

582.140722

ว 14 อ

ว. 3

อิทธิพลของออกซินและไซโตไคนินต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเย็นแก๊ว

(Smilax corbularia Kunth)

ปริญญาโท

ทอง

มงคล ฤทธิธรรม

ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๒๘ พ.ค. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

มกราคม 2532

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178466

อิทธิพลของอุณหภูมิและไฮโดรเจนต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(Smilax corbularia Kunth)

บทคัดย่อ

ของ

มงคล ฤทธิธ

แผนกต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าอิสระ

ปริญญาดุษฎีบัณฑิต

มกราคม 2532

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเย็นเหนือ Smilax corbularia Kunth โดยนำชิ้นส่วน
ใบอ่อน ลำต้นใต้ดิน และตาข้างเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog.)
ดัดแปลงจำนวน 100 สูตร โดยการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตคือ 2, 4 - D, NAA, BA
และ K ระดับความเข้มข้น 0.5 - 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าเนื้อเยื่อใบตอบสนองต่ออาหาร
ทุกสูตรโดยการขยายขนาดเพิ่มขึ้นและเกิดแคลลัสบนอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA บางสูตร
แต่น้ำหนักที่ได้น้อยมาก เนื้อเยื่อลำต้นใต้ดินเกิดแคลลัสได้ในทุก combination ของสารเร่ง
การเจริญเติบโตที่ใช้ แต่สูตรอาหารที่ทำให้ได้แคลลัสน้ำหนักมากที่สุดคือสูตรที่เติม NAA ความ
เข้มข้น 2.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับสูตร
อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ K ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร
จะให้ทั้งแคลลัสและยอด ตาข้างเกิดแคลลัสบนอาหารทุก combination แต่เกิดบนอาหารบางสูตร
เท่านั้นน้ำหนักที่ได้น้อยมาก ตาข้างไม่เกิดยอดบนอาหาร MS ซึ่งเติม 2, 4 - D ร่วมกับ BA,
2, 4 - D ร่วมกับ K และ NAA ร่วมกับ K แต่จะเกิดยอดบนอาหาร MS ซึ่งเติม NAA
ร่วมกับ BA ในสูตรอาหาร MS ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA
ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ยอดจำนวนมากและเจริญที่สุด ยอดที่ได้สามารถเกิดราก
บนอาหาร MS ที่เติม NAA ระดับความเข้มข้น 0.5 - 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แต่เกิดรากได้
ที่สุกจำนวนมากและยาวที่สุดบนอาหาร MS ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร
นำต้นที่มีรากและใบสมบูรณ์ออกปลูกในเรือนเพาะชำปรากฏว่าอัตราการรอดสูงและพืชสามารถ
ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้

EFFECTS OF AUXINS AND CYTOKININS ON TISSUE

CULTURE OF Smilax corbularia Kunth

AN ABSTRACT

BY

MONGKON RITTIRON

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree
at Srinakharinwirot University

January 1989

Leaf discs, rhizome cubes, and excised axillary buds of Smilax corbularia Kunth were aseptically cultured on 100 formulae of modified Murashige and Skoog (MS) media supplemented with auxins (2, 4 - D, NAA) and cytokinins (BA, K) of 0.5 - 10.0 mg l^{-1} varied concentrations. It was found that leaf discs responded to all of the formulae though gaining little weight. However, calluses were formed on certain combinations of NAA and BA with small weight. In the same fashion rhizome tissues formed calluses on media with all combinations of the growth regulators. Highest weight, however, was gained from the medium supplemented with 2.50 mg l^{-1} NAA and 0.50 mg l^{-1} BA while calluses and shoots were obtained on the medium with 5.0 mg l^{-1} NAA plus 10.0 mg l^{-1} K. Axillary buds formed little weights of calluses on the media of all combinations of auxins and cytokinins at certain concentrations. No shoot was developed on the media with 2, 4 - D plus BA, 2, 4 - D plus K and NAA plus K, but NAA plus BA. The combination of 1.25 mg l^{-1} NAA and 2.5 mg l^{-1} BA was most suitable for a satisfactory development of axillary shoots. The shoots were rooted on MS media with 0.5 - 2 mg l^{-1} NAA, but best result was obtained from 2 mg l^{-1} NAA. Rooted plantlets were successfully established under greenhouse conditions.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบไล่ที่จารย์ปริญญาโทฉบับนี้
แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษาภาควิชาจิตของ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... Onl 1102 ประธาน
(อาจารย์อรพินท์ แก้วลาย)
..... เม.ย. สันต กรรมการ
(อาจารย์เรณู ศรีสำราญ)

คณะกรรมการสอบ

..... Onl 1102 ประธาน
(อาจารย์อรพินท์ แก้วลาย)
..... เม.ย. สันต กรรมการ
(อาจารย์เรณู ศรีสำราญ)
..... รศ.ดร.เสนาะ บุญมี กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รศ.ดร.เสนาะ บุญมี)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้ปริญญาโทฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... สมพร บัวทอง คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ.ดร. สมพร บัวทอง)

วันที่...22....เดือน...พฤษภาคม...พ.ศ. 2532

ประกาศศุภปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยโดยทุนสิรินธร ผู้วิจัยขอขอบพระลัถึง
พระมหากรุณาธิคุณเป็นล้นพ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อรพินท์ แก้วฉาย ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ
อาจารย์เรณู ศรีสำราญ กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยกรุณาให้คำแนะนำในการวิจัย และ
ตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ ขอระลึกถึงพระคุณของครู อาจารย์ ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้
และที่เหนือสิ่งอื่นใดคือ พระคุณของ พ่อ แม่ ที่ ๆ ทุกคน ตลอดจนญาติจณา เวทนามหา ที่เ็น
กำลังใจในการศึกษาตลอดมาจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

มงคล ฤทธิธรณ

มกราคม 2532

สารบัญ

บทที่	เนื้อหา	หน้า
1	บทนำ.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า.....	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า.....	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า.....	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
	เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า.....	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
	ออกซิน (Auxins)	5
	บทบาทของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	5
	ไซโตไคนิน (Cytokinins)	6
	บทบาทของไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	7
	การทำงานของออกซินร่วมกับไซโตไคนิน.....	8
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า.....	12
	อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า.....	12
	วิธีทดลอง.....	13
	วิธีการรวบรวมข้อมูล.....	19
4	ผลการศึกษาค้นคว้า.....	20
	ผลการทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของ 2,4- D ร่วมกับ BA ต่อการเจริญเป็น แคลลัสหรือยอด.....	20

ผลการทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ BA ต่อการเจริญเป็น แคลลัสหรือยอด.....	24
ผลการทดลองที่ 1.3 ศึกษาผลของ 2,4- D ร่วมกับ K ต่อการเจริญเป็น แคลลัสหรือยอด.....	29
ผลการทดลองที่ 1.4 ศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ K ต่อการเจริญเป็นแคลลัส หรือยอด.....	32
ผลการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงยอดที่ได้จากการทดลองที่ 1 เพื่อให้เกิดราก	36
ผลการทดลองที่ 3 การนำต้นข้าวเข้มน้ำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก..	42
5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	47
จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า.....	44
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า.....	44
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	45
สรุปและอภิปรายผล.....	45
ข้อเสนอแนะ.....	49
บรรณานุกรม.....	51
ภาคผนวก.....	56
ประวัติย่อของผู้วิจัย	67

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ BA.....	15
2 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA.....	16
3 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ K.....	17
4 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ K.....	18
5 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม NAA และ NAA ร่วมกับ BA.....	19
6 การเจริญเติบโตของคนและการงอกรากของต้นข้าวเหนียวหลังจากเพาะเลี้ยง ออกบนอาหาร MS สูตรที่ 101 - 112 เป็นเวลา 2 เดือน.....	38

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลำต้นไต่ดิน ใบอ่อน และตาข้าง.....	12
2 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนใบ ตาข้าง และลำต้นไต่ดินที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 1 - 25.....	22
3 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไต่ดิน เป็นเวลา 2 เดือน บน อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร.....	23
4 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนใบ ตาข้าง และลำต้นไต่ดิน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 26 - 50.....	25
5 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไต่ดิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหาร สูตร MS คัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร.....	26
6 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไต่ดิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหาร สูตร MS คัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร.....	27
7 ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของตาข้าง เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร.....	28
8 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนใบ ตาข้าง และลำต้นไต่ดินที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 51 - 75.....	30
9 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไต่ดิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหาร สูตร MS คัดแปลงที่เติม K ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2, 4 - D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร.....	31

ภาพประกอบ

- 10 น้ำหนักสัตว์ที่เพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนใบ ตาข้าง และลำตัวโตเกิน ที่เพาะเลี้ยงบน
อาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 76 - 100..... 33
- 11 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำตัวโตเกิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหาร
สูตร MS คัดแปลงที่เติม K ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA
ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร..... 34
- 12 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำตัวโตเกิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหาร
สูตร MS คัดแปลงที่เติม K ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA
ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร..... 35
- 13 ต้นข้าวเย็นเหนือที่เพาะเลี้ยงจากส่วนยอด บนอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม
NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 2 เดือน..... 37
- 14 ความสูงของต้น ความยาวและจำนวนรากของข้าวเย็นเหนือต้นใหม่ที่เพาะเลี้ยง
บนอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 101 - 112 เป็นเวลา 2 เดือน..... 41
- 15 ต้นข้าวเย็นเหนือที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนยอด นำออกปลูกใน
เรือนเพาะชำ เป็นเวลา 1 เดือน..... 43

บทนำ

มนุษย์รู้จักนำพืชสมุนไพรมาใช้ให้เป็นประโยชน์ในทางยาแก้พิษมาแต่โบราณกาลแล้ว ดังเช่น ชาวอียิปต์โบราณนำพืชบางชนิดมาทำน้ำยาอาบเพื่อรักษาโรคผิวหนัง หรือที่เรียกว่า มัมมี่ ให้แก่ศพและบางชนิดก็ใช้เพื่อรักษาโรคให้เกิดขึ้น เช่น ไข้ส่าจะ ไข้เสมหะ และไข้หวัด เป็นต้น พวกอินเดียนแดงนำยาง Podophyllum มาใช้รักษาพิษแมลงกัดต่อย หรือใช้รับประทานเป็นยาระบาย สำหรับประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรเพื่อรักษาโรคโดยได้รับอิทธิพลความรู้จากจีน อินเดีย และชาวต่างชาติอื่น ๆ ที่เข้ามาติดต่อค้าขาย (ประเสริฐ สุทธิประสิทธิ์. 2528 : 2)

การใช้สมุนไพรช่วยรักษาโรคหรือบรรเทาอาการนั้น เมื่อพบว่าบรรเทาอาการโรคแล้วก็จดจำและใช้กันต่อมาจนวงการแพทย์ เกษตรแพทย์ปัจจุบันเจริญขึ้นและมีการทดลองนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยควบคู่กับวิธีการของแพทย์แผนปัจจุบัน ปรากฏว่าได้ผลดีเนื่องจากพืชสมุนไพรที่มีอัลคาลอยด์ (alkaloid) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นยาแก้รักษาโรค บำรุงหัวใจ ช่วยในการเจริญอาหาร และเป็นยาอายุวัฒนะ ศัพท์ที่สำคัญหลายชนิดเป็นสารจำพวกอัลคาลอยด์ซึ่งได้มาจากการสกัดพืชเหล่านั้น (สคิมมา สรรพางค์สกุล. 2523 : 1 ; เน้นทวิน บุณยะประภัสร์. ม.ป.ป. : 5 ; กัจจกร มนุษยจุ. 2521 : 6)

ถั่วเอ็นเหนือ (Smilax corbularia Kunth) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่แพทย์แผนโบราณใช้หัวปรุงเป็นยารักษาโรค เช่น เบาแดง คับพิษในกระตัก ประคอง เส้นเอ็นพิการ น้ำเหลืองเสีย กามโรคเข้าข้อ ออกคอก แก้ปวดหูพอง ตาแดง อุทเทรธาต มดลูกพิการ มะเร็ง เบาหวาน ร้อนใน นอกจากนี้ยังใช้ใบแก้ไข้เหนือและใช้สมันเขาค ส่วนดอกแก้พิษงูเห่า และผลแก้ลม ริดสีดวง แพทย์จีนใช้แก้ลมเอาน้ำซึ่งมีรสค่อนหวานเล็กน้อยรับประทานแก้ร้อนใน และแก้ไข้ส่าจะพิการ และตามตำรับพระวชิร จตุรคัลโย แห่งวัดเทพมณเฑียร จังหวัดสระบุรี

ใช้หัวข้าวเย็นเหนือในการรักษาโรคเบาหวานร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ ซึ่งประกอบด้วย ข้าวเย็นโต เชือกเขาน้ำผึ้ง ทองพันชั่ง แก่นไม้สัก หัวร้อยรู หนุ่ยเกล็ดปลา และพญารากดำ จาก รายงานการทดลองของ สมบัติ พุ่มสาธา ที่ทำให้หนูเป็นเบาหวานและใช้ยาสำหรับพระวชิ จตุतालโย บำบัดรักษา ผลปรากฏว่ายาสำหรับดังกล่าวสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูลง ได้อย่างมีผลทางการรักษา (เชษฐา พยากรณ์ 2525 : 116 ; พันธ์ สุจำนงค์ 2524 : 399 ; ประสพ บุรณมานัส 2526 : 201 ; สมบัติ พุ่มสาธา. 2530.)

จากความสำเร็จและประโยชน์ดังกล่าว ข้าวเย็นเหนือจึงเป็นส่วนหนึ่งที่สนใจควรแก่ การนำมาศึกษาวิจัย เพราะในธรรมชาติมีการขยายพันธุ์ได้ เป็นพืชที่หายาก และมีราคาแพง ประกอบกับยังไม่มีมีการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อนจึงเห็นควรมุ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อมาศึกษาทดลอง เพื่อหาสูตรอาหารที่เปลี่ยนแปลงโดยการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตที่ เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส หรือต้นใหม่ปริมาณมากพอที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาต่อไป

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาผลของออกซิน (Auxins) และไซโตไคนิน (Cytokinins) ในระดับ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ต่อการเกิดแคลลัสและ/หรือต้นใหม่ที่สมบูรณ์
2. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส และ/หรือต้นใหม่ที่สมบูรณ์

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้ทราบว่าชิ้นส่วนของข้าวเย็นเหนือที่สามารถเจริญเป็นแคลลัส และ/หรือ ต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้
2. ทำให้ทราบสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ในการชักนำให้ชิ้นส่วนของข้าวเย็นเหนือเกิดแคลลัส และ/หรือต้นใหม่ที่สมบูรณ์
3. เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส และ/หรือต้นข้าวเย็นเหนือให้ได้ปริมาณมาก

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเย็นเหนือ

1.1 อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่ดัดแปลง ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต ไคแก 2, 4 - D (2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid) NAA (α - naphthaleneacetic acid) BA (6 - benzyladenine) และ kinetin (6 - furfurylamino purine) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

2. เนื้อเยื่อข้าวเย็นเหนือที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยง ไคแก ลำต้นใต้ดิน ตาข้าง และใบอ่อน

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. แคลลัส หมายถึง กลุ่มเซลล์พาราไคมา (parenchyma cell) ที่เกาะรวมตัวกันอยู่โดยยังมีไคมีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (ไคบูลย์ กวินเลิศวัฒนา.

2524 : 10)

2. แคลลัสลำต้นใต้ดิน หมายถึง แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้านลำต้นใต้ดิน

3. แคลลัสตาข้าง หมายถึง แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้านตาข้าง

เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

เริ่มทดลองเมื่อ 9 กุมภาพันธ์ 2531

สิ้นสุดการทดลองเมื่อ 31 ธันวาคม 2531

สถานที่ทดลอง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวเย็นเหนือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Smilax corbularia Kunth จัดอยู่ในวงศ์ Smilacaceae ชื่อสามัญข้าวเย็นเหนือ ชื่อพื้นเมืองว่า ข้าวเย็นโลกแดง ข้าวเย็นเหนือ (ภาคกลาง) ขาวหัวขี้ คอกระแต (อุบล) หัวข้าวเย็นเหนือ หัวข้าวเย็นยอด (เชียงใหม่) หัวข่า จันทน์เหนือ เลี่ยมโลก (จันท) เป็นพืชเมืองร้อนขึ้นอยู่บนไหล่เขา ในป่าที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 2,000 เมตร ลักษณะทั่วไปคือเป็นไม้เลื้อยชนิดมีลำต้นใช้ดินสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อน ลำต้นมีขนเป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 2 - 4 เมตร ก้านมีขนาด 1 - 3 มิลลิเมตร ใบมีเส้นประสาวกันแบบตาข่าย แผ่นใบรูปหัวใจขอบเรียบกว้าง 1.5 - 5 เซนติเมตร ยาว 3 - 10 เซนติเมตร ปลายยอดแหลมสีเขียวสด ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ต่างต้นกัน ก้านดอกยาว 5 - 20 เซนติเมตร ช่อดอกแบบ umbel มีก้านช่อดอกขนาด 5 - 12 มิลลิเมตร ช่อดอกตัวผู้ 10 - 40 ดอกย่อย กลีบดอกตัวผู้สีแสดก้านยาว 2 มิลลิเมตร เรียงกันเป็น 2 ชั้น กลีบดอกกว้างเป็นรูปไข่หนา 1.5 - 1.8 มิลลิเมตร ฐานรองดอกยาว 2 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้ 6 อัน อับเรณูรูปวงรี (elliptic) ยาว 1.3 มิลลิเมตร ช่อดอกตัวเมียมี 8 - 20 ดอกย่อย กลีบดอกตัวเมียสีออกเขียวจนถึงออกเหลือง กลีบนอกสุดรูปไข่กว้าง 1.2 มิลลิเมตร ปลายแฉก ส่วนกลีบในกว้าง 0.7 มิลลิเมตร รังไข่รูปยาวรีมี 3 ห้อง กว้าง 1.5 มิลลิเมตร ยาว 2 มิลลิเมตร แต่ละห้องมีไข่ 1 - 2 ใบ ผลสีม่วงดำ มีเนื้อนุ่ม (berry) ขนาด 6 - 8 มิลลิเมตร เมล็ดมี 1 - 3 เมล็ด (เชษฐา พยากรณ์. 2525 : 116 ; หัสน์ สุจำนงค์. 2524 : 399 ; สอาด บุญเกิด, จเร สดากกร และทิพย์พรพรณ สดากกร. 2525 : 75 ; เต็ม สมิตินันท์. 2523 : 308 ; Tem. 1981 : 240 - 242)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) เป็นเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ที่สามารถนำชิ้นส่วนขนาดเล็กของพืช เช่น อวัยวะต่าง ๆ เนื้อเยื่อ เซลล์หรือโปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในขวดแก้วที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ ซึ่งมีองค์ประกอบคือ ธาตุอาหารต่าง ๆ น้ำตาล

ไวตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมคือ ในห้องปรับอากาศอุณหภูมิประมาณ 25 - 28 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 1,000 - 2,000 ลักซ์ ส่วนของพืชดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นพืชโดยตรง หรือเจริญเป็นแคลลัส หรือเอมบริอย (embryoid) แล้วพัฒนาเป็นต้นพืชต่อไป ซึ่งนักวิทยาศาสตร์สามารถบังคับให้ต้นพืชเหล่านี้เพิ่มปริมาณได้อย่างมากมายภายในเวลาอันรวดเร็ว (อรรถสิทธิ์พร. 2529 : 1)

ออกซิน (Auxins)

ออกซินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นสารประกอบ ซึ่งจะมีอัตราส่วนที่แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของออกซิน บางชนิดจะมีจำนวนไนโตรเจนและคลอรีนเป็นองค์ประกอบในจำนวนที่จำกัด ออกซินจะถูกสร้างที่ส่วนยอดหรือในส่วนของพืชที่ไม่ได้สีเขียว ตัวอย่างสารประกอบออกซิน เช่น IAA (indoleacetic acid) ซึ่งเป็นออกซินที่สามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อพืชทั่วไป แต่จะมีระดับแตกต่างกันไปตามอายุและสภาพทางสรีระของพืช นอกจาก IAA แล้วยังมีสารอื่นอีกในกลุ่มนี้ เช่น IBA (indolebutyric acid), 2, 4 - D (2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid), 2, 4, 5 - T (2, 4, 5 - trichlorophenoxyacetic acid), NAA (α - naphthalenecetic acid), NOA (α - naphthoxyacetic acid) และ pCPA (p-chlorophenoxyacetic acid) (พิสิท พงศ์สุภะสิทธิ์. 2527 ; Weaver. 1972 ; Wilkins. 1969)

บทบาทของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ออกซินในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งเสริมให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส ทั้งเช่น การทดสอบของ วารานนท์ ฉลองกิตติศักดิ์ (2529 : 45 - 46) ได้เพาะเลี้ยงเหง้าดอกชิง (*Gloriosa superba* Linn.) บนอาหารที่เติม NAA อย่างเดียวในระดับ

ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ปรากฏว่าความเข้มข้นของ NAA ที่เหมาะสม คือ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งให้น้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุด 2.8 เท่า เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น สำหรับสูตรอาหารที่เติม 2, 4 - D อย่างเดียวในระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร เนื้อเยื่อเน่าสามารถเกิดแคลลัสและให้น้ำหนักสดมากที่สุดเท่ากับ 6.6 เท่า เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น เมื่อเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และพบว่าเมื่อใช้ 2, 4 - D ความเข้มข้นสูงคือ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ 2, 4 - D แสดงผลของออกซินได้มาก อยู่ตัวดี และไม่เคลื่อนที่ออกไปจากตำแหน่งที่ก่อปฏิกริยา เมื่ออัตราความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ก่อผลในการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเมตาโบไลต์ที่เป็นอินเทอมีเดียท จึงก่อให้เกิดพิษแก่เนื้อเยื่อพืช

2. ออกซินกระตุ้นให้ต้นอ่อนงอกโตจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดราก เกศรินทร์ ภูมิศรีแก้ว (2527) ใช้เพาะเลี้ยงหัวของทองคอง บอนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm. ทำให้ชิ้นส่วนเกิดรากมากที่สุด มีน้ำหนักสดมากที่สุด 7.23 กรัม หนัก และวาล์ก (Pink and Walkey, 1984 : 107 - 114) ใช้เพาะเลี้ยงยอดจากต้นกล้วยทอง (*Cucurbita pepo* L.) บอนอาหารสูตร MS ปรากฏว่าอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 8.0 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดรากได้ดี

ไซโตไคนิน (Cytokinins)

ไซโตไคนิน เป็นสารเร่งการเจริญของพืชที่เกี่ยวกับการแบ่งเซลล์ของพืช แหล่งสังเคราะห์ที่สำคัญของไซโตไคนินภายในพืช ได้แก่ บริเวณปลายราก เติบโตที่รากสร้างไซโตไคนินขึ้นมาแล้วจะส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชและนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืชต่อไป ไซโตไคนินในธรรมชาติ ได้แก่ IPA (isopentenyl adenosine) และ ZR (zeatin riboside) ส่วนไซโตไคนินที่สังเคราะห์ขึ้นมาทดลองและทำการค้า เช่น BA (6-benzyladenine), BAP (6 - benzylamino purine), kinetin (6 - furfurylamino purine),

21P (N - isopentenylamino purine), 5M - 3 (cytex) และ adenine ที่
ไฮโดไลนแต่ละชนิดจะมีสูตรโครงสร้างที่แตกต่างกันไป (สัทธ คัมภีรานนท์. 2526 : 36 ;
สัทธ สัทธพันธ์. ม.ป.ป. : 102 ; Torrey. 1985 : 356 ; Wilkins. 1969)

บทบาทของไฮโดไลนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ส่งเสริมการเจริญของตาข้าง เช่น การทดลองของโอคาวา (Ohkawa. 1980 : 612 - 613) ที่ใช้ BA ในรูป lanolin paste ป้ายบริเวณตาข้างของต้นกุหลาบ 4 พันธุ์ ที่ทดลอง ปรากฏว่าตาข้างกล้าเจริญ
2. เร่งให้ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเกิดเป็นยอดจำนวนมาก (multiple shoots) หรือ (sprouts) ดังเช่น การทดลองของเปียร์ริก ลีเวน และริกเตอร์ (Pierik, Leeuwen and Rijkter. 1979 : 221 - 226) ที่เลี้ยงใบอ่อนของเหง้าว้าว (*Anthurium andraeanum*) ในสูตรอาหาร MS ที่เติม kinetin BA และ zeatin ปรากฏว่านอกจากเกิดแคลลัสแล้ว ยังเกิดหน่ออีกด้วย ซึ่งในอาหารที่มี BA 0.5 ppm. ใบอ่อนจะเกิดหน่อได้ 12.1 หน่อต่อใบอ่อน 1 ชิ้น และในอาหารที่เติม kinetin และ zeatin 1 ppm. สามารถให้หน่อได้ 8.5 หน่อ และ 25.5 หน่อต่อใบอ่อน 1 ชิ้น ตามลำดับ
3. ชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดยอด พบว่า BA ในระดับความเข้มข้นสูง ๆ จะชักนำให้เกิดยอด จากการทดลองของ เกสรีนทร์ ภูมิศรีแก้ว (2527) ที่เพาะเลี้ยงหัวคองคิง บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 ppm. พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ระดับความเข้มข้น 10.0 ppm. เกิดยอดจำนวนมากที่สุด 6.0 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วน มีน้ำหนักมากที่สุด 4.51 กรัม พันธ์ และวอลคีย์ (Pink and Walkey. 1984 : 107 - 114) ได้เพาะเลี้ยงยอดจากต้นกล้วยทอง บนอาหารสูตร MS ปรากฏว่าเกิดต้นกล้วยบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

การทำงานของออกซินร่วมกับไซโตไคนิน

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหากเพิ่มออกซินและไซโตไคนินร่วมกันจะมีผลทำให้การเจริญของเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ออกซินหรือไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่งแต่เพียงอย่างเดียว เรียกว่า synergistic effect (Miller and Skoog. 1953 : 768 - 773) จากความรู้ทำให้ เกษรินทร์ ภูมิศรีแก้ว (2527) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงหัวตองกิ่งบนอาหารสูตร MS โดยใส่ BA ความเข้มข้น 0.05 ppm. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm. ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด มีน้ำหนักสมมากที่สุด 4.07 กรัม เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น และเมื่อนำแคลลัสดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm. แคลลัสเกิดยอดได้ดีที่สุด

วรารักษ์ จุลองภิตติศักดิ์ (2529) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเหง้าของต้นตองกิ่งบนอาหารสูตร MS โดยใส่ 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ปรากฏว่าเนื้อเยื่อเหง้าเกิดเป็นแคลลัสได้

สมวัฒน์ รัตนदार (2529) ได้เพาะเลี้ยงหัวของ Cladidolus hybrida L. 2 พันธุ์ คือ Big League และ Pink Frost บนอาหารสูตร MS โดยใส่ BA ความเข้มข้น 5 ppm. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5 ppm. ทำให้ได้จำนวนหน่อต่อต้นมากที่สุด เฉลี่ย 1.21 หน่อต่อต้น

โนแวก และเพทรู (Novak and Petru. 1981 : 191 - 199) ได้ศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการเกิดหัวย่อยจากกลีบหัวของ Lilium oriental hybrid "Crimson Beauty" ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Linsmaier and Skoog (LS) พบว่าเกิดหัวย่อยได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารซึ่งเติม BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และหัวย่อยเกิดจากโคนเมื่อย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารซึ่งเติม NAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ต้นที่ได้เกิดรากและใบที่สมบูรณ์พร้อมที่จะย้ายลงปลูกในดินได้

ราวอล และเอทัล (Rawal and Atul. 1982 : 336 - 347) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสจากตาดอกของยาสูบ (Nicotiana tabacum) บนอาหารสูตร MS โดยเติม IAA

0.3 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 2, 3 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่าแคลลัสสามารถเกิดขยอกได้และเมื่อใส่น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดราก พบว่า LAA ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า kinetin ไม่ทำให้แคลลัสเกิดราก ทำนองเดียวกันเมื่อ kinetin ความเข้มข้นสูงกว่า LAA ไม่สามารถทำให้เกิดขยอก แต่เมื่อใส่ LAA และ kinetin ในระดับความเข้มข้น 1:1 สามารถที่จะชักนำให้แคลลัสเกิดทั้งขยอกและราก

เลสแฮม และโคเฮน (Lesham and Cohen. 1983 : 318 - 319) ใค่น้ำตาข้างของ Linonium sinuatum L. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรของ LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.6 ppm. แล้วขยายลงบนอาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของสารเพียงครึ่งเดียวและมี NAA 0.5 ppm. ปรากฏว่าเนื้อเยื่อตั้งกลาวเกิดรากและเจริญเติบโตดี

โอะโซคาน โอแฮร์ และลิทซ์ (Asokan, O'Hair and Litz. 1984 : 251 - 256) ใค้เพาะเลี้ยงหัว (Corm) ของคน Amorphophallus rivieri Durieu บนอาหารสูตร MS ที่ลดธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง และเติมสารเร่งการเจริญเติบโตคือ BA และ NAA โดยใส่ BA ความเข้มข้นระหว่าง 2.0 - 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 - 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าช่วงนี้จะเป็นช่วงที่ทำให้แคลลัสเกิดขยอกได้ดี ส่วนตาข้างเกิดขยอกได้นั้นโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม zeatin 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร GA_3 (gibberellic acid) 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร. และนำขยอกที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดรากได้ดี

โอบัจวานี มัลลินซ์และโคเฮน (Bhojwani, Mullins and Cohen. 1984 : 247 - 254) ใค้เพาะเลี้ยงตาข้างของคน Pyrus purifolia Burm. บนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BAP ความเข้มข้น 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.0, 0.02 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ปรากฏว่าเกิดขยอกได้ก็เมื่อใช้ NAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเกิดขยอก 2 - 3 ขยอกต่อหนึ่งชิ้นส่วน ขยอกขาวเฉลี่ย 5.9 มิลลิเมตร และนำขยอกที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.02, 0.20 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า NAA ในระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดรากได้มากที่สุด

ซิโมลา (Simola. 1985 : 77 - 85) ได้เพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้น Betula pendula F. purpurea บนอาหารสูตร N₇ (new medium combination) ปรากฏว่าเกิดแคลลส์ได้บนอาหารที่เติม 2, 4 - D 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วถ่ายแคลลส์ลงบนอาหารที่เติม 2 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ZR 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ ZR 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IBA 0.2 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าแคลลส์เกิดทั้งยอดและรากได้บนอาหารที่เติม ZR 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ต้นที่เพาะได้สามารถนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกได้

แมนเนียร์ เดสมาเรสต์ และซอสเซ (Manoir, Desmarest and Saussay. 1985 : 15 - 19) ได้เพาะเลี้ยงปลายยอดของต้น Foeniculum vulgare Miller บนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม IAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดยอดได้คือ 4.5 - 7.5 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วน ส่วนการเกิดรากนั้นเกิดเมื่อเติม IAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อพืชมีรากยาว 1 - 2 เซนติเมตร ทำการย้ายลงดิน

มารรี อาร์โนต์ และมิกิแนค (Maarri, Arnaud and Miginiac. 1986 : 315 - 321) ได้เพาะเลี้ยงตาข้างของต้น Cydonia oblonga Mill. บนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BAP ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร ปรากฏว่าเกิดยอด และยอดมีขนาดยาวที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนการเกิดรากนั้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

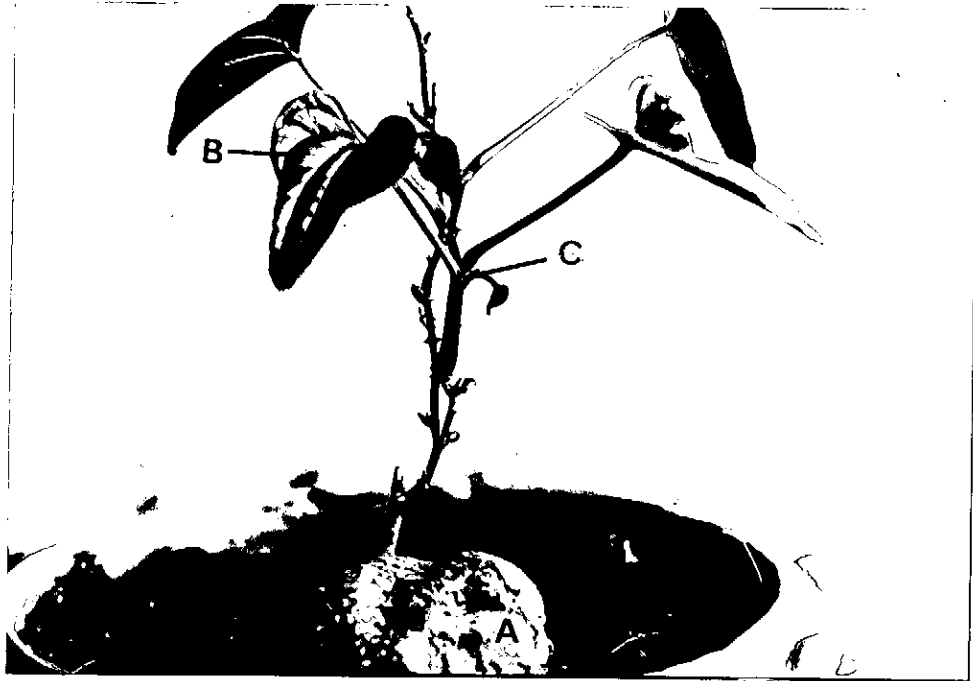
/ ลาล และคนอื่นๆ (Lal and others. 1988 : 202 - 205) ได้เพาะเลี้ยงปลายยอดของต้น Picrorhiza kurroa Royle ex Benth บนอาหารสูตร MS ซึ่งใส่ kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0 และ 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin ในระดับความเข้มข้น 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ผลปรากฏว่าเกิดยอดได้บนอาหารที่ใส่ kinetin 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร คือเกิดยอด 48 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วน ส่วนการทำให้ยอดเกิดรากนั้นโดยย้ายยอดที่โคลงบนอาหารที่เติม IAA, IBA หรือ NAA ในระดับความเข้มข้น 0.2, 0.5

และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าในอาหารที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ยอดเกิดราก
 ได้ดีที่สุดคือ 14 รากต่อนึ่งยอด หลังจากเกิดราก 4 สัปดาห์ ย้ายลงในกระถางซึ่งผสมดิน
 ทราย และปุ๋ย ในอัตราส่วน 1:1:1 ไว้ในเรือนกระจก อุณหภูมิระหว่าง 15 - 20 องศาเซลเซียส
 หลังจากนั้น 6 - 8 สัปดาห์ เมื่อพืชแข็งแรงก็จึงย้ายลงดิน

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

1. พืชหกลองคือต้นข้าวเย็นแฉะ (Smilax corbularia Kunth) โดยใช้ส่วน
ลำต้นใต้ดิน ใบอ่อน และตาข้าง (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 A. ลำต้นใต้ดิน
 B. ใบอ่อน
 C. ตาข้าง

2. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ ปีเปตต์
ชวดแก้ว กระบอกตวง เตาแกวต้มสาร เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (analytical balance) และเครื่องนึ่งก๊าด (autoclave)
3. เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายชิ้นส่วน โต๊ะ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (transfer cabinet)
มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (1962)
5. สารเร่งการเจริญเติบโต
กลุ่มออกซิน โตแก 2, 4 - D และ NAA
กลุ่มไซโตไคนิน โตแก BA และ kinetin
6. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ โตแก เมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride)
0.1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์
เอทานอล (ethanol) 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์
7. ทวิน 20 (tween 20)
8. วุ้นและน้ำตาล ซูโครส
9. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 - 27 องศาเซลเซียส มีชั้นวางขวด
เพาะเลี้ยงที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ชั่วแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

วิธีทดลอง

1. การเตรียมอาหาร

- 1.1 ชั่งสารเคมีต่าง ๆ ตามสูตรอาหาร MS ทำเป็น stock solution
เก็บไว้เมื่อเตรียมอาหารจึงตวงมาใช้ตามต้องการ
- 1.2 เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์
- 1.3 เติมสารเร่งการเจริญเติบโต

1.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบตามจำนวนที่ต้องการ

1.5 ปรับ pH ของอาหารให้ได้ 5.6 - 5.8 ด้วย NaOH 1 N หรือ

HCl 1 N

1.6 เติมน้ำ 0.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วคนให้ละลาย

1.7 บรรจุอาหาร 15 มิลลิกรัม ลงในขวด

1.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้

ในเย็น

2. การทำความสะอาดเนื้อเยื่อขาวเย็นเนื้อ

นำลำต้นไคคิน ตาข้าง และใบอ่อนของข้าวเย็นเนื้อล้างให้สะอาดด้วยผงซักฟอก แล้วล้างด้วยน้ำประปาหลาย ๆ ครั้งซ้ำอีก 2 ครั้ง นำไปแช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที แล้วมาเช็ดทิ้งต่อไป

ลำต้นไคคิน นำไปฆ่าเชื้อด้วยยาเมอร์คิวรีคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ

ตาข้าง ฆ่าเชื้อด้วยยาเมอร์คิวรีคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นานอย่างละ 10 นาที

ใบอ่อน ฆ่าเชื้อด้วยยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ ล้างชิ้นส่วนดังกล่าวด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้แล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที

3. ขนาดของเนื้อเยื่อซึ่งทำในตุลายนเนื้อเยื่อ

3.1 ลำต้นไคคิน ถัดแบ่งให้ลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ มีขนาดประมาณ $6 \times 6 \times 6$ มิลลิเมตร³ และมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.62 กรัม

3.2 ตาข้าง ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่เปื้อนตาข้าง ซึ่งมีความยาวประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.02 กรัม

3.3 ใบอ่อน ตักให้มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ซึ่งมีขนาดประมาณ 6×6 มิลลิเมตร² และมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.04 กรัม

4. ศึกษาผลของสารกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนิน เพื่อศึกษานำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัสหรือยอด

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของ 2, 4 - D ร่วมกับ BA ต่อการเจริญเป็นแคลลัสหรือยอดของชิ้นส่วนขั้วบนเหนือโคนนำชิ้นส่วนของลำต้นใต้ดิน ใบอ่อน และตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS คัดแปลง ที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร (ตาราง 1) ทำสูตรละ 5 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ตาราง 1 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)

2, 4-D \ BA	0.50	1.25	2.50	5.00	10.00
0.50	สูตรที่ 1	6	11	15	21
1.25	2	7	12	17	22
2.50	3	8	13	18	23
5.00	4	9	14	19	24
10.00	5	10	15	20	25

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ BA ต่อการเจริญเป็นแคลลัส หรือยอดของชิ้นส่วนชำเป็นเหื่อโดยนำชิ้นส่วนของลำต้นไต้ดิน ใบอ่อน และตาข้าง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร (ตาราง 2) ทำสูตรละ 5 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ตาราง 2 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)

NAA BA	0.50	1.25	2.50	5.00	10.00
	สูตรที่ 26	31	36	41	46
0.50	สูตรที่ 26	31	36	41	46
1.25	27	32	37	42	47
2.50	28	33	38	43	48
5.00	29	34	39	44	49
10.00	30	35	40	45	50

การทดลองที่ 1.3 ศึกษาผลของ 2, 4 - D ร่วมกับ K (kinetin) ต่อการเจริญเป็นแคลลัสหรือยอดของชิ้นส่วนชาวเย็นเหนือโดยนำชิ้นส่วนของลำต้นใต้ดิน ใบอ่อน และตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ทดลองที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ K ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร (ตาราง 3) ทำสูตรละ 5 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ตาราง 3 อาหารสูตร MS ทดลองที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ K (มิลลิกรัม/ลิตร)

2,4-D \ K					
	0.50	1.25	2.50	5.00	10.00
0.50	สูตรที่ 51	56	61	66	71
1.25	52	57	62	67	72
2.50	53	58	63	68	73
5.00	54	59	64	69	74
10.00	55	60	65	70	75

การทดลองที่ 1.4 ศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ K ต่อการเจริญเป็นแคลลัสหรือยอดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช โดยนำชิ้นส่วนของลำต้นไต่ต้น ใบอ่อน และตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ K ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร (ตาราง 4) ทำสูตรละ 5 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ตาราง 4 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ K (มิลลิกรัม/ลิตร)

NAA \ K	0.50	1.25	2.50	5.00	10.00
0.50	สูตรที่ 76	81	86	91	96
1.25	77	82	87	92	97
2.50	78	83	88	93	98
5.00	79	84	89	94	99
10.00	80	85	90	95	100

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงยอดที่ได้จากการทดลองที่ 1 เพื่อให้เกิดราก

นำยอดจากสูตรอาหารที่มีการเจริญดีที่สุดในการทดลองที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร (ตาราง 5) ทำสูตรละ 5 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน นับจำนวนต้นแฉะราก

ตาราง 5 อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม NAA และ NAA ร่วมกับ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)

BA \ NAA	0.0	1.0	3.0	5.0
0.5	สูตรที่ 101	104	107	110
1.0	102	105	108	111
2.0	103	106	109	112

การทดลองที่ 3 การนำต้นข้าวเย็นแก่ที่ออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

นำต้นข้าวเย็นเหนือที่สมบูรณ์ คือมีราก ลำต้น และใบลงปลูกในกระถาง ซึ่งใส่ทรายและพีทมอสที่เอนกที่เอนกในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ แล้วย้ายออกสู่ภายนอก เมื่อต้นแข็งแรงจึงย้ายลงสู่กระถางที่ใส่ส่วนผสมของดินร่วน ทราย และปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 1:1:1 ไว้ในเรือนเพาะชำ

วิธีการรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลทั้งก่อนไปเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน

1. ชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสและหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น
2. ถ่ายภาพแคลลัสที่มีน้ำหนักสดมากที่สุด
3. นับจำนวนยอดหรือต้นที่สมบูรณ์
4. ถ่ายภาพต้นที่สมบูรณ์

ผลการศึกษาค้นคว้า

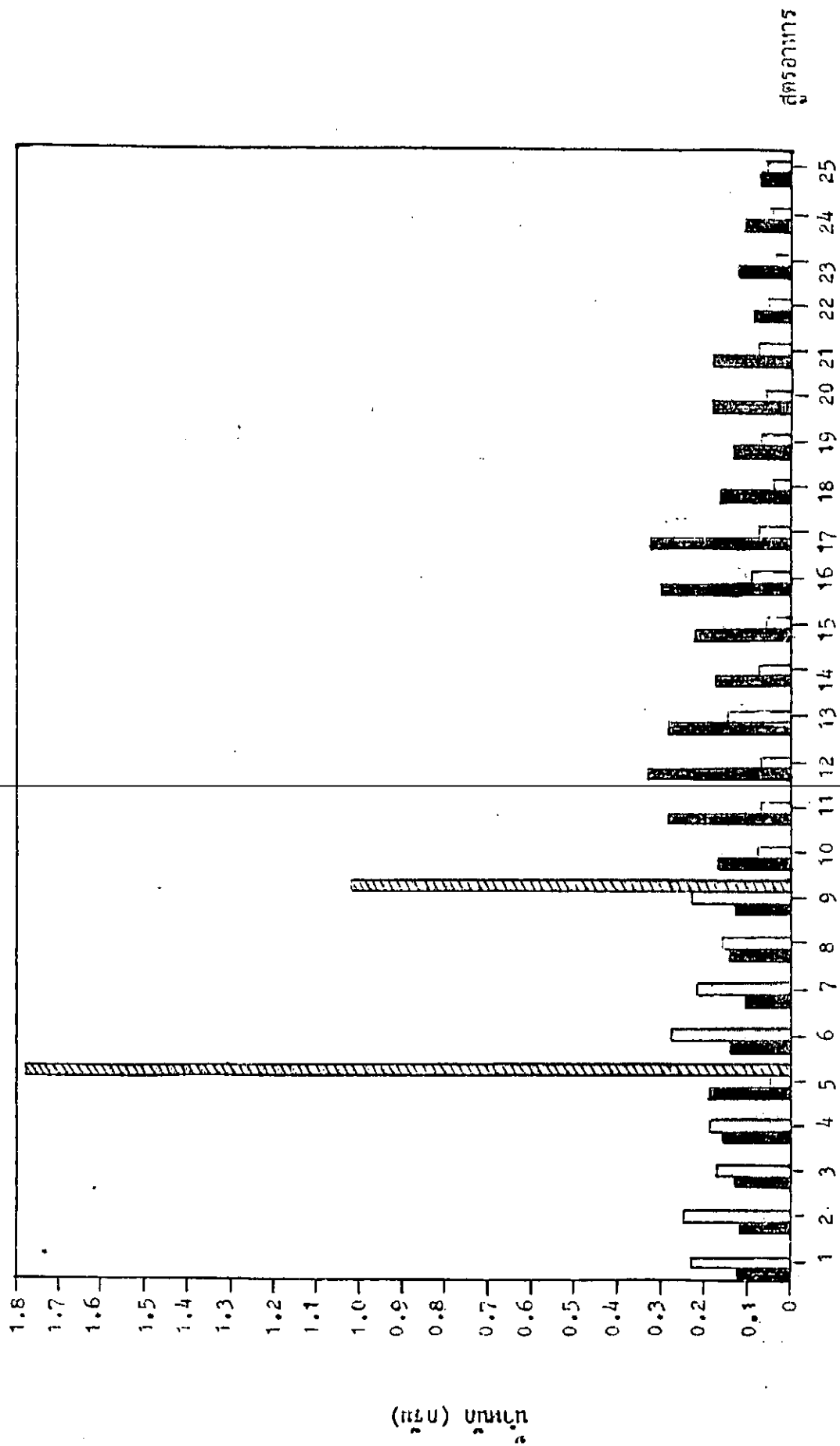
การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนิน เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วน
เริ่มต้นเกิดแคลลัสหรือยอด

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของ 2, 4 - D ร่วมกับ BA ต่อการเจริญเป็นแคลลัส
หรือยอดของชิ้นส่วนทวารเย็นแช่เย็น เมื่อนำชิ้นส่วนของลำต้นไคติน ใบอ่อน และตาข้างมาเพาะเลี้ยง
บนอาหารสูตร MS ถัดแปลงสูตรที่ 1-25 (ตาราง 1) ผลการทดลองมีดังต่อไปนี้ (ภาพประกอบ 2)
ชิ้นส่วนของใบอ่อนมีการตอบสนองต่ออาหารทุกสูตร โดยมีการขยายขนาดในชิ้น
ห้องโคง มีวนตัว ซึ่งจะเห็นได้ชัดใน 1 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะบนอาหารสูตร
ที่ 12 ซึ่งเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.25
มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ได้น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นมากที่สุด 0.33 กรัม เมื่อเพาะเลี้ยงไป 2 เดือน และ
ไม่เกิดแคลลัสในอาหารสูตรใดเลย

ชิ้นส่วนของลำต้นไคติน มีการเกิดแคลลัสบนอาหารเพียง 2 สูตรเท่านั้น คือสูตรที่ 5
ซึ่งเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/
ลิตร การเกิดแคลลัสนี้เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงไป 4 สัปดาห์ แคลลัสเกิดเป็นกลุ่มสีขาวที่รอยตัดแล้ว
ขยายขนาดในชิ้น และเมื่อเพาะเลี้ยงไป 2 เดือน แคลลัสจะมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาล มีน้ำหนักสด
เพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 1.78 กรัม (ภาพประกอบ 3) อาหารอีกสูตรหนึ่งที่ทำให้เกิดแคลลัส คือสูตร
ที่ 9 ซึ่งเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5.0
มิลลิกรัม/ลิตร ลักษณะการเกิดแคลลัสเช่นเดียวกับการเกิดบนอาหารสูตรที่ 5 แต่แคลลัสมีขนาด
เล็กกว่า

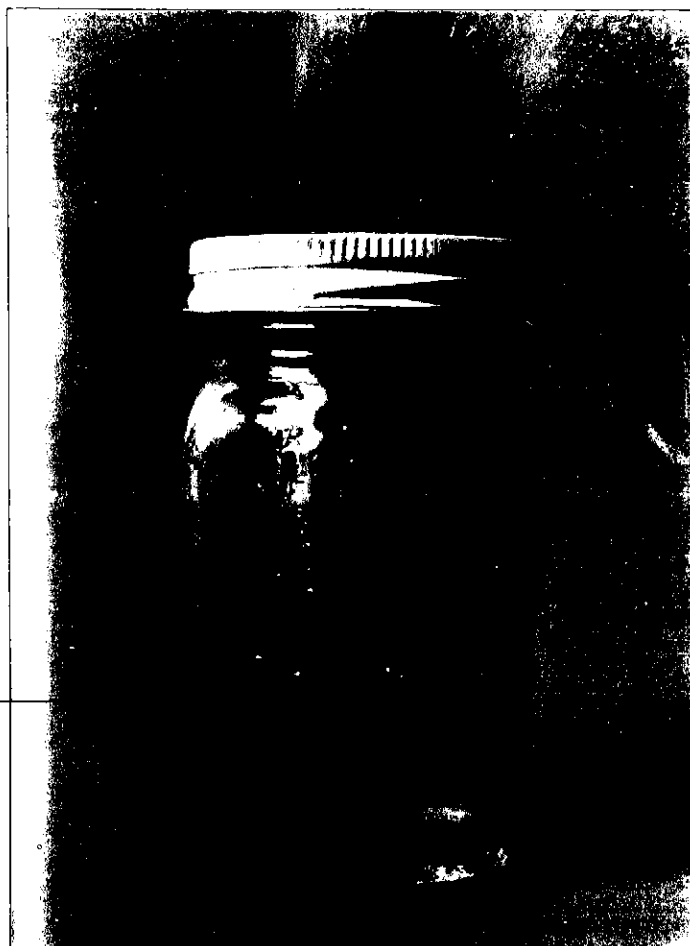
ชิ้นส่วนของตาข้าง มีการเกิดแคลลัสบนอาหารบางสูตรเท่านั้น คือสูตรที่ 2, 4, 6
8 และ 9 บนอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA

ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดแคลสไตคิตที่สุด น้ำหนักสัตว์เพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 0.28 กรัม
แคลสไตเกิดตามรอยหัก โดยเริ่มเกิดเป็นรูเล็กสีขาววาวใหญ่ แล้วเกิดรอยแตกเป็นสีขาวเกิดขึ้นที่รอย
แยกนั้น เกิดเป็นแคลสไตสีขาวเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ ตรงกลาง ส่วนรอบนอกก่อนแคลสไตเกาะ
กันแน่น และไม่มีอาหารสู่ครีโตทำให้ตาข้างเจริญเป็นยอก



ภาพประกอบ 2 น้ำหนักสัปดาห์แรกเกิดของทารกชายและหญิงตามอายุ 1-25

■ ชาย ■ หญิง ■ รวม



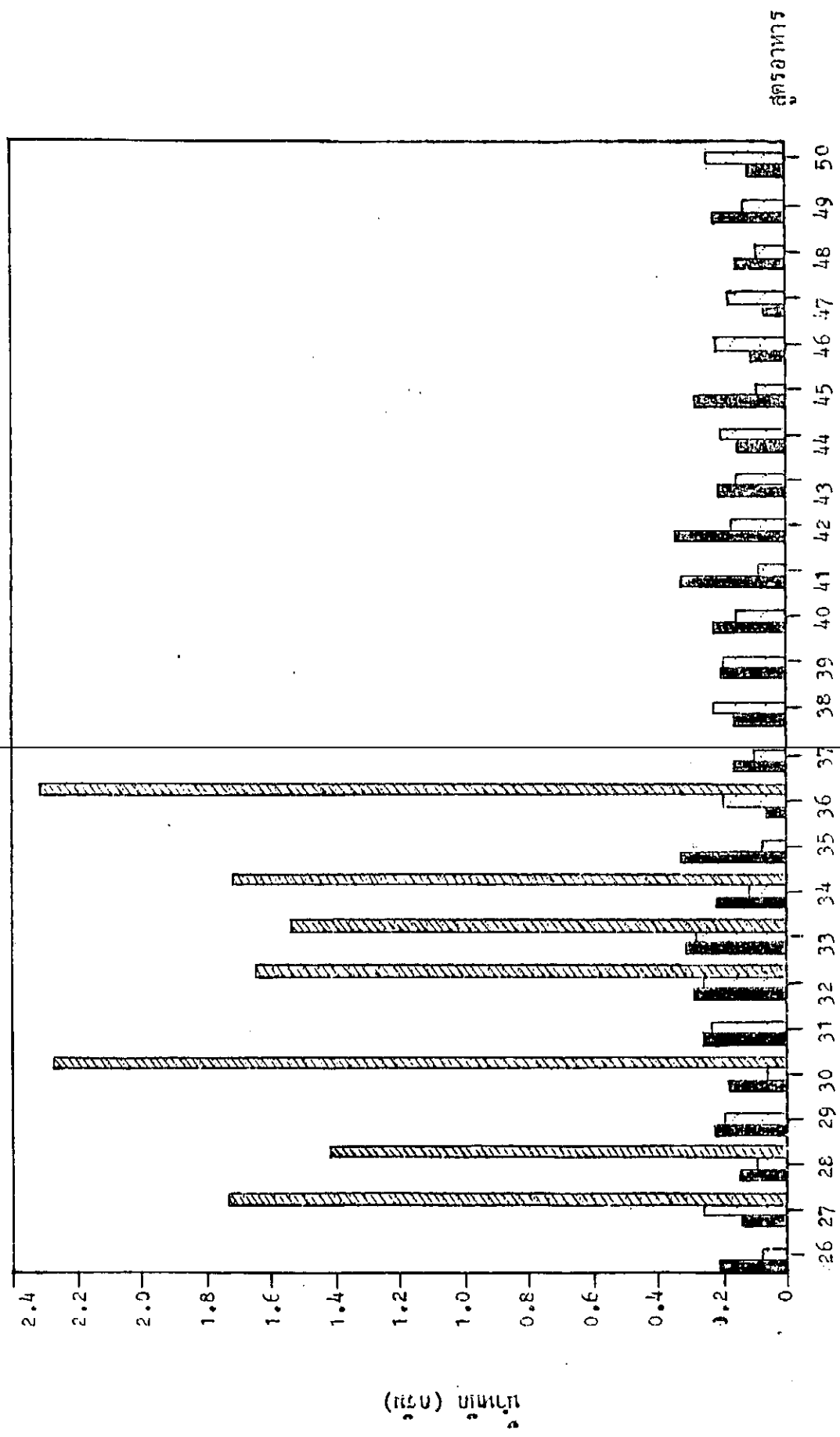
ภาพประกอบ 3 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไคคิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ BA ต่อการเจริญเป็นแคลลัสหรือยอดของชิ้นส่วนชาวเย็นเหนือเมื่อนำชิ้นส่วนของลำต้นไคติน ใบอ่อน และตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ทดแปลงสูตรที่ 26-50 (ตาราง 2) ผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

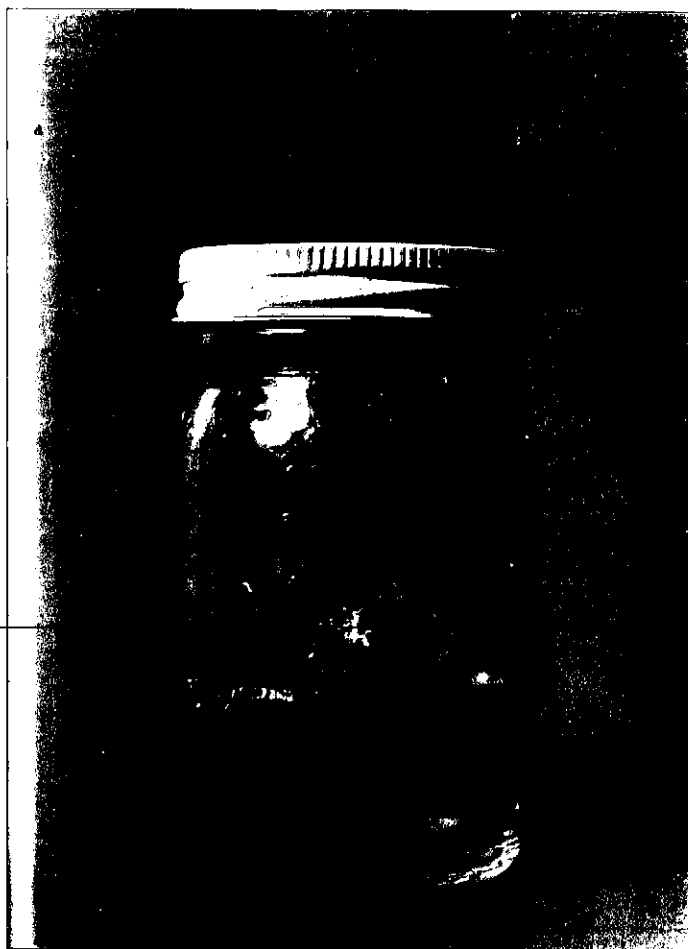
ชิ้นส่วนของใบอ่อนมีการโคงมวนตัว ทนายนาคใหญ่ขึ้น มีการสนองตอบต่ออาหารทุกสูตร แต่สูตรอาหารที่พืชตอบสนองมากที่สุด ทำให้ไคน์น้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือสูตรที่ 42 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ไคน์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.352 กรัม ส่วนการเกิดแคลลัสนั้นเกิดขึ้นบนอาหารเพียงบางสูตรเท่านั้น คือสูตรที่ 26, 28, 31 และ 44 แคลลัสเกิดได้ดีที่สุดบนอาหารสูตรที่ 31 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ไคน์น้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.26 กรัม (ภาพประกอบ 4) ซึ่งจะเห็นว่าน้ำหนักที่ไคน์อุมมาก เพราะแคลลัสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยที่รอยตัด และเส้นกลางใบ ลักษณะแคลลัสเป็นก้อนเล็ก ๆ สีขาว

ชิ้นส่วนของลำต้นไคติน มีการเจริญเป็นแคลลัสบนอาหารสูตรที่ 27, 28, 30, 32, 33, 34 และ 36 บนอาหารสูตรที่ 36 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดแคลลัสได้ดี มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ก้อนแคลลัสมีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสบนอาหารสูตรอื่น ๆ ไคน์น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 2.32 กรัม (ภาพประกอบ 5) ส่วนบนอาหารสูตร 30 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสเกิดยอดจำนวน 3 ยอด และยอดที่ยาวที่สุดยาว 3.5 เซนติเมตร และเกิดรากจำนวน 1 ราก ยาว 1.5 เซนติเมตร แต่ยอดและรากเกิดบนละที่ (ภาพประกอบ 4 และ 6)

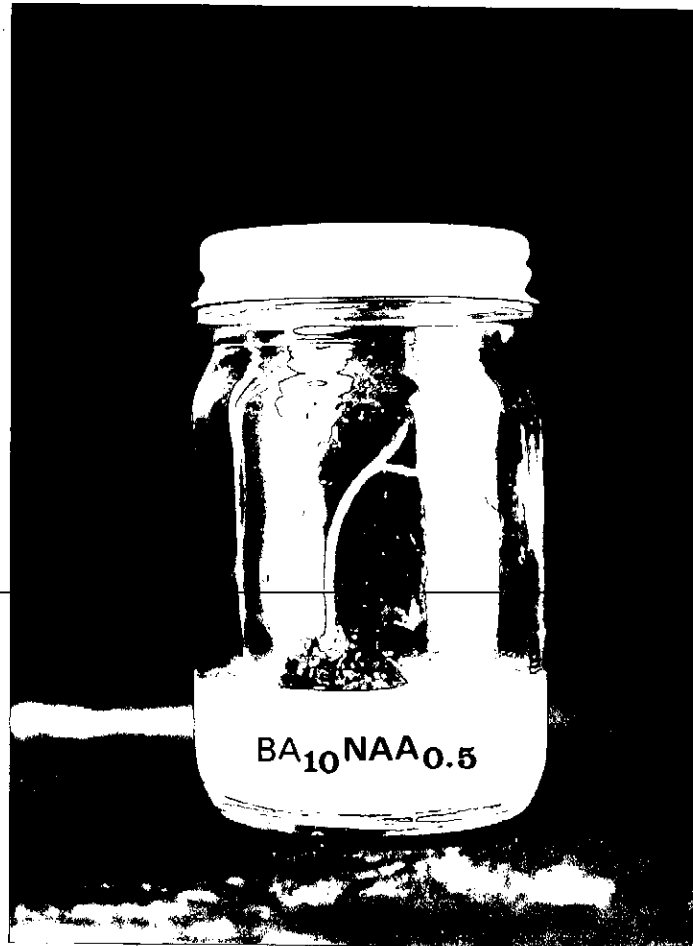
ชิ้นส่วนของตาข้าง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรเกิดแคลลัส แต่แคลลัสที่ได้เจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย ส่วนใหญ่จะเกิดยอดที่ตาข้างเกือบทุกสูตรอาหาร แต่สูตรอาหารที่ทำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด คือสูตรที่ 33 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดยอดยาวเฉลี่ย 3.2 เซนติเมตร และเกิดยอดมากกว่า 1 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วน (ภาพประกอบ 4 และ 7)



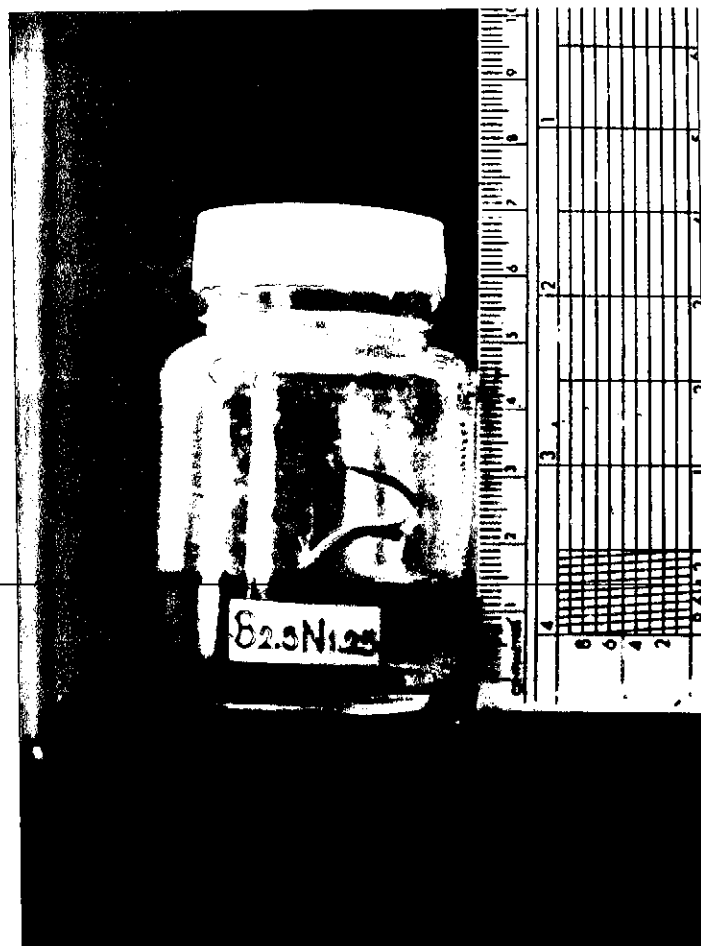
ภาพประกอบ 4 บำบัดสภาวะน้ำของปลาใน ทราย ลำต้นและเศษอาหาร MS ถัดไป 26-50



ภาพประกอบ 5 แคตลิสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไต่ดิน เป็นเวลา
2 เดือน บนอาหารสูตร MS กัดแปลงที่เติม NH_4 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร
ร่วมกับ NaCl ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพประกอบ 6 แก้วสและต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไค้ดิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหารสูตร MS ถักแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร



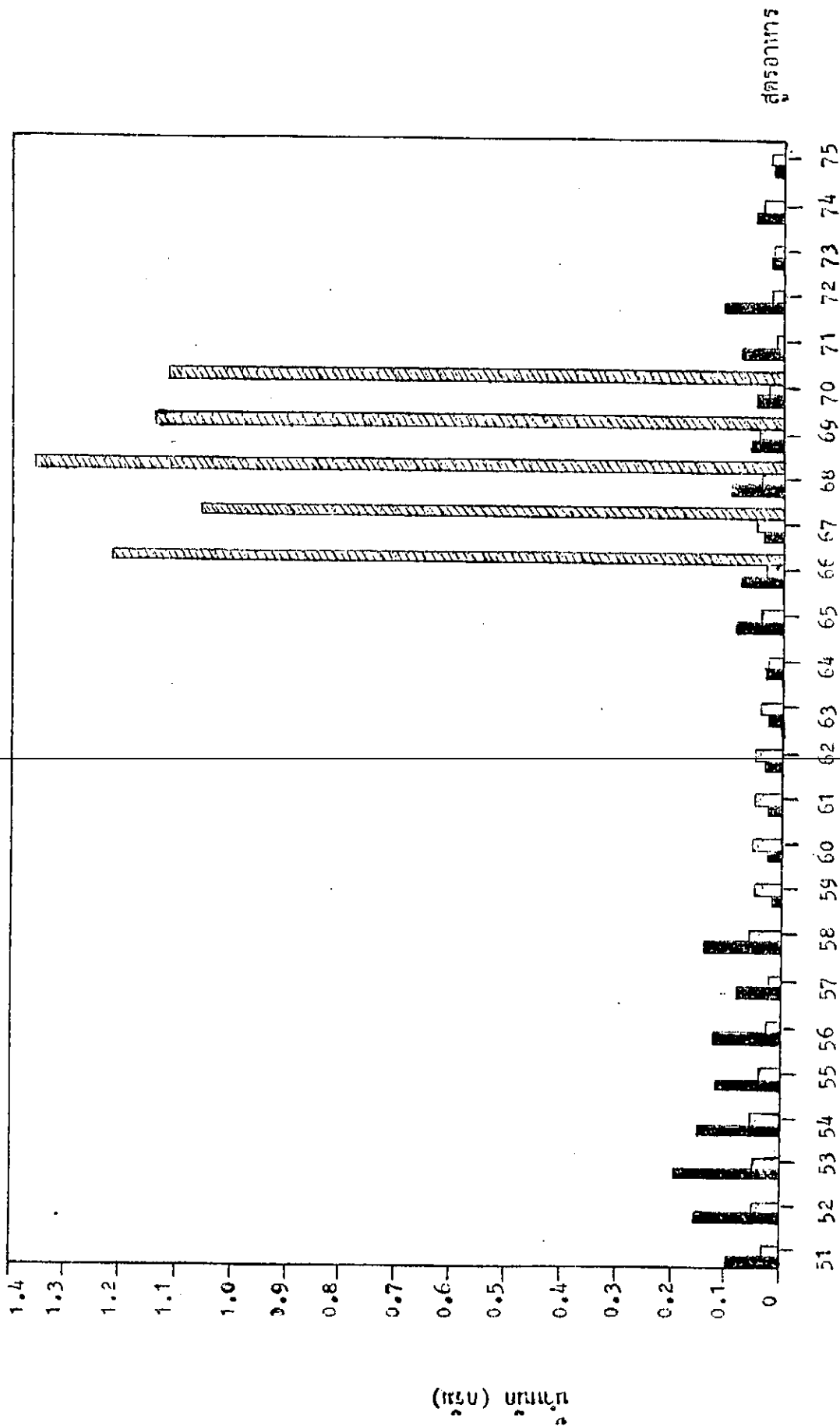
ภาพประกอบ 7 ขอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของสาหร่าย เป็นเวลา 2 เดือน
บนอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม Cu ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ
 NaCl ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร

การทดลองที่ 1.3 ศึกษาผลของ 2, 4 - D ร่วมกับ kinetin ต่อการเจริญเป็นแคลลัสหรือยอดของชิ้นส่วนชาวเย็นเหนือ เมื่อนำชิ้นส่วนของลำต้นโคน ใบกอน และตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS คัดแปลงสูตรที่ 51-75 (ตาราง 3) ผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

ชิ้นส่วนของใบกอน มีการตอบสนองต่อการเพาะน้อยมาก จึงทำให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นน้อย (ภาพประกอบ 8) ชิ้นส่วนของใบที่เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารกลุ่มนี้คือ ชิ้นส่วนของใบที่อยู่บนอาหารสูตรที่ 53 ซึ่งเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้น้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.192 กรัม ส่วนอาหารสูตรอื่น ๆ นั้น ชิ้นส่วนของใบที่น้ำหนักเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และการเกิดแคลลัสบนเกิดบนอาหารเพียงสูตรเดียวคือ สูตรที่ 52 ซึ่งเป็นสูตรที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสเกิดตรงรอยตัดและที่ด้านใบตามยาวมีลักษณะเป็นปุ่มเล็ก ๆ สีขาว สีเหลือง และสีน้ำตาลแก่

ชิ้นส่วนของลำต้นโคน เกิดแคลลัสบนอาหารสูตรที่ 66, 67, 68, 69 และ 70 บนอาหารสูตรที่ 68 ซึ่งเป็นสูตรที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีการเจริญของแคลลัสดีกว่าสูตรอื่น น้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 1.36 กรัม โดยแคลลัสที่เกิดในระยะแรกเป็นเพียงปุ่มเล็ก ๆ สีขาวที่กลางกอน ชิ้นส่วนของลำต้นโคนแล้วแคลลัสเจริญขึ้นเรื่อย ๆ ลักษณะแคลลัสที่เกิดใหม่เป็นก้อนสีเหลืองเกาะกันหลวม ๆ อยู่กลางแคลลัสเดิม ส่วนรอบนอกมีสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 9)

ชิ้นส่วนของตาข้าง พบว่ามีอาหารเพียงบางสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัส เช่น ในอาหารสูตรที่ 56, 61, 65, 67, 68 และ 75 แคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละสูตรมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันมากนัก (ภาพประกอบ 8) และไม่มีการเกิดยอดบนอาหารสูตรใดเลย



ภาพประกอบ 8 " นักศึกษาที่เพิ่มเข้ามาใน ส่วนใน" และ "นอก"

และคำจำกัดความของปี 51-75



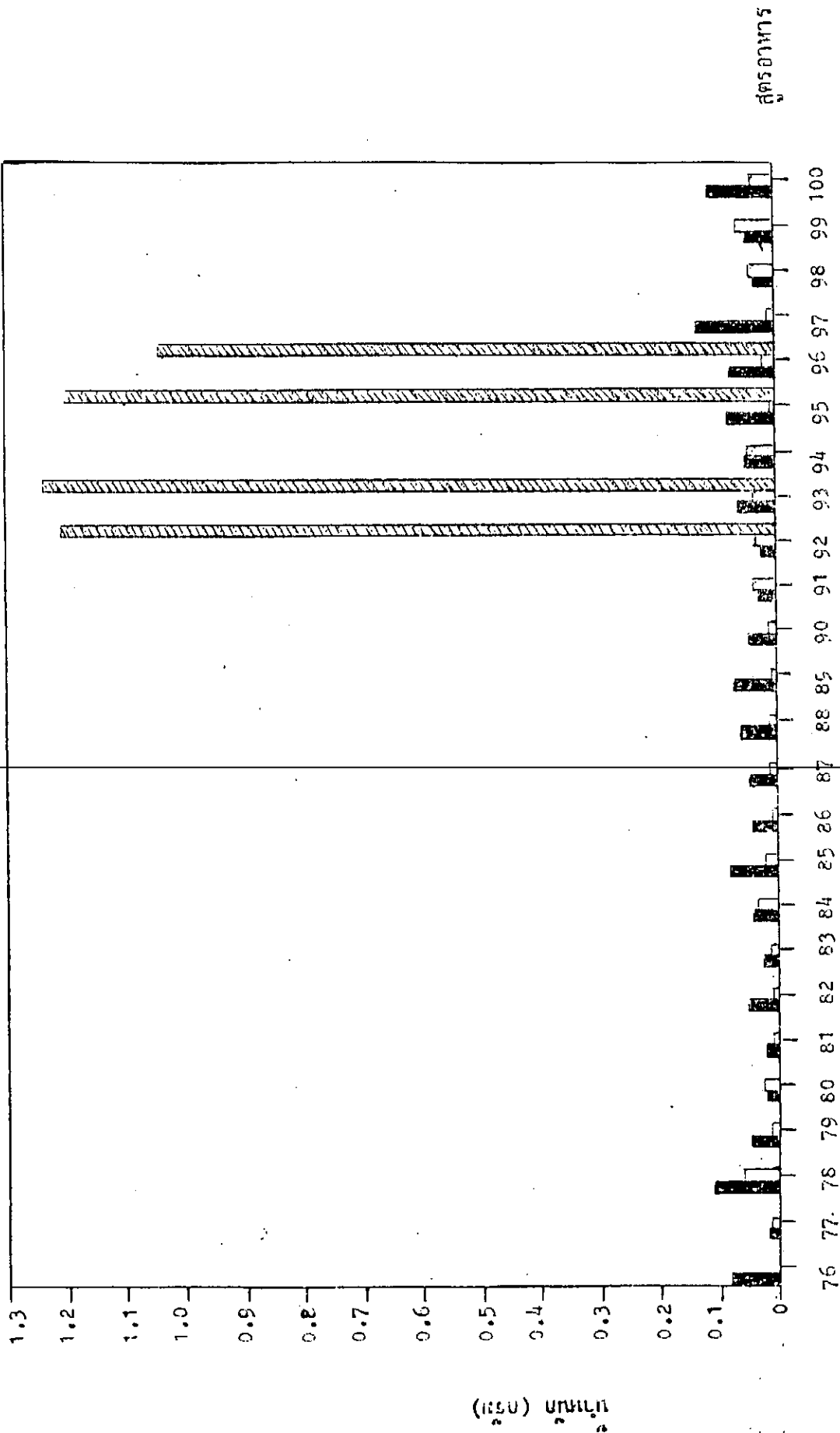
ภาพประกอบ 9 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นไต่ดิน เป็นเวลา
2 เดือน บนอาหารสูตร 15 คัดแปลงที่เติม K ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร
ร่วมกับ 2, 4 - D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร

การทดลองที่ 1.4 ศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ kinetin ต่อการเจริญเป็น แกลลัสหรือยอดของชิ้นส่วนชาวเขินเกือ เมื่อนำชิ้นส่วนของลำต้นไต่ต้น ใบอ่อน และตาข้างมา เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงสูตรที่ 76-100 (ตาราง 4) ผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

ชิ้นส่วนของใบอ่อน มีการตอบสนองต่ออาหารน้อยมาก แต่ในอาหารสูตรที่ 97 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร นั้น พบว่าชิ้นส่วนของใบอ่อนตอบสนองต่ออาหารได้ดีที่สุด มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.132 กรัม และไม่มีอาการสุกโรยทำให้ชิ้นส่วนของใบอ่อนเจริญเป็นแกลลัส (ภาพประกอบ 10)

ชิ้นส่วนของลำต้นไต่ต้น เกิดแกลลัสบนอาหารสูตรที่ 92, 93, 95 และ 96 แกลลัสที่เกิดบนอาหารสูตรที่ 92 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 5 สัปดาห์ อีก 1 สัปดาห์ต่อมาแกลลัสแตกปริออกเป็นรอยแยกแล้วเกิดแกลลัสโหนกที่กลางก้อนแกลลัสนั้น ส่วนแกลลัสที่เจริญบนอาหารสูตรที่ 93 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร แกลลัสมีการเจริญเติบโตได้มีขนาดใหญ่ จะเกิดแกลลัสโหนกสีขาวอยู่กลางก้อนแกลลัสที่เกิดก่อน แกลลัสที่เกิดก่อนจะอยู่รอบนอกมีสีน้ำตาล แกลลัสมีน้ำหนักมากที่สุดคือ 1.24 กรัม (ภาพประกอบ 11) ส่วนอาหารสูตรที่ 95 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ชิ้นส่วนของลำต้นไต่ต้นเกิดทั้งแกลลัสและยอด โดยเกิดแกลลัสสีขาวที่ข้างก้อนเนื้อเนื้อเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ ส่วนตรงกลางก้อนเนื้อเนื้อเกิดยอดโหนกสูง 2 เซนติเมตร (ภาพประกอบ 12)

ชิ้นส่วนของตาข้าง เกิดแกลลัสบนอาหารเพียง 2 สูตรเท่านั้น คือสูตรที่ 98 และ 99 โดยเกิดแกลลัสที่โคนตาข้างตรงรอยตัดที่สัมผัสกับอาหาร โดยที่โคนตาข้างมีการเจริญเติบโตขึ้นมีสีเขียวอ่อน แล้วเกิดรอยแยกตรงกลางมีแกลลัสเกิดขึ้น ลักษณะแกลลัสมีสีขาวเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ และพบว่าชิ้นส่วนของตาข้างที่เลี้ยงบนอาหารกลุ่มนี้ไม่มีการเกิดยอดเลย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (ภาพประกอบ 10)

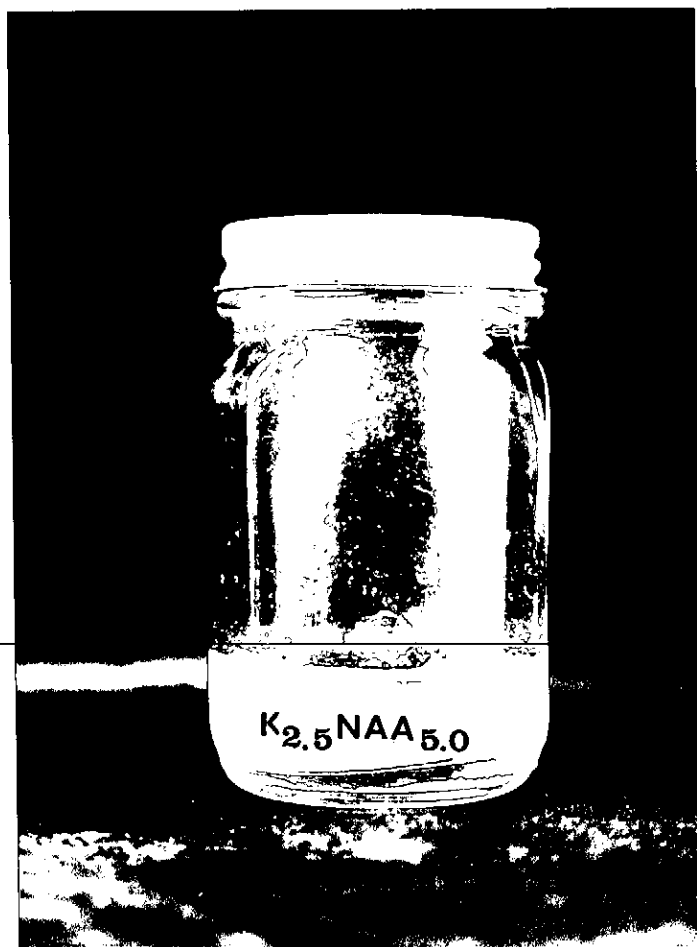


ภาพประกอบ 10 นักศึกษาที่ชื่นชอบของชิ้นส่วนใบ คาว และลำต้น/โคนที่เพาะเลี้ยงอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 76-100

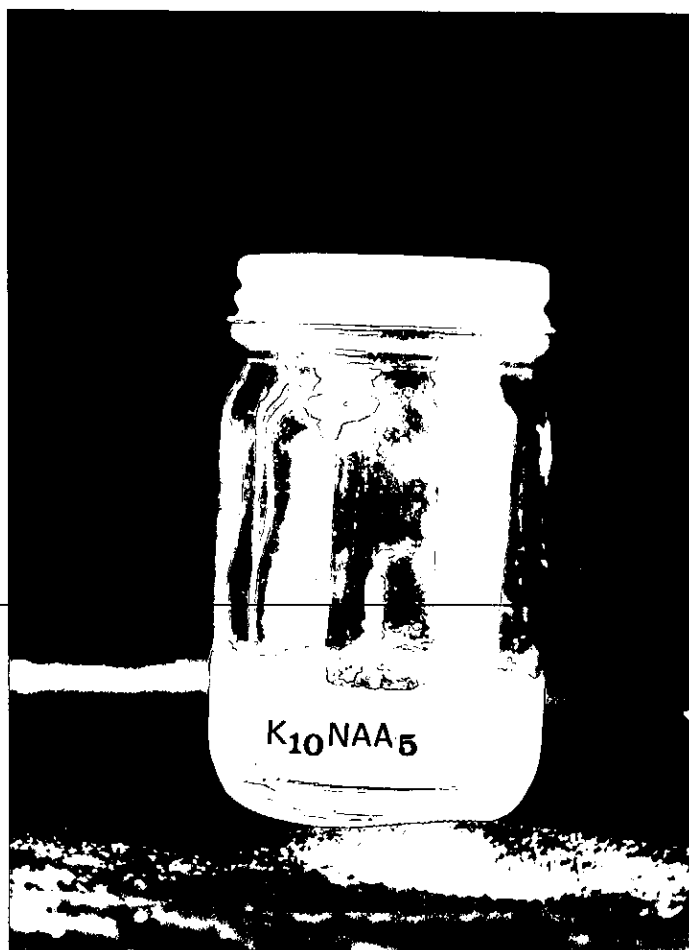
ใบ

คาว

ลำต้น/โคน



ภาพประกอบ 11 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นไต่ลิ้น เป็นเวลา 2 เดือน
 บนอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม K ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ
 NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพประกอบ 12 แกลลัสและยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นไต่ดิน เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม K ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงยอกที่ไคจากการทดลองที่ 1 เพื่อให้เกิดราก

นำยอดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงไคบนอาหารสูตรที่ 33 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีการเจริญที่ช้าในการทดลองที่ 1 โดยใช้ 1 ยอดต่อหนึ่งขวด มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรที่ 101-112 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร (ตาราง 5)

ผลการทดลองปรากฏว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดของชำวเริ่มแตกหน่อมาเพาะเลี้ยงจะสร้างรากได้ดีที่สุดบนอาหารสูตรที่ 103 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดรากเฉลี่ย 8 รากต่อกิ่งยอด และรากยาวเฉลี่ย 7 เซนติเมตร ต้นที่ได้มีลักษณะแข็งแรง มีการแตกยอดที่โคนต้น 3 - 4 ยอด ต้นสูงเฉลี่ย 10 เซนติเมตร มีใบ 9 - 10 ใบ (ภาพประกอบ 13) นอกจากนี้ยังพบว่ายอดที่จะสร้างรากบนอาหารสูตรที่ 101, 102, 104, 105, 106, 107 108 และ 109 ส่วนบนอาหารสูตรที่ 110, 111 และ 112 ไม่มีการสร้างราก (ตาราง 6 ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 13 ต้นข้าวขึ้นเต่งโตที่เพาะเลี้ยงจากส่วนยอด บนอาหารสูตร MS
 คัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

ตาราง 6 การเจริญเติบโตของต้นและการงอกรากของต้นข้าวเย็นแกมเมื่อ หลังจากเพาะเลี้ยงยกลบนอาหารสูตรที่ 101 - 112 เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรที่	สารเร่งการเจริญ	ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นและราก	การงอกราก
101	NAA 0.5 BA 0	ต้นแข็งแรง ความสูงเฉลี่ย 5 เซนติเมตร มีใบจำนวน 8-9 ใบ เกิดที่ข้อและยอด มีรากเกิดที่โคนต้น จำนวน 3 ราก ยาวเฉลี่ย 6 เซนติเมตร รากที่ข้อมีประมาณ 6-8 ราก	++
102	NAA 1.0 BA 0	ต้นแข็งแรง ความสูงเฉลี่ย 7 เซนติเมตร มีใบจำนวน 8-10 ใบ มีรากเกิดที่โคนต้นจำนวน 4 ราก ยาวเฉลี่ย 5 เซนติเมตร รากที่ข้อมีประมาณ 5 ราก และที่โคนต้นเกิดแคลลัสเล็กน้อย	++
103	NAA 2.0 BA 0	ต้นแข็งแรง มีการแตกยอดที่โคนต้น 3-4 ยอด ต้นสูงเฉลี่ย 10 เซนติเมตร มีใบ 9-10 ใบ มีรากเกิดที่โคนต้นจำนวน 8 ราก ยาวเฉลี่ย 7 เซนติเมตร และมีรากเกิดที่ข้อจำนวน 5-6 ราก	+++
104	NAA 0.5 BA 1.0	ต้นแข็งแรง มีแคลลัสเกิดที่โคนต้น ความสูงของต้นเฉลี่ย 7.5 เซนติเมตร มีใบจำนวน 6-8 ใบ เกิดรากที่โคนต้นจำนวน 3 ราก ยาวเฉลี่ย 4 เซนติเมตร และมีรากที่ข้อ 2-3 ราก	+

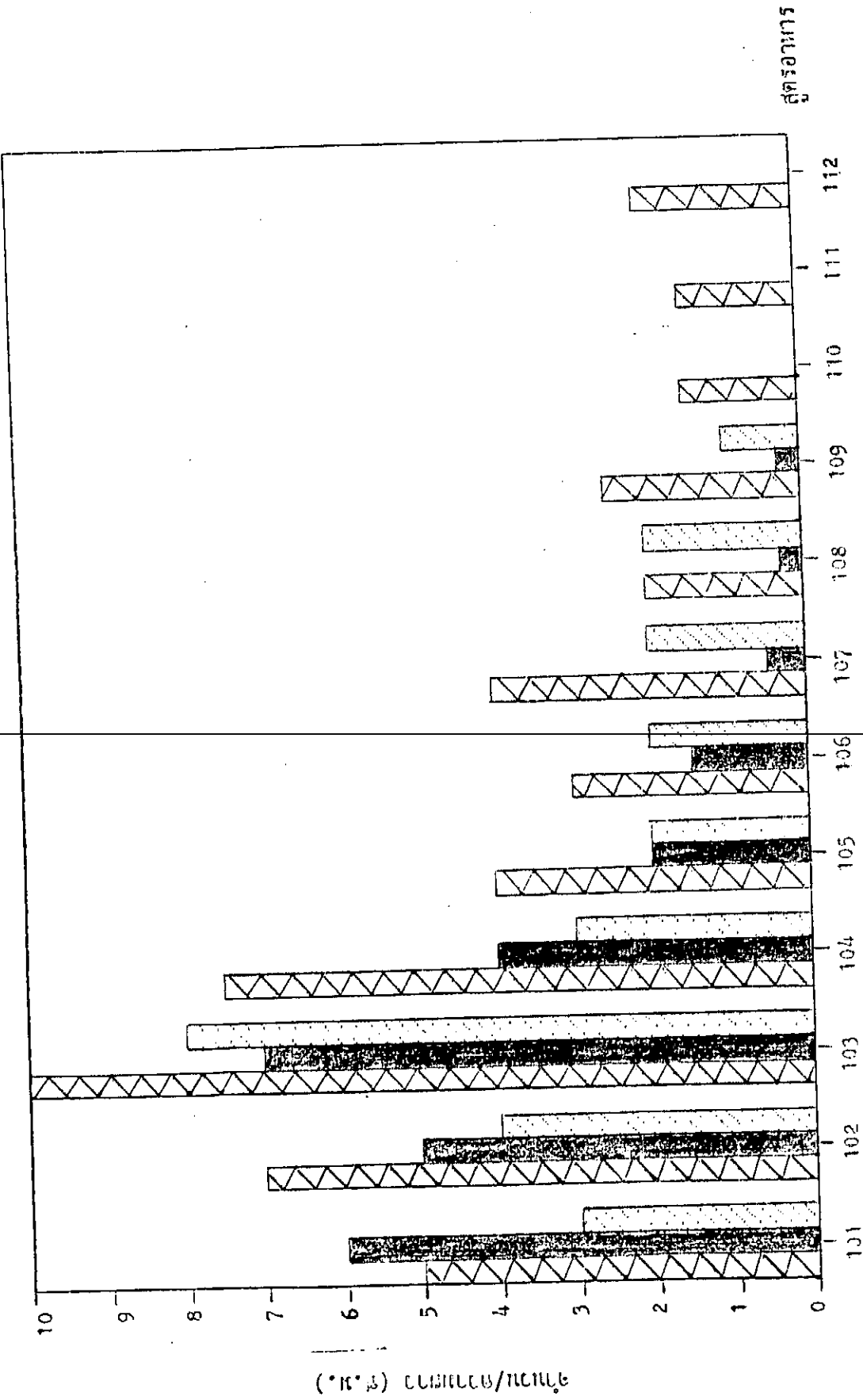
ตาราง 6 (ต่อ)

สูตรที่	สารเร่งการเจริญ	ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นและราก	การงอกราก
105	NAA 1.0 BA 1.0	ต้นแข็งแรง ความสูงของต้นเฉลี่ย 4 เซนติเมตร มีใบ 6-7 ใบ เกิดรากที่โคนต้น 2 ราก ยาวเฉลี่ย 2 เซนติเมตร และมีรากเกิดที่ข้อปลั่งลงไปในอาหารจำนวน 5 ราก	+
106	NAA 2.0 BA 1.0	ต้นแข็งแรง ความสูงของต้นเฉลี่ย 3 เซนติเมตร มีใบ 2-3 ใบ เกิดรากที่โคนต้น 2 ราก ยาวเฉลี่ย 1.5 เซนติเมตร และมีรากที่ข้อปลั่งลงไปในอาหาร 12 ราก	+
107	NAA 0.5 BA 3.0	ต้นแข็งแรง ความสูงของต้นเฉลี่ย 4 เซนติเมตร มีใบ 2-3 ใบ เกิดรากที่โคนต้น 2 ราก ยาวเฉลี่ย 0.5 เซนติเมตร และมีรากที่ข้อปลั่งลงไปในอาหารจำนวน 4 ราก	+
108	NAA 1.0 BA 3.0	ต้นแข็งแรง ความสูงของต้นเฉลี่ย 2 เซนติเมตร มีใบ 2-3 ใบ เกิดรากที่โคนต้นจำนวน 2 ราก ยาวเฉลี่ย 0.3 เซนติเมตร และมีรากที่ข้อปลั่งลงไปในอาหารจำนวน 2-3 ราก	+

ตาราง 6 (ต่อ)

สูตร	สารเร่งการเจริญ	ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นและราก	การงอกราก
109	NAA 2.0 BA 3.0	ต้นแข็งแรง ความสูงของต้นเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตร มีแคลลัสเกิดที่โคนต้น มีใบ 2-3 ใบ เกิดรากที่โคนต้น จำนวน 1 ราก ยาวเฉลี่ย 0.3 เซนติเมตร และเกิดรากที่ข้อ จำนวน 3 ราก	+
110	NAA 0.5 BA 5.0	ต้นอวบสูงเฉลี่ย 1.5 เซนติเมตร แยกยอดที่โคนต้น 3 ยอด มีแคลลัสที่โคนต้น มีใบ 2-3 ใบ ไม่เกิดราก	-
111	NAA 1.0 BA 5.0	ต้นอวบ สูงเฉลี่ย 1.5 เซนติเมตร แยกยอดที่โคนต้น 2 ยอด มีแคลลัสที่โคนต้น ไม่เกิดราก	-
112	NAA 2.0 BA 5.0	ต้นเรียวเล็ก สูงเฉลี่ย 2 เซนติเมตร แยกยอดที่โคนต้น 2 ยอด มีแคลลัสที่โคนต้น ไม่เกิดราก	-

การงอกราก - ไม่งอกราก ++ งอกรากปานกลาง (3-5 ราก)
 + งอกรากเล็กน้อย (1-2 ราก) +++ งอกรากมาก (6 รากขึ้นไป)



ภาพประกอบ 14 ความสูงของตน ความยาวและจำนวนรากของต้นข้าวเช่นเหนือเพาะเมล็ดพันธุ์ MS คัดแปลงผู้ตรวจ 101-112

การทดลองที่ 3 การนำต้นข้าวเย็นเหี่ยวออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

นำต้นข้าวเย็นเหี่ยวที่ได้จากการทดลองที่ 2 จำนวน 4 ชวด ซึ่งมีใบและรากสมบูรณ์ ย้ายลงปลูกในกระถางซึ่งใส่ทรายและพีแฉะแกลบ ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทุกต้นมีชีวิตรอดอยู่ได้ เมื่อย้ายลงสู่กระถางที่ใส่ส่วนผสมของดินร่วน ทราย และปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 1:1:1 นำไปไว้ในเรือนเพาะชำ ปรากฏว่าทุกต้นเจริญเติบโตดี และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 1 เดือน ทุกต้นมีการเจริญมากขึ้น โดยมีการแตกใบและยอด ลำต้นสูงขึ้น (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 ต้นข้าวเย็นเหล็ก ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากส่วนยอด
นำออกปลูกในเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 1 เดือน

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษากลของออกซิน (Auxins) และไซโตไคนิน (Cytokinins) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับต่อการเกิดแคลลัส และ/หรือต้นใหม่ที่มีสมบูรณ์
2. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส และ/หรือต้นใหม่ที่มีสมบูรณ์

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

นำลำต้นไคติน ตาข้าง และใบอ่อน ของข้าวเย็นเหนือล้างให้สะอาดด้วยผงซักฟอก แล้วล้างด้วยน้ำประปาหลาย ๆ ครั้ง นำไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที แล้วฆ่าเชื้อทั้งชุดดังนี้

ลำต้นไคติน แช่ในน้ำยาเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ

ตาข้าง แช่ในน้ำยาเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นานอย่างละ 10 นาที

ใบอ่อน แช่ในน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ

ล้างชิ้นส่วนดังกล่าวด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ทำเชื้อแล้วบนอาหารสูตร MS จัดแปลงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 26 - 27 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารกลุ่มออกซินร่วมกับไฮโดโคนิน เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัสหรือยอด บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ BA, NAA ร่วมกับ BA, 2, 4 - D ร่วมกับ K และ NAA ร่วมกับ K ที่ระดับความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงยอดที่ได้จากการทดลองที่ 1 เพื่อให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร

การทดลองที่ 3 การนำต้นข้าวเย็นเหนือออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยนำต้นที่ได้จากการทดลองที่ 2 ออกปลูกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน เก็บรวบรวมข้อมูลดังต่อไปนี้

1. ตั้งน้ำหนักสดของแคลลัสและหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น
2. ถ่ายภาพแคลลัสที่มีน้ำหนักสดมากที่สุด
3. นับจำนวนยอดหรือคนที่สมบูรณ์
4. ถ่ายภาพคนที่สมบูรณ์

สรุปและอภิปรายผล

การเจริญเติบโตของแคลลัสหรือยอดของต้นส่วนข้าวเย็นเหนือ

เมื่อนำใบอ่อนของต้นข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต คือ 2, 4 - D, NAA, BA และ K ในระดับความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าส่วนมากเนื้อเยื่อใบจะตอบสนองต่ออาหารโดยการโค้งม้วนตัว ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เช่น ในอาหารสูตรที่ 42

ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ใบมีการขยายขนาดใหญ่มากที่สุด ใต้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.352 กรัม อธิบายได้ว่า เนื่องจากใบอ่อนประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญซึ่งกำลังมีการแบ่งเซลล์และเนื้อเยื่อไคสาร NAA ซึ่งเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินในปริมาณที่พอเหมาะจึงกระตุ้นให้เซลล์ของพืชขยายตัว และมีการแบ่งเซลล์ (Wilkins. 1969 : 15, 22) แต่ถาเพิ่มสารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินในปริมาณที่สูงขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการขยายตัวของเซลล์ (Linsner. 1966 : 776 - 784) เช่น อาหารสูตรที่ 80 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ K ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การโตง้วนตัวและการขยายขนาดของใบน้อยที่สุด ส่วนการเกิดแคลลัสนั้นพบว่าใบอ่อนเกิดแคลลัสบนอาหารสูตรที่ 26(NAA 0.50 BA 0.50) 28(NAA 0.50 BA 2.50) 31(NAA 1.25 BA 0.50) 44(NAA 5.00 BA 5.00) 46(NAA 10.00 BA 0.50) และ 52(2, 4 - D 0.50 K 1.25) แต่ใต้น้ำหนักน้อยมาก กล่าวคือสูตรที่ 31 ซึ่งเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ใต้น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 0.262 กรัม

เนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ดินของข้าวเย็นเหนียว เกิดแคลลัสบนอาหารสูตรที่ 5(2, 4 - D

0.50 BA 10.00) 9(2, 4 - D 1.25 BA 5.00) 27(NAA 0.50 BA 1.25) 28(NAA 0.50 BA 2.50) 30(NAA 0.50 BA 10.00) 32(NAA 1.25 BA 1.25) 33(NAA 1.25 BA 2.50) 34(NAA 1.25 BA 5.00) 36(NAA 2.50 BA 0.50) 66(2, 4 - D 5.00 K 0.50) 67(2, 4 - D 5.00 K 1.25) 68(2, 4 - D 5.00 K 2.50) 69(2, 4 - D 5.00 K 5.00) 70(2, 4 - D 5.00 K 10.00) 92(NAA 5.00 K 1.25) 93(NAA 5.00 K 2.50) 95(NAA 5.00 K 10.00) และ 96(NAA 10.00 K 0.5) จะเห็นว่าต้นส่วนลำต้นใต้ดินมีแนวโน้มที่จะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีกว่าต้นส่วนใบอ่อนและตาข้าง โดยที่เนื้อเยื่อจะตอบสนองต่อสารเร่งการเจริญเติบโตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็น 2, 4 - D, NAA, BA และ K แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก และมีน้ำหนักน้อยทั้งนี้เพราะเนื้อเยื่อลำต้นใต้ดินจะยับยั้งสาร phenolic compound ลงบนอาหาร ซึ่งสารนี้จะไปทำให้เนื้อเยื่อซึ่งมีการเจริญ จากจำนวน สูตรอาหารทั้งกล่าว สูตรอาหารที่ 36 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 2.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด มีน้ำหนักมากที่สุด 2.320 กรัม

ในอาหารสูตรที่ 95 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ K ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้แคลลัสที่ได้เกิดยอด และในอาหารสูตรที่ 30 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้แคลลัสที่ได้เกิดทั้งยอดและราก แต่ยังไม่ติดต่อกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสก็อก และมิลเลอร์ (Skog and Miller, 1957 : 118 - 131) ที่ได้รายงานว่า การเกิดเป็นต้น ราก หรือ แคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณไซโตไคนินกับออกซินในอาหาร. ถ้าความเข้มข้นของไซโตไคนินและออกซินอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้นและมีรากที่สมบูรณ์ แต่ถ้าไซโตไคนินมีปริมาณมากกว่าออกซินเนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นยอด

ตาทางซ้ายเป็นเหนือ เกิดแคลลัสบนอาหารสูตรที่ 2(2, 4 - D 0.50 BA 1.25)

4(2, 4 - D 0.50 BA 5.00) 6(2, 4 - D 1.25 BA 0.50) 8(2, 4 - D 1.25 BA 2.50)
9(2, 4 - D 1.25 BA 5.00) 61(2, 4 - D 2.50 K 0.50) 65(2, 4 - D 2.50 K 10.00)
67(2, 4 - D 5.00 K 1.25) 68(2, 4 - D 5.00 K 2.50) 75(2, 4 - D 10.00 K 10.00)
98(BA 10.00 K 2.50) และ 99(NAA 10.00 K 5.00) สูตรอาหารที่ทำให้ตาข้างเกิดแคลลัส

ได้ดีที่สุด คือสูตรอาหารที่ 6 ซึ่งเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนสูตรอาหารที่ทำให้ตาข้างเกิดยอดนั้น ปรากฏว่าเป็นสูตรอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA ซึ่งจะช่วยให้ตาข้างเกิดยอดเกือบทุกสูตรอาหาร ส่วนใหญ่เนื้อเยื่อส่วนตาข้างจะเจริญเป็นยอดมากกว่าเกิดแคลลัส และในสูตรอาหารที่ 33 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.50 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดยอดได้ดีที่สุด อธิบายได้ว่าเพราะที่ตาข้างประกอบด้วยกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญซึ่งพร้อมที่จะพัฒนาไปเป็นยอด และเมื่อได้รับสาร NAA และ BA ในปริมาณที่เหมาะสมเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอดมากขึ้น สำหรับอาหารที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ BA หรือ K และอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ K ตาข้างไม่สามารถเจริญเป็นยอดในทุกความเข้มข้นที่ทดลองการใช้ปลายยอดนั้นจะประหยัคเวลา และคนที่ได้จะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนเดิม (Vasil and Vasil, 1980 : 145 - 175) เนื่องจากการเจริญของยอดเป็นแบบ direct organogenesis โดยไม่ต้องผ่านการเกิดแคลลัส (Hick, 1980 : 1 - 23) และ Street (1975) ได้รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีวัตถุประสงค์เพื่อ

การขยายพันธุ์นั้น จำเป็นจะต้องหลีกเลี่ยงการผ่านเซลล์หรือให้ช่วงเวลาที่ผ่านเซลล์น้อยที่สุด
จะเป็นวิธีที่ดีที่สุด เมื่อนำลำต้นข้าวเย็นเหนือในธรรมชาติสูง 1.50 เมตร จะมีตาข้างอยู่ประมาณ
30 ตา ถ้าใช้ตาข้างจากข้าวเย็นเหนือเพียง 20 ต้น นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะได้ต้นข้าวเย็นเหนือ
ต้นใหม่ประมาณ 600 ต้น ในเวลาเพียง 3 เดือน

การเพาะเลี้ยงยอดเพื่อให้เกิดราก

พบว่าการเกิดรากมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ NAA ที่ใส่ลงไปในอาหาร ยอดที่
เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน
รากที่ได้จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามความเข้มข้นของ NAA ที่ใส่ลงไป เช่น ในอาหารสูตรที่ 103
ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดรากจำนวนมาก และรากที่ไ้มี
ความยาวมากกว่า สมบูรณ์กว่าในอาหารสูตรที่ 102 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 1.0
มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตรที่ 101 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้น
ถ้าต้องการให้ยอดเกิดรากได้ดี ควรเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่ม
ออกซินเพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ หินค์ (Pink) และวอลกี (Walkey),
โนแวก (Novak) และเพทรู (Petru), โบจวานี (Bhojwani), มัลลินส์ (Mullins)
และโคเฮน (Cohen), มาร์รี (Maarri), อาร์โนด (Arnaud) และมิกินิแอก (Miginiaac)
และลอล (Lal) และคนอื่น ๆ ดังปรากฏรายละเอียดในบทที่ 2 อธิบายได้ว่า NAA ในอาหาร
ที่เพาะเลี้ยงยอดนั้นจะช่วยไ้แก่การแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์ (Evan 1974 ;
Nagano and Masuda, 1973) และกระตุ้นให้เกิดราก (Linscr, 1965) ยอดที่รากเกิด
จำนวนมากและยาวนั้นเป็นเพราะความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโตเหมาะสม กระตุ้นให้
เกิดรากได้สูงสุด (Thirmann, 1937)

ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตทั้ง NAA และ BA มี
การเกิดรากจำนวนน้อย รากมีขนาดเล็กและสั้น เช่น ในอาหารสูตรที่ 104 (NAA 0.5 BA 1.0)
105 (NAA 1.0 BA 1.0) 106 (NAA 2.0 BA 1.0) 107 (NAA 0.5 BA 3.0)

108(NAA 1.0 BA 3.0) และ 109(NAA 2.0 BA 3.0) เนื่องจากเนื้อเชื้อได้รับสารทั้งในกลุ่มออกซิน (NAA) และไซโตไคนิน (BA) ทำให้ระดับความเข้มข้นของ NAA ไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดราก

ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 110(NAA 0.5 BA 5.0) 111(NAA 1.0 BA 5.0) และ 112(NAA 2.0 BA 5.0) ไม่มีการเกิดรากเลย อธิบายได้ว่าเนื่องจากอัตราส่วนความเข้มข้นของ NAA และ BA ไม่เหมาะสมที่จะกระตุ้นให้เกิดราก หรืออาจเป็นเพราะ BA มีความเข้มข้นสูงไปยับยั้งการเกิดราก (Biale, 1978)

การนำต้นข้าวเย็นเหนือออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

เมื่อนำต้นข้าวเย็นเหนือ ซึ่งมีใบและรากสมบูรณ์ออกปลูกในกระถาง ซึ่งใส่ทรายและซีเมนต์กลบที่ฝังชำเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 ฝังไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ทุกต้นสามารถมีชีวิตรอด แล้วย้ายลงปลูกในกระถางที่ใส่ดินร่วน ทราย และปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 1:1:1 นำไปไว้ในเรือนเพาะชำเพื่อให้นักศึกษาเรียนรู้ตัวให้เข้ากับสภาพธรรมชาติได้ ปรากฏว่าทุกต้นเจริญเติบโตดี

ข้อเสนอแนะ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเย็นเหนือ ไม่ควรใช้ใบก่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เพราะเกิดแคลลัสเนืองมาก จากการทดลองใช้สารเร่งการเจริญเติบโตหลายชนิด เช่น 2, 4 - D, NAA, BA และ K ทดลองในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วยังพบว่าการเกิดแคลลัสเนืองมาก หรือแทบจะไม่มีการเจริญเป็นแคลลัสเลย แต่ลำต้นใต้ดินมีการตอบสนองต่อสารเร่งการเจริญเติบโตทุกชนิด ซึ่งสารเหล่านี้จะกระตุ้นให้ชิ้นส่วนเจริญเป็นทั้งแคลลัสและยอด ดังนั้นควรที่จะหาระดับความเข้มข้นของสารที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นใต้ดินเจริญเป็นแคลลัสและยอดมากกว่านี้ การวิจัยครั้งนี้ไม่ได้นำยอดที่เกิดจากลำต้นใต้ดินไปชักนำให้เกิดราก การวิจัยต่อไปจึงน่าจะได้นำยอดที่

เกิดจากอ้วนโตเกินไปเพราะเลี้ยงนมอาหารสูตรที่จะชักนำให้เกิดราก ซึ่งจะใส่ไขมันใหม่จำนวนมาก
ให้ขยายกันต่อไป นอกจากนี้บางจะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นโตขึ้นในอาหารเหลว เพื่อเพิ่ม
ปริมาณแคลลัสใหม่จำนวนมากพลที่จะสกัดหาสารอัลคาลอยด์ เพื่อใช้ประโยชน์ในวงการแพทย์ได้

ونړه ګارډ رڼ

บรรณานุกรม

- / เกศรินทร์ ภูมิศรีแก้ว. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคองคิงเพื่อเร่งขยายพันธุ์. ปริญญานิพนธ์
กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2527. อัดสำเนา.
กัจจกร มนุญปิจุ. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการทฤษฎีเคมีครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล, 2521.
- / ชลิต พงศ์ยุสมิทธิ. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะโหลกเขี้ยว. วิทยานิพนธ์ วท.ม.
กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2527. ถ่ายเอกสาร.
- เชษฐา พยากรณ์. สมุนไพรในชีวิตประจำวัน. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เชษฐา, 2525.
- เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรุงเทพฯ :
พืชน้ำทับลิ้ง, 2523.
- ธนวิมล รัตนการ. ผลของความเย็นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพักตัวของ
แมลงดีโอส. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.
ถ่ายเอกสาร.
- นันทวัน บุณยะประภัศร์. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการทฤษฎีเคมีครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ :
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2523.
- ประเสริฐ สุทธิประสิทธิ์. การศึกษาสภาวะการใส่สมุนไพรของประชาชนในเขตภาคเหนือตอนใต้
7 จังหวัด. พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พิษณุโลก, 2528.
- ประสม บรรณมานัส. สมุนไพรรักษากระเือ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526.
- พจน์ สุจันงค์. ตำรายาไทย-จีนจากกลางบ้าน ยาสมุนไพรยาแผนโบราณ. กรุงเทพฯ :
กรุงสยามการพิมพ์, 2524.
- ไพฑูย์ กวินเลิศวัฒนา. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ม.ป.ท., 2524.
- / วรากรณ์ ฉลองกิตติศักดิ์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคางคิง. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ :
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529. ถ่ายเอกสาร.

- ศศิมา ศรีธาวงศ์สกุล. การศึกษาสมุนไพรรักษาโรคที่มีการบันทึกไว้ในการบันทึกของมคก. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2523.
- สอาด บุญเกิด จเร สดากกร และพิทยพรพรณ สดากกร. พืชพรรณไม้ในเมืองไทย. กรุงเทพฯ : พ. จีระการพิมพ์, 2525.
- ✓ สัมพันธ์ คัมภีรานนท์. ฮอร์โมนพืช. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526.
- สมบัติ ห่มสาชา. การศึกษาผลของสมุนไพรรักษาโรคที่ปลูกขึ้นให้เป็นแบบหวานด้วยแอลกอฮอล์. ปริญญาโท ภาศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.
- สุรันต์ สุภัทรพันธุ์. ฮอร์โมน. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ม.ป.ป.
- อรดี สวัสดิ์จันทร์. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 2529.
- ✓ Asokan, M.P., S.K. O'Hair and R.E. Litz. "In Vitro Plant Regeneration From Corm Callus of Amorphophallus rivieri Durieu," Scientia Horticulturae. 24 : 251 - 256 ; December, 1984.
- ✓ Bhojwani, S.S., K. Mullins and D. Cohen. "In Vitro Propagation of Pyrus pyrifolia," Scientia Horticulturae. 23 : 243 - 254 ; September, 1984.
- Biale, J.B., "On the Interface of Horticulture and Plant Physiology," Annual Review of Plant Physiology. 29 : 1 - 23, 1978.
- Evans, H.L. "Rapid Responses to Plant Hormones," Annual Review of Plant Physiology. 25 : 195 - 223, 1974.
- Hicks, G.S. "Pattern of Organ Development in Plant Tissue Culture and The Problem of Organ Determination," Botanical Review. 46(1) : 1 - 23, 1980.
- ✓ Lal, R., and others. "Clonal Propagation of Picrorhiza kurroa Royle ex Benth by Shoot Tip Culture," Plant Cell Reports. 7(3) : 202 - 205 ; May 1988.
- Lesham, B. and A. Cohen. "Clonal Propagation of Statice (Limonium sinuatum L.) in Vitro," Hassadels. 64(2) : 318 - 319 ; August, 1983.

- Linser, H. "The Hormonal Systems of Plants," Angewandte Chemie.
Int. Ed. English 5 : 776 - 784, 1966.
- Maarri, K.A., Y. Arnaud and E. Higinia. "In Vitro Micropropagation of
Quince. (*Cydonia oblonga* Mill.)," Scientia Horticulturae.
28 : 315 - 321 ; May, 1986.
- Manoir, D.J., P. Desmarest and R. Saussay. "In Vitro Propagation of
Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller)," Scientia Horticulturae.
27 : 15 - 19 ; November, 1985.
- /Miller, C.O. and F. Skoog. "Chemical Control of Bud Formation in
Tobacco Stem Segments," American Journal of Botany. 40 :
768 - 773, 1953.
- Nagano, R.Y.M. and Y. Masuda. "A Kinetic Study of The Auxin Induced
Elongation of *Avena* Coleoptile Segments," Plant Cell Physiol.
14 : 397 - 408, 1973.
- Novak, F.J. and E. Petru. "Tissue Culture Propagation of *Lilium*
Hybrids," Scientia Horticulturae. 14 : 191 - 199 ; July, 1981.
- /Ohkawa, K. "Promotion of Renewal Canes in Greenhouse Rose by
6-Benzylamine purine Without Outback," Hort. Science. 14(5) :
612 - 613 ; June, 1980.
- /Pierik, R.L.M. ; P.V. Leeuwen and G.C.C.M. Rigter. "Regeneration of
Leaf Explants of *Anthurium andraeanum* Lind. in Vitro,"
Netherlands Journal of Agricultural Science. 27 : 221 - 226,
1979.
- /Pink, D.A.C. and D.G.A. Walkey. "Rapid Propagation of *Cucurbita pepo* L.
by Culture of Meristem Tips," Scientia Horticulturae. 24 :
107 - 114 ; December, 1984.
- Rawal, K.S. and R. Atul Mehta. "Tissue Culture of Tobacco. II
Influence of IAA, Kinetin and Sucrose On Organogenesis in
Nicotiana tabacum Callus Cultures," Indian Journal of Plant
Physiology. 25(4) : 336 - 347 ; December, 1982.
- Simola, L.K. "Propagation of Plantlets Form Leaf Callus of *Betula*
pendula F. *purpurea*," Scientia Horticulturae. 26 : 77 - 85,
May, 1985.
- Skoog, F. and C.O. Miller. "Chemical Regulation of Growth and Organ
Formation in Plant Tissue Culture In Vitro," Symposium Society
Experimental Biology. 11 : 118 - 131, 1957.

Street, H.E. Plant Cell Cultures : Present and Projected Applications for Studies in Cell Metabolism in Ledoux, L. Genetic Manipulations with Plant Material. New York : Plenum Press. 1975.

Tem, Smitinand. Flora of Thailand Volum two. Sirinandhasri : Thailand. 1981.

Thinmann, K.V. "On The Nature of Inhibitions Caused by Auxin," American Journal of Botany. 24 : 40 - 74, 1937.

Torrey, J.G. "The Development of Plant Biotechnology," American Scientist. 73 : 354 - 363 ; July - August, 1985.

Vasil, I.K. and V. Vasil, "Clonal propagation," International Review of Cytology. Suppl. 11A 145 - 175, 1980.

Weaver, A.J. Plant Growth Substance in Agriculture. San Francisco ; W.H. Freeman and Company, 1972.

Wilkins, M.B. The Physiology of Plant Growth and Development. London ; McGraw-Hill Publishing Company, 1969.

הרמזות

องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง

1. เตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร

1.1 stock 1

NH_4NO_3	165	กรัม
KNO_3	190	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1.2 stock 2

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.690	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.860	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1.3 stock 3

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44	กรัม
KI	0.083	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1.4 stock 4

KH_2PO_4	17	กรัม
H_3BO_3	0.620	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1.5 stock 5

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784	กรัม
Na_2EDTA	2.724	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายเข้มข้น 200 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร

2.1 stock 6

Inositol	2.0	กรัม
Nicotinic acid	0.01	กรัม
Pyridoxine HCL	0.01	กรัม
Thiamine HCL	0.002	กรัม
Glycine	0.04	กรัม
H_2O (distilled)	100	มิลลิลิตร

3. เตรียมสารเร่งการเจริญเติบโต ทำเป็น stock solution โดยใช้สาร 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ตาราง 1 น้ำหนักสกลเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบ ทาซาง และลำต้นใต้ดินของข้าวเป็นชนิดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS กักแปลงที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ BA เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสกลเฉลี่ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	2, 4- D (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	ใบอ่อน	ตาซาง	ลำต้นใต้ดิน
1	0.50	0.50	0.124	0.232	-
2	0.50	1.25	0.118	0.250 [*]	-
3	0.50	2.50	0.132	0.174	-
4	0.50	5.00	0.164	0.188 [*]	-
5	0.50	10.00	0.188	0.048	1.780 [*]
6	1.25	0.50	0.142	0.280 [*]	-
7	1.25	1.25	0.110	0.220 [*]	-
8	1.25	2.50	0.142	0.162 [*]	-
9	1.25	5.00	0.134	0.230 [*]	1.020 [*]
10	1.25	10.00	0.172	0.082	-
11	2.50	0.50	0.284	0.072	-
12	2.50	1.25	0.330	0.072	-
13	2.50	2.50	0.282	0.152	-
14	2.50	5.00	0.186	0.052	-
15	2.50	10.00	0.224	0.064	-
16	5.00	0.50	0.304	0.094	-
17	5.00	1.25	0.326	0.080	-

ตาราง 1 (ต่อ)

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสเกลเฉลี่ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	2,4-D (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	ใบอ่อน	ตาข้าง	ลำต้นใต้ดิน
18	5.00	2.50	0.168	0.046	-
19	5.00	5.00	0.136	0.074	-
20	5.00	10.00	0.184	0.060	-
21	10.00	0.50	0.184	0.078	-
22	10.00	1.25	0.092	0.055	-
23	10.00	2.50	0.125	0.040	-
24	10.00	5.00	0.106	0.044	-
25	10.00	10.00	0.072	0.056	-

ลักษณะการเจริญเติบโต

* = แคลลัส

** = แคลลัสและราก

*** = แคลลัสและยอด

**** = แคลลัส ยอดและราก

ตาราง 2 น้ำหนักสกลเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบ ตาข้าง และลำต้นใต้ดินของข้าวเย็นเบเกอรี่เพาะเลี้ยง
บนอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสกลเฉลี่ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	ใบอ่อน	ตาข้าง	ลำต้นใต้ดิน
26	0.50	0.50	0.214*	0.084***	-
27	0.50	1.25	0.144	0.260***	1.740*
28	0.50	2.50	0.150*	0.096***	1.420*
29	0.50	5.00	0.232	0.200***	-
30	0.50	10.00	0.184	0.064*	2.280****
31	1.25	0.50	0.262*	0.240***	-
32	1.25	1.25	0.290	0.262***	1.650*
33	1.25	2.50	0.320	0.280***	1.540*
34	1.25	5.00	0.222	0.120***	1.720*
35	1.25	10.00	0.330	0.080*	-
36	2.50	0.50	0.068	0.200***	2.320**
37	2.50	1.25	0.164	0.108*	-
38	2.50	2.50	0.164	0.228***	-
39	2.50	5.00	0.204	0.202***	-
40	2.50	10.00	0.232	0.162***	-
41	5.00	0.50	0.330	0.090*	-
42	5.00	1.25	0.352	0.174***	-

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสกลเล็ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	NAA (มก./ล.)	Ba (มก./ล.)	ใบอ่อน	ตาข้าง	ลำต้นใต้ดิน
43	5.00	2.50	0.212	0.156***	-
44	5.00	5.00	0.154*	0.208***	-
45	5.00	10.00	0.284	0.094*	-
46	10.00	0.50	0.116*	0.224***	-
47	10.00	1.25	0.070	0.188***	-
48	10.00	2.50	0.162	0.100*	-
49	10.00	5.00	0.232	0.140***	-
50	10.00	10.00	0.124	0.248***	-

ลักษณะการเจริญเติบโต

* = แคดลีส

** = แคดลีสและราก

*** = แคดลีสและยอด

**** = แคดลีสยอดและราก

ตาราง 3 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบ ก้าน และลำต้นใต้ดินของข้าวเย็นเหนือ
ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4 - D ร่วมกับ K เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	2, 4 - D (มก./ล.)	K (มก./ล.)	ใบอ่อน	ก้าน	ลำต้นใต้ดิน
51	0.50	0.50	0.096	0.036	-
52	0.50	1.25	0.160*	0.054	-
53	0.50	2.50	0.192	0.052	-
54	0.50	5.00	0.154	0.056	-
55	0.50	10.00	0.122	0.044	-
56	1.25	0.50	0.126	0.030*	-
57	1.25	1.25	0.084	0.024	-
58	1.25	2.50	0.142	0.060	-
59	1.25	5.00	0.022	0.054	-
60	1.25	10.00	0.036	0.056	-
61	2.50	0.50	0.028	0.052*	-
62	2.50	1.25	0.034	0.054	-
63	2.50	2.50	0.030	0.042	-
64	2.50	5.00	0.034	0.028	-
65	2.50	10.00	0.088	0.044*	-
66	5.00	0.50	0.078	0.036	1.220*
67	5.00	1.25	0.038	0.050*	1.060*

ตาราง 3 (ต่อ)

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	2,4- D (มก./ล.)	K (มก./ล.)	ใบอ่อน	ตาข้าง	ลำต้นใต้ดิน
68	5.00	2.50	0.096	0.042*	1.360**
69	5.00	5.00	0.064	0.046	1.140*
70	5.00	10.00	0.054	0.028	1.120*
71	10.00	0.50	0.080	0.016	-
72	10.00	1.25	0.112	0.026	-
73	10.00	2.50	0.026	0.020	-
74	10.00	5.00	0.050	0.038	-
75	10.00	10.00	0.022	0.024**	-

ลักษณะการเจริญเติบโต

* = แคลลัส

** = แคลลัสและราก

*** = แคลลัสและยอด

**** = แคลลัสยอดและราก

ตาราง 4 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบ คาซาง และลำต้นโตกิน ของข้าวเย็นเหนือ
ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ K เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	NAA (มก./ล.)	K (มก./ล.)	ใบอ่อน	คาซาง	ลำต้นโตกิน
76	0.50	0.50	0.084	0.004	-
77	0.50	1.25	0.018	0.016	-
78	0.50	2.50	0.110	0.060	-
79	0.50	5.00	0.050	0.016	-
80	0.50	10.00	0.022	0.028	-
81	1.25	0.50	0.022	0.010	-
82	1.25	1.25	0.054	0.010	-
83	1.25	2.50	0.028	0.016	-
84	1.25	5.00	0.042	0.034	-
85	1.25	10.00	0.082	0.024	-
86	2.50	0.50	0.046	0.012	-
87	2.50	1.25	0.048	0.014	-
88	2.50	2.50	0.060	0.014	-
89	2.50	5.00	0.076	0.012	-
90	2.50	10.00	0.050	0.014	-
91	5.00	0.50	0.032	0.040	-
92	5.00	1.25	0.026	0.034	1.210 ³

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหารที่	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วน (กรัม)		
	NAA (มก./ล.)	K (มก./ล.)	ใบอกบน	ตาข้าง	ลำต้นใต้ดิน
93	5.00	2.50	0.066	0.038	1.240 *
94	5.00	5.00	0.052	0.050	-
95	5.00	10.00	0.084	0.012	1.200 ***
96	10.00	0.50	0.080	0.024	1.040 *
97	10.00	1.25	0.132	0.014	-
98	10.00	2.50	0.034	0.042 *	-
99	10.00	5.00	0.050	0.066 *	-
100	10.00	10.00	0.110	0.040	-

ลักษณะการเจริญเติบโต

* = แคลลัส

** = แคลลัสและราก

*** = แคลลัสและยอด

**** = แคลลัสยอดและราก

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นายมงคล ชื่อสกุล ฤทธิธ

เกิดวันที่ 17 เดือนเมษายน พุทธศักราช 2499

สถานที่เกิด บ้านเลขที่ 356-357 ถนนสนามม้า อำเภอสตึก จังหวัดบุรีรัมย์

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 310/12 ถนนประสมสุข อำเภอสตึก จังหวัดบุรีรัมย์

31150

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน ศึกษานิเทศก์ 5

สถานที่ทำงานปัจจุบัน สำนักงานการประมงศึกษาอำเภอสตึก จังหวัดบุรีรัมย์

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2517 ป.กศ. จากวิทยาลัยครูบุรีรัมย์

พ.ศ. 2521 กศ.บ. (วิชาเอกชีววิทยา วิชาโทเทคโนโลยีทางการศึกษา)

จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม

พ.ศ. 2532 กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร