บทที่ 3

ผลการทดลอง

การเพาะปลูกต้นหญ้าหวาน

ปลูกต้นหญ้าหวานในสภาพธรรมชาติ เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพและเพาะเลี้ยงต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การปลูกหญ้าหวานในสภาพธรรมชาติ

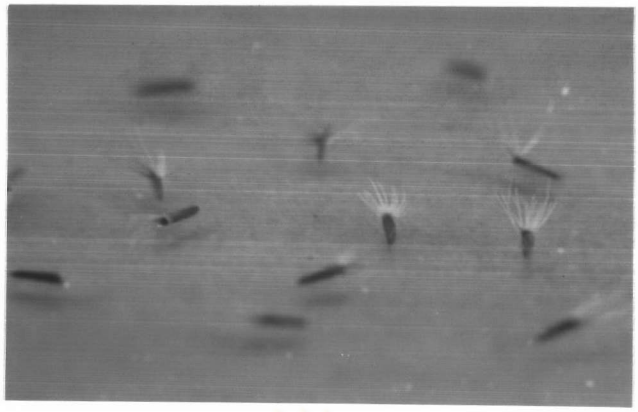
เพาะเมล็ดพันธุ์หญ้าหวานในกระถาง นำไปวางให้ได้รับแสงแดดประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (รูปที่ 2) พบว่ามีลำต้นขึ้นตรง มีกิ่งก้านสาขา แตกออกจากลำต้น ลักษณะใบมีขอบหยัก หลังจากหญ้าหวานงอกแล้วประมาณ 120 วันจะเริ่มออกดอก ดอกมีสีขาวเป็นกลุ่มอยู่ปลายกิ่ง เมล็ดสีดำ มีปุยขน เมื่อต้นรถเต็มที่ลำต้นสูงจากพื้นดินประมาณ 60-80 เซนติเมตร การปลูกหญ้าหวานในสภาพธรรมชาติประสบปัญหาเรื่องนกและแมลงมารบกวนมาก

2. การเพาะเลี้ยงต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อ

2.1 การเพาะเมล็ด

นำเมล็ดพันธุ์หญ้าหวานที่เก็บรักษาไว้ในภาชนะปิดที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส มาเตรียมเมล็ดให้ปราศจากจุลินทรีย์ โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด (ตารางที่ 2) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อสูงคิดเป็น 97.5 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีการเก็บรักษาในช่วง 1 ถึง 3 ปีแรกมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 17.5, 20.0 และ 14.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับโดยต้นอ่อนจะเริ่มงอกออกจากเมล็ดภายในระยะเวลา 4-7 วัน ใบจะคลี่ออกเต็มที่ ส่วนลำต้นยืดยาวออกพร้อม ๆ กับการเกิดราก เมล็ดที่มีอายุการเก็บรักษาในช่วงปีที่ 4 ไม่

ก

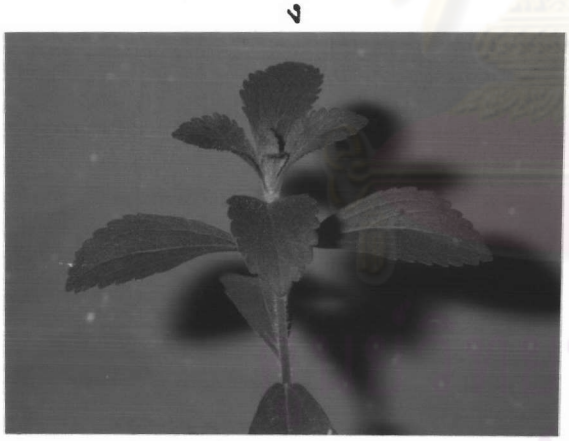


สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข

ค

ง



จ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 ลักษณะของต้นหญ้าหวาน

ก. เมล็ด

ข. ต้นอายุ 10 วัน

ค. ต้นอายุ 6 เดือน

ง. ลักษณะยอดและใบ

จ. ลักษณะดอก

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อ ความงอก ต้นอ่อนสีน้ำตาล และต้นอ่อนปกติจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่มีอายุการเก็บรักษาในช่วง 1 ถึง 4 ปี บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ระยะเวลาการเก็บรักษา (ปี)	จำนวนเริ่มต้น	เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อ	เปอร์เซ็นต์ความงอก	เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนสีน้ำตาล	เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนปกติ
1	50	100	17.5	0.5	17.0
2	50	100	20.0	1.5	18.5
3	50	97.5	14.0	1.6	12.5
4	50	99.0	-	-	-

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อ ต้นสีน้ำตาลออกม่วงและกิ่งที่มีการเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์จากการเพาะเลี้ยงส่วนกิ่งจากต้นธรรมชาติ ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

จำนวนเริ่มต้น	เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อ	เปอร์เซ็นต์กิ่งสีน้ำตาลออกม่วง	เปอร์เซ็นต์กิ่งที่มีการเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์
50	14	5	9

เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สามารถงอกเป็นต้นได้ ต้นอ่อนบางส่วนมีสีน้ำตาลเมื่องอกออกจากเมล็ดคิดเป็น 0.5, 1.5 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ต้นลักษณะดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตในระยะเวลาเพียง 2-3 วันแล้ว จึงหยุดเจริญ ส่วนต้นอ่อนหญ้าหวานที่มีลักษณะปกติคิดเป็น 17.0, 18.5 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงต่อไปในสภาวะเช่นนี้โดยทำการย้ายต้นไปสู่อาหารใหม่ทุก ๆ 8 สัปดาห์หรือแล้วแต่ช่วงเวลาของการทดลอง จะสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

2.2 การเพาะเลี้ยงส่วนกิ่ง

การเพาะเลี้ยงส่วนกิ่งจากต้นหญ้าหวานที่ปลูกในธรรมชาติ จากการเตรียมกิ่งให้ปราศจากจุลินทรีย์โดยการฆ่าเชื้อที่ผิว (ตารางที่ 3) พบว่ากิ่งที่นำมาเพาะเลี้ยงมีเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อ 14 เปอร์เซ็นต์ การเกิดเชื้อจะสามารถสังเกตได้ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์แรกของการทดลอง เชื้อที่เกิดจะเกิดจากแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่และราเป็นส่วนน้อย กิ่งที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อบางส่วนมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลออกม่วงบริเวณลำต้นและปลายกิ่งคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ กิ่งลักษณะดังกล่าวเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปสามารถเจริญเติบโตได้ แต่มีการเจริญเติบโตช้า กิ่งที่เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์คิดเป็น 9 เปอร์เซ็นต์

<u>การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชต่อขนาดภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง</u>

1. การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายขวดของการเลี้ยงต้นในภาชนะขนาดต่าง ๆ กัน

การเพาะเลี้ยงต้นหญ้าหวาน ในภาชนะเพาะเลี้ยงแบบต่าง ๆ (ตารางที่ 4, รูปที่ 3) พบว่าพืชมีการเจริญเติบโตดีในภาชนะเพาะเลี้ยงทุกแบบโดยมีช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญแตกต่างกันซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ ภาชนะขนาดใหญ่พืชจะมีระยะเวลาในการเจริญได้นาน ส่วนภาชนะขนาดเล็กพืชจะมีระยะเวลาในการเจริญสั้น พืชที่เพาะเลี้ยงในขวดตรงเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.6 ซม. ความสูง 6.0 ซม.มีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายขวดอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ขวดตรงเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 ซม. ความสูง 18.0 ซม. มีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายขวดอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่

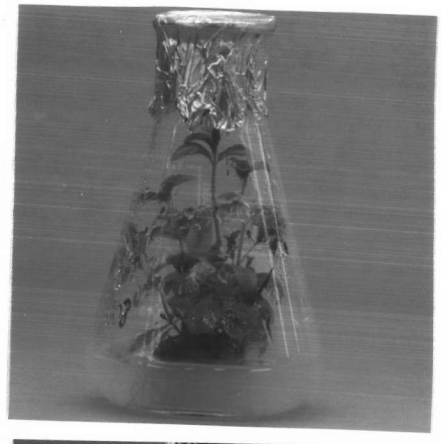
ตารางที่ 4 แสดงขนาดภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาการเจริญเมื่อต้นเริ่มเป็นสีน้ำตาลและระยะเวลา ที่เหมาะสมในการถ่ายขวด

ขนาดภาชนะ	ระยะเวลาการเจริญเมื่อต้นเริ่มเป็นสีน้ำตาล (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายทอด (สัปดาห์)
ขวดตรงเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ซม. ความสูง 6.0 ซม.	5.6	4
ขวดตรงเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 ซม. ความสูง 18.0 ซม.	12.2	10
ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล.	7.6	6
ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.	10.4	8
ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล.	12.0	10
ขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มล.	14.2	12

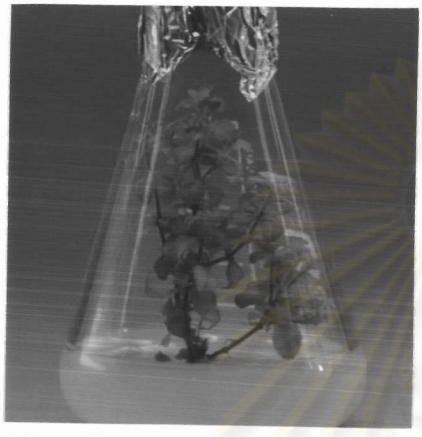
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก

ข



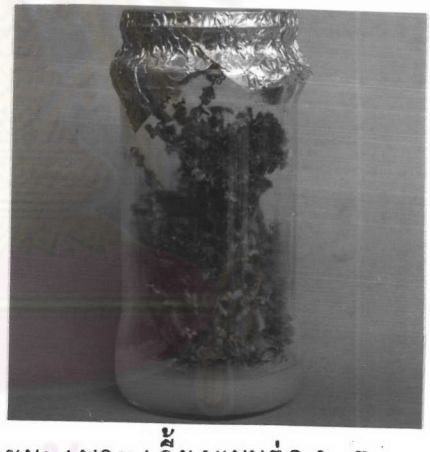
ค



ง

จ

ฉ



รูปที่ 3 ต้นหญ้าหวานในภาชนะเพาะเลี้ยงแบบต่าง ๆ

ก. ขวดตรงเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ซม.
ความสูง 6.0 ซม.

ข. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล.

ค. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.

ง. ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล.

จ. ขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มล.

ฉ. ขวดตรงเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 ซม.
ความสูง 18.0 ซม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250, 500 และ 1000 มล. มีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายขวดอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ ถ้าพืชไม่ได้รับการถ่ายขวดในช่วงเวลาที่เหมาะสม บริเวณปลายกิ่งจะเจริญจนชนภาชนะเพาะเลี้ยงแล้วค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและพืชจะตายในเวลาต่อมา

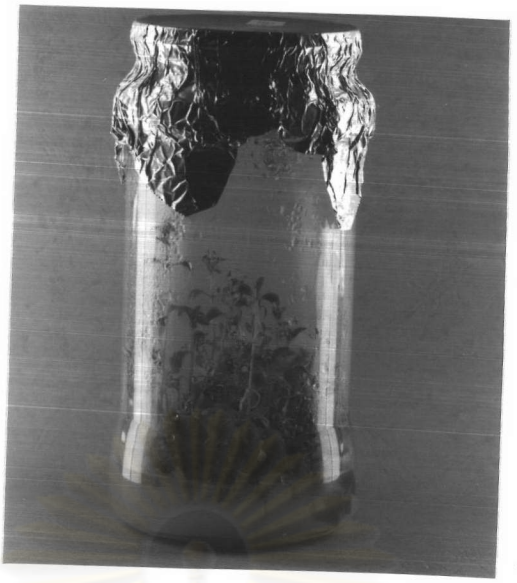
2. การศึกษาความหนาแน่นของการเลี้ยงต้นในภาชนะขนาดต่าง ๆ กัน ตัดยอดของต้นหญ้าหวานมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในภาชนะรูปทรง 2 แบบ คือ ขวดทรงตรงและขวดรูปชมพู่ โดยมีระยะห่างระหว่างยอดเท่ากับ 1.0 และ 1.5 ซม. (ตารางที่ 5,รูปที่ 4) พบว่าต้นพืชในภาชนะเพาะเลี้ยงทุกแบบ มีการพัฒนาทางความสูงอย่างรวดเร็ว โดยการพัฒนาทางความสูงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะห่างระหว่างยอดลดลง ต้นพืชที่เจริญในขวดตรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 ซม. ความสูง 18.0 ซม. ซึ่งทำการบักยอดจำนวน 19 ยอดต่อขวด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีน้ำตาลต่ำที่สุดคิดเป็น 5.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 37 ยอดต่อขวด มีผลทำให้จำนวนต้นที่เป็นสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นคิดเป็น 8.1 เปอร์เซ็นต์ โดยพืชจะเริ่มเป็นสีน้ำตาลบางส่วนในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ต้นพืชที่เจริญในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. มีเปอร์เซ็นต์ต้นสีน้ำตาลต่ำกว่าต้นพืชที่เจริญในขวดขนาด 250 มล.ภาชนะขนาด 500 มล. ซึ่งทำการบักยอดจำนวน 31 และ 61 ยอดต่อขวด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีน้ำตาลคิดเป็น 9.7 และ 11.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ต้นพืชที่เจริญในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ซึ่งทำการบักยอดจำนวน 19 ยอดต่อขวดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีน้ำตาลคิดเป็น 15.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 37 ยอดต่อขวดจะมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่เป็นสีน้ำตาลสูงสุดคิดเป็น 24.3 เปอร์เซ็นต์ โดยพืชจะเริ่มเป็นสีน้ำตาลบางส่วนในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงในบริเวณชิดกับขอบภาชนะ

ตารางที่ 5 ความสูงเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์ต้นสีน้ำตาลของพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงโดยมีความหนาแน่นแตกต่างกัน

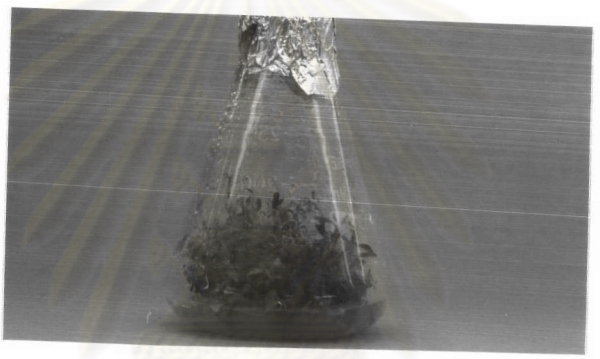
ภาชนะเพาะเลี้ยง	จำนวนยอด	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)	%ต้นสีน้ำตาล
ขวดตรง	19	9.0	5.2
	37	9.3	8.1
ขวดรูปชมพู่ 250 มล.	19	7.7	15.8
	37	8.9	24.3
ขวดรูปชมพู่ 500 มล.	31	7.5	9.7
	61	10.1	11.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก



ข



ค

รูปที่ 4 ลักษณะของต้นที่เพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงโดยมีระยะห่างระหว่างยอดเท่ากับ 1.0 ซ.ม.

ก. ขวดตรงเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 ซม. ความสูง 18.0 ซม.

ข. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.

ค. ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล.

การเพิ่มจำนวนต้นโดยการตัดยอดอย่างต่อเนื่อง

จากการเพิ่มจำนวนต้นโดยการตัดยอด 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกช่วง 15 วัน และการตัดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกช่วง 30 วัน (ตารางที่ 6) พบว่ายอดที่ถูกตัดจะแตกยอดใหม่ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยมีการแตกยอดเพิ่มขึ้น 2 เท่า จากการตัดในครั้งแรก และการเพิ่มจำนวนของยอดมีแนวโน้มลดลงทั้ง 2 กลุ่ม เนื่องจากยอดที่ถูกตัดบางส่วนเป็นสีน้ำตาลและไม่เกิดการแตกยอดใหม่

ความสามารถในการเกิดแคลลัสจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ

จากการทดลองเลี้ยงอวัยวะส่วนต่าง ๆ จากต้นหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล และ BA 2 มก./ล.

อวัยวะที่ใช้ในการทดลองคือ ยอด ใบ ลำต้น ราก ทุกอวัยวะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ส่วนยอดจะเริ่มเกิดแคลลัสบริเวณขอบใบที่ติดกับอาหารก่อนแล้วจึงค่อยเจริญเต็มชิ้นส่วนแคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่น (Compact) มีสีเขียว ค่อนข้างชุ่มน้ำ แคลลัสมีการเจริญดี ส่วนใบมีการเปลี่ยนแปลงคือ ใบขยายใหญ่ขึ้น เริ่มเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและผิวใบแคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่น มีสีเขียวแคลลัสมีการเจริญดี ส่วนลำต้นที่วางในแนวตั้งจะเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดที่ติดกับอาหารก่อน ลำต้นที่วางในแนวนอนจะเกิดแคลลัสบริเวณผิวของลำต้น แคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่นมากกว่า มีสีเขียว ส่วนรากเริ่มเกิดแคลลัสบริเวณผิวรากก่อน แคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่น มีสีเขียวออกเหลืองเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (ตารางที่ 7,รูปที่ 5,6) พบว่าส่วนยอดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 78.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดเท่ากับ 95.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำต้นที่วางในแนวนอนและแนวตั้งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 70.0,65.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนรากมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 51.7 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 อัตราการเจริญเติบโตของพืชเมื่อทำการตัดยอดเพื่อเพิ่มจำนวนต้น

ระยะเวลาการทดลอง (วัน)	จำนวนยอดต่อต้น กลุ่ม 1	กลุ่ม 2
0	10.7	13.1
30	20.2	25.5
60	37.7	41.9
90	71.3	75.8

หมายเหตุ กลุ่ม 1 ทำการตัดยอด 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกช่วง 15 วัน
กลุ่ม 2 ทำการตัดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกช่วง 30 วัน

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและลักษณะแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนยอด ใบ ลำต้นและราก ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

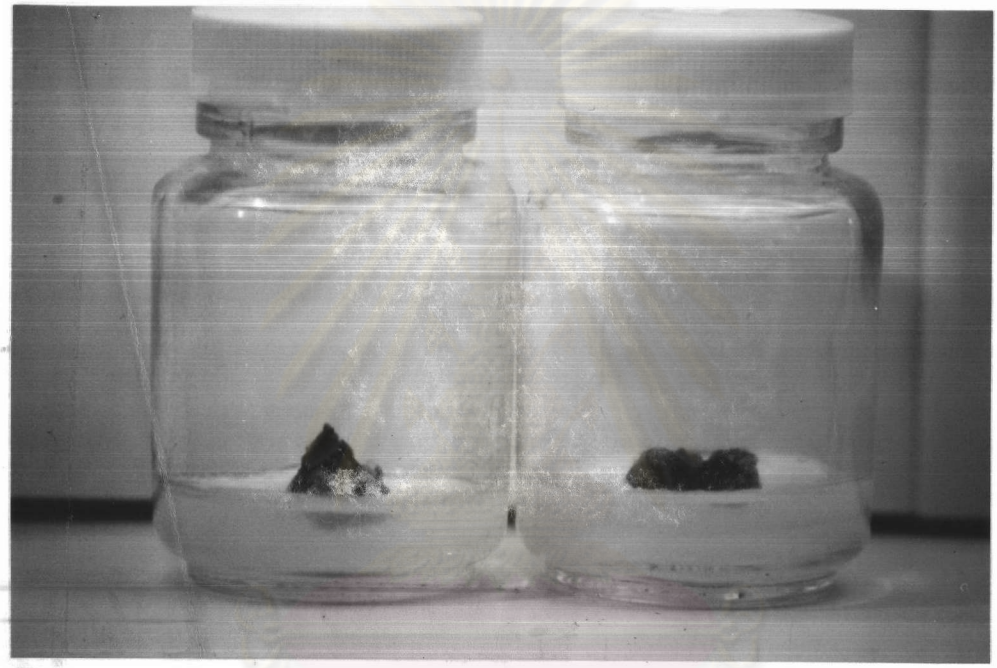
ส่วนของพืช	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
ยอด	60	78.3	เนื้อแน่นสีเขียว
ใบ	60	95.0	เนื้อแน่นสีเขียว
ลำต้น (วางนอน)	60	70.0	เนื้อแน่นสีเขียว
ลำต้น (วางตั้ง)	60	65.0	เนื้อแน่นสีเขียว
ราก	60	51.7	เนื้อแน่นสีเขียวออกเหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 ลักษณะของแคลลัสจากอวัยวะส่วน 1.ยอด 2.ใบ 3.ลำต้น 4.ราก ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.



1 2

รูปที่ 6 ลักษณะของแคลลัสจากส่วนลำต้นที่มีทิศทางในการวางบนอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 1.วางตั้ง 2.วางนอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ม16700096X

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากเนื้อเยื่อส่วนใบ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยง คือ ชนิดและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดของสารอาหาร รวมทั้งสภาวะการเพาะเลี้ยงในที่มีแสงและที่มืด

1. การหาชนิดและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

ทำการเตรียมเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS แปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ NAA ใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA และ Kinetin ในระดับ 0, 0.02, 0.2, 2.0, 4.0 มก./ล. และแปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA และ Kinetin ในระดับ 0, 0.1, 0.5, 1.0 มก./ล. ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตลักษณะแคลลัส คิดเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการให้คะแนนการเกิดแคลลัส

คะแนนแคลลัสเฉลี่ย = คะแนนแคลลัสรวม/จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทดลอง

เกณฑ์กำหนดคะแนนการเกิดแคลลัส

0 ไม่ตอบสนอง	น้ำหนักประมาณ 0.00-0.03	กรัม
1 เกิดแคลลัสปริมาณต่ำ	น้ำหนักประมาณ 0.04-0.10	กรัม
2 เกิดแคลลัสปริมาณปานกลาง	น้ำหนักประมาณ 0.11-0.89	กรัม
3 เกิดแคลลัสปริมาณสูง	น้ำหนักประมาณ 0.90	กรัม

ผลการทดลอง (ตารางที่ 8 ถึง 11) แสดงให้เห็นว่าการชักนำการสร้างแคลลัสจะเกิดขึ้นได้ดี จำเป็นต้องอาศัยการทำงานเสริมกันของทั้ง

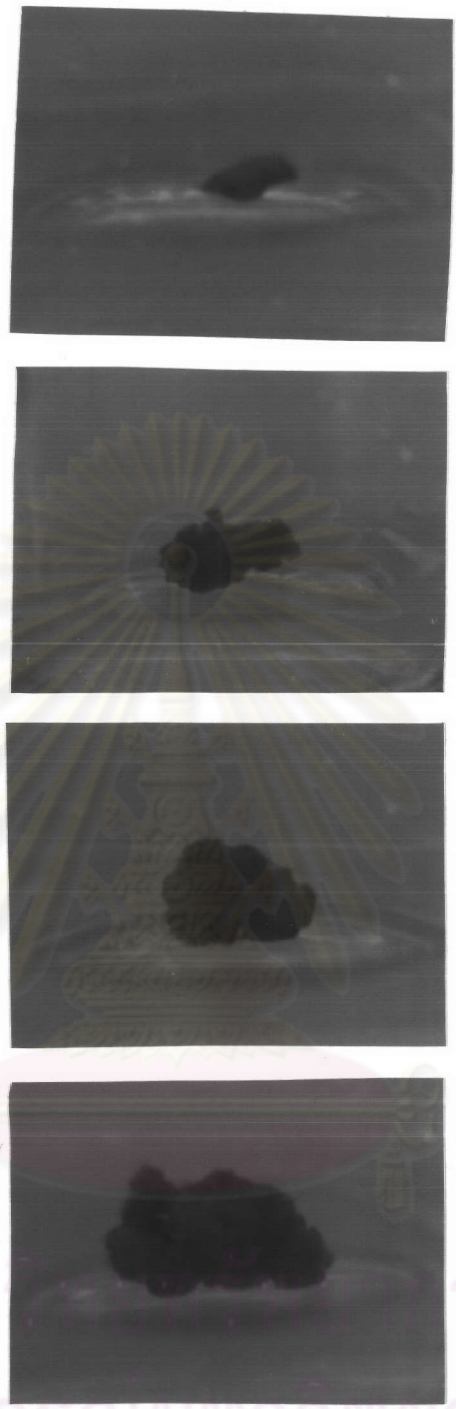
ออกซิน (NAA, 2,4-D) และไซโตไคนิน (BA, Kinetin) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามออกซินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยไม่มีไซโตไคนิน และไซโตไคนินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยไม่มีออกซินสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้บ้าง และการชักนำการเกิดแคลลัสจะสูงขึ้นเมื่อมีการเสริมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสม

เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และคะแนนการเกิดแคลลัสให้ผลสอดคล้องกันว่าเนื้อเยื่อใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสดีที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างไปกว่านี้จะให้การเจริญของแคลลัสเช่นกันแต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและคะแนนการเกิดแคลลัสต่ำกว่า เมื่อเปลี่ยนไปใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน เป็น Kinetin พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดต่ำกว่าเมื่อใช้ BA เล็กน้อย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อใช้ 2,4-D ปริมาณ 0.5 มก./ล. ร่วมกับไซโตไคนิน (BA และ Kinetin) 0.5 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส คิดเป็น 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การสร้างแคลลัสที่ระดับความเข้มข้นของออกซิเจนและไซโตไคนินสูง ๆ การสร้างแคลลัสโดยเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลง

ลักษณะของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยออกซิน (NAA) ร่วมกับไซโตไคนิน (BA, Kinetin) ในระดับต่าง ๆ มีลักษณะเนื้อแน่น สีเขียว ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยออกซิน (2,4-D) ร่วมกับไซโตไคนิน (BA, Kinetin) ในระดับต่าง ๆ มีลักษณะเนื้อแน่นสีเหลือง

2. ชนิดของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

ทำการเตรียมเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน เลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร MS, B5 และ N6 ที่เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ BA ปริมาณ 2 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส และสังเกตลักษณะแคลลัส



รูปที่ 7 แสดงมาตรฐานของลักษณะและขนาดแคลลัสที่ใช้เป็นเกณฑ์กำหนดคะแนนการเกิดแคลลัส

0	ไม่ตอบสนอง	น้ำหนักประมาณ 0.00-0.03 กรัม
1	เกิดแคลลัสปริมาณต่ำ	น้ำหนักประมาณ 0.04-0.10 กรัม
2	เกิดแคลลัสปริมาณปานกลาง	น้ำหนักประมาณ 0.11-0.89 กรัม
3	เกิดแคลลัสปริมาณสูง	น้ำหนักประมาณ 0.90 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) และไซโตไคนิน (BA) ในระดับต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการให้คะแนนการเกิดแคลลัส

อัตราส่วนของ NAA:BA	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ระดับคะแนน
0 : 0	0	0.0
0.02 : 0	5	0.9
0.2 : 0	5	0.5
2.0 : 0	35	2.1
4.0 : 0	30	1.5
0 : 0.02	0	0.0
0.02 : 0.02	25	2.1
0.2 : 0.02	45	2.9
2.0 : 0.02	50	2.5
4.0 : 0.02	10	1.5
0 : 0.2	20	2.1
0.02 : 0.2	30	2.6
0.2 : 0.2	65	2.3
2.0 : 0.2	60	2.7
4.0 : 0.2	10	1.0
0 : 2.0	50	2.4
0.02 : 2.0	55	2.5
0.2 : 2.0	80	2.8
2.0 : 2.0	90	2.9
4.0 : 2.0	35	2.1
0 : 4.0	45	2.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัตราส่วนของ NAA:BA	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ระดับคะแนน
0.02 : 4.0	10	1.5
0.2 : 4.0	10	0.9
2.0 : 4.0	25	1.9
4.0 : 4.0	15	1.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) และไซโตไคนิน (kinetin) ในระดับ ต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการให้คะแนนการเกิดแคลลัส

อัตราส่วนของ NAA : Kinetin	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ระดับคะแนน
0 : 0	0	0.0
0.02 : 0	5	0.3
0.2 : 0	10	0.7
2.0 : 0	25	1.8
4.0 : 0	15	1.2
0 : 0.02	0	0.0
0.02 : 0.02	10	1.1
0.2 : 0.02	40	2.1
2.0 : 0.02	55	2.4
4.0 : 0.02	10	0.9
0 : 0.2	5	1.1
0.02 : 0.2	45	2.0
0.2 : 0.2	65	2.4
2.0 : 0.2	50	2.2
4.0 : 0.2	30	1.9
0 : 2.0	60	2.5
0.02 : 2.0	60	2.7
0.2 : 2.0	65	2.4
2.0 : 2.0	85	2.7
4.0 : 2.0	20	1.9
0 : 4.0	55	2.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัตราส่วนของ NAA : Kinetin	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ระดับคะแนน
0.02 : 4.0	15	1.2
0.2 : 4.0	5	0.8
2.0 : 4.0	15	1.7
4.0 : 4.0	10	0.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (2,4-D) และไซโตไคนิน (BA) ในระดับต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการให้คะแนนการเกิดแคลลัส

อัตราส่วนของ 2,4-D:BA	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ระดับคะแนน
0 : 0	0	0.0
0.1 : 0	5	0.2
0.5 : 0	10	0.9
1.0 : 0	30	1.2
0 : 0.1	0	0.0
0.1 : 0.1	55	2.4
0.5 : 0.1	60	2.7
1.0 : 0.1	40	1.9
0 : 0.5	5	0.7
0.1 : 0.5	45	2.1
0.5 : 0.5	80	2.8
1.0 : 0.5	50	2.5
0 : 1.0	20	1.2
0.1 : 1.0	15	1.9
0.5 : 1.0	10	0.7
1.0 : 1.0	30	1.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (2,4-D) และไซโตไคนิน (kinetin) ในระดับต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการให้คะแนนการเกิดแคลลัส

อัตราส่วนของ 2,4-D:kinetin	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ระดับคะแนน
0 : 0	0	0.0
0.01 : 0	10	0.5
0.5 : 0	25	1.2
1.0 : 0	10	0.8
0 : 0.1	0	0.0
0.1 : 0.1	65	2.3
0.5 : 0.1	65	2.4
1.0 : 0.1	10	1.5
0 : 0.5	0	0.0
0.1 : 0.5	30	2.1
0.5 : 0.5	70	2.6
1.0 : 0.5	25	1.5
0 : 1.0	10	1.0
0.1 : 1.0	25	0.7
0.5 : 1.0	30	1.6
1.0 : 1.0	35	1.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง (ตารางที่ 12, รูปที่ 8,9) แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงที่สุด คือ 88 และ 98 เปอร์เซ็นต์ในที่มีแสงและที่มืดตามลำดับ อาหารสูตร B5 จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลัสต่ำกว่าเล็กน้อย คือ 85 และ 80 เปอร์เซ็นต์ในที่มีแสงและที่มืดตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร N6 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำสุด คือ 45 และ 57 เปอร์เซ็นต์ในที่มีแสงและที่มืดตามลำดับ

แคลลัสที่เจริญในอาหารทั้ง 3 สูตร มีลักษณะคล้ายกันคือ ในที่มีแสงมีเนื้อแน่นสีเขียว ส่วนในที่มืดมีเนื้อแน่น สีเหลือง

3. การศึกษารูปแบบการเจริญของแคลลัส

3.1 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของแคลลัส

เมื่อนำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. ร่วมกับ BA 2 มก./ล. กับ NAA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. มาศึกษาการเจริญ ผลการศึกษา (รูปที่ 10) พบว่าแคลลัสมีการเจริญที่ดี โดยแคลลัสที่เจริญในอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. มีอัตราการเจริญสูงกว่าแคลลัสในอาหารสูตรเดียวกันที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล. เล็กน้อยการเจริญของแคลลัสใช้เวลาอยู่ในช่วง Lag phage ประมาณ 1 สัปดาห์ เข้าสู่การเจริญระยะ log phase ในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีอัตราการเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 แล้วจึงเข้าสู่ stationary phase หลังจากนั้น แคลลัสจะเริ่มมีสีออกน้ำตาลและเริ่มตายในที่สุด

3.2 การศึกษาการเจริญของแคลลัสในที่มีแสงและที่มืด

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. ร่วมกับ BA 2 มก./ล. กับ NAA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. ในที่มีแสงและที่มืดพบว่าอัตราการเจริญของแคลลัสในที่มืดจะสูงกว่าเมื่อให้แสงทุกช่วงการเจริญ โดยรูปแบบการเจริญของแคลลัสทั้งในที่มืดและที่มีแสงจะมีลักษณะคล้ายคลังกันคือเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดที่เวลา 6 สัปดาห์เท่ากัน

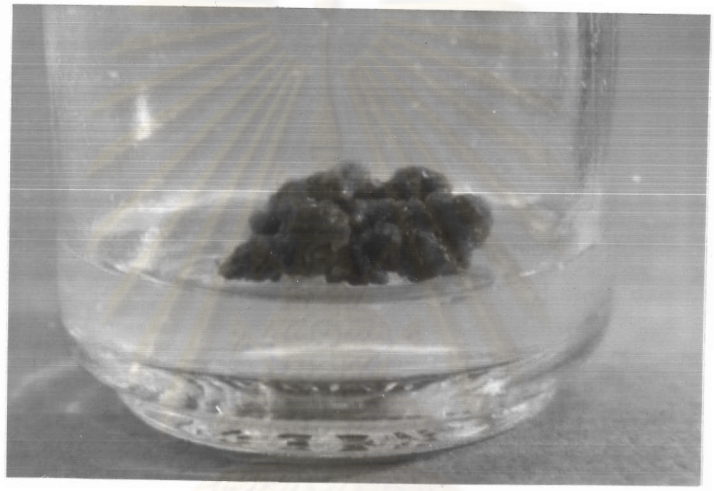
ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบในอาหารสูตร MS,B5 และ N6 ที่เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ BA ปริมาณ 2 มก./ล. ในที่ได้รับแสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด

อาหารสูตร	% การเกิดแคลลัส	
	ที่มีแสง	ที่มืด
MS	88	98
B5	85	80
N6	45	57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MS

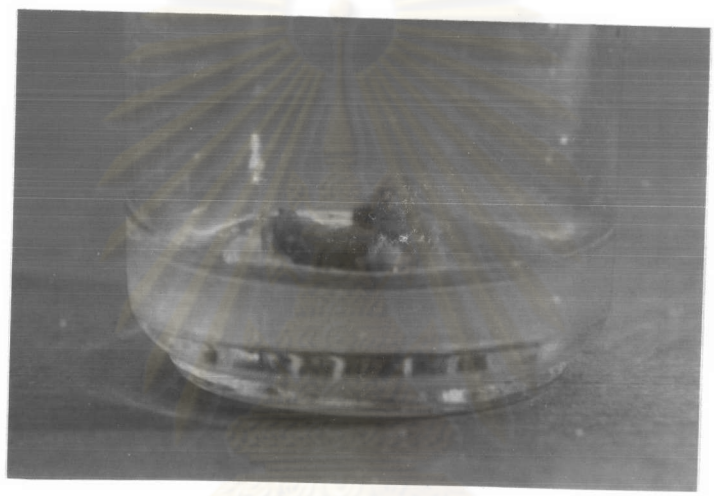


B5

N6

รูปที่ 8 ลักษณะของแคลลัสจากส่วนใบ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS, B5 และ N6 ให้ได้รับแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

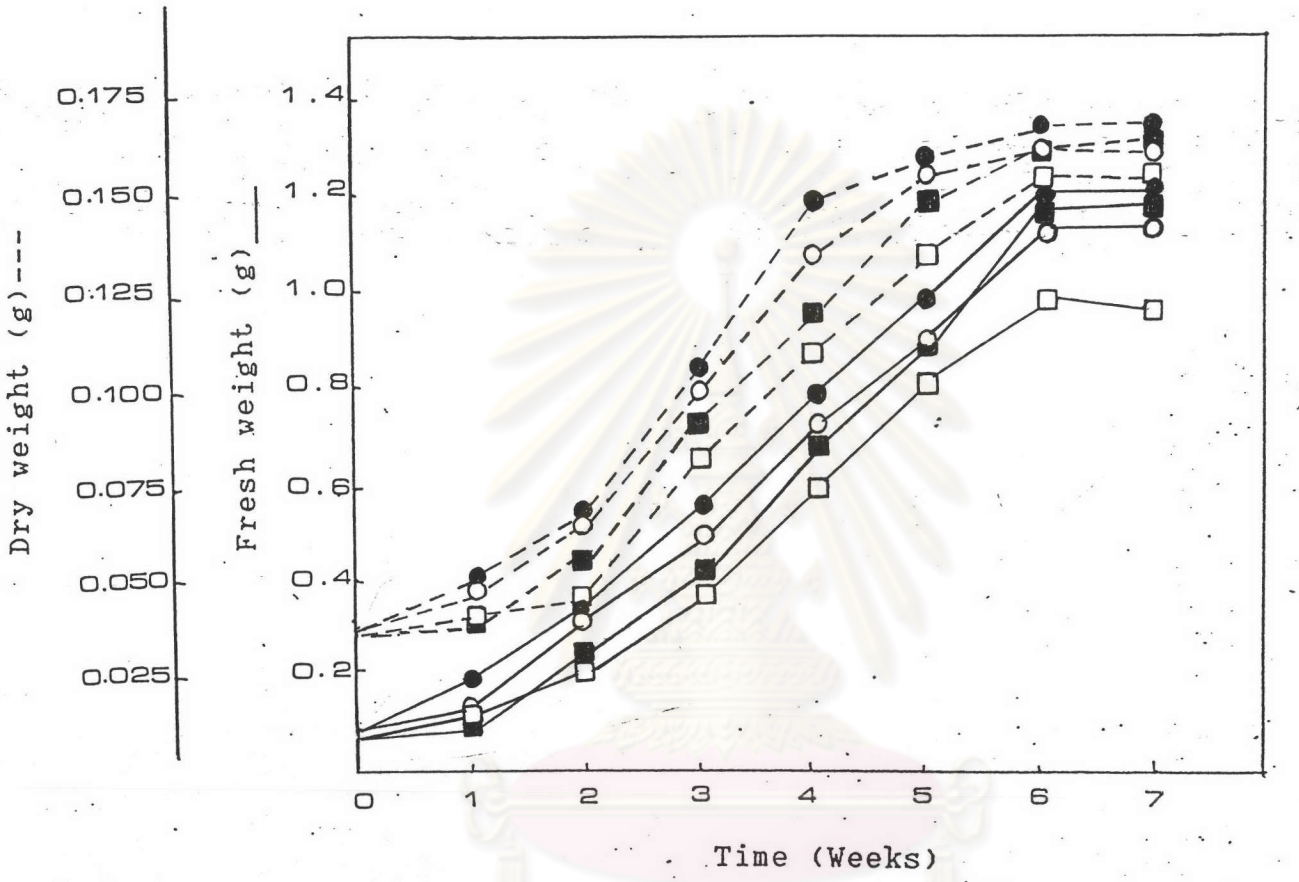
MS



B5

N6

รูปที่ 9 ลักษณะของแคลลัสจากส่วนใบ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS, B5 และ N6 ในที่มืด



NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่มีแสง

NAA 2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล. ที่มีแสง

NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่มืด

NAA 2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล. ที่มืด

รูปที่ 10 กราฟแสดงการเจริญของแคลลัสจากส่วนใบในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยออกซิน (NAA) ปริมาณ 2 มก./ล. ร่วมกับไซโตไคนิน (BA, kinetin) ปริมาณ 2 มก./ล. ในที่ได้รับแสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืด

4. การชักนำให้เกิดต้นและราก

จากการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้น/ราก จากการเลี้ยงส่วนใบในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (NAA, 2,4-D) และไซโตไคนิน (BA, Kinetin) เพาะเลี้ยงในที่มีแสงและที่มืด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง และคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส พบว่าสามารถเกิดแคลลัสได้ดีทุกสูตรอาหาร (ตารางที่ 13, รูปที่ 11-12)

โดยแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ BA ปริมาณ 2 มก./ล. เมื่อแคลลัสมีอายุประมาณ 7 สัปดาห์ บริเวณผิวของแคลลัสจะเกิดเป็นปุ่มเล็ก ๆ แล้วมีการพัฒนาเป็นยอดจำนวน 2 ยอดต่อแคลลัส คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดสามารถเกิดรากจำนวน 1-3 รากต่อแคลลัส คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เจริญในอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ Kinetin ปริมาณ 2 มก./ล. ในที่สว่าง สามารถชักนำให้เกิดรากจำนวน 1-7 ราก ต่อแคลลัสในระยะเวลา 8 สัปดาห์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเกิดรากจำนวน 1-10 รากต่อแคลลัส ในระยะเวลา 7 สัปดาห์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 29 เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เจริญในอาหารสูตร MS เสริมด้วย 2,4-D ปริมาณ 0.5 มก./ล. และ BA ปริมาณ 0.5 มก./ล. ในที่มีแสงและที่มืดไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ แคลัสที่เจริญในอาหารสูตร MS เสริมด้วย 2,4-D ปริมาณ 0.5 มก./ล. และ Kinetin ปริมาณ 0.5 มก./ล. ในที่มืดสามารถชักนำให้เกิดรากจำนวน 1-5 รากต่อแคลลัส คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์การเกิดรากเป็นแบบไม่มีทิศทาง และเมื่อทำการตัดแบ่งชิ้นส่วนของแคลลัสลงบนอาหารสูตรเดิม รากสามารถเจริญต่อไปได้

5. การศึกษาชนิดของวิตามินที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสและยอด

เมื่อทำการเปรียบเทียบ การพัฒนาไปเป็นยอดและรากจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ใส่วิตามินตามสูตร MS และสูตร Nitsch (ตารางที่ 14, รูปที่ 13-14) พบว่าอาหารที่ใส่วิตามินตามสูตร Nitsch สามารถชักนำให้เกิดการหวนกลับเป็นต้นได้สูงกว่าที่ใส่วิตามินตามสูตร

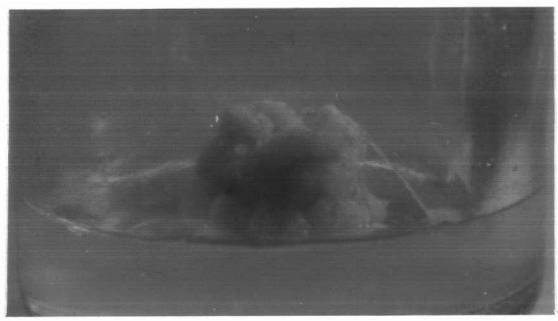
ตารางที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดต่อแคลลัส การเกิดรากจำนวนรากต่อแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ ในที่ได้รับแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน และในที่มืด

สูตร	MS+2NAA +2BA		MS+2NAA +2K		MS+0.5 2,4 +0.5 BA		MS+0.5 2,4-D +0.5K	
สภาวะการเพาะเลี้ยง	ที่มีแสง	ที่มืด	ที่มีแสง	ที่มืด	ที่มีแสง	ที่มืด	ที่มีแสง	ที่มืด
%การเกิดแคลลัส	95	98	87	95	92	85	82	90
%การเกิดยอด	1	–	–	–	–	–	–	–
จำนวนยอดต่อแคลลัส	2	–	–	–	–	–	–	–
%การเกิดราก	–	2	11	29	–	–	–	9
จำนวนรากต่อแคลลัส	–	1-3	1-7	1-10	–	–	–	1-5

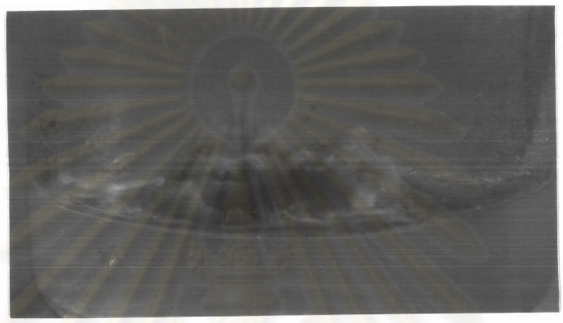
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 แสดงการเกิดราก จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบในอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ kinetin ปริมาณ 2 มก./ล. ให้แสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม. ต่อวัน

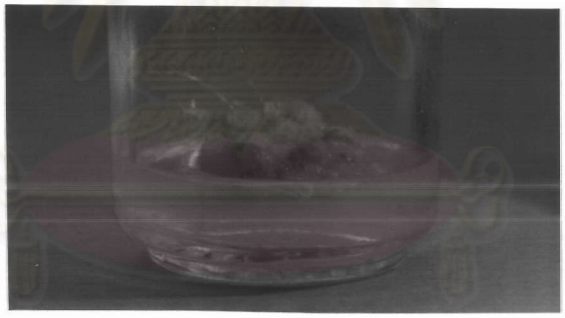
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข



ค

รูปที่ 12 แสดงการเกิดราก จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบในอาหารสูตรต่าง ๆ ในที่มืด

ก. MS เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ BA ปริมาณ 2 มก./ล.

ข. MS เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ kinetin ปริมาณ 2 มก./ล.

ค. MS เสริมด้วย 2,4-D ปริมาณ 0.5 มก./ล. และ kinetin ปริมาณ 0.5 มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ผลของการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบในอาหารสูตร MS ที่ใส่วิตามินตามสูตร MS และสูตร Nitsch

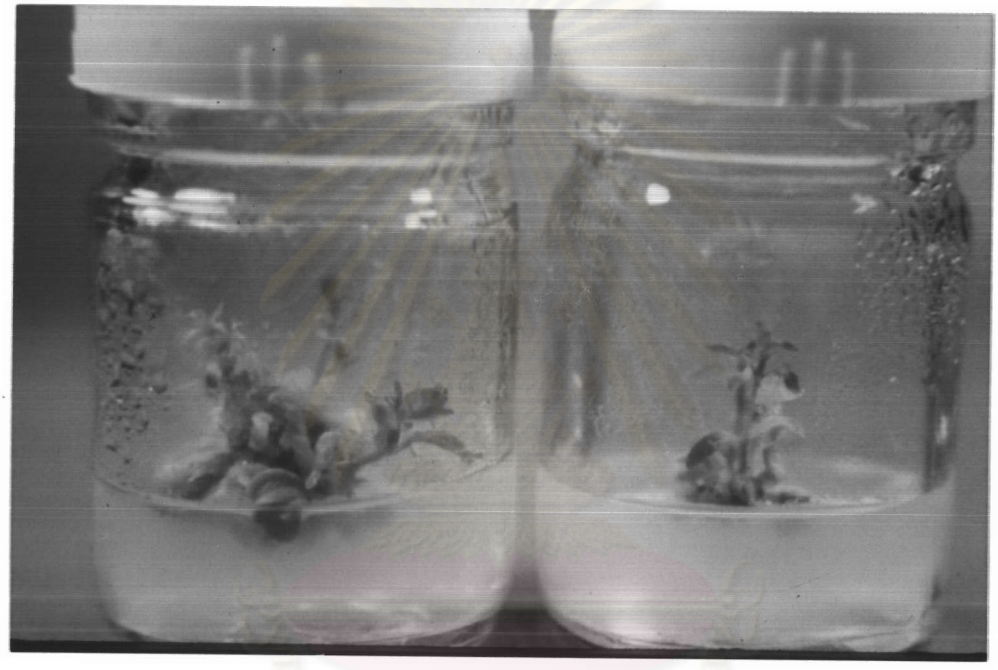
	อาหารสูตร	
	MS	MSN
% การเกิดแคลลัส	95	70
% การหวนกลับเป็นต้น	1	25
จำนวนยอดต่อแคลลัส	2	1-5
จำนวนรากต่อแคลลัส	-	3-10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 ลักษณะของยอดที่พัฒนาจากแคลลัสจากส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 ลักษณะของยอดที่พัฒนาจากแคลลัสจากส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ใส่วิตามินตามสูตร Nitsch เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถพัฒนาเป็นยอดจำนวน 1-5 ยอดต่อแคลลัส และเกิดรากจำนวน 3-10 รากต่อแคลลัส

6. การชักนำให้เกิดราก

เมื่อนำแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นยอดแล้ว มาย้ายลงสู่อาหารชักนำให้เกิดรากพบว่าสามารถเกิดรากจำนวน 3-10 รากต่อแคลลัสได้ ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 15)

<u>การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด</u>

1. การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจำนวนมาก

1.1 อิทธิพลของสูตรอาหารต่อการชักนำการสร้างแคลลัส และยอดจำนวนมาก

การเตรียมเนื้อเยื่อส่วนยอดเพาะเลี้ยงในอาหาร 6 สูตร (ตารางที่ 15, รูปที่ 16) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตร โดยแคลลัสจะเริ่มเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ แคลลัสที่เจริญในอาหารทุกสูตร มีลักษณะเนื้อแน่น สีเขียว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 4 สัปดาห์ จึงทำการย้ายลงในอาหารสูตรเดิม แคลลัสที่เจริญในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย Kinetin 8 มก./ล. จะเริ่มมีการพัฒนาของยอดภายในระยะเวลา 5 สัปดาห์ และสามารถเกิดยอดจำนวน 30-50 ยอดต่อยอดเริ่มต้นได้ ภายในระยะเวลา 12 สัปดาห์ ส่วนในอาหารสูตรอื่นจะเกิดยอดจำนวน 1-7 ยอดต่อยอดเริ่มต้น

1.2 การเจริญของยอดในที่มีแสงและที่มืด

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเสริมด้วย NAA 2 มก./ล. ร่วมกับ BA 2 มก./ล. หรือ Kinetin 2 มก./ล. ในสภาวะที่ให้แสง 2000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันกับในที่มืด (ตารางที่ 16) พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในที่มืดจะสูงกว่าเมื่อให้แสงเล็กน้อย ลักษณะของแคลลัสจากส่วนยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงจะมีลักษณะเนื้อแน่น สีเขียว ส่วนในที่มืดแคลลัสจะมีสีเหลืองยอดส่วนใหญ่มีลักษณะผอมและมีการพัฒนาทางความสูงมากกว่าในที่มีแสง (รูปที่ 17) ยอดที่เพาะเลี้ยงใน

รูปที่ 15 ลักษณะการเกิดรากในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 0.1 มก./ล.

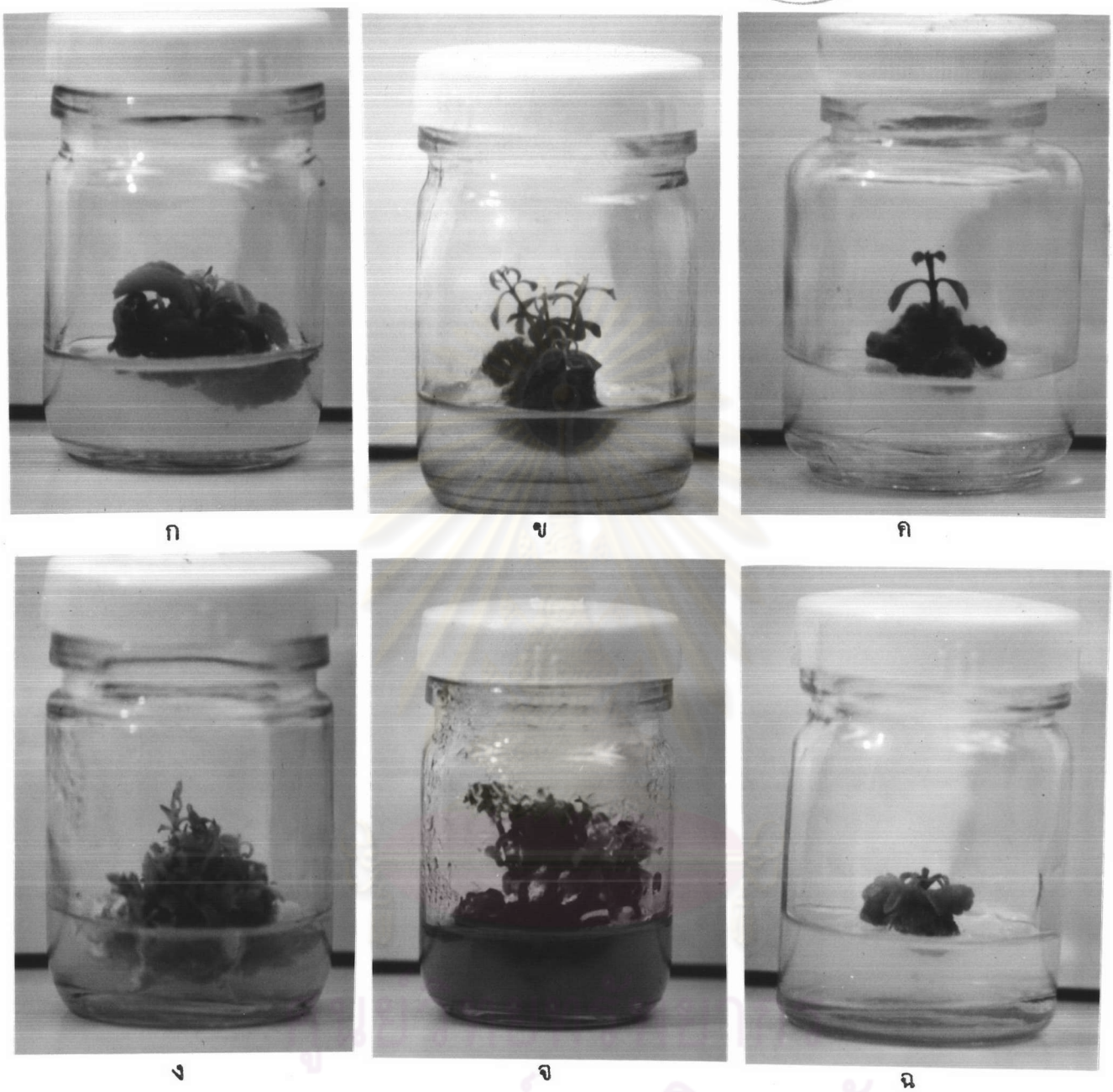
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จำนวนยอดต่อแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดในอาหาร 6 สูตร

สูตร	%การเกิดแคลลัส	จำนวนยอดต่อแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
1	85	1-5	-
2	80	1-3	-
3	70	1-3	-
4	75	30-50	-
5	80	1-7	-
6	65	1-3	-

หมายเหตุ อาหารสูตร 1 MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.
อาหารสูตร 2 MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล.
อาหารสูตร 3 MS เสริมด้วย NAA 0.2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล.
อาหารสูตร 4 MS เสริมด้วย Kinetin 8 มก./ล.
อาหารสูตร 5 B5 เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.
อาหารสูตร 6 N6 เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก ข ค

ง จ ฉ

รูปที่ 16 ลักษณะของยอดจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อน ในอาหารสูตรต่าง ๆ

ก. MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

ข. MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล.

ค. MS เสริมด้วย NAA 0.2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล.

ง. MS เสริมด้วย Kinetin 8 มก./ล.

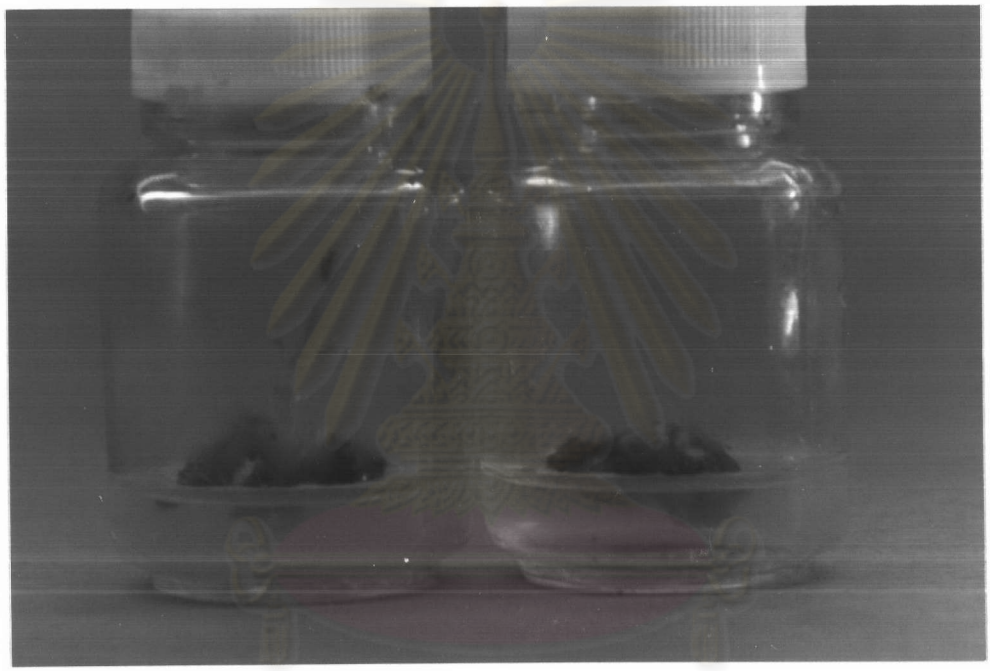
จ. B5 เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

ฉ. N6 เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

ตารางที่ 16 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ลักษณะแคลลัส จำนวนยอดต่อแคลลัส เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก และจำนวนรากต่อแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดในที่ได้รับแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด

	MS+2NAA+2BA		MS+2NAA+2K	
	ที่มีแสง	ที่มืด	ที่มีแสง	ที่มืด
%การเกิดแคลลัส	85	90	80	85
ลักษณะแคลลัส	เนื้อแน่น สีเขียว	เนื้อแน่น สีเหลือง	เนื้อแน่น สีเขียว	เนื้อแน่น สีเหลือง
จำนวนยอดต่อแคลลัส	1-5	1-3	1-3	1-3
%การเกิดราก	-	-	5	10
จำนวนรากต่อแคลลัส	-	-	1-6	1-4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



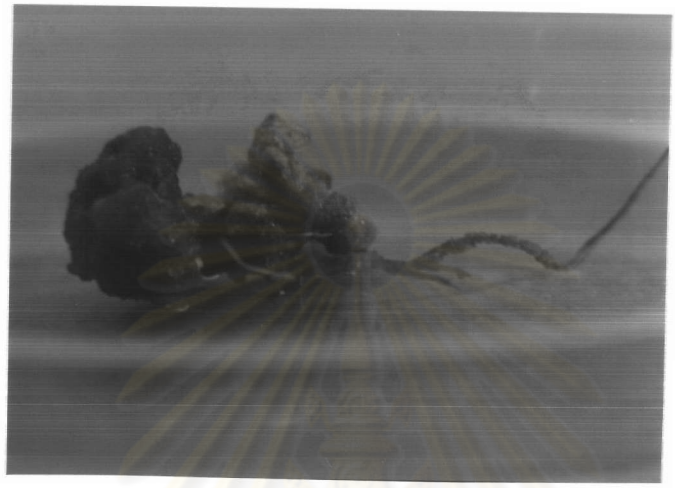
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 เปรียบเทียบลักษณะยอดที่เจริญในอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ในที่ได้รับแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืด

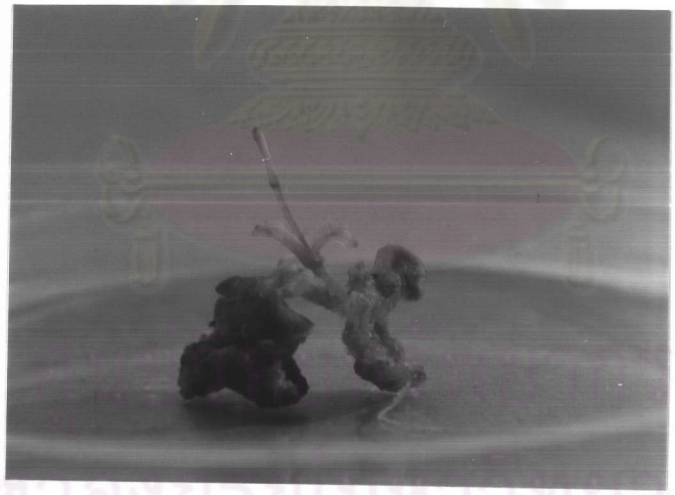
อาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล. สามารถเกิดรากจำนวน 1-6 ราก คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ในที่มีแสง และเกิดรากจำนวน 1-4 รากคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ในที่มืด (รูปที่ 18) โดยพบการเกิดรากในช่วงสัปดาห์ที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง

2. การศึกษาความเข้มข้นของไคนีตินที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจำนวนมาก

จากการที่อาหารสูตร MS เสริมด้วย Kinetin 8 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ จึงได้ศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของ Kinetin ต่อการชักนำการสร้างยอดจำนวนมากโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดในอาหารสูตร MS ที่แปรผันปริมาณ Kinetin ในระดับต่าง ๆ (ตารางที่ 17, รูปที่ 19) พบว่า Kinetin ในระดับ 0 และ 2 มก./ล. ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ ยอดที่เจริญในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม Kinetin จะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นปกติ ส่วนยอดที่เจริญในอาหารที่มี Kinetin ในระดับ 2 มก./ล. จะมีจำนวนยอดโดยเฉลี่ย 5.9 ยอดต่อยอดเริ่มต้น และมียอดบางส่วนสามารถเกิดรากได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ยอดที่มีการเกิดรากร่วมด้วยจะมีการพัฒนาทางความสูงอย่างรวดเร็ว ปริมาณ Kinetin ในระดับ 4 มก./ล. มีผลต่อการสร้างรากคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีอิทธิพลสูงในระดับตั้งแต่ 6 มก./ล. ขึ้นไป ปริมาณ Kinetin ที่เหมาะสมต่อการชักนำการสร้างยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดมากที่สุดคือในระดับ 12 มก./ล. โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจำนวนมากเท่ากับ 85.1 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 60.2 ยอดต่อยอดเริ่มต้น ภายในระยะเวลาประมาณ 12 สัปดาห์ ยอดจำนวนมากที่เกิดขึ้นเมื่อทำการแบ่งออกเป็น 2 ถึง 4 ส่วนที่ฐานของแคลัสและทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม สามารถเกิดยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง



ก



ข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

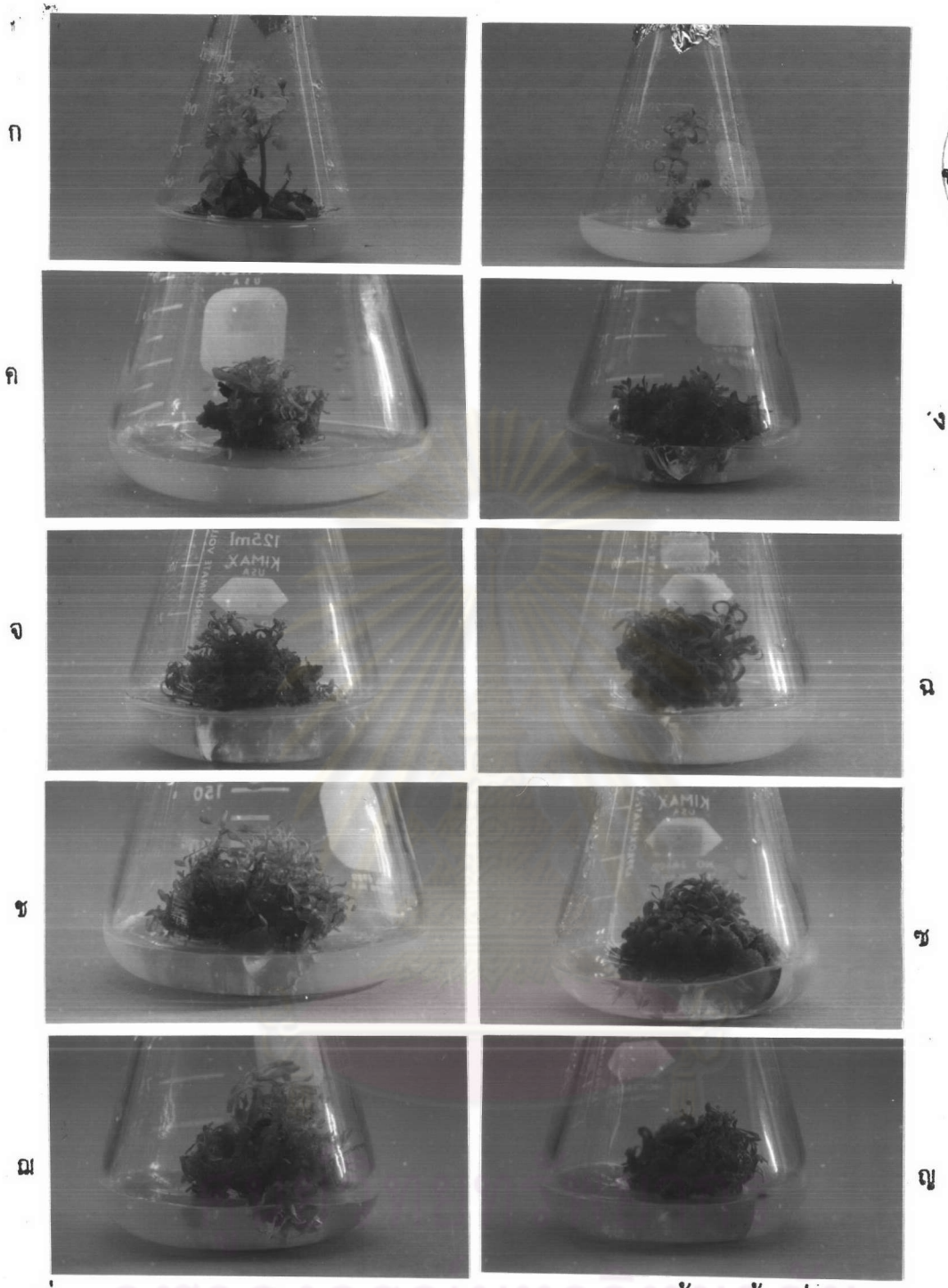
รูปที่ 18 แสดงการเกิดราก จากการเพาะเลี้ยงส่วนยอด ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล.
ก. ในที่ได้รับแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน
ข. ในที่มืด

ตารางที่ 17 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย Kinetin ความเข้มข้นต่าง ๆ

ปริมาณ Kinetin (มก./ล.)	%การเกิดแคลลัส	%การเกิดยอดจำนวนมาก	จำนวนยอดต่อยอดเริ่มต้น	%การเกิดราก
0	0	0	8.5	100
2	65	0	5.9	10
4	60	10	14.8	-
6	70	50.1	38.2	-
8	80	44.7	40.1	-
10	75	50.3	59.8	-
12	80	85.1	60.2	-
14	75	83.2	50.5	-
16	85	70.4	60.2	-
24	70	70.1	40.2	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 แสดงการเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบรดย แปรผันความเข้มข้นของ kinetin ในระดับต่าง ๆ

ก. kinetin 0 มก./ล.
ข. kinetin 2 มก./ล.
ค. kinetin 4 มก./ล.
ง. kinetin 6 มก./ล.
จ. kinetin 8 มก./ล.
ฉ. kinetin 10 มก./ล.
ช. kinetin 12 มก./ล.
ซ. kinetin 14 มก./ล.
ฌ. kinetin 16 มก./ล.
ญ. kinetin 24 มก./ล.

การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการย้ายแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA ในระดับต่าง ๆ (ตารางที่ 18, รูปที่ 20) พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี NAA และอาหารที่เสริมด้วย NAA ในระดับ 0.01, 0.05 และ 0.1 มก./ล. สามารถเกิดรากได้ดี คิดเป็น 79.7 ถึง 87.3 เปอร์เซ็นต์ และรากมีลักษณะแข็งแรง ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA 0.5 และ 1.0 มก./ล. สามารถเกิดรากได้เล็กน้อยคิดเป็น 29.3 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยรากมีลักษณะสั้นและหนา ส่วนการตัดยอดเดี่ยวที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงมาปักลงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่ายอดเดี่ยวสามารถเกิดรากได้ภายในระยะเวลา 2 ถึง 3 สัปดาห์ และต้นมีการเจริญได้ดี

การวิเคราะห์ปริมาณสตีวีโอไซด์

การทดลองศึกษาหาปริมาณสตีวีโอไซด์จากส่วนใบของพืชในธรรมชาติที่อายุต่าง ๆ กัน โดยแยกสกัดส่วนใบ 5 คู่แรก และใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน (ตารางที่ 19) พบว่าใบจากต้นธรรมชาติอายุ 24 เดือนมีปริมาณสตีวีโอไซด์สูงกว่ากลุ่มอายุอื่น และใบ 5 คู่แรกมีปริมาณสตีวีโอไซด์โดยเฉลี่ยสูงกว่าใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดสตีวีโอไซด์ จากส่วนใบ ลำต้น และรากของต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและต้นที่ได้จากการหวนกลับเป็นต้นใหม่ พบว่า ส่วนใบมีปริมาณสตีวีโอไซด์สูงกว่าส่วนลำต้นและราก

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสตีวีโอไซด์จากส่วนใบของต้นธรรมชาติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และต้นที่ได้จากการหวนกลับเป็นต้นใหม่ที่อายุเดียวกัน พบว่าใบจากต้นธรรมชาติมีปริมาณสตีวีโอไซด์สูงที่สุด

เมื่อทำการศึกษาหาปริมาณสตีวีโอไซด์จากแคลลัสในช่วงระยะการเจริญ 3, 4, 5 และ 6 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงในที่ได้รับแสง 2000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืด ไม่พบปริมาณสตีวีโอไซด์จากสารสกัดจากแคลลัส

ตารางที่ 18 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดรากและจำนวนรากต่อต้น จากการชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ

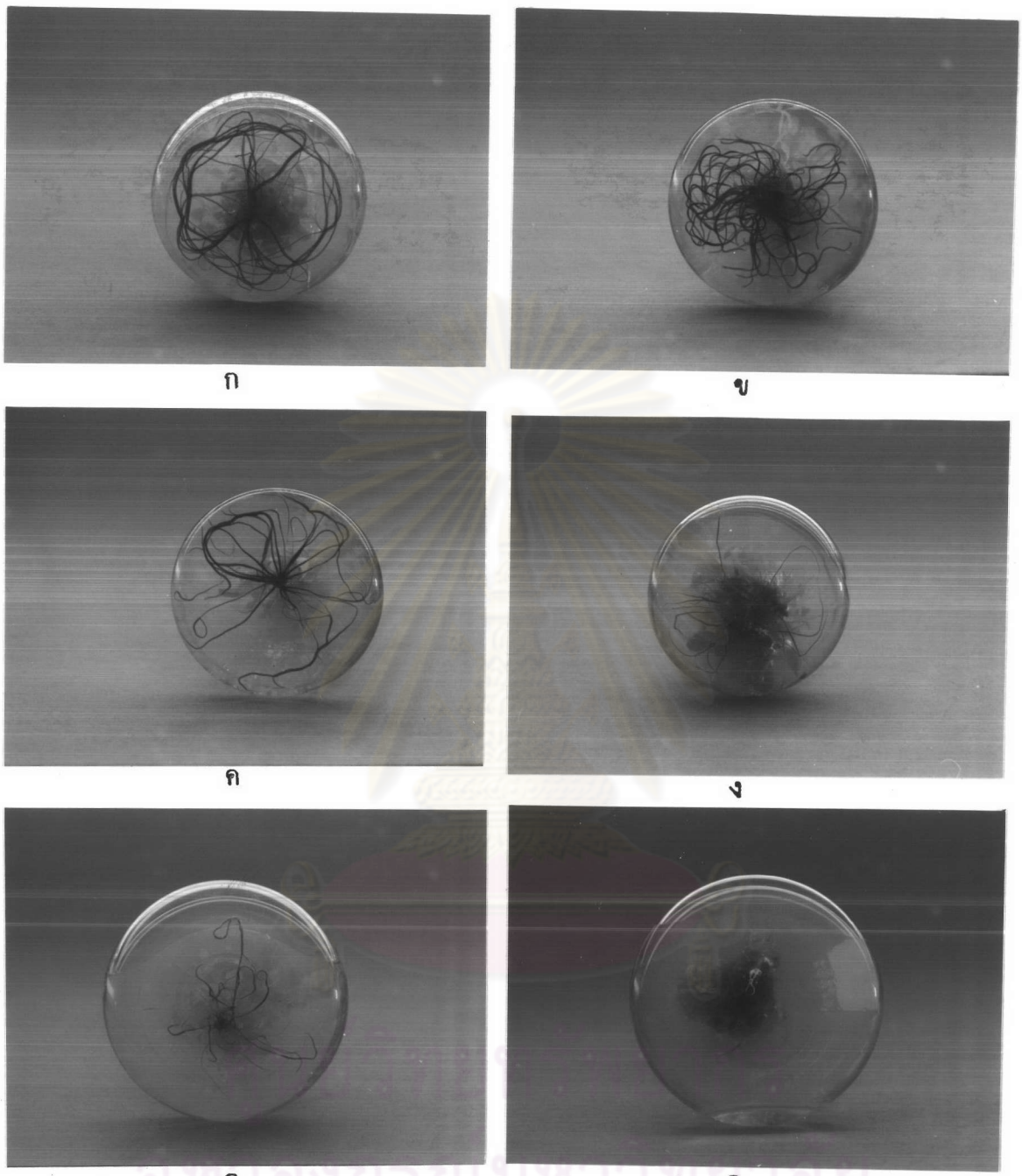
ปริมาณ NAA (มก./ล.)	%การเกิดราก	จำนวนรากต่อต้น
0	87.3	8.2
0.01	85.5	10.1
0.05	79.7	9.2
0.1	81.0	9.8
0.5	29.3	4.2
1.0	6.0	3.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 แสดงปริมาณสตีวีรอไซด์จากส่วนใบของต้นธรรมชาติที่มีอายุต่าง ๆ กัน

อายุต้นธรรมชาติ (เดือน)	ปริมาณสตีวีรอไซด์ (mg) ใบ 5 คู่แรก	ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน
6	3.2	2.9
9	3.7	3.6
12	2.9	3.1
15	4.1	3.2
18	4.5	4.2
21	3.9	3.7
24	4.8	3.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

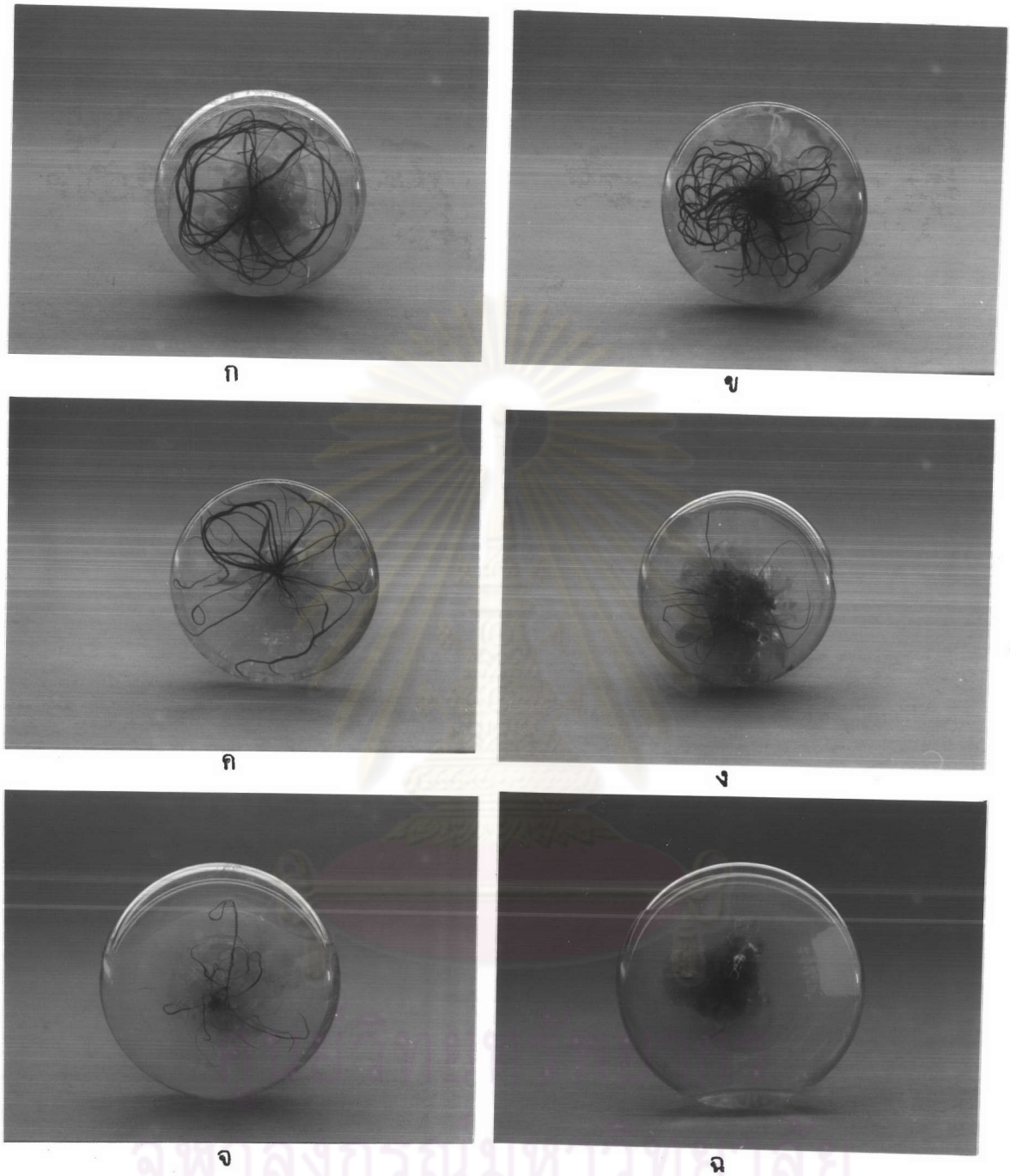


รูปที่ 20 แสดงลักษณะรากที่เกิดจากการแปรผันความเข้มข้นของ NAA ในระดับต่าง ๆ

ก. NAA 0 มก./ล. ข. NAA 0.01 มก./ล.

ค. NAA 0.05 มก./ล. ง. NAA 0.1 มก./ล.

จ. NAA 0.5 มก./ล. ฉ. NAA 1.0 มก./ล.



รูปที่ 20 แสดงลักษณะรากที่เกิดจากการแปรผันความเข้มข้นของ NAA ในระดับต่าง ๆ

ก. NAA 0 มก./ล.
ข. NAA 0.01 มก./ล.
ค. NAA 0.05 มก./ล.
ง. NAA 0.1 มก./ล.
จ. NAA 0.5 มก./ล.
ฉ. NAA 1.0 มก./ล.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณสตีวีโอไซด์จากส่วน ใบ ลำต้น ราก ของต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และต้นที่ได้จากการหวนกลับเป็นต้นใหม่ เมื่ออายุการเพาะเลี้ยง 6 เดือน

ตัวอย่างพืช	ปริมาณสตีวีโอไซด์ (mg)		
	ใบ	ลำต้น	ราก
ต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ	2.7	1.8	1.1
ต้นที่ได้จากการหวนกลับเป็นต้นใหม่	2.2	1.6	1.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การย้ายต้นลงปลูกในดิน

ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อย้ายมาปลูกในดินโดยหุ้มปากกระถางด้วยถุงพลาสติก พบว่าต้นอ่อนสามารถตั้งตัวได้ภายในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์ จึงนำถุงพลาสติกออกได้ต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ (รูปที่ 21)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ