที่หนาวเย็นซึ่งมีผลทำให้หน่อไม้ฝรั่งพักตัว ดังนั้นจึงมีบริษัทต่างประเทศได้เข้ามาส่งเสริมการผลิตในประเทศที่มีการผลิตมากและมีภูมิอากาศอบอุ่น เช่น ประเทศไทยโดยผลิตในรูปหน่อสด หน่อแช่แข็ง และหน่อขาวแปรรูป (ไพฑูรย์ 2536) จากศักยภาพที่ประเทศไทยนั้นสามารถปลูกและเก็บเกี่ยวหน่อไม้ฝรั่งได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นควรใช้ความได้เปรียบนี้ผลิตหน่อไม้ฝรั่งเพื่อการส่งออกในช่วงเวลาที่ประเทศเหล่านั้นไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ในประเทศไทยพบว่าชนิดหน่อสีขาวซึ่งใช้สำหรับแปรรูป มีปลูกกันมากที่จังหวัดสุพรรณบุรี (พรชัย 2534) และชนิดหน่อสีเขียว ซึ่งใช้รับประทานสดมีปลูกกันมากที่จังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี นนทบุรี และนครราชสีมา โดยพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่นิยมปลูก ได้แก่ Brocked Improve, Brocked Imperial และ UC157 (สุนทรี 2542) เป็นต้น หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชที่มีผลตอบแทนสูง โดยเฉลี่ย 10,000–30,000บาท/ไร่/ปี (อรสา 2540) นอกจากการนำมารับประทานเป็นอาหารแล้วหน่อไม้ฝรั่งยังเป็นสมุนไพรช่วยเสริมการทำงานของร่างกาย อีกทั้งคนที่เป็นโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิต และโรคมะเร็งก็ควรกินหน่อไม้ฝรั่งเป็นประจำอีกด้วย (สิทธิโชค และคณะ 2549)

หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชที่มีดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกันคนละต้น (dioecious plant) การผลิตในเชิงการค้านั้นเกษตรกรต้องการต้นเพศผู้ซึ่งให้ผลผลิตและความสม่ำเสมอสูงกว่าต้นเพศเมีย การขยายพันธุ์โดยทั่วไปใช้วิธีเพาะจากเมล็ดที่นิยม คือ เมล็ดพันธุ์ UC157F1 ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้การขยายพันธุ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

โดยใช้วิธีเพาะเมล็ดมีปัญหาเรื่องความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง และใช้ระยะเวลาปลูกนาน (อรสา 2540) ปัจจุบันได้มีการนำการเทคนิคการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์ เพราะเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนต้นได้อย่างรวดเร็ว (กรมส่งเสริมการเกษตร 2546) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่งยังคงประสบปัญหาบางประการ เช่น ต้นกล้ามีอาการฉ่ำน้ำ ต้นกล้าออกรากยาก เป็นต้น (ศิริลักษณ์ 2539)

แม้การทดลองและศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหน่อไม้ฝรั่งมีผู้รายงานไว้เป็นจำนวนมาก (Saito และคณะ 1991) วิธีการใช้ปลายยอด (shoot-tip) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอและยังคงต้องใช้แรงงานสูง (Levi และ Sink 1991) แต่ได้ต้นที่มีคุณภาพดีและเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอยู่ในประเทศไทย ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการอื่นๆ เพื่อให้สามารถผลิตหน่อไม้ฝรั่งได้จำนวนมากขึ้น เช่น การให้เกิด somatic embryo ในอาหารเหลว และเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ (Reuther 1996) การเลี้ยง somatic embryo ใน encapsulatable unit (Mamiya และ Sakamoto 1999) เป็นต้น และพบว่า somatic embryogenesis มีความสำคัญเพื่อที่จะผลิตหน่อไม้ฝรั่งให้ได้จำนวนมาก (Limanton และ Jullien 2000)

ด้วยเหตุนี้ การขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากตาข้างและแคลลัสจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่นำไปใช้เพื่อแก้ปัญหาข้างต้นได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ ราก จากข้อของยอดที่เกิดจากตาข้างของหน่ออ่อน
3. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เกิดจากตาข้างของหน่ออ่อน
4. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด และราก

3. ขอบเขตของการศึกษา

1. ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของหน่ออ่อนบนอาหาร10 สูตร เพื่อหาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด

2. ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อนในอาหาร 10 สูตร ทั้งสภาพอาหารแข็งและอาหารเหลวเพื่อหาสูตรอาหารและสภาพอาหารที่เหมาะสมในชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและราก

3. ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อนบนอาหาร 15 สูตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

4. ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนแคลลัสบนอาหาร 4 สูตร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและราก

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน

2. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เกิดจากตาข้างของหน่ออ่อน

3. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นยอดและรากจากข้อของยอดที่เกิดจากตาข้างของหน่ออ่อน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4. สามารถขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งในระยะเวลาอันสั้นได้จำนวนมากจากต้นพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Liliaceae (Quiros 2003) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบชายฝั่งทะเลของยุโรป และเอเชีย เชื่อกันว่าชาวกรีกโบราณได้นำหน่อไม้ฝรั่งจากเอเชียเข้าไปปลูก (กลุ่มเกษตรสัญจร 2530) นอกจากนี้ หน่อไม้ฝรั่งจัดเป็นผักที่เป็นที่ชื่นชอบของผู้รักษาสุขภาพเพราะมีคุณค่าทางอาหารค่อนข้างสูงโดยเฉพาะฟอสฟอรัส วิตามินเอ และ กลูตาไธโอน สารต่อต้านการเกิดมะเร็งทั้งยังมีสรรพคุณเป็นยาระบายอ่อนๆ และช่วยขับปัสสาวะอีกด้วย แต่ถ้าบริโภคมากๆ จะทำให้ปัสสาวะมีกลิ่นฉุน และหน่อไม้ฝรั่งมีสารพิวรีน (purine) ที่ทำให้เกิดอาการปวดข้อได้ (สิทธิโชค และคณะ 2549)

1. ลักษณะทั่วไปของหน่อไม้ฝรั่ง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.1 ลำต้น (stem)

ลำต้นหน่อไม้ฝรั่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ลำต้นใต้ดิน (root stock หรือ rhizome หรือ crown) ติดอยู่กับส่วนราก ส่วนของลำต้นเหนือดินจะเจริญมาจากตาข้างของลำต้นใต้ดิน เมื่อเจริญขึ้นมาเป็นยอดแล้ว เรียกว่า ตายอด (bud shoot) หรือสเปียร์ (spear) จะปกคลุมด้วยใบแท้ ซึ่งต่อมาเมื่อหน่อเจริญขึ้นจะเห็นใบแท้เป็นเกล็ดบางๆ อยู่บริเวณข้อ (รูปที่ 1A) ลำต้นเหนือดินจะมีความสูงประมาณ 90–120 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายเฟิร์น (สมพร 2541)

1.2 ใบ (leaf)

ใบ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ใบแท้ มีลักษณะคล้ายเกล็ดบางๆเกิดอยู่บนข้อตรงข้ามกับกิ่งแขนงหลัก ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ส่วนใบเทียม (cladodes) หรือ คลาโดฟิลล์ (cladophyll) มีลักษณะเป็นใบเรียวแหลมคล้ายเข็ม (รูปที่ 1C) มีคลอโรฟิลล์ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นส่วนที่สร้างอาหารให้แก่ต้น (มณฑา 2545)

1.3 เหง้า (crown)

เหง้าจะอยู่ระหว่างรากและลำต้น เป็นส่วนตาหน่อเจริญ ภายในเหง้าประกอบด้วยตาหน่อเจริญเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 1E) และมีกาบใบปิดอยู่จะขยายตัวออกทางด้านข้างเจริญประมาณ 2 นิ้วต่อปี ราก และหน่อจะเจริญจากเหง้า โดยหน่อแรกในเหง้าจะแก่ที่สุด ตาหน่ออื่นๆจะมีอายุอ่อนตามลำดับ เมื่อ

หน่อแรกเจริญหน่ออื่นๆ จะพักตัว จนหน่อแรกสามารถสร้างอาหารได้ หน่อที่สองจึงจะเริ่มเจริญ ดังนั้นในเหง้าหนึ่งๆในแต่ละครั้งจะมีหน่อเจริญเพียงหนึ่งหน่อการที่สามารถเก็บเกี่ยวได้หลายหน่อต่อต้นเนื่องจากแต่ละต้นจะมีหลายเหง้า หลังจากเหง้าเจริญและสร้างเหง้าใหม่ขึ้นมาเหง้าเก่าจะตายไป ผลผลิตจะขึ้นอยู่กับ จำนวนและความสมบูรณ์ของตาหน่อ (นิพนธ์ และวาสนา 2533)

1.4 ราก (root)

รากหน่อไม้ฝรั่งมี 2 ชนิด คือ รากสะสม (fleshy root หรือ tuberous root) เกิดจากส่วนตาของลำต้น ใต้ดิน (root stock) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1/8–1/4 นิ้ว ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหารและยึดลำต้นให้ตั้งอยู่ได้ เป็นรากที่ดูดซึมอาหารได้ดีเท่ารากฝอย ที่ผิวนอกของรากเนื้อมีขนราก (root hair) ปกคลุมอยู่ทั่วไป (รูปที่ 1D) รากสะสมจะแผ่ขยายได้ปีละ 1 ฟุต สำหรับความลึกของการหยั่งรากขึ้นอยู่กับความลึกของหน้าดิน ความลึกของระดับน้ำใต้ดิน และความชื้นในดินโดยทั่วไปจะสามารถหยั่งลึกลงไปในดินได้มากกว่า 1 เมตร จึงควรเลือกปลูกหน่อไม้ฝรั่งในดินที่มีหน้าดินลึก ส่วนรากฝอยเป็นรากที่แตกออกจากรากเนื้อ ทำหน้าที่ดูดซึมอาหารในดิน (absorptive root) และยึดเหนี่ยวให้ต้นตั้งอยู่ได้ ปกติจะทำหน้าที่ได้เพียง 1 ปี ก็จะตายไป (สมพร 2541)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.5 ดอก (flower)

ดอกเป็นแบบ dioecious (Shalaby และคณะ 2003) คือ ต้นเพศผู้และต้นเพศเมียแยกต้นกัน คือมีต้นที่ให้ดอกเพศผู้และต้นที่ให้ดอก เพศเมียอย่างละเท่าๆกัน (Shalaby และคณะ 2003) ซึ่งต้องอาศัยแมลงเป็นพาหะช่วยผสมเกสร (Maeda และคณะ 2002) สำหรับต้นเพศผู้อาจให้ดอกที่เป็นดอกสมบูรณ์เพศบ้างแต่มีปริมาณน้อยมาก (รูปที่ 1F) ในประเทศที่มีอากาศร้อนชื้นเช่นในประเทศไทยนั้น ต้นกล้าหน่อไม้ฝรั่งจะเจริญเติบโตเร็วมาก ภายในเวลา 4 เดือนนับจากวันงอกต้นหน่อไม้ฝรั่งก็จะออกดอก (อรสา 2540) การจำแนกว่าต้นใดเป็นต้นเพศผู้และต้นใดเป็นต้นเพศเมียสังเกตดูได้จากลักษณะดอก ดังนี้

ดอกเพศผู้ มีสีเขียวแกมเหลือง มีขนาดดอกใหญ่และยาวกว่าดอกเพศเมีย ภายในดอกประกอบด้วยอับเรณู 6 อัน และเกสรเพศเมียที่ไม่สมบูรณ์ (Falavigna และคณะ 1996)

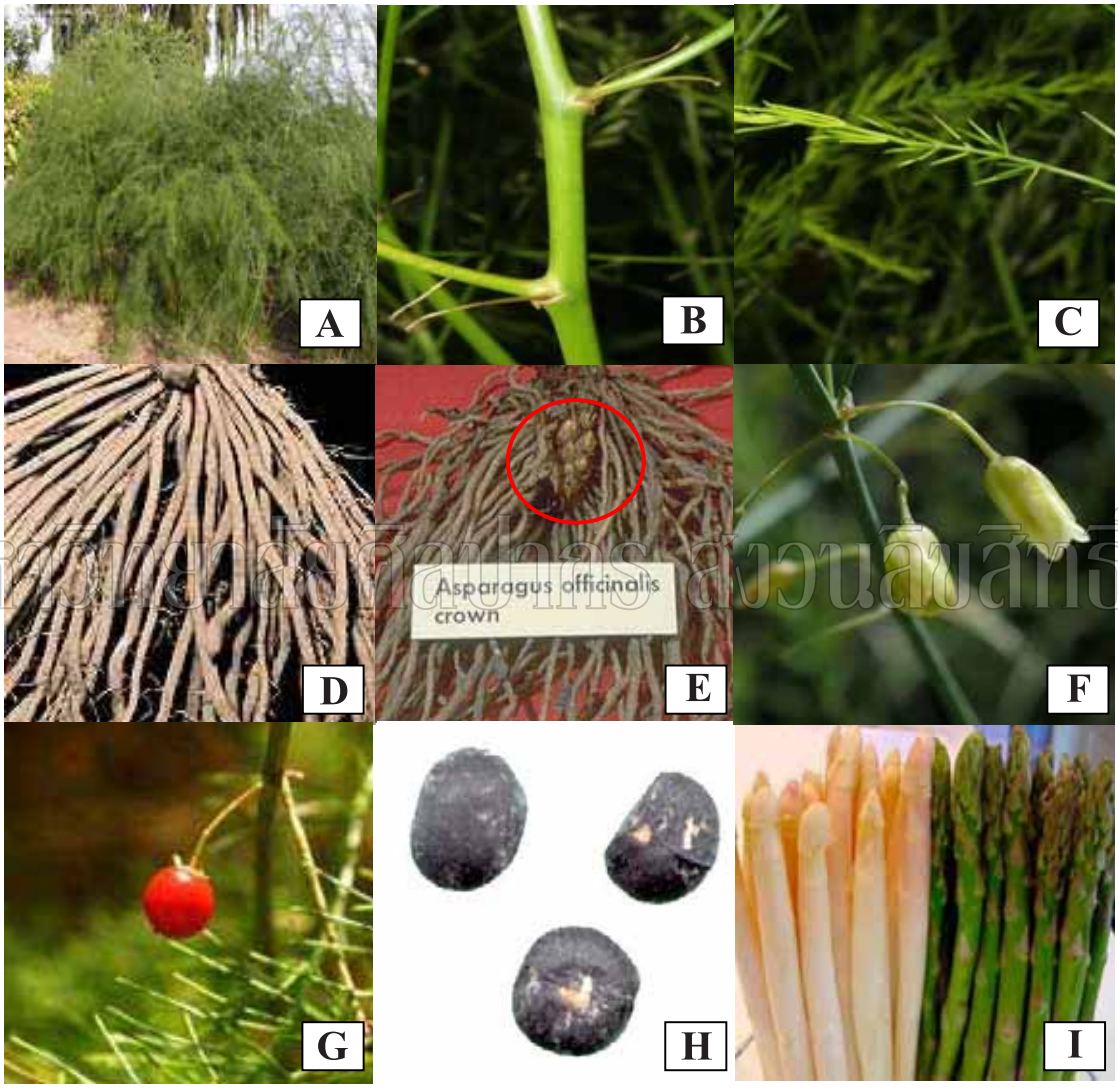
ดอกเพศเมีย มีขนาดเล็กมองเห็นได้ชัดและมีไม่มากเหมือนดอกเพศผู้ ประกอบด้วยเกสรเพศผู้ 6 อัน ที่ไม่สมบูรณ์ รังไข่มี 3 ห้อง (lucule) และก้านเกสรเพศเมียขนาดสั้น (ธนพันธุ์ 2545)

1.6 ผล (berry)

ผลแบบเบอรี่ (berry) ขนาดเล็ก (รูปที่ 1G) ขณะที่ผลยังอ่อนอยู่จะมีสีเขียวเมื่อผลแก่จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ผลมีรูปร่างค่อนข้างกลมโดยปกติแต่ละผลจะมี 3 เมล็ดบางผลมีถึง 6 เมล็ด

1.7 เมล็ด (seed)

เมล็ดมีสีดำรูปร่างกึ่งกลมกึ่งเหลี่ยม (รูปที่ 1H) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1/8 นิ้ว (สมพร 2541)



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 1 หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) แสดงลักษณะ A = ลักษณะวิสัย B = ลำต้น C = ใบ (คลาโดฟิลล์ D = ราก E = เหง้า F = ดอก G = ผล H = เมล็ด I = หน่อ (หน่อขาวและหน่อเขียว)

ที่มา : A (Quiros 2003), B (Baskauf 2002a), C (Baskauf 2002b), D (Bergeson 2005), E (Skirvin 1999), F (Bernnett and McAvoy2003), G (Readingdirt 2006), H (John 2007), I (Caroll 2007)

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ การนำเอาเซลล์หรือเนื้อเยื่อหรืออวัยวะบางส่วนของพืช เช่น ยอด ลำต้น ใบ ราก ส่วนต่าง ๆ ของดอก หรือส่วนของผล มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพที่ปลอดเชื้อ เพื่อให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการตามที่ต้องการ

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย

1. สารประกอบอนินทรีย์ (Organic compound) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.1 สารอาหารหลัก (macronutrient) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ออกซิเจน (O), โพแทสเซียม (P), กำมะถัน (S), แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชธาตุไนโตรเจนจะอยู่ในรูปของแอมโมเนียม (NH_4^+) และไนเตรต (NO_3^-) ไอออน บางครั้งอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น ยูเรีย กลูตามีน(glutamine) หรือเคซีนไฮโดรไลเสต (casein hydrolysate) ส่วนธาตุอาหารอื่นๆจะได้รับจากสารประกอบต่างๆ ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) จะให้ทั้งแมกนีเซียม และกำมะถัน $NH_4H_2P_4$, KH_2PO_4 หรือ NaH_2PO_4 ให้ฟอสฟอรัส $CaCl_2$-$2H_2O$ หรือ $Ca(Na_3)_2$-$4H_2O$ ให้แคลเซียม KCl, KNO_3 หรือ KH_2PO_4 ให้โพแทสเซียม ส่วนคลอไรด์ได้จากสารประกอบ KCl และ $CaCl_2$-$2H_2O$ (รังสฤษดิ์ 2541)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.2 สารอาหารรอง (micronutrient) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต้องใช้ในปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก (Fe), คลอรีน (Cl), แมงกานีส (Mn), สังกะสี (Zn), โบรอน (B) และโมลิบดินัม (Mo) เหล่านี้จะอยู่ในรูปของสารประกอบ โดยเหล็กอยู่ในรูปของ $FeSO_4$-$7H_2O$ และ NaEDTA หรือ $Fe_2(SO_4)_3$, แมงกานีสอยู่ในรูปของ $MnSO_4$-H_2O, โบรอน (H_3BO_3), โคบอลท์ ($CoCl_2$-$6H_2O$), โมลิบดินัม ($NaMoO_3$), ทองแดง ($CuSO_4$-$5H_2O$), สังกะสี ($ZnSO_4$-$7H_2O$) และอาหารบางสูตรต้องการ iodide (KI) (สมพร 2549)

2. สารอินทรีย์ (Organic nutrients)

2.1 แหล่งคาร์บอน (carbon sources) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงในระหว่างที่เพาะเลี้ยงหรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำ ดังนั้น จึงต้องการแหล่งคาร์บอนจากภายนอกเพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และ มีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) มีการใช้บ้างปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นเมื่อได้รับ

ปริมาณ น้ำตาลเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง จากนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นอีกจะลดการเจริญเติบโตลง น้ำตาลอาจเปลี่ยนรูปได้เมื่อถูกนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากนี้น้ำตาลโพลีแซ็กคาไรด์อาจเปลี่ยนเป็นโมโนแซ็กคาไรด์ เมื่อเกิดการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) (บุญยืน 2540)

2.2 วิตามิน (vitamins) เนื้อเยื่อพืชสามารถที่จะสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นแต่อยู่ในปริมาณต่ำกว่าปกติ จึงมีการเติมวิตามิน เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญได้ดีที่สุด เช่น ไทเอมีน (thaiamine) ไนอะซีน (niacin) กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) เป็นต้น (ลิลลี่ และคณะ 2548)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) มีผลต่อการเจริญเติบโตของราก ยอด กระตุ้นการแบ่งเซลล์ สารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สำคัญ (Hartmann และคณะ 1997) คือ

2.3.1 ออกซิน (auxin) เป็นสารกลุ่มที่ช่วยกระตุ้นให้เซลล์ยืดตัว และกระตุ้นให้มีการเกิดราก มักนิยมใช้ร่วมกับไซโทไคนินตัวอย่างสารกลุ่มออกซิน เช่น idole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), α-naphthaleneacetic acid (NAA) และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เป็นต้น

2.3.2 ไซโตไคนิน (cytokinins) เป็นสารกลุ่มที่ช่วยแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการสร้างยอด ชักนำให้เกิดต้น สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ N^6-benzladenine (BA), Kinetin (Kn) และ zeatin เป็นต้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.3.3 จิบเบอเรลลิน (gibberellin) มีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการยืดยาวของ internodes และจำเป็นต่อการเจริญของเนื้อเยื่อเจริญ

2.3.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ ได้แก่ abscissic acid (ABA), paclobutrazol, picloram และ daminozide เป็นต้น

2.4 กรดอะมิโน amino acid ได้แก่ glutamine, asparagines, adenine, glycine และ casein hydrolysate

2.5 อินโนซิทอล (inositol) เป็นน้ำตาลแอลกฮอล์ ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ผนังเซลล์ และระบบเยื่อหุ้มเซลล์

2.6 สารประกอบที่ยังไม่ทราบคุณสมบัติที่แน่นอน เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ กล้วยบด

2.7 สารที่ไม่ออกฤทธิ์บางอย่างที่ได้มีการเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ผงถ่าน (activated charcoal) สามารถช่วยดูดซับสารพิษพวกสารประกอบฟีนอลิก (phenolic) ซึ่งสร้างออกมาโดยพืช

3. การขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1 การเพาะเลี้ยงอับเรณู

Ziauddin และคณะ (1996) นำส่วนของอับเรณูของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Mary Washington 500W จากที่ปลูกในแปลงและเรือนกระจก เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and skoog, 1962 (MS) ที่เติม casein hydrolysate ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, glutamine ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร, α-Naphthaeneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0–10.78 ไมโครโมลาร์, 6-benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์, triiodobenzoic acid (TIBA) ความเข้มข้น 0–5 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร และ วุ้น (gelrite) 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ส่วนของอับเรณูจากหน่อไม้ฝรั่งที่ปลูกในเรือนกระจก เลี้ยงบนอาหารที่เติม TIBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิด embryogenic callus และเอ็มบริโอมากที่สุด คือ 8.7 และ 7.7 เอ็มบริโอ ตามลำดับ ต่อมานำ embryogenic callus มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10.78 ไมโครโมลาร์, น้ำตาลซูโครส 20–60 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เกิด somatic embryo ในระยะ globular embryos มากที่สุด คือ 25 เอ็มบริโอ ต่อมานำ somatic embryo ในระยะ globular embryos มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20–40 กรัมต่อลิตร, glutamine 146 มิลลิกรัมต่อลิตร, inositol ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ วุ้น (gelrite) 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร somatic embryo ในระยะ globular embryos มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงสุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

3.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด

Kohmura และคณะ (1995) ทำการทดลองเลี้ยงเนื่อเยื่อปลายยอดจากหน่อไม้ฝรั่ง 10 สายพันธุ์ บนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม ancymidol ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ปลายยอดของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Hiroshimagreen เพศผู้ เกิด embryogenic callus มากที่สุด เกิดกลุ่มยอดสูงสุด คือ 21 กลุ่ม ต่อมานำกลุ่มยอดมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า สายพันธุ์ MW500W NJ322 และ Hiroshimagreen เกิด embryogenic callus มากที่สุด นำ embryogenic callus ที่ได้เลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้น (agar) 8 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา

1 เดือน พบว่า หน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ MW500W เพศผู้ MW500W เพศเมีย Poletom เพศเมีย NJ322 เพศผู้ และ Hiroshimagreen เพศผู้ เกิด somatic embryo ในระยะ globular embryos มากที่สุด และเมื่อย้าย somatic embryo ในระยะ globular embryos เลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า หน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Hiroshimagreen เพศผู้ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์สูงที่สุด คือ 84 เปอร์เซ็นต์

3.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดเหง้า

Araki และคณะ (1996) นำส่วนข้อที่ 1 และ 2 นับจากด้านล่างของยอดของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Mary Washington 500W เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณไนโตรเจนลดลงครึ่งหนึ่ง ร่วมกับ ancymidol ความเข้มข้น 0–2 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำตาลซูโครส 10–30 กรัมต่อลิตร, NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์, Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ และ วุ้น (gelrite) 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน พบว่า อาหารที่มี ancymidol ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเหง้ามากสุด คือ 57% และมีจำนวนเหง้ามากสุด คือ 3.5 เหง้า ต่อมานำส่วนของข้อที่ 1 และ 2 นับจากด้านล่างของยอดของหน่อไม้ฝรั่งมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณไนโตรเจนลดลงครึ่งหนึ่งร่วมกับ gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 0–28.9 ไมโครโมลาร์, ancymidol ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร, NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์, Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ และ วุ้น (gelrite) 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน พบว่า ในอาหารที่ปราศจาก GA_3 มีเปอร์เซ็นการเกิดเหง้ามากสุด คือ 54% มีจำนวนเหง้ามากสุด คือ 3.7 เหง้า และในอาหารที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 8.67 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดที่มีขนาดยาวกว่า 5 เซนติเมตร มากที่สุด

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

3.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ (multiple shoots) และราก

ศิริลักษณ์ (2539) นำส่วนตาข้าง 1 ตา จากข้อของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Brocked improve เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.21, 0.32 และ 0.43 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.46, 0.93, 2.14 และ 3.72 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 45 วัน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.43 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิดยอดที่มีความยาวเฉลี่ยและจำนวนยอดต่อข้อเฉลี่ยมากที่สุด คือ 4.06 เซนติเมตรและ 3.14 เซนติเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำยอดที่ได้มาชักนำให้เกิดรากบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 50–60 กรัมต่อลิตร, indol-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 0.2, 0.39 และ 0.78 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 60

วัน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ มีการเกิดรากดีที่สุด

Shigeta และคณะ (1996) ศึกษาผลของ gellan gum ต่อการเกิดรากสะสมอาหารจากเนื้อเยื่อส่วนข้อ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์, Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์, น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ gellan gum 2–12 กรัมต่อลิตร พบว่า ในอาหารที่เติม gellan gum 8 กรัมต่อลิตร มีการเกิดรากสูงสุด 96 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำส่วนข้อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, น้ำตาลกลูโคส 10–60 กรัมต่อลิตร และ gellan gum 8 กรัมต่อลิตร พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเพิ่มขึ้นจาก 40 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมากกว่า 30 กรัมต่อลิตร

Chin (1982) ทำการเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้าง 1 ตาของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์, Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ และ ancymidol 5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ตาข้างสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยในอาหารที่ไม่มีการเติม ancymidol มีการพัฒนาให้เกิดต้นได้เพียง 52 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ย้ายต้นลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่มีการเติม ancymidol สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่ไม่มีการเติม ancymidol มีการชักนำให้เกิดรากได้เพียง 26 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Yang และ Clore (1974) นำส่วนของข้อที่มีตา 1 ตา จากหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ UC 500 W และสายพันธุ์ UC 711 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ และ Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เกิดยอด 77 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงไว้ทั้งหมด และ มียอดเฉลี่ย 2.6 ยอดต่อตา ต่อมาย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลาอีก 7 สัปดาห์ พบว่า มีรากเกิดขึ้น 35 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงไว้ทั้งหมด

Yang และ Clore (1973) ใช้ส่วนข้อของหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ University of California 500W (UC500W) เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร, วุ้น (agar) 7 กรัมต่อลิตร, ไกลซีน (glycine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, myo-inositol ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, nicotinic acid ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, pyridoxine-HCl ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, thiamine-HCl ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA ความเข้มข้น 0–2.69 ไมโครโมลาร์ และ Kn ความเข้มข้น 0–1.39 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27–0.54 ไมโครโมลาร์ มีการเจริญเติบโตของยอดสูงที่สุด เมื่อยอดมีความยาว 8–10

เซนติเมตร นำยอดมาตัดให้แต่ละชิ้นมีตาข้าง 1 ตา แล้วนำตาข้าง 2–3 ชิ้น เลี้ยงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4–6 สัปดาห์ เพื่อให้เกิดยอดทวีคูณ (multiple shoot) จากนั้น นำยอดที่มีความยาวประมาณ 10–20 เซนติเมตร มาแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนด้านบน (apical), ส่วนตรงกลาง (middle) และ ส่วนด้านล่าง (basal) จากนั้น นำข้อของแต่ละส่วน เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ข้อที่ตัดจากส่วน basal มีการเจริญเติบโตเป็นต้นและรากสูงที่สุด คือ 96.7 และ 62.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต่อมานำยอดที่มีความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร เลือกเฉพาะส่วน basal มาตัดเป็นชิ้นให้แต่ละชิ้นมีตาข้าง 1 ตา นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54–1.39 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.41 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า เกิดยอดทวีคูณมาก โดยมีต้นและรากมีขนาดใหญ่

3.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิด embryogenic callus

Takeda และคณะ (2003) เลี้ยงส่วนข้อของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ และ วุ้น (agar) 8 กรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ เมื่อเกิดแคลลัส แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 และ 0.9 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ในอาหารเหลวที่ปราศจาก 2,4-D แคลลัสจะพัฒนาไปเป็น somatic embryo และพบว่า ในอาหารเหลวที่ปราศจาก 2,4-D มีจำนวน somatic embryo มากกว่าประมาณ 3 เท่า

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Mamiya และ Sakamoto (1999) เลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Fest บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, morpholinoethane sulfonic acid (MES) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร, วุ้น (gelrite) 4 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเป็นส่วนของต้นและราก จากนั้นนำรากสะสมอาหารมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร, แมนนิทอล (mannitol) ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร, 2,4-D ความเข้มข้น 9.0 ไมโครโมลาร์, proline ความเข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์, casein acid hydrolysate ความเข้มข้น 0.1 กรัมต้นลิตร และ MES 1 กรัมต่อลิตร เพื่อให้เกิดกลุ่มของเซลล์แล้วนำกลุ่มของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 1.0–1.4 มิลลิเมตร มาชักนำให้เกิด somatic embryo ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร, sorbitol ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร, casein acid hydrolysate ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร, MES ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยได้ somatic embryo ในระยะ torpedo นอกจากนี้ยัง พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อน้ำหนักสดของยอดและรากด้วย โดยมีความเข้มข้น 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของยอดเท่ากับ 31.5, 14.9, 8.6 มิลลิกรัมต่อต้น และให้น้ำหนักสดของรากเท่ากับ 14.5, 33.7, 46.3

มิลลิกรัมต่อต้น ส่วนความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ก็มีผลต่อน้ำหนักสดของยอดเช่นกัน โดยมีน้ำหนักสดของยอดเท่ากับ 8.9, 31.0, 60.0 มิลลิกรัมต่อต้น ในอาหาร 1/2MS, MS และ 2MS ตามลำดับ

Reuther (1996) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Schwetzinger Meisterschuss ในระบบ temporary immersion bioreactor โดยใช้ส่วนปล้อง ขนาด 1–2 มิลลิเมตร เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.37 ไมโครโมลาร์ และ isopentenyl adenine (2iP) ความเข้มข้น 17.48 ไมโครโมลาร์ ในที่มืดเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เกิด somatic embryo ที่อยู่ในระยะ globular ต่อมาเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ Kn ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์

Saito และคณะ (1991) ใช้ส่วนข้อจากหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ Mary Washington 500W เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Linsmaier and skoog 1965 (LS) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.97 ไมโครโมลาร์, น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และ วุ้น (agar) 8 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วทำการเพิ่มปริมาณแคลลัส ในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.97 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร LS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการพัฒนาไปเป็น somatic embryo ในระยะต่างๆ โดยบนอาหารแข็งมีจำนวน somatic embryo ในระยะ globular น้อยกว่าในอาหารเหลว แต่มี somatic embryo ในระยะ torpedo มากกว่าในอาหารเหลว โดยมี somatic embryo ในระยะ globular 2,322 เอ็มบริโอ และ 2,679 เอ็มบริโอ ตามลำดับ และ somatic embryo ในระยะ torpedo จำนวน 312 เอ็มบริโอ และ 90 เอ็มบริโอ ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Kunitake และ Mii (1990) แยกโปรโตพลาสต์จาก embryogenic calli ของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Mary Washington แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.37 ไมโครโมลาร์, zeatin ความเข้มข้น 2.28 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-glutamine ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร, น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ gellan gum 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ได้ 7.2% จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์, น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, gellan gum 2 กรัมต่อลิตร แล้วนำกลุ่มเซลล์ขนาด 0.5–1.0 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ กลุ่มเซลล์จะพัฒนาไปเป็น somatic embryo ทำการย้าย somatic embryo ขนาด 1–3 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า somatic embryo มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 30–40% เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่

เติม IBA ความเข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์, GA_3 ความเข้มข้น 2.89 ไมโครโมลาร์, น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร, gellan gum 2 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20–30 วัน เกิดการพัฒนาไป เป็นต้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมี

พืชทดลอง

หน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Brocked Improve จากแปลงปลูกของ บริษัท กำแพงแสนคอมเมอร์เชียน จำกัด เลขที่ 222 หมู่ 2 ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์

- อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
- Gelrite (G1910, SIGMA)
- Agar Powder (C5001, CRITERION)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

- Kinetin (Kn)
- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- α-Naphthaleneacetic acid (NAA)

สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ

- 95% Ethyl alcohol
- Calcium hypochlorite [$Ca(OCl)_2$]
- น้ำกลั่น
- Tween 20

เครื่องมือ

1. อุปกรณ์และวัสดุสำหรับใช้เตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งแบบละเอียดและหยาบ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- หม้อนึ่งความดันไอ

- เตาไฟฟ้า
- กระบอกตวง
- ปิเปต
- ช้อนตักสารเคมี
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ภาชนะบรรจุอาหารพร้อมฝาปิด
- แท่งแก้ว
- ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาดต่างๆ

2. อุปกรณ์และวัสดุสำหรับตัดและย้ายเนื้อเยื่อ

- ตู้ปลอดเชื้อ
- ตะเกียงแอลกฮอล์
- จานแก้ว
- ด้ามมีดเบอร์ 4 และ7 พร้อมใบมีดเบอร์ 11 และ 24
- ปากคีบ
- กระบอกแช่เครื่องมือ
- ไม้ขีดไฟ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2. วิธีการทดลอง

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน

ตัดหน่ออ่อนของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Brocked Improve ที่มีตาข้างเป็นท่อนขนาดประมาณ 3–5 เซนติเมตร แช่ใน Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Calcium hypochlorite ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3–5 นาที ตัดแต่งแต่ละชิ้นให้มีตาข้าง 1 ตา และมีความยาว 1 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้น (agar) 6.5 กรัมต่อลิตร โดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 10 สูตร มีดังนี้

สูตร MS1 = MS

สูตร MS2 = MS + NAA (0.27 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS3 = MS + NAA (0.54 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS4 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS5 = MS + NAA (0.27 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS6 = MS + NAA (0.54 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS7 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS8 = MS + NAA (0.54 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.46 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS9 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.46 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS10 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์) + Kn (2.32 ไมโครโมลาร์)

ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.6–5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 C^o เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงตาข้าง 1 ชิ้น ต่อขวดอาหารที่มีปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 25 C° ให้แสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

การบันทึกผลการทดลองโดยเก็บข้อมูลต่อไปนี้

1. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากชิ้นเนื้อเยื่อ
2. จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
3. จำนวนข้อทั้งหมดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
4. ความยาวยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
5. เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

ทำการเพิ่มขยายยอดจากตาข้างโดยใช้อาหารสูตรที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 นำยอดมาตัดเป็นชิ้น ให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยแต่ละชิ้นให้มีตาข้าง 1 ตา นำไปเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 10 สูตร มีดังนี้

ทำการเลี้ยงในสภาพของอาหารที่แตกต่างกัน 2 ประเภท คือ

1. อาหารเหลวสภาพนิ่ง ปริมาตร 7 มิลลิลิตรต่อขวด

2. อาหารแข็งปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อขวดโดยเติม วุ้น (agar) 6.5 กรัมต่อลิตร

สูตร MS1 = MS

สูตร MS2 = MS + NAA (0.27 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS3 = MS + NAA (0.54 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS4 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS5 = MS + NAA (0.27 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS6 = MS + NAA (0.54 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS7 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS8 = MS + NAA (0.54 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.46 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS9 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์) + Kn (0.46 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS10 = MS + NAA (2.69 ไมโครโมลาร์) + Kn (2.32 ไมโครโมลาร์)

ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.6–5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 C° เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงตาข้าง 1 ชิ้น ต่อขวดอาหาร จำนวน 10 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 25 C° ให้แสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

การบันทึกผลการทดลองโดยเก็บข้อมูลต่อไปนี้

1. จำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
2. จำนวนข้อเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
3. ความยาวยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
4. จำนวนรากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
5. การเกิดแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.3 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

ทำการเพิ่มขยายยอดจากตาข้างโดยใช้อาหารสูตรที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 นำยอดมาตัดเป็นชิ้น ให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยแต่ละชิ้นให้มีตาข้าง 1 ตา เลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส MS-C ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้น (gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร (MS-C) โดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโต 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 15 สูตร มีดังนี้

สูตร MS-C1 = MS

สูตร MS-C2 = MS + 2,4-D (2.26 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C3 = MS + 2,4-D (2.26 ไมโครโมลาร์) + Kn (2.32 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C4 = MS + 2,4-D (4.52 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C5 = MS + 2,4-D (4.52 ไมโครโมลาร์) + Kn (2.32 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C6 = MS + 2,4-D (4.52 ไมโครโมลาร์) + Kn (4.65 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C7 = MS + 2,4-D (9.04 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C8 = MS + 2,4-D (9.04 ไมโครโมลาร์) + Kn (2.32 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C9 = MS + 2,4-D (9.04 ไมโครโมลาร์) + Kn (4.65 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C10 = MS + 2,4-D (9.04 ไมโครโมลาร์) + Kn (9.30 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C11 = MS + 2,4-D (18.08 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C12 = MS + 2,4-D (18.08 ไมโครโมลาร์) + Kn (2.32 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C13 = MS + 2,4-D (18.08 ไมโครโมลาร์) + Kn (4.65 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C14 = MS + 2,4-D (18.08 ไมโครโมลาร์) + Kn (9.30 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-C15 = MS + 2,4-D (18.08 ไมโครโมลาร์) + Kn (18.60 ไมโครโมลาร์)

ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.6–5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 C° เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงตาข้าง 1 ชิ้น ต่อขวดอาหารที่มีปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 25 C° ให้แสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารเดิมใหม่ทุก 4 สัปดาห์

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

การบันทึกผลการทดลองโดยเก็บข้อมูลต่อไปนี้

1. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากชิ้นเนื้อเยื่อ
2. เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสต่อชิ้นเนื่อเยื่อ
3. ลักษณะของแคลลัส

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.4 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส

2.4.1 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส

นำแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร จากการทดลองที่ 3 คือ แคลลัสที่ได้จากอาหารแข็งสูตร MS-C6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-P ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้น (gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร โดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโต Kn ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.23 ไมโครโมลาร์ รวม 4 สูตร ดังนี้

สูตร MS-P1 = 1MS

สูตร MS-P2 = 1/2MS

สูตร MS-P3 = 1MS + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-P4 = 1/2MS + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.6–5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 C° เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงแคลลัส 1 ชิ้น ต่อขวดอาหารที่มีปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 25 C° ให้แสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารเดิมใหม่ทุก 4 สัปดาห์

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของ

การบันทึกผลการทดลองโดยเก็บข้อมูลต่อไปนี้

1. จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส
2. ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส
3. จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส
4. จำนวนรากเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส

2.4.2 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 15 สูตร

นำแคลลัสจากผลการทดลองที่ 3 ได้จากอาหารแต่ละสูตรรวม 15 สูตร มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ก่อน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS-P ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้น (gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร โดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโต Kn ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.23 ไมโครโมลาร์ รวม 4 สูตร ดังนี้

สูตร MS-P1 = 1MS

สูตร MS-P2 = 1/2MS

สูตร MS-P3 = 1MS + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

สูตร MS-P4 = 1/2MS + Kn (0.23 ไมโครโมลาร์)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.6–5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 C° เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงแคลลัส 1 ชิ้น ต่อขวดอาหารที่มีปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 25 C° ให้แสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารเดิมใหม่ทุก 4 สัปดาห์

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของ

การบันทึกผลการทดลองโดยเก็บข้อมูลต่อไปนี้

1. จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส
2. ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส
3. จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส
4. จำนวนรากเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส

เวลาที่ใช้ในการทดลอง

เวลาที่ใช้ในการทำการวิจัย 24 เดือน เริ่มงานตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2548 เสนอหัวข้อวิทยานิพนธ์ภายในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2549 และสอบวิทยานิพนธ์ภายในเดือนกันยายน พ.ศ. 2550

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน

นำชิ้นส่วนหน่ออ่อนของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Brocked Improve ความยาว 1 เซนติเมตร ที่ประกอบด้วยตาข้าง 1 ตา เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.27, 0.54 และ 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0, 0.23, 0.46 และ 2.32 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ทุกสูตรมีการเกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (MS3) มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 1.2 ยอดต่อตาข้าง ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.05$ กับสูตรอื่น ๆ ทุกสูตรที่มีจำนวนยอด 1 ยอด (ตารางที่ 1, รูปที่ 2A–2I) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 .69 ไมโครโมลาร์ (MS4) และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27–2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5, MS6 และ MS7) ให้จำนวนข้อในช่วง 5.8–7.7 ข้อต่อตาข้าง ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.05$ (ตารางที่ 1, รูปที่ 2D, 2E, 2F และ 2G) อย่างไรก็ตาม อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 และ 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5 และ MS6) ให้ความยาวยอดสูงที่สุด คือ 7.94 และ 7.35 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของยอด 2.65 และ 2.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1, รูปที่ 2E และ 2G)

อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS6) ให้ผลดีที่สุด คือ เกิดยอด 1 ยอด จำนวนข้อ 7.7 ข้อ ความยาวยอด 7.35 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของยอด 2.20 มิลลิเมตร

สำหรับอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS9) มีจำนวนยอด จำนวนข้อ ความยาวยอด และเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยที่สุดและพบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณข้อเล็กน้อย (ตารางที่ 1, รูปที่ 2I)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตร MS	ความเข้มข้น (μM)		การพัฒนาของตาข้างจากหน่ออ่อนของหน่อไม้ฝรั่ง[1/]				
	NAA	Kn	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอด	จำนวนข้อ	ความยาวยอด (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางของยอด (มม.)
1	0	0	100	1.0±0.0 a	4.4±0.6 bc	6.06±0.7 ef	2.53±0.2 cd
2	0.27	0	100	1.0±0.0 a	4.2±0.6 bc	3.19±0.5 bcd	2.50±0.2 cd
3	0.54	0	100	1.2±0.2 a	5.2±1.2 c	5.24±0.6 e	2.12±0.2 bcd
4	2.69	0	100	1.0±0.0 a	6.3±0.9 cd	4.60±1.0 de	2.05±0.2 bc
5	0.27	0.23	100	1.0±0.0 a	6.1±0.7 cd	7.94±0.5 f	2.65±0.1 d
6	0.54	0.23	100	1.0±0.0 a	7.7±1.2 d	7.35±0.9 f	2.20±0.1 cd
7	2.69	0.23	100	1.0±0.0 a	5.8±1.0 cd	4.47±1.0 cde	2.05±0.2 bc
8	0.54	0.46	100	1.0±0.0 a	3.8±0.6 abc	2.55±0.5 abc	1.65±0.2 ab
9	2.69	0.46	100	1.0±0.0 a	1.5±0.3 a	0.67±0.2 a	1.40±0.2 a
10	2.69	2.32	100	1.0±0.0 a	2.6±0.4 ab	2.28±0.4 ab	2.65±0.2 d

[1/] จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=10

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

A = อาหารแข็ง MS (MS1)

B = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.27 ไมโครโมลาร์ (MS2)

C = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ (MS3)

D = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ (MS4)

E = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.27 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5)

F = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS6)

G = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS7)

H = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS8)

I = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS9)

J = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS10)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

ทำการเพิ่มขยายยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนในอาหารสูตรที่ดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ นำยอดที่ได้มาตัดเป็นชิ้นให้แต่ละชิ้นมีความยาว 0.5 เซนติเมตร และประกอบด้วย 1 ตา เลี้ยงในอาหารสูตร MS 2 สภาพ คือ อาหารแข็งปริมาตร 30 มิลลิลิตร และอาหารเหลวสภาพนิ่งปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.27, 0.54 และ 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0, 0.23, 0.46 และ 2.32 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 2 , รูปที่ 3A–3J และ 4A–4J) พบว่า การเลี้ยงบนอาหารแข็ง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA เพียงอย่างเดียว เป็น 2.69 ไมโครโมลาร์ (MS4) หรือร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 และ 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS7 และ MS9) ให้จำนวนยอด ความยาวยอด และจำนวนข้อต่ำกว่าการทดลองชุดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยอยู่ระหว่าง 0.5–1.1 ยอด 0.49–1.88 เซนติเมตร และ 0.4–1.7 ข้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 2, รูปที่ 3D, 3G และ 3I) ส่วนสูตรอื่นๆ คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (MS1) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27–0.54 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว (MS2 และ MS3) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27–0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5 และ MS6) ให้จำนวนยอดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ 4.3–5.8 ยอด ให้ความยาวยอดและจำนวนข้อที่แตกต่างกันไป ระหว่าง 2.90–4.99 ยอด และ 5.00–10.13 ข้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 2, รูปที่ 3A, 3B, 3C, 3E และ 3F) อาหารแข็งที่ดีที่สุด สำหรับการเกิดยอดทวีคูณ คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS6) โดยให้จำนวนยอด 5.8 ยอด ความยาวยอด 4.03 เซนติเมตร จำนวนข้อ 10.13 ข้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 2, รูปที่ 3F)

สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสภาพนิ่ง พบว่าให้ผลคล้ายกับการเลี้ยงบนอาหารแข็ง คือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA เพียงอย่างเดียว เป็น 2.69 ไมโครโมลาร์ (MS4) หรือร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS9) ให้จำนวนยอดและจำนวนข้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ ระหว่าง 1.7–2.3 ยอด และ 6.50–7.70 ข้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 2, รูปที่ 4D และ 4I) ส่วนอาหารสูตรอื่นๆ คือ อาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (MS1) อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ (MS2) อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5) อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23–0.46 ไมโครโมลาร์ (MS6 และ MS8) และ อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS10) ให้จำนวนยอดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 3.6–4.9 ยอด แต่ให้ความยาวและจำนวนข้อแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2.99–7.36 เซนติเมตร และ 11.15–17.86 ข้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 2, รูปที่ 4A, 4B, 4E, 4F, 4H และ 4J) โดยอาหารเหลวที่ดีที่สุดสำหรับการเกิดยอดทวีคูณ คือ อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ ซึ่งให้จำนวนยอด 4.4 ยอด ความยาวยอด 6.62 เซนติเมตร และจำนวนข้อ 17.86 ข้อ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตรเดียวกัน คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5) พบว่าอาหารเหลวสภาพนิ่งให้ผลดีกว่าอาหารแข็ง ถึงแม้ให้จำนวนยอดและความยาวยอดที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ บนอาหารแข็งให้จำนวนยอด 4.3 ยอด และความยาวยอด 4.79 เซนติเมตร ส่วนในอาหารเหลวสภาพนิ่งให้จำนวนยอด 4.4 ยอด และความยาวยอด 6.62 เซนติเมตร แต่ให้จำนวนข้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ 9.60 และ 17.86 ข้อ บนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสภาพนิ่ง ตามลำดับ นอกจากนี้ การให้อาหารเหลวยังใช้ปริมาตรที่น้อยกว่าอาหารแข็งอีกด้วย

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สำหรับการเกิดรากไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ เกิดรากน้อยมาก และในบางสูตรอาหารที่เกิดรากมากแต่การเจริญของยอดก็ไม่ดี สำหรับการเกิดแคลลัสเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 2, รูปที่ 3A–3J และ 4A–4J)

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สภาพอาหาร	สูตร MS	ความเข้มข้น (μM)		การพัฒนาของข้อจากยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน[1/]				
		NAA	Kn	จำนวนยอด	ความยาวยอด (ซม.)	จำนวนข้อ	จำนวนราก	การเกิดแคลลัส[2/]
อาหารแข็ง	1	0	0	4.4±0.6 efg	2.90±0.4 abcd	5.00±1.0 abcd	0.00±0.0 a	-
	2	0.27	0	5.0±0.8 fg	3.38±0.4 cdef	5.90±0.9 abcde	0.00±0.0 a	+
	3	0.54	0	4.4±0.4 efg	4.99±0.4 defghi	9.30±1.2 defg	1.00±0.5 ab	++
	4	2.69	0	0.5±0.3 a	0.49±0.4 a	0.40±0.4 a	0.60±0.3 ab	++
	5	0.27	0.23	4.3±0.3 efg	4.79±0.5 defghi	9.60±1.6 defghi	0.10±0.1 a	++
	6	0.54	0.23	5.8±0.4 g	4.03±0.3 cdefg	10.13±1.2 defghij	0.00±0.0 a	++
	7	2.69	0.23	1.1±0.3 ab	1.88±0.6 abc	1.70±0.5 abc	1.90±0.3 b	++
	8	0.54	0.46	3.7±0.2 def	4.50±0.6 cdefgh	7.10±1.4 cdefg	0.30±0.3 ab	++
	9	2.69	0.46	1.1±0.3 ab	0.78±0.3 ab	0.70±0.4 ab	4.10±0.3 c	+++
	10	2.69	2.32	3.4±0.4 def	3.23±0.5 bcdef	1.88±0.6 abc	1.20±0.7 ab	+++
อาการเหลว	1	0	0	3.8±0.3 def	4.52±1.0 cdefg	14.20±1.1 hijk	0.00±0.0 a	-
สภาพนิ่ง	2	0.27	0	3.6±0.7 def	7.08±0.9 hi	15.53±2.3 ijk	0.80±0.6 ab	+
	3	0.54	0	2.9±0.5 cde	5.62±1.0 efghi	14.10±2.8 hijk	0.00±0.0 a	+
	4	2.69	0	2.3±0.4 bcd	4.03±0.6 cdefg	6.50±1.1 bcdef	3.80±1.5 c	+
	5	0.27	0.23	4.4±0.5 efg	6.62±0.9 ghi	17.86±2.2 k	1.20±0.8 ab	+
	6	0.54	0.23	4.9±1.4 fg	2.99±0.5 bcde	11.25±3.2 efghij	0.00±0.0 a	+
	7	2.69	0.23	2.7±0.4 bcde	7.42±1.1 i	12.80±4.6 ghijk	1.30±0.7 ab	+
	8	0.54	0.46	3.7±0.4 def	5.87±0.8 fghi	15.90±1.7 jk	0.70±0.5 ab	+
	9	2.69	0.46	1.7±0.2 abc	7.12±1.6 hi	7.70±1.5 cdefg	0.41±0.3 ab	++
	10	2.69	2.32	3.7±0.6 def	7.36±1.5 hi	12.50±0.7 fghijk	0.50±0.4 ab	++

[1/] จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=10

[2/] ปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา6 สัปดาห์

- หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส
+ หมายถึง เกิดแคลลัสปริมาณน้อย
++ หมายถึง เกิดแคลลัสปริมาณปานกลาง
+++ หมายถึง เกิดแคลลัสปริมาณมาก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

A = อาหารแข็ง MS (MS1)

B = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.27 ไมโครโมลาร์ (MS2)

C = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ (MS3)

D = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ (MS4)

E = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.27 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5)

F = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS6)

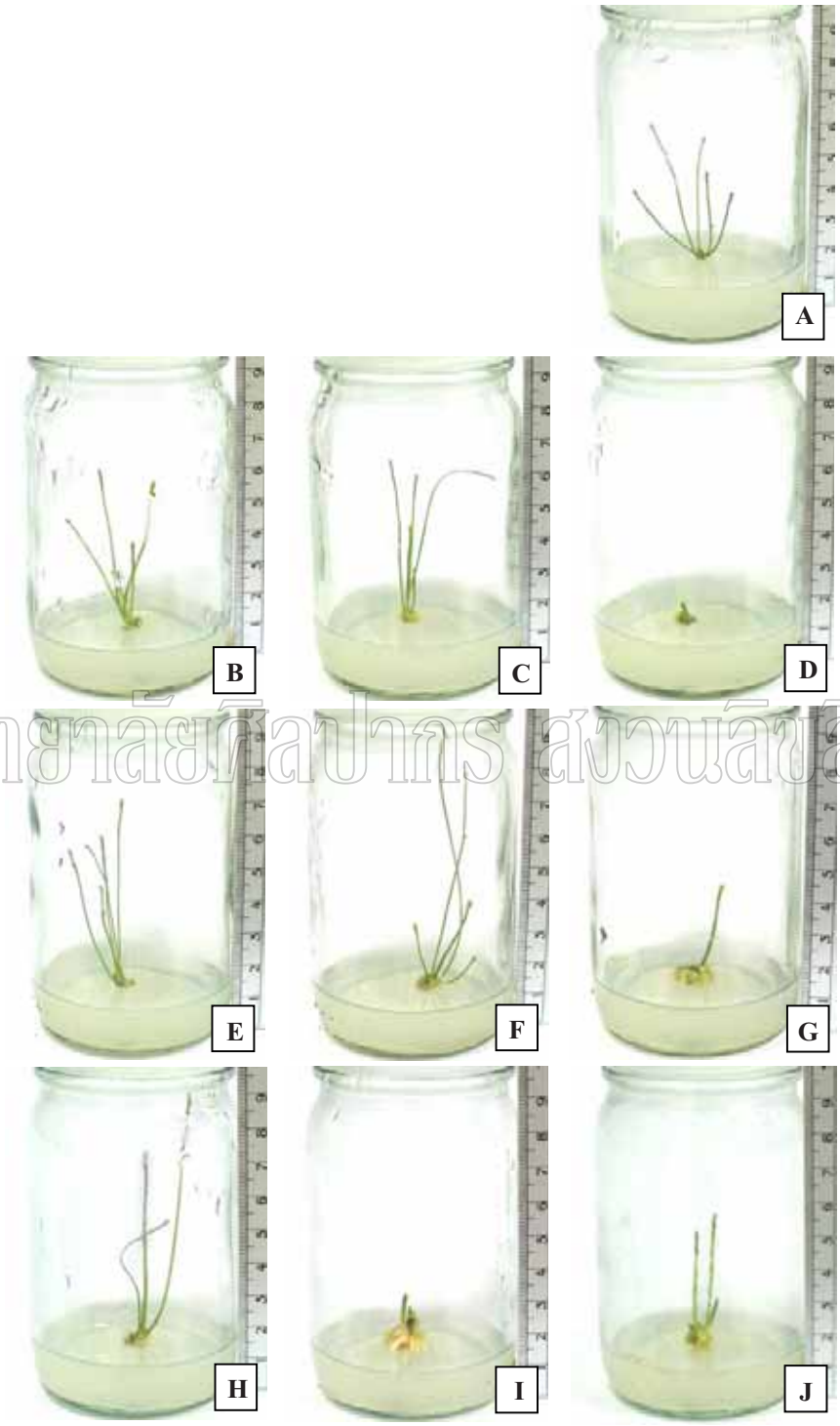
G = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS7)

H = อาหารแข็ง + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS8)

I = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS9)

J = อาหารแข็ง + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS10)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารเหลวสภาพนิ่งสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

A = อาหารเหลว MS (MS1)

B = อาหารเหลว + MS + NAA 0.27 ไมโครโมลาร์ (MS2)

C = อาหารเหลว + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ (MS3)

D = อาหารเหลว + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ (MS4)

E = อาหารเหลว + MS + NAA 0.27 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS5)

F = อาหารเหลว + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS6)

G = อาหารเหลว + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS7)

H = อาหารเหลว + MS + NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS8)

I = อาหารเหลว + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ (MS9)

J = อาหารเหลว + MS + NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS10)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

ทำการเพิ่มขยายยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนในอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ นำยอดที่ได้มาตัดเป็นชิ้นให้แต่ละชิ้นมีความยาว 0.5 เซนติเมตร และประกอบด้วย 1 ตา เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 2.26, 4.52, 9.04, 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0, 2.32, 4.65, 9.90, 18.6 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ทุกสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3, รูปที่ 5B–5O) ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต(MS-C1) ไม่เกิดแคลลัส (ตารางที่ 3, รูปที่ 5A) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้น 2.26–18.08 ไมโครโมลาร์ (MS-C2, MS-C4, MS-C7 และ MS-C11) เกิดแคลลัสน้อยมาก มีเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสอยู่ในช่วง 0.61–1.12 เซนติเมตร (ตารางที่ 3, รูปที่ 5B, 5D, 5G และ 5K) ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26–9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32–9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C3, MS-C5, MS-C6, MS-C8, MS-C9 และ MS-C10) ชักนำให้เกิดแคลลัสมากขึ้นโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสระหว่าง 2.03–2.59 เซนติเมตร (ตารางที่ 3, รูปที่ 5C, 5E, 5F, 5H, 5I และ 5J) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D สูงถึง 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32–18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C12–MS-C15) จะลดการเกิดแคลลัส โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสระหว่าง 1.23–1.67 เซนติเมตร(ตารางที่ 3, รูปที่ 5L–5O) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้น 2.26–18.08 ไมโครโมลาร์ (MS-C2, MS-C4, MS-C7 และ MS-C11) แคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มหนาแน่นเป็นก้อนเหนียวชุ่มน้ำ (mucilaginous callus) (รูปที่ 5B, 5D, 5G และ 5K) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3) แคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มหนาแน่น (compact callus) (รูปที่ 5C) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32–4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C5 และ MS-C6) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32–9.9 ไมโครโมลาร์ (MS-C8–MS-10) และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32–18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C12–MS-C15) แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ สามารถหลุดออกจากกันได้ง่าย (friable callus) (รูปที่ 5L–5O)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C6) ให้ผลดีที่สุด คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส 2.59 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.05$ กับสูตรอื่น ๆ ทุกสูตร (ตารางที่ 3, รูปที่ 5F) แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ สามารถหลุดออกจากกันได้ง่าย (รูปที่ 5F)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 12 สัปดาห์

สูตร MS-C	ความเข้มข้น (μM)		การพัฒนาของข้อจากยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน[1/]		
	2,4-D	Kn	เปอร์เซ็นต์ของข้อที่เกิดแคลลัส	เส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส (ซม.)	ลักษณะของแคลลัส[2/]
1	0	0	0	0.00±0.0 a	-
2	2.26	0	100	1.12±0.1 d	mucilaginous
3	2.26	2.32	100	2.03±0.0 f	compact
4	4.52	0	100	0.87±0.1 c	mucilaginous
5	4.52	2.32	100	2.41±0.1 hi	friable
6	4.52	4.65	100	2.59±0.1 i	friable
7	9.04	0	100	0.61±0.1 b	mucilaginous
8	9.04	2.32	100	2.16±0.1 fg	friable
9	9.04	4.65	100	2.32±0.1 gh	friable
10	9.04	9.9	100	2.07±0.1 f	friable
11	18.08	0	100	0.67±0.1 bc	mucilaginous
12	18.08	2.32	100	1.62±0.1 e	friable
13	18.08	4.65	100	1.23±0.1 d	friable
14	18.08	9.9	100	1.45±0.1 e	friable
15	18.08	18.6	100	1.67±0.1 e	friable

[1/] จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=10

[2/] friable callus = แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ สามารถหลุดออกจากกันได้ง่าย

compact callus = แคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มหนาแน่น

mucilaginous callus = แคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มหนาแน่นเป็นก้อนเหนียวชุ่มน้ำ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 12 สัปดาห์

A = อาหารแข็ง MS (MS-C1)

B = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ (MS-C2)

C = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3)

D = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ (MS-C4)

E = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C5)

F = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6)

G = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ (MS-C7)

H = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8)

I = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C9)

J = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10)

K = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ (MS-C11)

L = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C12)

M = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C13)

N = อาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C14)

O = อาหารแข็ง MS +2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส

4.1 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส

นำแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3 คือ แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C6) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-P จำนวน 4 สูตร ซึ่งประกอบด้วย 1MS และ1/2MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่เติม Kn ความเข้มข้น 0 และ 0.23 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 4 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 1.3 เซนติเมตร มีจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 15.79 ข้อ และมีจำนวนรากเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 4.6 ราก (ตารางที่ 4, รูปที่ 6C) ส่วนอาหารสูตร 1MS, 1/2MS ที่ปราศจาก Kn และอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P1, MS-P2 และ MS-P4) ไม่มีการเกิดยอดและรากหรือเกิดยอดจำนวนน้อยมากโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4, รูปที่ 6A ,6B และ 6D)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 4 ผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส ที่เจริญจากตาข้างที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ และ Kn ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ		การพัฒนาของแคลลัส[1/]			
MS-P	MS (เท่า)	Kn (μM)	จำนวนยอด/กลุ่มแคลลัส	ความยาวยอด/กลุ่มแคลลัส (ซม.)	จำนวนข้อ/กลุ่มแคลลัส	จำนวนราก/กลุ่มแคลลัส
MS-P1	1	0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.0±0.0 a
MS-P2	1/2	0	0.2±0.2 a	0.2±0.2 a	0.20±0.2 a	0.0±0.0 a
MS-P3	1	0.23	4.0±2.1 b	1.3±0.7 b	15.79±9.3 b	4.6±1.9 b
MS-P4	1/2	0.23	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.8±3.2 a

[1/] จากการทดลอง 5 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=5

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 6 ผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญจากตาข้างที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ และ Kn ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

A = อาหารแข็ง MS (MS-P1)

B = อาหารแข็ง 1/2MS (MS-P2)

C = อาหารแข็ง MS + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3)

D = อาหารแข็ง MS + Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4)

4.2 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 15 สูตร

นำแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน จากการทดลองที่ 3 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS-C ทั้งหมด 15 สูตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดและราก สูตร MS-P จำนวน 4 สูตร ซึ่งประกอบด้วย 1MS (MS-P1), 1/2MS (MS-P2), 1MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) และ 1/2MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.1 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS (MS-P1) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ (MS-C2), MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.23–4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C5 และ MS-C6) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65–9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C9 และ MS-C10) และอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90–18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C14 และ MS-C15) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 0.4–7.4 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 0.20–4.48 เซนติเมตร และจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 1.00–54.47 ข้อ ส่วนคุณภาพของรากอยู่ที่ระดับ 1.4–2.8 ซึ่งให้จำนวนรากระหว่าง 8–36 รากต่อกลุ่มแคลลัส (ตารางที่ 5, รูปที่ 7A–7B, 7D–7E, 7H–7I และ 7M–7N) โดยอาหารสูตรอื่นๆ ที่เหลือไม่ทำให้เกิดยอด (ตารางที่ 5, รูปที่ 7C, 7F–7G และ 7J–7L) อย่างไรก็ตาม แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ คือ 7.4 ยอด และ 54.47 ข้อ ตามลำดับ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 3.19 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 2.2 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 24 รากต่อกลุ่มแคลลัส (ตารางที่ 5, รูปที่ 7N)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 5 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS (MS-P1) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็น 8 สัปดาห์

อาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]			การพัฒนาของแคลลัสบนอาหาร 1MS (MS-P1) [2/]			
MS-C	2,4-D (μM)	Kn (μM)	จำนวนยอด/กลุ่มแคลลัส	ความยาวยอด/กลุ่มแคลลัส (ซม.)	จำนวนข้อ/กลุ่มแคลลัส	คุณภาพราก/กลุ่มแคลลัส[3/]
MS-C1	0	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	0.0±0.0 a
MS-C2	2.26	0	2.8±1.7 bc	3.21±1.9 c	26.60±15.7 a	2.8±0.4 ij
MS-C3	2.26	2.32	3.6±2.3 c	4.48±3.8 ab	12.54±6.2 ab	2.6±0.4 hi
MS-C4	4.52	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	2.6±0.4 hi
MS-C5	4.52	2.32	0.8±0.6 b	1.94±1.2 ab	9.00±6.8 a	2.0±0.3 ef
MS-C6	4.52	4.65	6.0±4.8 b	2.44±1.0 bc	18.20±9.5 a	2.4±0.5 gh
MS-C7	9.04	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.6±0.2 cd
MS-C8	9.04	2.32	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.8±0.4 de
MS-C9	9.04	4.65	2.6±1.9 a	0.40±0.3 a	3.80±2.7 a	2.6±0.4 hi
MS-C10	9.04	9.9	0.4±0.4 a	0.20±0.2 a	1.00±1.0 a	1.4±0.2 c
MS-C11	18.08	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	3.0±0.3 j
MS-C12	18.08	2.32	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	2.6±0.5 hi
MS-C13	18.08	4.65	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.0±0.0 b
MS-C14	18.08	9.9	2.2±1.2 a	0.62±0.3 a	2.20±1.2 a	1.6±0.2 cd
MS-C15	18.08	18.6	7.4±4.2 bc	3.19±2.0 d	54.47±40.1 b	2.2±0.2 fg

[1/] ทำการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS-C รวม 15 สูตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสในแต่ละสูตรของ MS-C รวม 15 สูตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-P1 ที่ประกอบด้วย MS ความเข้มข้น 1 เท่า ที่ปราศจาก Kn

[2/] จากการทดลอง 5 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=5

[3/] คุณภาพราก 0 = 0 ราก, 1 = 1–20 ราก, 2 = 21–40 ราก, 3 = 41–60 ราก, 4 = 61–80 ราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 7 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS (MS-P1) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

A = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ (MS-C2)

B = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3)

C = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ (MS-C4)

D = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C5)

E = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6)

F = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ (MS-C7)

G = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8)

H = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C9)

I = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10)

J = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ (MS-C11)

K = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C12)

L = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C13)

M = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C14)

N = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS +2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4.2.2 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2MS (MS-P2) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ (MS-C2), MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C9) และอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C14) ให้จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยอยู่ระหว่าง 8.40–14.60 ข้อ และให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 1.0–3.8 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 0.78–2.61 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4–2.6 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ยระหว่าง 8–32 รากต่อกลุ่มแคลลัส (ตารางที่ 6, รูปที่ 8A–8B, 8E, 8H และ 8M) โดยอาหารสูตรอื่นๆ ที่เหลือไม่ทำให้เกิดยอดหรือให้จำนวนยอดและข้อน้อยมาก (ตารางที่ 6, รูปที่ 8C, 8D, 8F–8G 8J–8L และ 8N) อย่างไรก็ตาม แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3) และ แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6) ให้จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 3.0–3.8 ยอด, 2.55–2.61 เซนติเมตร และ 14.40–14.60 ข้อ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4–1.6 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 8–12 รากต่อกลุ่มแคลลัส ตามลำดับ (ตารางที่ 6, รูปที่ 8B และ 8E)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 6 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2MS (MS-P2) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

อาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]			การพัฒนาของแคลลัสบนอาหาร 1/2MS (MS-P2)[2/]			
MS-C	2,4-D (μM)	Kn (μM)	จำนวนยอด/กลุ่มแคลลัส	ความยาวยอด/กลุ่มแคลลัส (ซม.)	จำนวนข้อ/กลุ่มแคลลัส	คุณภาพราก/กลุ่มแคลลัส[3/]
MS-C1	0	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	0.0±0.0 a
MS-C2	2.26	0	1.8±1.6 bc	1.52±1.4 bc	14.00±13.7 c	2.6±0.4 d
MS-C3	2.26	2.32	3.0±1.1 de	2.55±1.3 d	14.40±9.3 c	1.6±0.4 bc
MS-C4	4.52	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	2.6±0.2 d
MS-C5	4.52	2.32	1.6±0.8 bc	1.58±0.8 bc	3.80±2.5 ab	1.4±0.2 b
MS-C6	4.52	4.65	3.8±2.3 e	2.61±1.3 d	14.60±9.2 c	1.4±0.2 b
MS-C7	9.04	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.6±0.2 bc
MS-C8	9.04	2.32	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	2.0±0.6 c
MS-C9	9.04	4.65	1.0±1.0 abc	1.46±1.5 bc	14.40±14.4 c	1.6±0.6 bc
MS-C10	9.04	9.9	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.4±0.2 b
MS-C11	18.08	0	0.2±0.2 a	0.60±0.6 ab	0.60±0.6 a	2.8±0.5 d
MS-C12	18.08	2.32	0.6±0.6 ab	1.73±1.7 cd	4.60±4.6 ab	2.8±0.6 d
MS-C13	18.08	4.65	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.2±0.2 b
MS-C14	18.08	9.9	3.4±2.7 e	0.78±0.5 abc	8.40±6.6 bc	1.6±0.2 bc
MS-C15	18.08	18.6	2.2±1.3 cd	1.58±0.7 bc	4.40±3.0 ab	2.0±0.3 c

[1/] ทำการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS-C รวม 15 สูตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสในแต่ละสูตรของ MS-C รวม 15 สูตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-P2 ที่ประกอบด้วย MS ความเข้มข้น 1/2 เท่า ที่ปราศจาก Kn

[2/] จากการทดลอง 5 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=5

[3/] คุณภาพราก 0 = 0 ราก, 1 = 1–20 ราก, 2 = 21–40 ราก, 3 = 41–60 ราก, 4 = 61–80 ราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 8 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2 (MS-P2) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

A = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ (MS-C2)

B = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3)

C = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ (MS-C4)

D = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C5)

E = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6)

F = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ (MS-C7)

G = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8)

H = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C9)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

I = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10)

J = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ (MS-C11)

K = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C12)

L = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C13)

M = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C14)

N = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS +2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4.2.3 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C14) และอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15) ให้จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยอยู่ระหว่าง 63.56–82.60 ข้อ และให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 12.8–17.0 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 1.25–2.15 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4–2.4 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ยระหว่าง 8–28 รากต่อกลุ่มแคลลัส (ตารางที่ 7, รูปที่ 9B, 9I และ9M–9N)โดยอาหารสูตรอื่นๆ ที่เหลือไม่ทำให้เกิดยอดหรือให้จำนวนยอดและข้อน้อย (ตารางที่ 7, รูปที่ 9A, 9C–9H, 9J–9K และ 9L) อย่างไรก็ตาม แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10) ให้จำนวนยอดเฉลี่ย และจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุดอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ คือ 17.0 ยอดและ 82.60 ข้อ ตามลำดับ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.08 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 8 รากต่อกลุ่มแคลลัส ตามลำดับ (ตารางที่ 7, รูปที่ 9I)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 7 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

อาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]			การพัฒนาของแคลลัสบนอาหาร 1MS ที่เติม 0.23 μM Kn (MS-P3)[2/]			
MS-C	2,4-D (μM)	Kn (μM)	จำนวนยอด/กลุ่มแคลลัส	ความยาวยอด/กลุ่มแคลลัส (ซม.)	จำนวนข้อ/กลุ่มแคลลัส	คุณภาพราก/กลุ่มแคลลัส[3/]
MS-C1	0	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	0.0±0.0 a
MS-C2	2.26	0	2.4±1.7 ab	1.18±0.9 cd	11.20±8.5 a	2.0±0.4 cd
MS-C3	2.26	2.32	15.4±7.6 de	1.25±0.6 cd	63.56±44.2 cd	2.2±0.5 de
MS-C4	4.52	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	3.6±0.2 g
MS-C5	4.52	2.32	10.6±5.8 cd	1.57±0.8 de	50.01±26.5 bc	2.8±0.6 f
MS-C6	4.52	4.65	3.8±2.7 ab	1.03±0.8 bcd	20.00±17.6 a	2.8±0.5 f
MS-C7	9.04	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.8±0.2 bc
MS-C8	9.04	2.32	6.8±6.8 bc	0.31±0.3 ab	15.23±15.2 a	1.4±0.2 b
MS-C9	9.04	4.65	13.6±9.3 d	1.02±0.5 bcd	29.80±16.8 ab	1.6±0.4 b
MS-C10	9.04	9.9	17.0±10.4 e	2.08±1.1 e	82.60±56.8 d	1.4±0.2 b
MS-C11	18.08	0	4.4±2.9 ab	1.79±1.2 de	13.40±8.9 a	2.2±0.2 de
MS-C12	18.08	2.32	0.2±0.2 a	0.76±0.8 abc	1.00±1.0 a	3.6±0.4 g
MS-C13	18.08	4.65	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.6±0.2 b
MS-C14	18.08	9.9	12.8±6.0 d	2.15±0.9 e	63.94±41.3 cd	1.6±0.4 b
MS-C15	18.08	18.6	15.6±10.5 de	1.77±0.9 de	62.68±56.4 cd	2.4±0.4 e

[1/] ทำการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS-C รวม 15 สูตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสในแต่ละสูตรของ MS-C รวม 15 สูตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-P3 ที่ประกอบด้วย MS ความเข้มข้น 1 เท่า ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์

[2/] จากการทดลอง 5 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=5

[3/] คุณภาพราก 0 = 0 ราก, 1 = 1–20 ราก, 2 = 21–40 ราก, 3 = 41–60 ราก, 4 = 61–80 ราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 9 ผลของอาหารแข็งสูตร 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและราก จากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

A = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ (MS-C2)

B = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3)

C = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ (MS-C4)

D = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C5)

E = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6)

F = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ (MS-C7)

G = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8)

H = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C9)

I = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10)

J = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ (MS-C11)

K = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C12)

L = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C13)

M = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C14)

N = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS +2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4.2.4 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและราก

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6) อาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8) และอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 2.0–4.6 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 0.67–3.01 เซนติเมตร และจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสอยู่ในช่วง 9.20–21.85 ข้อ ส่วนคุณภาพของรากอยู่ที่ระดับ 2.0–2.8 ซึ่งให้จำนวนรากระหว่าง 21–36 รากต่อกลุ่มแคลลัส (ตารางที่ 8 รูปที่ 10B, 10E, 10G และ 10I) โดยอาหารสูตรอื่นๆ ที่เหลือไม่ทำให้เกิดยอดหรือให้จำนวนยอดและข้อน้อย (ตารางที่ 8, รูปที่ 10A, 10C–10D, 10F, 10H, 10J–10M และ 10N) อย่างไรก็ตาม แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ คือ 4.6 ยอด และ 21.85 ข้อ ตามลำดับ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.27 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 2.6 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 32 รากต่อกลุ่มแคลลัส (ตารางที่ 8, รูปที่ 10G)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 8 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

อาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]			การพัฒนาของแคลลัสบนอาหาร 1/2MS ที่เติม 0.23 μM Kn (MS-P4)[2/]			
MS-C	2,4-D (μM)	Kn (μM)	จำนวนยอด/กลุ่มแคลลัส	ความยาวยอด/กลุ่มแคลลัส (ซม.)	จำนวนข้อ/กลุ่มแคลลัส	คุณภาพราก/กลุ่มแคลลัส[3/]
MS-C1	0	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	0.0±0.0 a
MS-C2	2.26	0	1.6±1.6 bcde	2.68±0.3 ab	5.20±5.2 abcd	2.4±0.5 e
MS-C3	2.26	2.32	2.0±1.5 a	0.91±0.6 c	15.60±13.5 f	2.6±0.5 ef
MS-C4	4.52	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	2.6±0.2 ef
MS-C5	4.52	2.32	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	2.6±0.2 ef
MS-C6	4.52	4.65	2.2±0.9 cde	3.01±0.9 e	9.20±3.0 de	2.8±0.5 ef
MS-C7	9.04	0	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.8±0.2 cd
MS-C8	9.04	2.32	4.6±1.8 f	2.27±0.8 d	21.85±8.9 g	2.6±0.6 ef
MS-C9	9.04	4.65	2.6±2.6 de	0.46±0.5 abc	8.40±8.4 cde	1.4±0.2 b
MS-C10	9.04	9.9	2.8±2.1 e	0.67±0.5 abc	11.76±10.6 ef	2.0±0.5 d
MS-C11	18.08	0	1.0±0.6 abc	1.76±1.2 d	6.80±5.2 bcde	2.4±0.2 e
MS-C12	18.08	2.32	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	3.6±0.4 g
MS-C13	18.08	4.65	0.0±0.0 a	0.00±0.0 a	0.00±0.0 a	1.6±0.2 bc
MS-C14	18.08	9.9	1.4±1.4 abcd	0.58±0.6 abc	2.24±2.2 abc	1.4±0.2 b
MS-C15	18.08	18.6	0.6±0.6 ab	0.23±0.2 ab	0.80±0.8 ab	3.0±0.3 f

[1/] ทำการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS-C รวม 15 สูตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสในแต่ละสูตรของ MS-C รวม 15 สูตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-P4 ที่ประกอบด้วย MS ความเข้มข้น 1 เท่า ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์

[2/] จากการทดลอง 5 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P = 0.5$ วิเคราะห์โดย Duncan's New multiple Range Test, n=5

[3/] คุณภาพราก 0 = 0 ราก, 1 = 1–20 ราก, 2 = 21–40 ราก, 3 = 41–60 ราก, 4 = 61–80 ราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 10 ผลของอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 15 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

A = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ (MS-C2)

B = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 2.26 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C3)

C = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ (MS-C4)

D = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C5)

E = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6)

F = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ (MS-C7)

G = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8)

H = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C9)

I = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 9.04 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10)

J = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ (MS-C11)

K = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C12)

L = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C13)

M = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS + 2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C14)

N = แคลลัสจากอาหารแข็ง MS +2,4-D 18.08 ไมโครโมลาร์ + Kn 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

จากการทดลอง

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C15 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 18.60 ไมโครโมลาร์ ย้ายลงอาหารแข็งสูตร 1MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (MS-P1) ให้ผลจำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 7.4 ยอด และ 54.47 ข้อ ตามลำดับ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 3.19 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 2.2 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 24 รากต่อกลุ่มแคลลัส

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ และแคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ย้ายลงอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (MS-P2) ให้ผลจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 3.0–3.8 ยอด, 2.55–2.61 เซนติเมตร และ 14.40–14.60 ข้อ ตามลำดับ ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4–1.6 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 8–12 รากต่อกลุ่มแคลลัส ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C10 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ ย้ายลงอาหารแข็งสูตร 1MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ให้ผลจำนวนยอดเฉลี่ย และจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 17.0 ยอดและ 82.60 ข้อ ตามลำดับ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.08 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 8 รากต่อกลุ่มแคลลัส ตามลำดับ

แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS-C8 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ ย้ายลงอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 4.6 ยอด และ 21.85 ข้อ ตามลำดับ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.27 เซนติเมตร ส่วนคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 2.6 ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 32 รากต่อกลุ่มแคลลัส

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งโดยการนำข้อของหน่อไม้ฝรั่งมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0–2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0–2.32 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าตาข้างเกิดยอดใหม่ เนื่องจาก อาหารสูตร MS, น้ำตาล และอาหารที่เติม NAA อย่างเดียวหรือที่เติม NAA ร่วมกับ Kn มีผลในการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช เพราะ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน โดยพบว่าออกซินในปริมาณเหมาะสมมีส่วนช่วยในการยืดของเซลล์และทำให้เกิดการขยายตัวของเซลล์ (Hartmann และคณะ 1997) ในการใช้ออกซินร่วมกับไซโทไคนินจะช่วยในเรื่องการแบ่งเซลล์ โดยออกซินมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์ DNA กระตุ้นเอ็มไซม์ DNA polymerase และไมโตซิส แต่ไมโตซิสและไซโตไคเนซิสจะเกิดขึ้นต่อเมื่อได้รับไซโตไคนินในปริมาณที่เหมาะสม (Hopking and Huner 2004)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

หน่ออ่อนของหน่อไม้ฝรั่งที่ประกอบด้วยตาข้าง 1 ตา เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้ผลดีที่สุด ผลของ NAA และ Kn นี้คล้ายกับการทดลองของ Yang และ Clore (1974) นำตาข้างของหน่ออ่อน มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า 77 เปอร์เซ็นต์ ของการเพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาไปเป็นหน่อใหม่ได้ และการทดลองของ ศิริลักษณ์ (2539)นำตาข้างของหน่ออ่อน เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn 0.46 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 45 วัน พบว่าต้นมีความสูงเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 4.06 เซนติเมตร

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อนที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ที่มีความยาว 0.5 เซนติเมตร ประกอบด้วยตาข้าง 1 ตา และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS 2 สภาพ คือ อาหารเหลวสภาพนิ่ง และอาหารแข็งที่เติม NAA และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในอาหารแข็งสูตรที่ให้ผลดีที่สุด คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27–0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ ส่วนในอาหารแข็งสูตรที่ให้ผลดีที่สุด คือ อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตรเดียวกัน พบว่าอาหารเหลวสภาพนิ่งให้ผลดีกว่าอาหารแข็ง เนื่องจาก ในอาหารแข็งการกำจัดของเสียและอาหารที่ใช้จะทำได้เฉพาะบริเวณรอบๆผิวของเนื้อเยื่อ (Hartmann และคณะ 1997) ส่วนเนื้อเยื่อพืชบางชนิดอาจปล่อยสารพิษออกมาซึ่งในอาหารแข็งสารพิษที่ถูกปล่อยออกมาไม่สามารถกระจายสู่ส่วนอื่นๆได้ทำให้การเจริญเติบโตของพืชน้อยกว่าเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลว (บุญยืน 2540) ขณะที่ต้นพืชกำลังเติบโตปลายยอดมีการสร้างปุ่มกำเนิดใบนั้น กลุ่มเซลล์ด้านข้างของปลายยอดจะสร้างตาข้าง (axillary bud) ที่ซอกใบ ส่วนใหญ่ตาข้างจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าตายอด เนื่องจาก apical dominance ทำให้ตายอดไปยับยั้งการเจริญเติบโตของตาข้าง เนื่องจาก ปริมาณออกซินที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของตาข้างน้อยกว่าการยืดของลำต้น แต่เมื่อตัดส่วนของตายอดจะกระตุ้นตาข้างให้เจริญเป็นยอดได้ (Davies 2004) พบว่าเมื่อใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสมจะส่งเสริมการเกิดยอดจากตาข้างเพิ่มขึ้นแทนการส่งเสริมการยืดของลำต้น ส่วนการเจริญเติบโตของราก พบว่าออกซินในปริมาณต่ำสามารถกระตุ้นการพัฒนาของรากได้ (รังสฤษดิ์ 2541)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

เมื่อนำข้อที่เกิดจากยอดที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ที่ประกอบด้วยตาข้าง 1 ตา และมีความยาว 0.5 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS สภาพนิ่ง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด พบว่าการเกิดยอด ความยาวยอด จำนวนข้อ และจำนวนราก เฉลี่ยเท่ากับ 4.4 ยอด, 6.62 เซนติเมตร, 4.34 ข้อ และ1.2 ราก ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Chin (1982) แต่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.46 ไมโครโมลาร์ และ ancymidol 1.1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าตาข้างสามารถพัฒนาให้เกิดต้นได้ 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ย้าย

ต้นลงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่ามีการเกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ คล้ายกับการทดลองของศิริวรรณและคณะ (2533) แต่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเกิดยอดเฉลี่ย 4 ยอด โดยความยาวยอดเฉลี่ย เท่ากับ 6 เซนติเมตร

3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหน่อไม้ฝรั่งโดยการนำยอดที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ที่มีความยาว 0.5 เซนติเมตร ประกอบด้วยตาข้าง 1 ตา และนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kn ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ามีการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 2.59 เซนติเมตร ซึ่งต่างกับการทดลองของ May และ Sink (1995) นำข้อจากตาข้างของหน่ออ่อนมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ามีการเกิดแคลลัสเกิดขึ้น ซึ่งต่างกับการทดลองของ Takeda และคณะ (2003) นำข้อจากตาข้างของหน่ออ่อนมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเกิด embryogenic callus 6.75×10^{7} embryos ซึ่งต่างกับการทดลองของ Ziauddin และคณะ (1996) นำส่วนของ anther มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Triiodobenzoic acid (TIBA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเกิด embryogenic callus และ embryo มากที่สุด คือ 8.7 embryos ซึ่งต่างกับการทดลองของ Mamiya และ Sakamoto (1999) นำส่วนของรากจากตาข้างของหน่ออ่อนมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มของเซลล์ 1 กรัม มี somatic embryo ในระยะ torpedo จำนวน 5000–7000 เอ็มบริโอ

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ 2,4-D ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มออกซินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเซลล์ไปเป็นแคลลัส โดยจะใช้ 2,4-D อย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสารที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนินด้วยก็ได้ ในการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าตำแหน่งที่เกิดแคลลัสส่วนมากจะเกิดบริเวณรอยแผล ปลายลำต้น หรือราก (บุญยืน 2540)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4. ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ของหน่อไม้ฝรั่ง พบว่าในการทดลองที่ 4.1 แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 4 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 1.3 เซนติเมตร มีจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 15.79 ข้อ และมีจำนวนรากเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 4.6 ราก ซึ่งดีกว่าสูตรอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดและรากมีน้อยมาก ดังนั้น การทดลองที่ 4.2 จึงนำแคลลัสที่ได้จากอาหารแข็งทั้งหมด 15 สูตร ย้ายลงอาหารแข็งที่ทำให้เกิดยอดและราก 4 สูตร พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาดีที่สุด คือ จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 17 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยกลุ่มแคลลัส คือ 2.08 เซนติเมตร จำนวนข้อเฉลี่ยกลุ่มแคลลัส คือ 82.60 ข้อ และคุณภาพของรากอยู่ที่ระดับ 1.4 จำนวนรากเฉลี่ย 18 รากต่อกลุ่มแคลลัส ซึ่งต่างกับกับการทดลองของ Bojnauth และคณะ (2003) นำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.76 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 20.5 ยอด และการเกิดราก 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองของ Ziauddin และคณะ (1996) นำแคลลัสที่เจริญจากมาจากส่วนของ anther มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10.78 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20–60 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ พบว่าในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เกิด somatic embryo ในระยะ globular embryos มากที่สุด คือ 25 เอ็มบริโอ ต่อมานำ somatic embryo ในระยะ globular embryos มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงสุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองของ Mamiya และ Sakamoto (1999) พบว่าเมื่อนำ somatic embryo มาเลี้ยงที่ในน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะมีน้ำหนักสดของยอดสูงที่สุด คือ 31.5 มิลลิกรัมต่อต้น และมีน้ำหนักสดของรากสูงที่สุด คือ 46.3 มิลลิกรัมต่อต้น หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่วนความเข้มข้นของอาหาร ในสูตร MS ที่เติมความเข้มข้น 2MS จะมีน้ำหนักสดของยอดสูงที่สุด คือ 60 มิลลิกรัมต่อต้น หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

การพัฒนาของแคลลัสไปเป็นส่วนต่าง ๆ ถูกกำหนดโดยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ ออกซินและไซโทไคนินที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมโดย พบว่าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินต่ำจะช่วยในการเกิดต้นและอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินสูงจะช่วยในการเกิดราก (Hartmann และคณะ 1997) แต่ในพืชบางชนิดสามารถใช้ไซโทไคนินอย่างเดียวก็เพียงพอต่อการเพิ่มจำนวนยอด (รังสฤษฎ์ 2541)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

1. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหน่ออ่อน

นำชิ้นส่วนหน่ออ่อนของหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ Brocked Improve ความยาว 1 เซนติเมตร ที่ประกอบด้วยตาข้าง 1 ตา เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.27, 0.54 และ 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0, 0.23, 0.46 และ 2.32 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS6) ให้ผลดีที่สุด คือ เกิดยอด 1 ยอด จำนวนข้อ 7.7 ข้อ ความยาวยอด 7.35 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของยอด 2.20 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและรากจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

ทำการเพิ่มขยายยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนในอาหารสูตรที่ดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ นำยอดที่ได้มาตัดเป็นชิ้นให้แต่ละชิ้นมีความยาว 0.5 เซนติเมตร และประกอบด้วย 1 ตา เลี้ยงในอาหารสูตร MS 2 สภาพ คือ อาหารแข็งปริมาตร 30 มิลลิลิตร และอาหารเหลวสภาพนิ่งปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.27, 0.54 และ 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0, 0.23, 0.46 และ 2.32 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็งที่ดีที่สุด สำหรับการเกิดยอดทวีคูณ คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27–0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์โดยให้จำนวนยอด 4.3 และ 5.8 ยอด ความยาวยอด 4.76 และ4.03 เซนติเมตร จำนวนข้อ 9.60 และ 10.13 ข้อ ตามลำดับ ส่วนอาหารเหลวที่ดีที่สุดสำหรับการเกิดยอดทวีคูณ คือ อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ ซึ่งให้จำนวนยอด 4.4 ยอด ความยาวยอด 6.62 เซนติเมตร และจำนวนข้อ 17.86 ข้อ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตรเดียวกัน คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ พบว่าอาหารเหลวสภาพนิ่งให้ผลดีกว่าอาหารแข็ง

3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน

ทำการเพิ่มขยายยอดจากตาข้างของหน่ออ่อนในอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ นำยอดที่ได้มาตัดเป็นชิ้นให้แต่ละชิ้นมีความยาว 0.5 เซนติเมตร และประกอบด้วย 1 ตา เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 2.26, 4.52, 9.04, 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0, 2.32, 4.65, 9.90, 18.6 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C6) ให้ผลดีที่สุด คือ แคลลัสมีเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส 2.59 เซนติเมตร แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ สามารถหลุดออกจากกันได้ง่าย (friable callus)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4. ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส

4.1 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัส

นำแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-P จำนวน 4 สูตร ซึ่งประกอบด้วย 1MS และ1/2MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่เติม Kn ความเข้มข้น 0 และ 0.23 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 0.23 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 4 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 1.3 เซนติเมตร มีจำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 15.79 ข้อ และมีจำนวนรากต่อกลุ่มแคลลัสสูงที่สุด คือ 4.6 ราก

4.2 ศึกษาผลของอาหารแข็ง 4 สูตรต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-C ที่เติม 2,4-D และ Kn ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 15 สูตร

นำแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อของยอดที่เจริญจากตาข้างของหน่ออ่อน จากการทดลองที่ 3 ทั้งหมด 15 สูตรที่เลี้ยงบนอาหาร MS-C ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดและราก สูตร

MS-P จำนวน 4 สูตร ที่ประกอบด้วย 1MS (MS-P1), 1/2MS (MS-P2), 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3), 1/2MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า

อาหาร 1MS (MS-P1) ให้ผลในการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 7.4 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 3.19 เซนติเมตร จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 54.47 ข้อ และมีคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 2.2 จำนวนรากเฉลี่ย 24 รากต่อกลุ่มแคลลัสดีที่สุด ซึ่งได้จากแคลลัสที่ชักนำบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 18.08 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 18.60 ไมโครโมลาร์ (MS-C15)

อาหาร 1/2MS (MS-P2) ให้ผลในการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 3.8 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.61 เซนติเมตร จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 14.60 ข้อ และมีคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4 จำนวนรากเฉลี่ย 18 รากต่อกลุ่มแคลลัสดีที่สุด ซึ่งได้จากแคลลัสที่ชักนำบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ (MS-C6)

อาหาร 1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ให้ผลในการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 17 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.08 เซนติเมตร จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 82.60 ข้อ และมีคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 1.4 จำนวนรากเฉลี่ย 18 รากต่อกลุ่มแคลลัสดีที่สุดซึ่งได้จากแคลลัสที่ชักนำบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10)

อาหาร 1/2MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P4) ให้ผลในการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 4.6 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.27 เซนติเมตร จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 21.85 ข้อ และมีคุณภาพของรากเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 2.6 จำนวนรากเฉลี่ย 36 รากต่อกลุ่มแคลลัสดีที่สุดซึ่งได้จากแคลลัสที่ชักนำบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (MS-C8)

จากการเปรียบเทียบการเลี้ยงแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารทั้งหมด 15 สูตร แล้วย้ายลงในอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดและราก 4 สูตร พบว่าควรชักนำให้เกิดแคลลัสในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 9.90 ไมโครโมลาร์ (MS-C10) แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร1MS ที่เติม Kn 0.23 ไมโครโมลาร์ (MS-P3) ให้ผลในการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 17 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 2.08 เซนติเมตร จำนวนข้อเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส 82.60 ข้อ และมีคุณภาพของรากอยู่ที่ระดับ 1.4 จำนวนรากเฉลี่ย 18 รากต่อกลุ่มแคลลัสดีที่สุด

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กรมส่งเสริมการเกษตร. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับงานขยายพันธุ์. กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร, 2546.

กลุ่มเกษตรสัญจร. หน่อไม้ฝรั่ง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สหมิตร, 2530.

ธนพันธุ์ จอมพิทักษ์. หน่อไม้ฝรั่ง. สำนักงานเกษตรกิ่งอำเภอเทพารักษ์ จังหวัดนครราชสีมา, 2545.

นิพนธ์ ไชยมงคล และวาสนา ยังดี. การเปรียบเทียบพันธุ์หน่อไม้ฝรั่ง. งานวิจัยสาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ เชียงใหม่, 2533.

บุญยืน กิจวิจารณ์. เทคโนโลยีการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2540.

พรชัย ปิ่นวิเศษ. การส่งเสริมการปลูกหน่อไม้ฝรั่ง. รายงานการสัมมนาการผลิตหน่อไม้ฝรั่งปี 2534 จังหวัด สุพรรณบุรี, 2534.

ไพฑูรย์ นาควานิช. การทดสอบพันธุ์หน่อไม้ฝรั่ง 7 พันธุ์ เพื่อผลิตหน่อขาวในจังหวัดกาฬสินธุ์. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์ กระทรวงศึกษาธิการ, 2536.

มณฑา วงศ์มณีโรจน์. การคัดเลือกหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ดีเพื่อขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและโรงเรือนปลูกทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, 2545.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2541.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และสุริยา ตันติวิวัฒน์. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2548.

ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต. การปรับสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่งก่อนนำออกปลูก. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2539.

ศิริวรรณ บุรีคำ, เบญจา อ้นแพ, กัญญา ขำเกลี้ยง และกรีก นฤทุม. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2533.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี, 2549.

สมพร ทรัพยสาร. การปลูกหน่อไม้ฝรั่ง. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541.

สุนทรี เรืองศรี. หน่อไม้ฝรั่งปลอดภัยจากสารพิษพิชิตตลาดญี่ปุ่น. ภาควิชาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์ เกษตร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, 2542.

สิทธิโชค ศรีโช, ธันยธรณ์ นาราเต็มทรัพย์, จิรัฏฐ์ ฉายะจินดาวงศ์, สุทิชา เหวียนระวี. กินผักอย่างไรให้ปลอดภัย. นิตยสาร Heath and cuisine 67 (2549): 26.

สัมพันธ์ ธนูรักษ์. สรีรวิทยาของพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2525.

อรสา ดิสถาพร. เอกสารวิชาการเรื่องหน่อไม้ฝรั่ง กองส่งเสริมพืชสวน. กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร, 2540.

ภาษาต่างประเทศ

Araki, H., Watanabe, S., Harada, T. and Yakuwa, T. “Arial crown-like body formation through nodal segment culture in asparagus.” Acta Horticulturae. 415 (1996): 209-214.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Baskauf, S. *Asparagus officinalis*, stem [Online]. Accessed 2002a. Available from http://pick4.pick. uga.edu /mp/20p?res=640&see=I_SB35266

Baskauf, S. *Asparagus officinalis*, leaf [Online]. Accessed 2002b. Available from http://pick4.pick. ug a.edu/mp/20p?see=I_SB35263&res=640

Bergeson E. Indian summer [Online]. Accessed November 2005. Available from http://www.countryscribe.com/weblog/2005_11_06_archive.htm

Bernnett, K. and McAvoy, W. Garden asparagus [Online]. Accessed June 2003. Available from http://www.delawarewildflowers.org/0180.html

Bojnauth, G., Puchooa, S. and Bahorun, T. “*In vitro* regeneration of *Asparagus officinalis*: preliminary results.” Food and Agricultural Research Council. pp. 7-15, 2003.

Caroll B. Asparagus [Online]. Accessed April 2007. Available from http://www.chefdecuisine.com /vegetables/asparagus/asparagusmain.asp

Chin, C. “Promotion of shoot and root formation in asparagus *in vitro* by ancymidol.” HortScience. 17 (1982): 590-591

Davies, P.J. Plant hormones. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 2004.

Falavigna, A., Casali, P.E. and Tacconi, M.G. "Advance in asparagus breeding following *in vitro* anther Culture." Acta Horticulturae. 415 (1996): 137-144.

Hartmann, H., Kester, D., Davies, F.T. and Geneve, R.L. Plant propagation:principle and practices. United State: Prentice Hall International, Inc, 1997.

Hopking, W.G. and Huner, N.P.A. Plant Physiology. United State: John Wiley and Sons, inc, 2004.

John T. Vegetable [Online]. Accessed 2007. Available from http://www.territorial-seed.com /stores/1/Jersey_Knight_Crowns_P2970C40.cfm

Kohmura, H., Chokyu, S. and Harada T. "Application of a new micropropagation system involving induction of bud clusters and somatic embryogenesis in asparagus." Acta Horticulturae. 415 (1995): 119-127.

Kunitake, H. and Mii, M. "Somatic embryogenesis and plant regeration from protoplasts of asparagus (*Asparagus officinalis* L.)." Plant Cell Reports. 8 (1990): 706-710.

Levi, A. and Sink, K.C. "Somatic embryogenesis in asparagus : the role of explant and growth regulators." Plant Cell Reports. 10 (1991): 71-75.

Limanton, G.A. and Jullien, M. "Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* can be an *in vitro* selection process leading to habituated and 2,4-D dependent embryogenic lines." Plant Physiology and Biochemistry. 38 (2000): 567-576.

Linsmaire, E.M. and Skoog, F. "Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures." Plant Physiology. 18 (1965) : 100-127.

Maeda, T., Kumagai, M.,Inoue, N., Uragami, A. and Ito, K. "Effective method for seed production of all-male asparagus hybrids in a greenhouse." Acta Horticulturae. 589 (2002): 133-138.

Mamiya, K. and Sakamoto, Y. "Effect of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L." Scientia Horticulrae. 84 (1999): 15-26.

May, R.A. and Sink, K.C. " Genetic and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspension of *asparagus officinalis* L." Plant Science. 108 (1995): 71-84.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Murashige, T. and Skoog, F. "A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture." Physiologia Plantarum. 15 (1962): 473-497.

Quiros, C.F. Asparagus [Online]. Accessed May 2003. Available from http://veghome.ucdavis.edu /classes/vc221/asparagus/asparg.htm

Readindirt. The garden in august [Online]. Accessed August 2006. Available from http://readingdirt. blogspot.com/search /label/my%20garden

Reuther, G. "Somatic embryogenesis in asparagus suspension culture." Acta Horticulturae. 415 (1996): 215-224.

Saito, T., Nishizawa, S. and Nishinura, S. "Import culture condition for somatic embryogenesis from *Asparagus officinalis* L. Using an aseptic ventilative filter." Plant Cell Reports. 10 (1991): 230-234.

Shalaby, T., Haneklaus, S. and Schnug, E. "Influence of growth regulator and cultivar on callus and embryo induction in anther culture of asparagus (*Asparagus officinalis* L.)." Landbauforschung Völkenrode. 53 (2003): 217-221.

Shigeta, J., Saito K., Tanaka, S., Nakayama, M. and Mii, M. "Efficient plant regeneration of asparagus by inducting normal roots from *in vitro* multiplied shoot explants using gellan gum and glucose." Plant Science. 113 (1996): 99-104.

Skirvin, R.M. Asparagus crown [Online]. Accessed December 1999. Available from http://classes. aces.uiuc.edu/NRES103/3473-14.htm

Takeda, H., Kotake, T., Nakagawa, N., Sakurai, N and Nevin, D.J. "Expression function of cell wall-bound cationic peroxidase in asparagus somatic embryogenesis." Plant Physiology. 131 (2003):1765-1774.

United states department of agriculture. World asparagus situation and outlook [Online]. Accessed August 2004. Available from http://www.usda.gov/nofear/allusda/2004.html

Yang, H.J. and Clore, W.J. "*In vitro* reproductiveness of asparagus stem segment with branch-shoot at a node." HortScience. 10 (1973): 411-413.

Yang, H.J. and Clore, W.J. "Somatic embryogenesis in asparagus: the role of explant and growth regulators." Plant Cell Reports. 10 (1974): 71-75.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Ziauddin, A., Feng, X.R. and Wolyn, D.J. “Advances in asparagus anther culture.” Acta Horticulturae. 415 (1996): 231-236.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางภาคผนวก องค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
ธาตุอาหารหลัก (macronutrients)	
$MgSO_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
$KHPO_4$	170
ธาตุอาหารรอง (micronutrients)	
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
KI	0.83
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
สารอินทรีย์ (organic constituents)	
Glycine	2
Myo-inositol	100
Thiamine HCl (Vitamin B1)	0.1
Pyridoxine HCl (Vitamin B2)	0.5
Nicotinic acid	0.5
EDTA (disodium salt)	37.3
Sucrose	30,000 (30 g/l)
Agar	6,200 (6.2 g/l)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายรัฐพล สุขัมศรี
ที่อยู่	337/12 ตำบล วัดท่าพระ อำเภอ บางกอกใหญ่ จังหวัด กรุงเทพฯ 10600
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2542	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนทวีธาภิเศก
พ.ศ. 2545	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์ สาขาปฐพีวิทยา จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2546	ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยานิพนธ์เรื่อง "การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) จากตาข้าง และแคลลัส"

ผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Ratapon S, Thepsithar C, Thongpukdee A. (2006) Multiple shoot induction of asparagus (*Aparagus officinalis* L.). *Proceeding: Congress on Science and Technology of Thailand – Science and Technology for Sufficiency Economy to Celebrate the 60th Anniversary of the Majesty the King's Accession to the Throne*. Sirikit Convention Hall, Bangkok, Thailand, 10-12 October, FF0010