

584.324

ก 258ก

ร 3

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกิ่ง Gloriosa superba linn.
เพื่อเร่งการขยายพันธุ์

ปริญญาโท

ของ

เกศวินทร์ ภูมิกรแก้ว

12 พค 2536

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

ตุลาคม 2527

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178804

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกิ่ง Gloriosa superba Linn.
เพื่อการเร่งขยายพันธุ์

โดย
มัทกัญญะ
ของ
เกศรินทร์ ภูมิกริแก้ว

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
ตุลาคม 2527

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค (ส่วน ก คือชิ้นส่วน 1 ส่วนของ หัวคองคิงส่วนกลางหัวตำแหน่งที่เคยมีลำต้นเหนือดิน ส่วน ข คือชิ้นส่วน 2 ส่วนของ หัวคองคิงตัดจากส่วน ก ทั้งสองข้าง แต่ไม่รวมส่วน ค ส่วน ค คือชิ้นส่วนปลายสุด 2 ส่วน) ของหัวคองคิง Gloriosa superba Linn. ในอาหารเลี้ยงสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962 473-497) และ MS กัดแปลงโดยการเติม 2, 4 - D (2, 4 - dichlorophenoxy acetic acid) BA (6 benzyladenine) และ NAA (α naphthalene acetic acid) ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ผลการทดลองมีดังนี้

1. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS + 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.0 ppm ส่วน ก และ ข เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด มีน้ำหนักสดมากที่สุด (1.98 และ 1.89 กรัม ตามลำดับ) และในความเข้มข้น 0.05 ppm ส่วน ค เกิดยอด 2 ยอด ในอาหารสูตร MS ส่วน ค เกิดยอดและต้นที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด มีน้ำหนักสดมากที่สุด (2.86 กรัม)

2. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA ความเข้มข้น 0.05 ppm + NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm ส่วน ค เจริญเติบโตได้ดีที่สุด มีน้ำหนักสดมากที่สุด (4.07 กรัม)

3. เมื่อนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วน ก ข และ ค ในอาหาร MS + 2, 4 - D มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA ความเข้มข้น 1.0 ppm แคลลัสเจริญเติบโตได้ดี มีน้ำหนักสดมากที่สุด (0.88 กรัม) แต่ไม่มีการสร้างยอด และราก

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วน ค ในอาหาร MS + BA + NAA มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA ความเข้มข้น 5.0 ppm + NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm แคลลัสเกิดยอดได้ดีที่สุด แต่ในอาหารสูตร MS + BA ความเข้มข้น 5.0 ppm เกิดยอดและมีน้ำหนักสดมากที่สุด (3.33 กรัม) ในอาหารสูตร MS + NAA

ความเข้มข้น 0.5 ppm เกิดเฉพาะรากมากที่สุด มีน้ำหนักสดมากที่สุด (7.23 กรัม) ในอาหารสูตร MS + BA ความเข้มข้น 10.0 ppm + NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น มีน้ำหนักสดมากที่สุด (3.91 กรัม)

4 เมื่อนำยอดจำนวน 1 ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วน ก ในอาหารสูตร MS + 2, 4 - D มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm พบว่า เจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและมีน้ำหนักสดมากที่สุด (4.82 กรัม) แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA ความเข้มข้น 10.0 ppm เกิดยอดใหม่เพิ่มจำนวนมากที่สุด (6.0) มีน้ำหนักสดมากที่สุด (4.51 กรัม) ในอาหาร MS ยอดเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้มากที่สุด (3.6) และมีน้ำหนักสดมากที่สุด (2.86 กรัม)

ต้นคงตั้ง ที่ได้จากการทดลองมีใบสีเขียว และมีรากสมบูรณ์สามารถนำออกมาเพาะเลี้ยงในกระถางและเจริญเติบโตในธรรมชาติได้

TISSUE CULTURE OF Gloriosa superba LINN.
FOR MASS PROPAGATION

AN ABSTRACT
BY
KETSARIN POOMSRIKAEW

Presented in partial fulfillment of the requirement
for the Master of Education degree
at Srinakharinwirot University
October 1984

Attempts were made to culture 3 parts [(Tuberous roots of Gloriosa superba Linn. was divided into 5 part, A = the middle part, B = the left and right latter part of A, C = the both left and right end part.)] of Gloriosa superba Linn. aseptically in MS (Murashige and Skoog 1962.) and MS modified [(by adding various concentration of 2, 4 - D (2, 4 - dichlorophenoxy acetic acid), BA (6 - benzyladenine) and NAA (α - naphthalene acetic acid)] medium agar. The results were as the followings,

1. In the MS medium + 1.0 ppm 2, 4 - D, the calluses from part A and B showed the maximum growth (1.98 and 1.89 gm by wet weight respectively) and in the MS medium + 0.05 ppm 2, 4 - D, two shoots were formed at the C part.

In the MS medium, the C part gave the shoot and complete plant body including the maximum growth (2.86 gm by wet weight)

2. In the MS medium + 0.05 ppm BA + 0.05 ppm NAA the C part showed the maximum growth (4.07 gm by wet weight)

3. The callus obtained through tissue culture were subcultured in MS medium + 1.0 ppm BA, showed the maximum growth (0.88 gm by wet weight) but neithers shoots nor roots were produced.

The calluses obtained through the C part tissue culture were subcultured, the results were in MS medium + 5.0 ppm BA + 0.5 ppm NAA, the shoots were formed, but the shoots maximum growth (3.33 gm by wet weight) was subcultured in MS medium + 5.0 ppm BA, in MS medium + 0.5 ppm NAA, only the roots were formed with the maximum growth (7.23 gm by wet weight), in MS medium + 10.0 ppm BA + 0.5 ppm NAA, the calluses increased in size and showed the maximum growth. (3.91 gm by wet weight).

4. The shoots obtained through tissue culture and were subcultured in MS medium + 0.5 ppm BA + 0.05 ppm NAA showed the maximum growth (4.82 gm by wet weight) when compared with the control group.

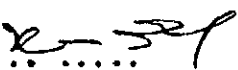
In the MS medium + 10.0 ppm BA, the maximum number of shoots (6) also the maximum growth (4.51 gm by wet weight) were found.

In the MS medium, the shoots developed to the complete plant body and showed the maximum growth (2.86 gm by wet weight).

Otherwise the plants obtained through the tissue cultured method can grow normally in nature.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำบัณฑิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปัญหานี้
ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

... 

ประธาน

... 

กรรมการ

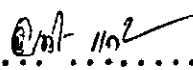
คณะกรรมการสอบ

... 

ประธาน

... 

กรรมการ

... 

กรรมการ

ประกาศกฎบัตร

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ได้ เองลงใจใฝ่ใจได้รับความช่วยเหลือ คำแนะนำและ
ตรวจแก้ไขเป็นอย่างดีจากอาจารย์บรรยา วัชรพันธุ์ จ. อุษยา และอาจารย์พิมพ์วรรณ
น พัทลุง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา พรหมบุญ ที่กรุณา
ช่วยเหลือและให้คำปรึกษา แนะนำ แก่ขอขอบพระคุณ อาจารย์อัมรินทร์ ผู้ให้ทุนการศึกษา และขอขอบพระคุณ
ในการถ่ายภาพผลการวิจัยของดิฉัน

ขอขอบพระคุณเขาวนุต หงษ์งามที่ ผู้ใกล้ชิด นิธิพัฒน์ ที่ช่วยฝึก
เทคนิคเบื้องต้นของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรีดา เจริญศรี
และคุณประยุตต์ แสงประเสริฐ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการถ่ายภาพ

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้สนับสนุนทางด้านทางการเงินและการทำ
ปริญญานิพนธ์ ทั้งด้านกำลังใจและทุนทรัพย์ และขอขอบคุณคุณยาย จันทาบุญหงษ์
รวมทั้งเพื่อนทุกคนและน้อง ๆ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

เกษรินทร์ ภูมิศรีแก้ว

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	3
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	นิยามคำศัพท์เฉพาะ	4
	เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	15
	อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า	15
	วิธีทดลอง	17
	วิธีเก็บรวบรวมข้อมูลและวิธีวิเคราะห์ข้อมูล	20
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	21
	ผลการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง	21
	ผลการทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทดลองที่ 1	26
	ผลการทดลองที่ 3 เพาะเลี้ยงยอดของคองคิงที่ได้จาก การทดลองที่ 1	30

ผลการทดลองที่ 4	เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค	
ของหัวคองคิง		39
ผลการทดลองที่ 5	เพาะเลี้ยงแกกส์ที่ได้จากการทดลองที่ 5	47
ผลการทดลองนำต้นออกปลูกในกระถาง		57
5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ		58
จุดมุ่งหมายของการศึกษาก่อนว่า		58
วิธีดำเนินการก้นว่า		58
การวิเคราะห์ข้อมูล		59
สรุปและอภิปรายผล		59
ข้อเสนอแนะ		67
บรรณานุกรม		68
ภาคผนวก		74

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงสูตร MSD เป็นเวลา 2 เดือน	24
2	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MSBA เป็นเวลา 2 เดือน	28
3	จำนวนและน้ำหนักสดเฉลี่ยของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง MSBA MSN MSBAN เป็นเวลา 2 เดือน	32
4	จำนวนและน้ำหนักสดของต้นที่สมบูรณ์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง ยอดของคองคิง ในอาหารสูตร MS MSBA MSN และ MSBAN เป็นเวลา 2 เดือน	38
5	น้ำหนักสดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS MSBA MSN และ MSBAN เป็นเวลา 2 เดือน	44
6	จำนวนเฉลี่ยของยอดและน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เกิดจาก การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS MSB MSN และ MSBAN เป็นเวลา 2 เดือน	54

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	หัวของคองคิ่ง <u>Gloriosa superba</u> Linn.	15
2	แสดงแบ่งหัวคองคิ่งเป็น 5 ส่วนเท่า ๆ กัน ความยาว 2 เซนติเมตร ได้แก่ ส่วน ก 1 ส่วน ส่วน ข 2 ส่วน และส่วน ก 2 ส่วน	16
3	ลักษณะแก๊สที่ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ของหัว คองคิ่งในอาหารสูตร MSD _{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน . . .	22
4	ลักษณะแก๊สที่ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ข ของหัว คองคิ่งในอาหารสูตร MSD _{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน . . .	22
5	ลักษณะแก๊สที่ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ของหัว คองคิ่งในอาหารสูตร MSD _{1.0} เป็นเวลา 2 เดือน . . .	22
6	เปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยของแก๊สเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSD ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 2 เดือน . . .	24
7	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วน ก ของหัวคองคิ่ง ในอาหารสูตร MS MSD ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 และ 1.0 ppm เป็นเวลา 2 เดือน ...	25
8	ลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วน ก ของหัวคองคิ่ง ในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน . . .	25
9	ลักษณะแก๊สและยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่วน ค ของหัว คองคิ่งในอาหารสูตร MSD _{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน . . .	25
10	เปรียบเทียบแก๊สและรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแก๊สคองคิ่ง ในอาหารสูตร MSBA _{0.01} MSBA _{1.0} MSBA _{5.0} MSBA _{10.0} เป็นเวลา 1 - 2 เดือน . . .	27

- 11 เปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยของแกดลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS
และ MSD เป็นเวลา 2 เดือน 29
- 12 เปรียบเทียบลักษณะที่ เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด
ของคองคิงในอาหารสูตร MS MSBA_{0.5} N_{0.05}
เป็นเวลา 2 เดือน 31
- 13 เปรียบเทียบลักษณะรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดของ
คองคิงในอาหารสูตร MS MSN_{0.05} MSN_{0.5} MSN_{5.0}
MSN_{10.0} เป็นเวลา 2 เดือน 31
- 14 น้ำหนักสดเฉลี่ยของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS
และ MS คัดแปลงสูตร 15 - 39 MCRA MSN MSBAN
เป็นเวลา 2 เดือน 33
- 15 จำนวนเฉลี่ยของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS
คัดแปลงสูตร 15 - 39 MSBN MSN MSBAN
เป็นเวลา 2 เดือน 35
- 16 ลักษณะยอดของคองคิงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSEA_{10.0}
เป็นเวลา 2 เดือน 36
- 16 A ลักษณะยอดของคองคิงที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSBA_{5.0}
เป็นเวลา 2 เดือน 36
- 17 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอดคองคิงที่เพาะเลี้ยงใน
อาหารสูตร MS และ MSBA_{0.05} N₅ เป็นเวลา 2 เดือน 36
- 18 ลักษณะยอดและแกดลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดใน
อาหารสูตร MS MSBA_{0.5} N_{0.5} เป็นเวลา 2 เดือน 40

19	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของขอก ยอดใหม่ แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงขอกในอาหารสูตร MS MSBA _{5.0} N _{10.0} เป็นเวลา 2 เดือน	41
20	น้ำหนักสดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อส่วน ข ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSBA เป็นเวลา 2 เดือน	45
21	น้ำหนักสดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อส่วน ข ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSN เป็นเวลา 2 เดือน	45
22	เปรียบเทียบน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อส่วน ก ของหัวคองคิงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSBA MSN MSBAN เป็นเวลา 2 เดือน	46
23	ยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของคองคิงในอาหาร MSBA _{5.0} เป็นเวลา 2 เดือน	48
24	ยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของคองคิงในอาหาร MSBA _{5.0} N _{0.5} เป็นเวลา 2 เดือน	48
25	ยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของคองคิงในอาหาร MSBA _{10.0} เป็นเวลา 2 เดือน	48
26	ลักษณะรากและแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	49
27	ลักษณะรากและแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS MSBA _{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน	49
28	ลักษณะรากและแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS MSBA _{0.5} เป็นเวลา 2 เดือน	49

29	ลักษณะรากและแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS MSN _{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน	49
30	ลักษณะรากที่มีสีขาวและเขียวที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ของคองคิงในอาหารสูตร MS MSBA _{0.05} N _{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน	50
31	การเจริญเติบโตของรากและแคลลัสที่มีสีเขียวในอาหารสูตร MSBA _{0.05} N _{5.0} เป็นเวลา 2 เดือน	51
32	การเจริญเติบโตของรากและแคลลัสที่มีสีเขียวในอาหารสูตร MSBA _{10.0} N _{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน	51
33	ลักษณะของแคลลัสที่มีสีเขียว เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS และ MSBA _{10.0} เป็นเวลา 2 เดือน	52
34	น้ำหมักสกัดเนื้อเยื่อแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSN เป็นเวลา 2 เดือน	55
35	น้ำหมักสกัดเนื้อเยื่อแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSEA MSEAN เป็นเวลา 2 เดือน	56
36	ต้นคองคิง <u>Gloriosa superba</u> Linn. ที่ย้ายลงปลูกใน กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร เป็นเวลา 2 เดือน	57

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ตั้งแต่สมัยโบราณมาแล้วที่มนุษย์รู้จักใช้พืชสมุนไพรฆ่าโรค โดยไม่ได้นำพืชมาสกัดเอาสารออกฤทธิ์ด้วยกรรมวิธีเคมีวิเคราะห์ แต่ทางโอกาสก็ได้ใช้พืชสมุนไพรเป็นยารักษาโรคเสมอไป แต่อาจใช้เป็นยาเบื่อเมาสัตว์ ยาบารุงหัวใจ ระบาย หรือเจียวยาเพื่อช่วยให้เจริญอาหาร ทั้งนี้เพราะพืชสมุนไพรปีศาจประกอบมีพวกอัลกาลอยด์ กลูโคไซด์ เรซิน และแทนนิน ซึ่งพืชที่ต่อร่างกายคน สัตว์ และพืช การรับประทานที่เหมาะสมจะมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ได้ดี แต่การรับประทานที่มากเกินไปก็อาจจะเป็นพิษหรือทำให้เสียชีวิตได้ (พยอม กันต์วัฒน์ 2521 : 202)

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าหัวและเมล็ดของพืชปีศาจโคคลิซินใช้บำบัดโรคปวดข้อและโรค มะเร็งบางชนิดในคนได้ดี ใช้เป็นสารเคมีปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเพิ่มจำนวนโครโมโซม เป็นสองเท่า อาจทำให้ได้พืชที่มีคุณภาพดีขึ้นและยังใช้เป็นตัวยาในการกำจัดศัตรูของพืช ไร่ค้า (ฉัตรวิทย์ บุชรัตนกรกิจ อนุมจิต สุภาวีกา 2525 : 5)

ปัจจุบันคงยังเป็นพืชสมุนไพรที่มีราคาก็มีการซื้อขายหัวของพืชในท้องตลาด ทั้งภายในและนอกประเทศ และยังใช้เป็นไม้ตัดดอก เป็นไม้ประดับได้ดี เพราะคงกิ่ง มีสีดอกสวยงาม สดุดตา ดอกที่ตัดจะอยู่ได้นาน 10 - 15 ชั่วโมง โดยไม่เหี่ยวเฉา และเมื่อห่อด้วยกระดาษแก้วเคมีเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 15 - 20 องศาเซลเซียส จะสดอยู่ได้นานถึง 10 วัน (ปริศนา เอกะวิภาต 2523 : 29) การปลูกคงกิ่งเพื่อการค้า โดยการขยายพันธุ์ด้วยหัวมีปัญหารงที่หัวของพืชแต่ละหัวมีจุดกำเนิดเป็นลำต้น โคนตรงส่วนปลายสุดของหัวเท่านั้น จุดนี้มีลักษณะเป็นปมสีขาวขนาดเล็กมีลักษณะคล้ายหน่อ ถ้าส่วนปลายสุดของหัวนี้หักหรือเน่าหัวนั้นจะแห้งและแข็งไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้อีก

เมื่อปลุกหัวของกิ่งจนมีลำแ่งกอกขึ้นมาแล้วจะมีหัวใหม่สีขาวงอกออกมาจากหัวเก่า ถ้าหัวเก่าหักหรือเขาสากันอาจจะเหวี่ยงต่อไป แต่ใบออกดอกกาเป็นากนั้น นอกจากนี้การหักหรือเน่าของหัวเก่ายังไปรบกวนการเจริญเติบโตของลำต้นและการเพิ่มขนาดของหัวที่เกิดขึ้นในภายหลัง พบว่าหลังจากการเจริญเติบโตในโรงเรือนถึงแล้วหัวของกิ่งมีระยะพักตัว 2 - 3 เดือน ต้องเก็บหัวนั้นไว้จนกระทั่งปลายหัวเริ่มเกิดปลีสีขาวซึ่งมีจุดกาเนคต้นใหม่ (ปริศี เอกะวิภาต 2526 : 58 - 67) เมื่อเอาหัวชนิดนี้ไปปลูกจะมีลำต้นเจริญขึ้นมาจากส่วนปลีสีขาวและเมื่อเลี้ยงต่อไปจะออกดอกได้ ส่วนหัวเดิมจะทำหน้าที่ให้อาหารแก่ลำต้นและสลายไปในที่สุด ดังนั้น การขยายพันธุ์ของกิ่งโดยการแยกหัวจึงได้งานวนเวียนน้อยและใช้เวลานาน จึงควรนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณแบบทวีคูณในเวลาอันรวดเร็ว โดยใช้ส่วนขยายพันธุ์เริ่มต้นจำนวนน้อย ทั้งยังสามารถขยายพันธุ์ให้สะดวกในการผลิตทำให้ได้ต้นหรืออาจได้เมล็ดจากส่วนหัวซึ่งมีสารเคมีจากเมทิลไกลอซิโนลอะตอม ถ้าตรวจพบใบแก่ลัดสีสารนี้มากก็

สามารถเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อสกัดสารนี้ โดยไม่ต้องลงทุนปลูกให้เป็นต้นเสียก่อน เป็นการประหยัดทุก ๆ ค่า และเนื่องจากยังไม่มีวิธีการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกิ่งเพื่อเร่งการขยายพันธุ์มาก่อน จึงควรศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกิ่งเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม และเห็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณของต้นคงได้บ้างเพียงพอ ในการนำไปใช้ทำประโยชน์ทั้งในทางเป็นยาและทางการผลิตสารเคมี จึงมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อหาว่าสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) และ MS คัดแปลงที่มีประสิทธิภาพทำให้ส่วนใดของหัวของกิ่งเจริญเป็นต้นและแคลลัส (callus) เป็นจำนวนมากที่สุดและมีน้ำหนักสดมากที่สุด
2. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหาร MS คัดแปลงที่ได้แคลลัสจากข้อ 1 เจริญเป็นต้นเป็นจำนวนมากที่สุดและมีน้ำหนักสดมากที่สุด

3. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหาร MS คัดแปลงที่ทำให้ยอดจากข้อ 1 เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ใบแก่จากใบที่สุกและมีน้ำหนักมากที่สุด
4. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหาร MS คัดแปลงที่ทำให้ส่วน ก ข และ ค เจริญโตมากที่สุดและมีน้ำหนักมากที่สุด
5. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหาร MS คัดแปลงที่ทำให้แคลลัสเจริญโตมากที่สุดและมีน้ำหนักมากที่สุด

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. หาคำตอบว่าชิ้นส่วนของหัวคองคิงที่นำมาเพาะเลี้ยงแล้วเจริญเป็นต้นพืชได้
2. ใ้สูตรอาหาร MS คัดแปลงที่ความเหมาะสมกับชิ้นส่วนของหัวคองคิงให้เกิดแคลลัสและเกิดต้นที่สมบูรณ์
3. เชื่อว่าให้เห็นแนวทางในการเร่งขยายพันธุ์พืชหัวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทางการผลิตสินค้าอาหารและยา

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. พืชที่นำมาสกัดสารให้เฉพาะหัวคองคิง (*Gloriosa superba* Linn.)
2. สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวคองคิงมีดังนี้
 - 2.1 สูตร MS
 - 2.2 สูตร MS คัดแปลงที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตต่าง ๆ ได้แก่ 6-benzyladenine) BAP (1-naphthalene acetic acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ลงในอาหารสูตร MS ในระดับความเข้มข้นเป็นอัตราส่วนต่าง ๆ กัน (ตาราง 2 ภาคผนวก)

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. อาหารสูตร MS หมายถึง สูตรอาหารมาตรฐานของมูราซึกิ และสูกุ (Murasige and SUGU, 1962, 1971, 1977)
2. หัวคองคิง (lupercus root) หมายถึง ส่วนของรากที่สะสมอาหาร ประกอบด้วย 5 ส่วนเท่า ๆ กัน ดังนี้
 - 2.1 ส่วน ก หมายถึง ชิ้นส่วน 1 ส่วนของหัวคองคิง ส่วนกลางหัวคองคิงที่เคยมีลำต้นแตกออก
 - 2.2 ส่วน ข หมายถึง ชิ้นส่วน 2 ส่วนของหัวคองคิงตัดจากส่วน ก ทั้งสองข้างเข้ามารวมกัน ค
 - 2.3 ส่วน ง หมายถึง ชิ้นส่วนปลายสุด 2 ส่วนของหัวคองคิง
3. แคลลัส หมายถึง กลุ่มของเรซินาเรโนไมมา (calenchyma cell) ที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นหรือราก
4. ต้นที่สมบูรณ์ หมายถึง ต้นที่มีครบทั้งลำต้นและราก

เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

- เริ่มทดลองเมื่อ 21 มิถุนายน 2526
 สิ้นสุดการทดลอง 7 พฤษภาคม 2527
 สถานที่ทดลอง ไร่นองปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คองคิง (Gloriosa superba Linn.) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแอฟริกา และเอเชีย เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในตระกูล Liliaceae มีชื่อสามัญว่า Glory lily Superbilly Turk's cap Flame lily Gloriosa lily และ Climbing lily เพราะเป็นพืชกึ่งไม้เลื้อยและกึ่งพืชล้มลุก (เต็ม สมิตินันท์ 2518 : 155 - 156) G. superba เป็นพันธุ์พื้นเมือง พบบริเวณทางภาคใต้ของประเทศไทย ตั้งแต่เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ลงไป มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น กลอริโอซา คองคิง คาวคิงส์ วานกัมปู พันมหา มะชาโง้ง คมขวาน หัวขวาน บ้องขวาน เพราะมีหัวลักษณะคล้ายหัวขวาน (พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ 2524 : 193) มีลักษณะโดยทั่วไปดังนี้คือ รากเป็นรากหัว มีสีน้ำตาลอ่อน ผิวเป็นมัน ลักษณะยาวรูปร่างกลมขนาดสม่ำเสมอ มีจุดกำเนิดใหม่อยู่ทางด้านบนปลายของหัว รากหัวนี้ใช้เป็นที่ยึดเกาะอาหาร มีลักษณะคล้ายเงี่ยงของกระชายที่ต่อเนื่องกันจากโคนต้นที่ให้กำเนิด และมีรากฝอยเกิดที่โคนลำต้นทำหน้าที่ยึดพื้นดิน ดูน้ำและแร่ธาตุ ไปเลี้ยงลำต้นให้เจริญเติบโต ลำต้นที่เติบโตเต็มที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1.0 เซนติเมตร สูงประมาณ 60 - 180 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ไม่มีก้านใบ ใบมีรูปร่างมนรีคล้ายหอก ปลายใบแหลมเรียวยาว ตรงปลายสุดมนงอ ทำหน้าที่เป็นมือเกาะเพื่อพยุงลำต้น ใบยาวประมาณ 5 - 7 เซนติเมตร เส้นใบเรียงขนานกันตามความยาวของใบ เมื่อเกิดใบแท้ 3 - 4 ใบแรก การเรียงตัวของใบที่ติดกับลำต้นเป็นแบบสลับ (alternated arrangement ใบที่ถัดไปจากนั้นมีการจัดเรียงแบบตรงกันข้ามไปเรื่อย ๆ แต่ถ้าข้อใดเกิดดอกจะมีใบเพียงใบเดียว ตรงกันข้ามกับก้านดอก หรือถ้ามีการแตกแขนงใบจะเรียงแบบเป็นวง (whorled arrangement) แต่ละวงมีใบ 3 ใบ ดอกเป็นดอกเดี่ยวมี 6 กลีบ ยาวประมาณ 8 เซนติเมตร กลีบดอกเรียวบิดตามขอบกลีบ ดอกมีรูปร่างคล้ายกระดิ่งคว่ำมีสีเขียวนวล

เมื่อเริ่มบานปลายกลีบจะค่อย ๆ งอขึ้นทางด้านหลังจนกระทั่งปลายกลีบเกือบชนกัน ช่วงนี้ดอกจะมีสีเหลืองทรงโคนกลีบและขอบกลีบ ต่อจากนั้นกลีบดอกจะค่อย ๆ งาม กลับมาอยู่ในแนวระนาบและดอกจะเริ่มสีสีแดง บริเวณสีแดงจะแผ่ไปเรื่อย ๆ จนกลายเป็นสีแดงทั้งกลีบดอก ดอกที่บานเต็มที่ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 - 15 เซนติเมตร มีเกสรตัวผู้ 6 อัน ซึ่งไปทางด้านหลังทรงกลางของอับเรณูติดอยู่กับปลายสุดของ ก้านชูทำให้อับเรณูหันไปมาได้ (dorsifixed anther) เห็นเกสรตัวเมียไม่ชัดเจน ไข่สีเขียวมี 3 พู ผลเป็นฝักสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาล เริ่มตั้งแต่ดอกได้รับการถ่ายละอองเกสรจนเมล็ดแก่ใช้เวลาประมาณ 50 วัน ลักษณะเมล็ดค่อนข้างกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 0.8 เซนติเมตร คงทิ้งขยายพันธุ์ได้ 2 วิธีคือการแยกหัวและเพาะเมล็ด (เต็ม สมิกินันท์ 2518 : 155 - 156 และ ปรีดี เอกะวิภาต 2526 : 58 - 67)

ประวัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) เป็นเทคนิคการนำเอาอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น เนื้อเยื่อ เซล หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังที่เรียกว่า โปรโตพลาส (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล ไวตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโต (plant growth regulator) ในสภาพปลอดเชื้อรา แบคทีเรียและสาหร่าย ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นและแสงสว่างที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะเจริญไปเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์โดยตรง หรือเป็นเอ็มบริอยด์ (embryoid) หรือแคลลัสแล้วกลายเป็นต้นในที่สุด (อรรถิ สหวัชรินทร์ 2522 : 34 - 43) ซึ่งเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศแบบหนึ่ง เพื่อให้ได้ต้นพืชเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม สามารถขยายพันธุ์พืชให้ได้ต้นหรือแคลลัสมากตามต้องการ ในขณะที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์มีเพียง

จำนวนน้อย ในปัจจุบันที่จึงได้หาเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาถ่ายทอดพันธุ์กัน
 อย่างแพร่หลายและถูกต้องกับการลงทุน การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เริ่มมีขึ้น
 ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1902 โดยฮาเบอร์แลนด์ (Faherland) (Murashige,
 1977 : 127) ได้พยายามเอาเซลล์พืชจากใบเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์
 แต่ไม่ประสบความสำเร็จ นักวิทยาศาสตร์คนอื่น ๆ เสนอชื่อของฮาเบอร์แลนด์ที่ว่า
 เซลล์แต่ละเซลล์จะมีการแบ่งตัวและสามารถเจริญเป็นพืชใหม่ได้นั้นขาดไปตาม
 อีกหลายท่าน ในปี ค.ศ. 1934 ไทท์ได้พยายามพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลาย
 รากของมะเขือเทศ ในอาหารที่เติมเกลือแร่ ส่วนสกัดรากยาล์ (coarse tract)
 และน้ำตาลจากอ้อย มากกว่าครึ่งส่วนของรากมีการเจริญเติบโตดี (White,
 1934 : 585 - 600) ในปี ค.ศ. 1953 มิลเลอร์ และสก็อตทดลองเพาะเลี้ยง
 เนื้อเยื่อใจกลาง (bark) ของยาสูบ โดยใช้ไกลโคซิน (glucine) กระตุ้น
 ให้เกิดการสร้างตา (Miller and Skoog, 1953 : 768 - 773)
 ต่อมาในปี ค.ศ. 1962 บูราชิกและสก็อตได้ศึกษาปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารให้
 เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อยาสูบและเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด (Murashige
 and Skoog, 1962 : 473 - 497) และในปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยง
 เนื้อเยื่อของพืชได้ถูกนำไปใช้ในการวิจัยในห้องปฏิบัติการอย่างกว้างขวางทั้งในทาง
 ปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ การเพาะเลี้ยงละอองเกสร เพื่อผลิต
 ตัวผู้ที่มีवानานโครโมโซมเป็นรูปเดี่ยว (haploid) (Murashige, 1974
 135 - 166, 1974 : 170) ใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์เนื้อเยื่อให้ได้ต้นใหม่ที่มี
 ลักษณะเหมือนต้นแม่จากเวลาอันรวดเร็ว กับในกรณีที่ไ้ยังสะดวกปราศจาก
 เชื้อราและแบคทีเรีย (Murashige, 1974 : 135 - 166) ตลอดจนการ
 เก็บรวบรวมพันธุ์และการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศจากความสำเร็จของการเลี้ยง
 เนื้อเยื่อพืช บูราชิก (Murashige, 1974 : 135 - 166, 1977
 17 - 30) จึงได้สรุปขั้นตอนการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ดังนี้

1. การเตรียมเนื้อเยื่อพืชให้ปราศจากจุลินทรีย์ โดยยังงองีวีวักอยู่และนำไปเลี้ยงในอาหารให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไป
2. การเก็บปริมาณของเนื้อเยื่อที่ลอกจนฉวยวะและโครงสร้างอื่น ๆ ที่สามารถเจริญไปเป็นต้นพืชได้
3. การเทียบกันพืชก่อนย้ายปลูกลงดิน

ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเลี้ยง (Fvort and Mary. 1975 : 444 - 447, Murashige. 1974 : 170, 1977 : 127 - 130) ต้องมีการพิจารณาเกี่ยวกับตำแหน่งของชิ้นส่วนนั้น ความสูงวัย สภาพแวดล้อมที่นำมา ขนาดของเนื้อเยื่อและความสมบูรณ์ของต้นพืช (Murashige. 1974 : 170, 1977 : 127 - 130) ส่วนต่าง ๆ ของต้นไม้นั้น ๆ ไปพัฒนามา ้วยยาศัยโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ปลายยอด ใบ ราก กิ่งกอก และอื่น ๆ (Meyer. 1976 : 485 - 487) ชิ้นส่วนที่ได้จากส่วนดังกล่าวหรือส่วนของพืชที่ยังอ่อนจะงอกได้ดีกว่าเนื้อเยื่อของพืชที่เจริญเติบโตจนเต็มที่แล้ว (โบลล์ กวีเลิศวิทยา 2524 : 11) มูราชิกิได้รายงานว่าการเลือกส่วนของพืชที่ขนาดเล็กระหว่างความสะอาดได้ง่ายกว่า แต่การการดูแลรักษาและการเจริญจะต่ำกว่าชิ้นส่วนขนาดใหญ่ (Murashige. 1974 : 135 - 166, 1977 : 127 - 130)
2. การเตรียมเนื้อเยื่อ ความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นกับการเลือกอาหารที่เหมาะสม นอกจากที่เราก่อนทุกชนิดสามารถจะเจริญได้บนอาหารซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ในปริมาณที่พอเหมาะ จากการให้สูตรอาหารของมูราชิกิและสก็อตในการทดลองใด ๆ ก็ตามน่าจะได้อาหารมูราชิกิและสก็อตเป็นตัวมาตรฐาน (Murashige and Skoog. 1962 : 473 - 497) อาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยสารประกอบต่าง ๆ ดังนี้

2.1 สารอินทรีย์ ประกอบด้วยแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แบ่งออกเป็น

2.1.1 สารอาหารหลัก ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส กากะกัน แคลเซียม และแมกนีเซียม (Murashige and Skoog, 1962 : 176)

2.1.2 สารอาหารรอง ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง สังกะสี โบรอน โบรมีน โซเดียม โคบอลต์ (Murashige and Skoog, 1962 : 477)

2.2 สารอินทรีย์ แบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้ดังนี้

2.2.1 การโบไฮเดรต เป็นแหล่งพลังงานที่นิยมใช้ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส โดยทั่วไปจะใช้ซูโครสประมาณ 2 - 3 เปอร์เซ็นต์ และในบางกรณีปรากฏว่ากลูโคสใช้ได้ดีกว่าซูโครส จากการทดลองยังไม่พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นที่ใช้ได้ดีกว่าซูโครสและกลูโคส (Murashige, 1974 : 135 - 166, White, 1951 : 231 - 242)

2.2.2 วิตามิน มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ไนอาซิน (niacin) หรือนิโคตินิกแอซิด (nicotinic acid) ไพริดอกซิน (pyridoxine) ไบโอติน (biotin) แพนโททีนิกแอซิด (panthothenic acid) และอินโนซิทอล (inositol) (White, 1951 : 231 - 242)

2.2.3 กรดอะมิโน เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ และส่งเสริมการเกิดราก ได้แก่ ไกลซีน (glycine) อาร์จินีน (arginine) กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) (Murashige, 1974 : 170)

2.2.4 สารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่

2.2.4.1 ออกซิน (auxins) ที่นิยมใช้ได้แก่

2, 4-D, IAA, IAA⁻ (indole acetic acid) และ IBA (indole butyric acid) ช่วยส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ กระตุ้นให้เกิดราก ถ้าความเข้มข้นของออกซินสูงเกินไปจะไปยับยั้งการเกิดรากได้ การใช้ออกซินเข้มข้นเดียวอาจทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตลดลง แต่ถ้าใช้ร่วมกับไซโตไคนิน ในอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดอาจทำให้การเจริญเติบโตเริ่มมากขึ้น จากการทดลองพบว่าถ้าใช้ออกซินมีความเข้มข้นสูง ไซโตไคนินต่ำ จะส่งเสริมการเจริญทางราก ถ้าออกซินต่ำ ไซโตไคนินสูง จะส่งเสริมการเจริญทางยอด (Murashige, 1974 135 - 166, Skoog and Miller, 1957 118 - 131)

2.2.4.2 ไซโตไคนิน (cytokinins) ที่นิยม

ได้แก่ IAA และไคเนตินมีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ (Biale, 1978 : 1 - 23) สำหรับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับชนิดของพืช การย่นอายุ 0.1 - 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Skoog and Miller, 1957 : 118 - 131)

2.3 สารที่ได้จากธรรมชาติ พบว่าการเติบโตของพืชที่ได้จากธรรมชาติลงในอาหาร จะช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญดีคือกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาขึ้น ที่นิยมได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ ส่วนสกัดจากยีสต์ น้ำสกัดจากกล้วย และหัวมันฝรั่ง (White, 1951 242)

2.4 น้ำ ปัสสาวะอาจเป็นตัวยับยั้งการงอกของเมล็ด (biological function) (Meyer, 1976 435 437)

3. สภาพอาหาร เนื้อเยื่อพืชบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารเหลว ส่วนการเพิ่มปริมาณและการเตรียมพืชก่อนย้ายปลูกจะเลี้ยงได้ดีในอาหารแข็ง แต่บางชนิดจะเลี้ยงได้ดีทั้งในระยะแรกและการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว (Murashige, 1974 154)

4. การหาความสะอาดชิ้นส่วน ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงจะต้องปราศจากจุลินทรีย์ เพราะอาหารจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต จะทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ

5. ระดับความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยที่สำคัญมาก เนื้อเยื่อพืชสามารถใช้อาหารได้ดีในสภาพที่เหมาะสม เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ pH อยู่ระหว่าง 5.0 - 6.5 (Puhan and Martin. 1967 15)

6. สภาพแวดล้อม

แสง แม้ว่าแสงที่เพียงพอได้ถูกมุ่งหมายเพื่อให้เนื้อเยื่อใช้แสงในการปรุงอาหาร แต่เพื่อช่วยการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (morphogenesis) มากกว่า (Murashige. 1971 157 - 158) จากการทดลองในต่างประเทศพบว่าแสงสีแดงกระตุ้นให้เกิดราก และแสงสีน้ำเงินกระตุ้นให้เกิดยอดในพืชบางชนิด สำหรับความเข้มแสงนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ จะเหมาะกับการเริ่มปริมาณเนื้อเยื่อ และความเข้มแสง 3,000 - 10,000 ลักซ์ เหมาะในช่วงก่อนย้ายปลูก ระยะเวลาในแสงขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยทั่วไปมักได้แสงแก่พืชประมาณ 16 ชั่วโมง แต่พืชบางชนิดต้องการแสงน้อยกว่า 16 ชั่วโมง

(Murashige. 1971 155 - 166) กุศเกษมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส เหมาะสมกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชล้มลุก (annual) และพืชยืนต้น (perennial) (Murashige. 1971 170)

ในต่างประเทศได้มีรายงานการขยายพันธุ์ไม้ดอกประเภทหัว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อน เช่น การขยายพันธุ์ Hyacinths (Pierl and Rubing. 1973 : 129 - 138) และ กล้วย (Gladiolus) Simonson and Hildebrandt. 1971 1817 - 1819, Ziv and others. 1970 671 - 676) หัวปลี (Banana. 1973 (1 60) กล้วย (Meyer and others. 1975 479 - 480) ลิ้น (Simmonds and Cumming. 1976 161 - 170) Haworthia (Kaul and Sahharval. 1972 377 - 385) และ Narcissus (Scrubbrook and others. 1976 816 - 819) เป็นต้น พืชหัวที่อยู่ในตระกูล Liliaceae ซึ่งได้นำมาศึกษาวิจัยทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ หัวแก้ว (Haworthia cooperi)

Allium porrum หัวหอม (*Allium cepa*. Linn.) หน่อไม้ฝรั่ง
(*Asparagus*) ลิลลี่ (*Lilium*)

ประยูทธ สุวรรณวิบูล (ประยูทธ สุวรรณวิบูล 2524 : 17) ได้ศึกษา
เพาะเลี้ยงแคลลัสบัวแก้ว (*Haworthia cooperi*) ในอาหารสูตร MS
ภายใต้อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส และความเข้มข้น 1,000 ลักซ์ พบว่าใน
อาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากและ
น้ำพักสคมากที่สุด อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวน
ต้นมากที่สุดและอาหารที่ไม่มี BA ให้น้ำพักสคมากที่สุด อาหารสูตรที่เติมน้ำมะพร้าว
ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ให้น้ำพักสคมากที่สุด น้ำมะพร้าว 40 เปอร์เซ็นต์ให้
จำนวนต้นมากที่สุด ในอาหารสูตรที่เติมไข่ชะเชือกที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
ให้น้ำพักสคจำนวนต้นและรากมากที่สุด น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์
ให้น้ำพักสคมากที่สุดและที่มีความเข้มข้น 40 กรัมน้ำเคียว ให้น้ำจำนวนต้นและรากมากที่สุด

คันสตันและชอร์ต (Dunstan and Short. 1979 37 - 43)
ทำการเพาะเลี้ยงส่วนล่างของหัว (basal regions) ของ *Allium*
porrum ในอาหาร BDS (Dunstan and Short. 1977 70 - 72)
ซึ่งเติม 2IP (6 (3-methyl-2-buten-1-ylamino) purine)
6.0 - 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.0 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจะได้
ยอดจำนวนมาก ในปี 1978 คันสตันและชอร์ต ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนหน่อ
อ่อนหัวหอมบนอาหารที่เติมไรโบไทโกลีน คือ 2IP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
และ NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บไว้ที่มีความยาวชักนำให้เกิด
แคลลัสและต้นอ่อน และเกิดยอดจำนวนมาก (Dunstan and Short. 1978
99 - 110)

เซซิลและบาร์เวอะ (Cecile and Barja. 1968 36 - 370)
สามารถเพาะเลี้ยงส่วน hypocotyl ของต้นหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus*
officinalis Linn) ให้เกิดแคลลัสได้ในอาหาร LS (Linsmaier and

Skoog. 1965) โดยเติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และโคเนติน ความเข้มข้น 0.135 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเลี้ยงในหลอดอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างของหลอดฟลูออโรไลต์ (TL 4010/33 tuber) ความเข้มของแสง 40 มิลลิแอมป์ต่อตารางเซนติเมตรต่อวินาที

ซิมมอนส์และคัมมิงส์ (Simmonds and Cumming. 1976 161 - 170) ได้เพาะเลี้ยงส่วนกลีบหัว (bulbscale) ของ *Lilium* 12 ชนิดในอาหาร MS ที่เติม DA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล (μ M) และ 2, 4-D ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและแคลลัสเจริญได้ดีในอาหารที่มี NH_4NO_3 10 มิลลิโมล และพบว่าเลี้ยงแคลลัสในอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมล ในที่มีแสงติดต่อกันตลอดเวลาสามารถชักนำให้เกิดต้น (plantlet)

ในปี 1980 ทากายามาและมิซาวะ (Takayama and Misawa. 1980 : 121 - 125) ได้เพาะเลี้ยงกลีบหัวของลิเลียอาหาร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มของหลอด 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 100 วัตต์ 40 วัตต์ ตลอด 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดหัวและเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนผสมของผงถ่าน ซึ่งใช้ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร การใช้หัวที่แก่กว่าหัวแรกมีความสามารถในการเกิดหัวใหม่ได้บ่อยกว่าที่ใช้หัวอ่อน ถ้าใช้กลีบหัวภายในและยังอ่อนจะมีการพัฒนาการอย่างมีประสิทธิภาพสูง และยังพบว่าความเข้มข้นของลิเลียที่ 5 องศาเซลเซียส และเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงหัววัยในอาหาร MS เป็นเวลา 4 เดือน จะหาการเกิดหัวได้ดี การกระตุ้นให้เกิดใบได้ดี โดยใช้ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร วัน 0.8 กรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

ในปี 1981 มาร์ทริกและบลอม บาร์นฮอร์น (Martrijk and Blom-Barnhoorn. 1981 261 - 268) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงหัวของ *Lilium speciosum* (Rubrum. No.10) ขนาดเส้นรอบวงหัว 18 - 20 เซนติเมตร และ *L. pirae* ขนาดเส้นรอบวงหัว 16 - 18 เซนติเมตร *L. ochaniment*

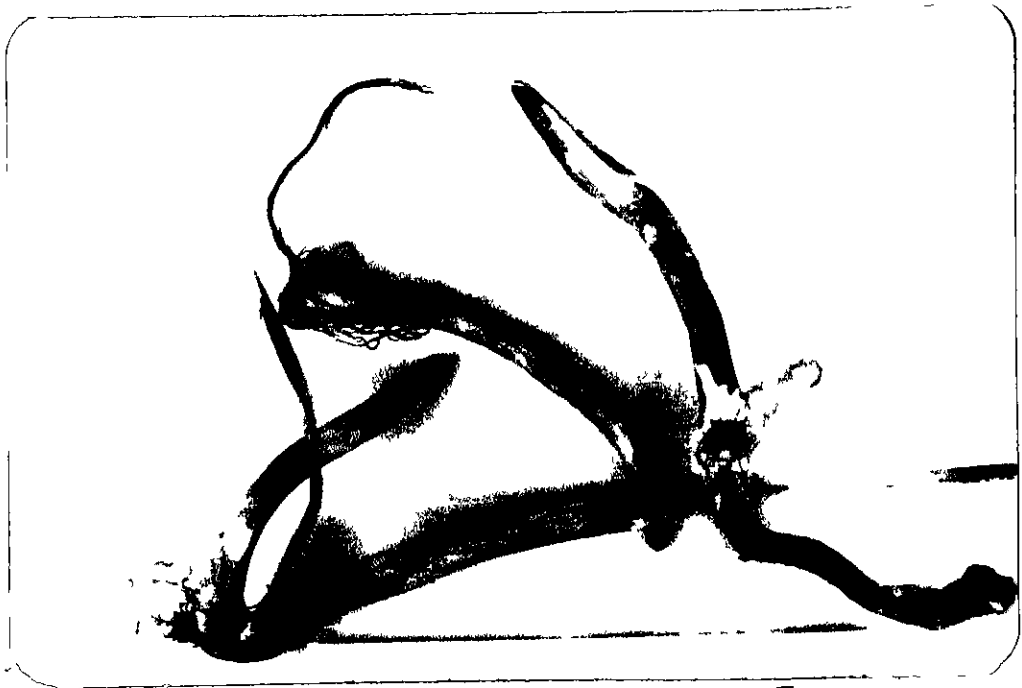
ขนาดเส้นรอบวงหัว 16 - 18 เซนติเมตร และ *L. connecticut King*
 ขนาดเส้นรอบวงหัว 16 - 18 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวในฤดูใบไม้ร่วง แช่หัวในเบนเลท
 (benlate) 0.2 เปอร์เซ็นต์ ไดโฟลแทน (difolatan) 1.5 เปอร์เซ็นต์
 และเก็บไว้ในที่เย็น 0 องศาเซลเซียส ใช้กลีบหัวชำชำผ่าใบใช้โรย เกล็ดไฮโปคลอไรด์
 (sodium hypochloride) 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วตัดขนาด
 7 x 7 มิลลิเมตร เก็บยบอาหาร MS ที่มีสารเร่งการเจริญเติบโตต่าง ๆ กัน คือ
 NAA ความเข้มข้น 0.05 - 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.01 - 0.10
 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียสในที่แสง ปรับ pH ให้ได้
 pH6 ทุกสูตรอาหาร พบว่า *Lilium speciosum* (Rubrum No. 10) ที่
 เก็บเกี่ยวในฤดูใบไม้ร่วงเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน LA ไม่ชักจูงให้เกิด
 อวัยวะขึ้นมาใหม่ แต่ N/A ความเข้มข้นที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร รบกวนให้เกิดการ
 พัฒนาการ *L. pirate* ใช้ NAA ที่เหมาะสมคือ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
L. enchantment ใช้ NAA ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 - 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
L. connecticut King ใช้ N/A ความเข้มข้นระหว่าง 1.0 - 5.0 มิลลิกรัม
 ต่อลิตร

บทที่ 3

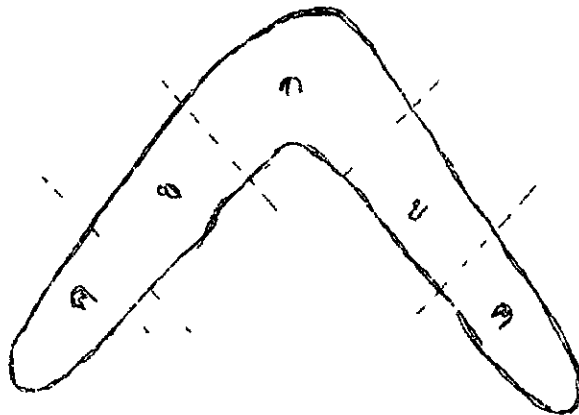
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

1. หัวของคองคิง (Gloriosa superba Linn.) (ภาพประกอบ 1)
แบ่งเป็น 5 ส่วนเท่า ๆ กัน ได้แก่ ส่วน ก 1 ส่วน ส่วน ข 2 ส่วน และส่วน ค
2 ส่วน (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 1 หัวของคองคิง (Gloriosa superba Linn)



ภาพประกอบ 2 แสดงการแบ่งหัวคองคิงเป็น 5 ส่วนเท่า ๆ กัน ความยาว 2 เซนติเมตร ได้แก่ ส่วน ก 1 ส่วน ส่วน ข 2 ส่วน และส่วน ค 2 ส่วน

2 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) (ตาราง 1 ภาคผนวก)

3 สารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่ 2, 4- D ไดคลอโรฟีนอกซี อะซิติก แอซิด (2, 4 - dichlorophenoxy acetic acid) α แอลฟาแนบทาลีน อะซิติก แอซิด ($\mathcal{L}$ - naphthalene acetic acid) และ 6 - เบนซิล อดีนีน (6 - benzyladenine)

4 สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอโรกซ์ เมอร์คิวริกคลอไรด์ เอทิล อัลกอฮอล์ และ ทวิน 20 (tween 20)

5 วุ้นและน้ำตาลซูโครส

6 เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดคอแคบ ขนาดจุ 60 มิลลิลิตร ขวดรูปชมพู่ ปิเปตต์ กระจกบดวาง จานเพาะเชื้อ และแท่งแก้วคนสาร

7. เครื่องใช้ตัดเนื้อเยื่อ ไก่ก๊วก ไก่เป่าก๊วก มาก 1 และตะเกียงอัลกอฮอล
8. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง เครื่องวัดอย่างละเอียด หนึ่งหน่วย
ความดัน (auclavac) และตู้เย็นเชื้อ (transfer hood)
9. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความจุอุณหภูมิที่ 25 - 27 องศาเซลเซียส มีรั้ววางขวดที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ให้ความเข้มข้น 1,000 ลักซ์
วางแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

วิธีทดลอง

1. การเตรียมอาหาร
 - 1.1 เตรียมสารละลายเข้มข้นอาหาร มูราซิกิและสจุก (MS)
กึ่งตาราง 1 ตาราง
 - 1.2 การเตรียมสารเร่งการเจริญเติบโตโดยรังสีแล้วละลายสาร
ในเอทานอลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ วานานเจ้านอย แล้วเก็บน้ำก้นในได้ความเข้มข้น
ตามต้องการ
 - 1.3 การเตรียมอาหาร 1 ลิตร มีขั้นตอนดังนี้คือ
 - 1.3.1 หักน้ำตาลซูโครส 50 กรัม
 - 1.3.2 เติมน้ำตาลละลายน้ำเชื้อเข้มข้น 1 (stock solution 1)
100 มิลลิลิตร
 - 1.3.3 เติมน้ำตาลละลายน้ำเชื้อเข้มข้น 2 (stock solution 2)
1 มิลลิลิตร
 - 1.3.4 เติมน้ำตาลละลายน้ำเชื้อเข้มข้น 3 (stock solution 3)
5 มิลลิลิตร
 - 1.3.5 เติมน้ำตาลละลายน้ำเชื้อเข้มข้น 4 (stock solution 4)
1 มิลลิลิตร

1.3.6 เก็บน้ำก้นผสมให้กรร 1 จิตร

1.3.7 ปริมาณ ไปได้ 5.6 ± 1 โดยใช้ 1N PC1 และ

1.3.8

1.3.8 เข้มข้น 0.6 กรัม

1.3.9 คำนวณจะจ่าย

1.3.10 เกล็ดอาหารประมาณ 10 มิลลิกรัม ปิดจุ

1.3.11 หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 - 20 นาที

1.3.12 ปล่อยให้เย็นลงเพื่อให้นำไปใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

2. การเตรียมเชื้อ

2.1 การปฏิบัติงานในห้องเชื้อ

2.1.1 ใช้กระดุมแก้วที่มีฝาปิด ปากคีม จานเพาะเชื้อ และปิเปตที่ใช้สำหรับ การใส่ น้ำคั้นน้ำเชื้อ แล้วนำไปทิ้งในหม้อน้ำ ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 - 20 นาที

2.1.2 เช็ดโต๊ะเก็บเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทุกครั้งก่อนนำเชื้อเข้าตู้เลี้ยงเนื้อ

2.2 ในระหว่างปฏิบัติงาน ทำความสะอาดปากคีม ปิดฝาขวดทุกครั้งที่ใช้ โดยจุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วอบไฟ ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3. การหาความสะอาดเนื้อเยื่อตัวทดลอง

3.1 ล้างแก้วคองคิงให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วล้างให้แห้งด้วยกระดาษซับ

3.2 ใส่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 - 2 นาที

3.3 เขย่าในสารละลายเมอร์คิวริกไอโอดีน 0.1 เปอร์เซ็นต์

นาน 15 นาที

- 3.4 เขย่าในสารละลายคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที
 3.5 ล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อโรคแล้วโดยทำในตู้เขี่ยเชื้อ
 4 วิธีตัดเนื้อเยื่อทำในตู้เขี่ยเชื้อโดย
 4.1 ตัดแบ่งหัวส่วน ก และ ข ให้มีขนาด $3 \times 3 \times 3$ ลูกบาศก์

มิลลิเมตร

4.2 ตัดส่วน ค ออกเป็นท่อนตามขวาง โดยวัดจากส่วนปลายสุดเข้ามา
 ให้ยาว 4 มิลลิเมตร

5 การเลี้ยงและการย้ายเนื้อเยื่อ

- 5.1 ใช้ปากคีบที่ทำความสะอาดแล้วจับชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารขวดละ
 1 ชิ้น นาไปวางบนถันวางขวดซึ่งให้แสงที่มีความเข้ม 1,000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง
 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส

5.2 สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์

5.3 ย้ายเนื้อเยื่อเปลี่ยนลงในขวดอาหารใหม่และตัดแบ่งเนื้อเยื่อ
 ที่เจริญทุก ๆ 4 สัปดาห์ เพื่อย้ายขวดเพิ่มปริมาณสำหรับการเร่งขยายพันธุ์แบบทวีคูณ

6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคองคิง แบ่งการทดลองเป็น 5 การทดลองคือ

- 6.1 การทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค
 ของหัวคองคิงในอาหาร MS และ MS คัดแปลง สูตรที่ 1 - 8 แต่ละสูตร
 ทาการทดลอง 10 ขวด

6.2 การทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้จากการทดลอง
 ที่ 1

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาตัดแบ่งให้มีลักษณะเป็นรูป
 สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาดประมาณ $3 \times 3 \times 3$ มิลลิเมตร และให้น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย
 0.27 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 9 - 14 แต่ละสูตรทาการ
 ทดลอง 10 ขวด

- 6.3 การทดลองที่ 3 เพาะเลี้ยงยอกที่ได้จากการทดลองที่ 1
นำยอกที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS
คัดแปลงสูตรที่ 15 - 39 แต่ละสูตรทำการทดลอง 5 ขวด
- 6.4 การทดลองที่ 4 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของ
หัวตองคิงในอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 15 - 39 แต่ละสูตรทำการทดลอง 10 ขวด
- 6.5 การทดลองที่ 5 เพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกิดจากการทดลองที่ 3
นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 3 มาตัดแบ่งให้มีลักษณะเป็นรูป
สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาดประมาณ $5 \times 5 \times 5$ มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย
0.49 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS คัดแปลงสูตรที่ 15 - 39 แต่ละสูตรทำการ
ทดลอง 5 ขวด

วิธีการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

1. ชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสและยอก เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน
2. นับจำนวนของยอกและจำนวนต้นที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน
3. ชั่งน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อและต้นที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน
4. ถ่ายภาพและบรรยายลักษณะชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

วิธีการย้ายต้นกองง่อออกปลูก

นำต้นกองง่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีใบและรากสมบูรณ์ แข็งแรง
ออกปลูกโดยล้างเอาวุ้นออกให้หมดก่อนปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร
ใช้วัสดุผสมสำหรับปลูกคือ แกลบ ดินร่วน ทราย ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 อบฆ่าเชื้อ
นำไปไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,000 ลักซ์ ตลอดเวลา
นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายกระถางออกมาไว้ในสภาพแสงคร่าไรอุณหภูมิปกติ เลี้ยงจน
ครบ 2 เดือน บันทึกผลการทดลองโดยทำการเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญเติบโตและการ
รอดชีวิต

ผลการศึกษาค้นคว้า

การทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิงในอาหาร
สูตร MS และ MS กัดแปลงสูตรที่ 1 - 8 (ตาราง 1) พบว่าไม่มีการพัฒนาเนื้อเยื่อ
ส่วน ก และ ข เป็นต้นเลยทั้งในอาหารสูตร MS และ MS กัดแปลง แต่เกิดแคลลัส
เมื่ออายุได้ 2 เดือน ลักษณะแคลลัสมีสีเขียวอ่อนและสีขาวใส แคลลัสลักษณะอ่อน
เซลล์ที่เกาะกันเป็นแคลลัสเกาะกันอย่างหลวม ๆ สังเกตได้จากตอนย้ายเนื้อเยื่อ
ผิวหน้าของแคลลัสไม่เรียบ และบริเวณที่เกิดคือบริเวณผิวนอกของเนื้อเยื่อ ยกเว้น
บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อส่วนใน ในอาหารสูตร MS กัดแปลง ซึ่งเติม 2, 4 - D
ความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 0.05 - 0.4 ppm (ภาพประกอบ 3 และ 4) ในอาหาร
สูตร MS ที่มี 2, 4 - D ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.5 และ 1.0 ppm แคลลัส
มีสีเขียวเข้มเกิดเซลล์เกาะกันหนาแน่น มีลักษณะแข็ง บางครั้งมีลักษณะเป็นเม็ด
หรือเป็นตุ่ม (ภาพประกอบ 5) การเกิดแคลลัสแบบนี้เกิดหลังจากเนื้อเยื่อผิวนอก
ของชิ้นส่วนเกิดใหม่มีลักษณะผิวขรุขระสีขาว เมื่อเนื้อเยื่อผิวแยกออกจะเกิดแคลลัส
สีเขียวใสเนื้อเยื่อเกาะ พบว่าส่วน ก เกิดแคลลัสได้มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด
1.98 กรัม เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.0 ppm
(ตาราง 1 และภาพประกอบ 6) และพบว่าน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อจะเพิ่มขึ้น
ตามความเข้มข้นของ 2, 4 - D ที่เพิ่มขึ้น ส่วน ข มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยง

ในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของ 2, 4 - D และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด 1 89 กรัม เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 - D 1.0 ppm (ตาราง 1 และภาพประกอบ 6)

การพัฒนาของเนื้อเยื่อส่วน ค ของหัวคองคิง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นขน ยอดกับแคลลัส และแคลลัส ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 - D จะเกิดยอด ยอดกับแคลลัส และแคลลัส ทุกสูตรอาหาร (ภาพประกอบ 7) แต่ส่วนใหญ่จะเกิดยอดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2, 4 - D ความเข้มข้นต่ำ การเกิดต้นที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต นั้นจะเกิดยอดสีขาวภายใน 2 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงและสร้างรากหลังจากเกิดยอดแล้วภายในเวลา 2 สัปดาห์ ยอดจะมีสีเขียว และนวลใบ รากมีสีขาว เขียวอ่อน ม่วงอ่อนและม่วงน้ำตาล เนื้อเยื่อบางชิ้นเกิดแคลลัสบริเวณปลายสุดและบริเวณผิวรอบ ๆ ชิ้นส่วน บางชิ้นเกิดตุ่มยอดสีขาว บริเวณโคนก้นพองออกเป็นกระเปาะสีเขียวอ่อน เมื่อเลี้ยงต่อไปครบ 2 เดือน พบว่ามียอดใหม่เกิดจากกระเปาะนี้ (ภาพประกอบ 8) และพบว่าในอาหารสูตรที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.05 ppm เกิดยอดใหม่ 2 ยอด จากกระเปาะที่เกิดระหว่างลำต้นของต้นเดิม และเกิดแคลลัสบริเวณฐานของยอดของเนื้อเยื่อเก่า (ภาพประกอบ 9) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้น 2, 4 - D เพิ่มขึ้นเป็น 0.5 และ 1.0 ppm เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสมากกว่าเจริญเป็นยอดหรือต้นใหม่ (ภาพประกอบ 7)



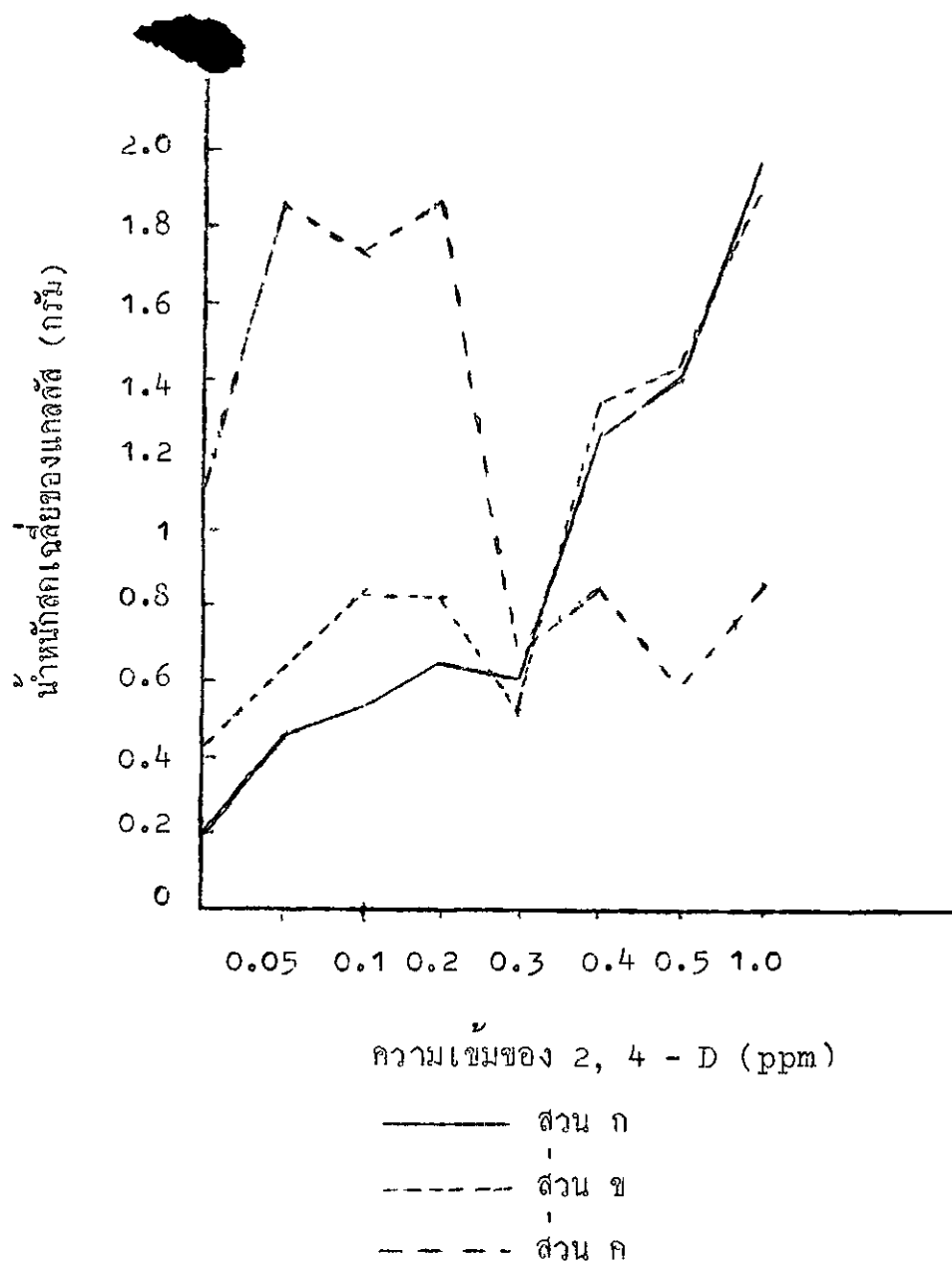
ภาพประกอบ 3 ลักษณะคลอรัลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก
ของหัวคองคิงในอาหารสูตร $MSD_{0.05}$ เป็นเวลา 2 เดือน

ภาพประกอบ 4 ลักษณะคลอรัลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ข ของหัวคองคิง
ในอาหารสูตร $MSD_{0.05}$ เป็นเวลา 2 เดือน

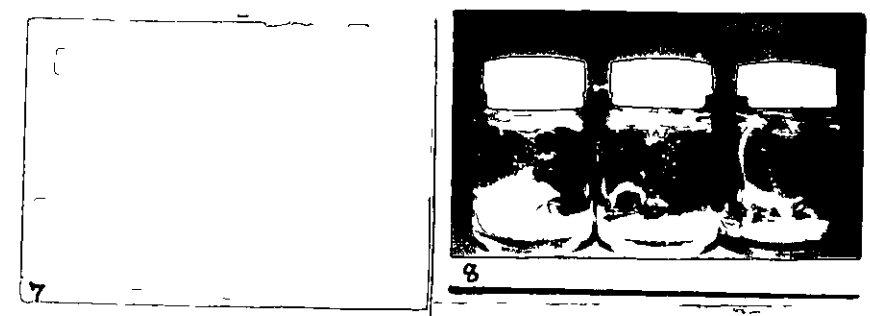
ภาพประกอบ 5 ลักษณะคลอรัลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ของหัว
คองคิงในอาหารสูตร $MSD_{1.0}$ เป็นเวลา 2 เดือน

ตาราง 1 น้ำหนักสเกลลี่ยของแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก
 ข และ ค ของหัวคองคิง ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงสูตร MSD
 เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสเกลลี่ยของ ส่วน ก (กรัม)	น้ำหนักสเกลลี่ยของ ส่วน ข (กรัม)	น้ำหนักสเกลลี่ยของ ส่วน ค (กรัม)
MS	0.20	0.42	1.12
MSD _{0.05}	0.46	0.63	1.86
MSD _{0.1}	0.53	0.83	1.74
MSD _{0.2}	0.65	0.82	1.87
MSD _{0.3}	0.60	0.53	0.69
MSD _{0.4}	1.25	1.34	0.85
MSD _{0.5}	1.40	1.42	0.59
MSD _{1.0}	1.98	1.89	0.84



ภาพประกอบ 6 เปรียบเทียบน้ำหนักตกเจือยของแคลด์ส เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSD ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 2 เดือน



ภาพประกอบ 7 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วน ค ของหัวคองคิง
ในอาหารสูตร MS และ MS7 ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.3
0.4 0.5 และ 1.0 ppm เป็นเวลา 2 เดือน

ภาพประกอบ 8 ลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วน ก ของหัวคองคิง ใน
อาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

ภาพประกอบ 9 ลักษณะแคลลัสและยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่วน ค ของหัวคองคิง
ในอาหารสูตร MSD_{0.05} เป็นเวลา 2 เดือน

สำหรับแก๊สที่เกิดจากการเผาเลี้ยงส่วน ค ในอาหาร MS และ MS คัดแปลงที่เติม 2, 4 - D พบว่า มีลักษณะแตกต่างกันคือ มีแก๊สสีสีขาว เหลืองอ่อน และน้ำตาลอ่อน ลักษณะเป็นปุ่ม หรือเป็นก้อนขนาดใหญ่ และมีลักษณะคล้ายรากสีขาว เป็นแผ่น ๆ ต่อกันเฉพาะในอาหารสูตรที่มี 2, 4 - D ความเข้มข้นต่ำ ส่วนในอาหาร MS สูตรที่มี 2, 4 - D ความเข้มข้นสูงขึ้น เกิดแก๊สสีเหลืองอ่อน ขนาดใหญ่ ไม่มีส่วนของรากหรือลักษณะคล้ายราก (ภาพประกอบ 7) เนื้อเยื่อส่วน ค ที่เผาเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงสูตรที่ 1 - 8 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 2, 4 - D ต่ำ และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 0.2 ppm โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.87 กรัม และน้ำหนักจะลดลงเมื่ออาหารมีความเข้มข้นของ 2, 4 - D ลดลง (ตาราง 1 และภาพประกอบ 6)

การทดลองที่ 2 เผาเลี้ยงแก๊สจากการทดลองที่ 1

เมื่อเผาเลี้ยงแก๊สจากส่วน ก ข และ ค ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงสูตร MSBA พบว่าในทุกสูตรอาหาร ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอหรือตุ่ม พบเพียงการเพิ่มปริมาณของแก๊สเล็กน้อย และเกิดเนื้อเยื่อคล้ายราก มีลักษณะเป็นเส้นสีขาว บางส่วนสีเขียวและในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 ppm เกิดลักษณะเนื้อเยื่อคล้ายรากที่มีสีเขียวมากที่สุด แต่ในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นสูง ลักษณะเนื้อเยื่อคล้ายรากจะลดน้อยลงเรื่อย ๆ (ภาพประกอบ 10)



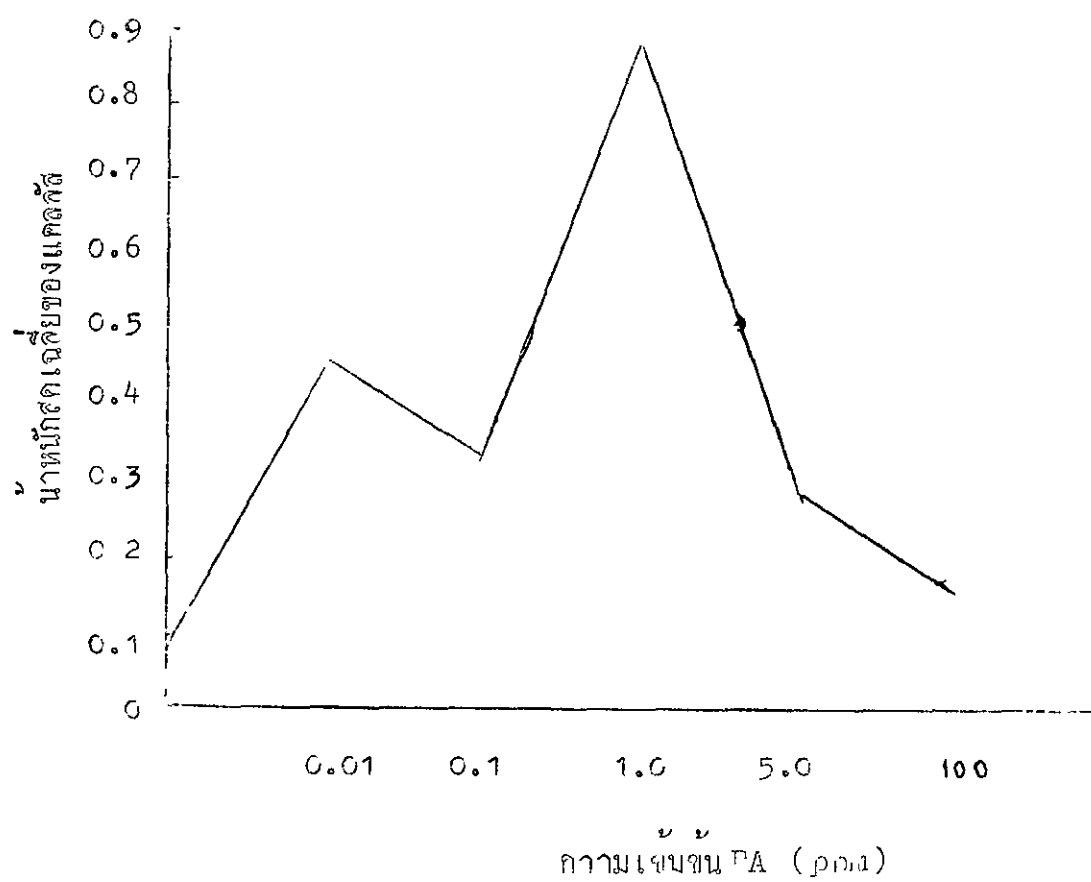
ภาพประกอบ 10 เปรียบเทียบแคลดัสและรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลดัสคองคิง
ในสูตรอาหาร สูตร MSBA_{0.01} MSBA_{1.0} MSBA_{5.0} MSBA_{10.0}
เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของแคลดัสจากทั้งสามส่วนของหัวคองคิง พบว่า
ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 1.0 ppm มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด
0.88 กรัม (ตาราง 2 และภาพประกอบ 11) และน้ำหนักสดของแคลดัสคองเมื่อ
เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นมากและน้อยกว่า 1.0 ppm

ตาราง 2 น้ำหนักสเกลลีของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MSBA เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสเกลลีของแคลลัส (กรัม)
MS	0.08
MSBA 0.01	0.46
MSBA 0.1	0.33
MSBA 1.0	0.88
MSBA 5.0	0.28
MSBA 10.0	0.15

ลักษณะของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง สูตร 9 - 15 ที่เติม EA มีลักษณะแตกต่างกันคือ แคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นต่ำ มีลักษณะคล้ายรากเป็นเส้น ๆ สีขาว บางส่วนสีเขียวและสีน้ำตาลอ่อน จำนวนมาก (ภาพประกอบ 10) และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้นสูงขึ้น ลักษณะคล้ายรากลดน้อยลง และพบแคลลัสมีสีเขียวอ่อน บางส่วนมีสีเขียวและเขียวอ่อนมากขึ้น แคลลัสแข็งเหนียวเกาะกันเป็นแคลลัสจะเกาะกันแน่น สังกะตจากตอนย้ายเนื้อเยื่อแคลลัสไม่หลุดออกจากกัน ยังพบอีกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้นสูง มีสีเขียวเกิดขึ้นเป็นบริเวณกว้าง และสีเขียวเข้มมากขึ้นเมื่อเลี้ยงต่อไปจนครบ 2 เดือน แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้ และเมื่อเลี้ยงต่อไปครบ 3 เดือน เนื้อเยื่อมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด



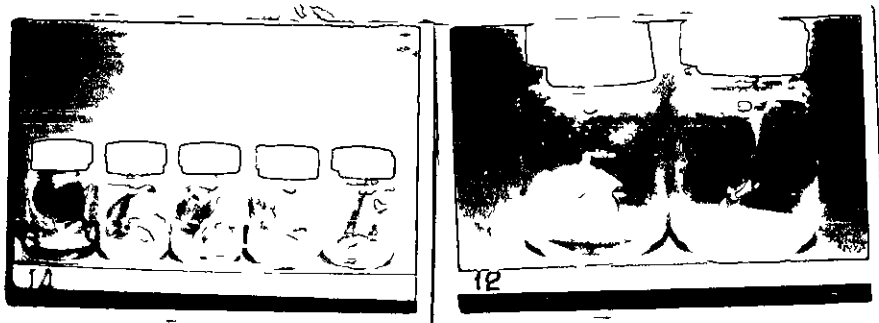
ภาพประกอบ 11 เปรียบเทียบน้ำหนักกรดเฉลี่ยของแคลคูลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS และ MSO เป็นเวลา 2 เดือน

การทดลองที่ 3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดที่เกิดจากการทดลองที่ 1

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนยอดของคองคิงจากการทดลองที่ 1 มาตัดแบ่งแล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง สูตร 15 - 39 (MS MSN MSBA และ MSBAN) มีผลการทดลองดังนี้คือ

1.1 การเกิดราก

เนื้อเยื่อส่วนยอดของคองคิงที่นำมาเลี้ยงจะสร้างรากได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm (ภาพประกอบ 12) และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด (ตาราง 6 และภาพประกอบ 13) นอกจากนี้ยังพบว่ายอดจะสร้างรากในอาหารสูตรอื่น ๆ เช่น NAA ความเข้มข้น 0.05 และ 0.5 ppm (ภาพประกอบ 14) ยกเว้นในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นสูง MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่ำร่วมกับ NAA ความเข้มข้นสูง และ MS ที่เติม BA ความเข้มข้นสูงร่วมกับ NAA ความเข้มข้นสูง ลักษณะรากที่เกิดขึ้นมีสีขาว ซึ่งเมื่อเลี้ยงต่อไปรากจะมีสีเขียวอ่อน และน้ำตาลอ่อน และพบว่ารากเจริญเติบโตตามความยาวได้รวดเร็ว



ภาพประกอบ 12 เปรียบเทียบลักษณะต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของคองคิง ในอาหารสูตร MSBN_{0.5}N_{0.05} MS เป็นเวลา 2 เดือน

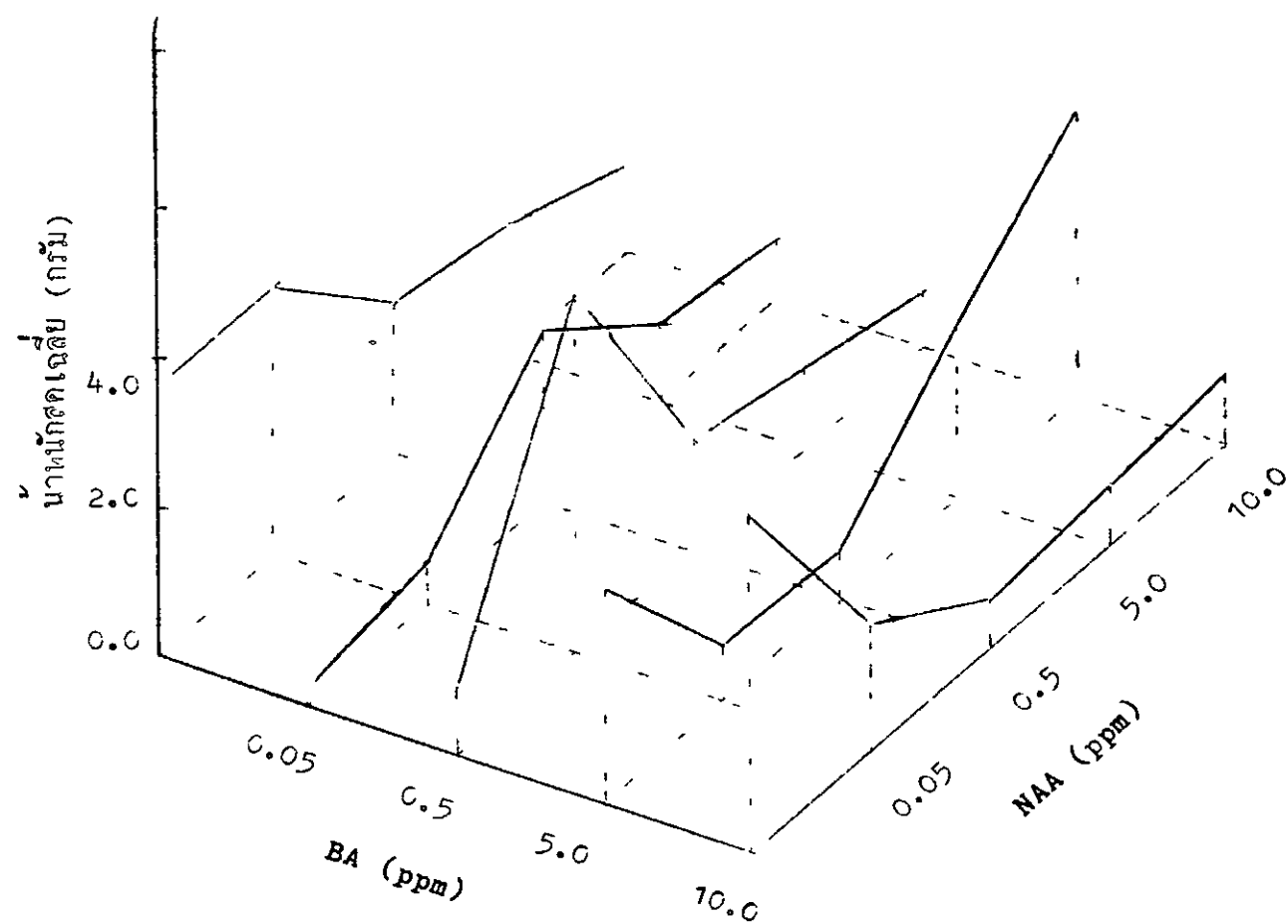
ภาพประกอบ 14 เปรียบเทียบลักษณะรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดของคองคิงในอาหารสูตร MS MSN_{0.05} MSN_{0.5} MSN_{5.0} MSN_{10.0} เป็นเวลา 2 เดือน

ตาราง 3 เปรียบเทียบหาปริมาณและน้ำหนักสเกลลีของบดที่ใส่ลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง สูตร MSPA MSN และ MSBAII (สูตร 15 - 39) เป็นเวลา 2 เดือน

PA (ppm)	คุณภาพและ ปริมาณ	NAA (ppm)				
		0.0	0.05	0.5	5.0	10.0
0.0	N	2.0	1.3	2.0	2.5	2.0
	W	3.61	3.57	2.00	1.75	1.12
0.05	N	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0
	W	0.23	0.61	2.33	1.02	1.83
0.5	N	2.0	1.25	1.17	2.00	1.67
	W	0.90	4.82	1.49	1.08	0.78
5.0	N	3.0	1.0	1.0	1.17	1.5
	W	2.87	0.73	0.62	2.25	3.84
10.0	N	6.0	1.0	1.0	1.0	1.67
	W	4.51	1.65	0.62	0.77	0.90

N = จำนวนยกลดเฉลี่ย (ยกล)

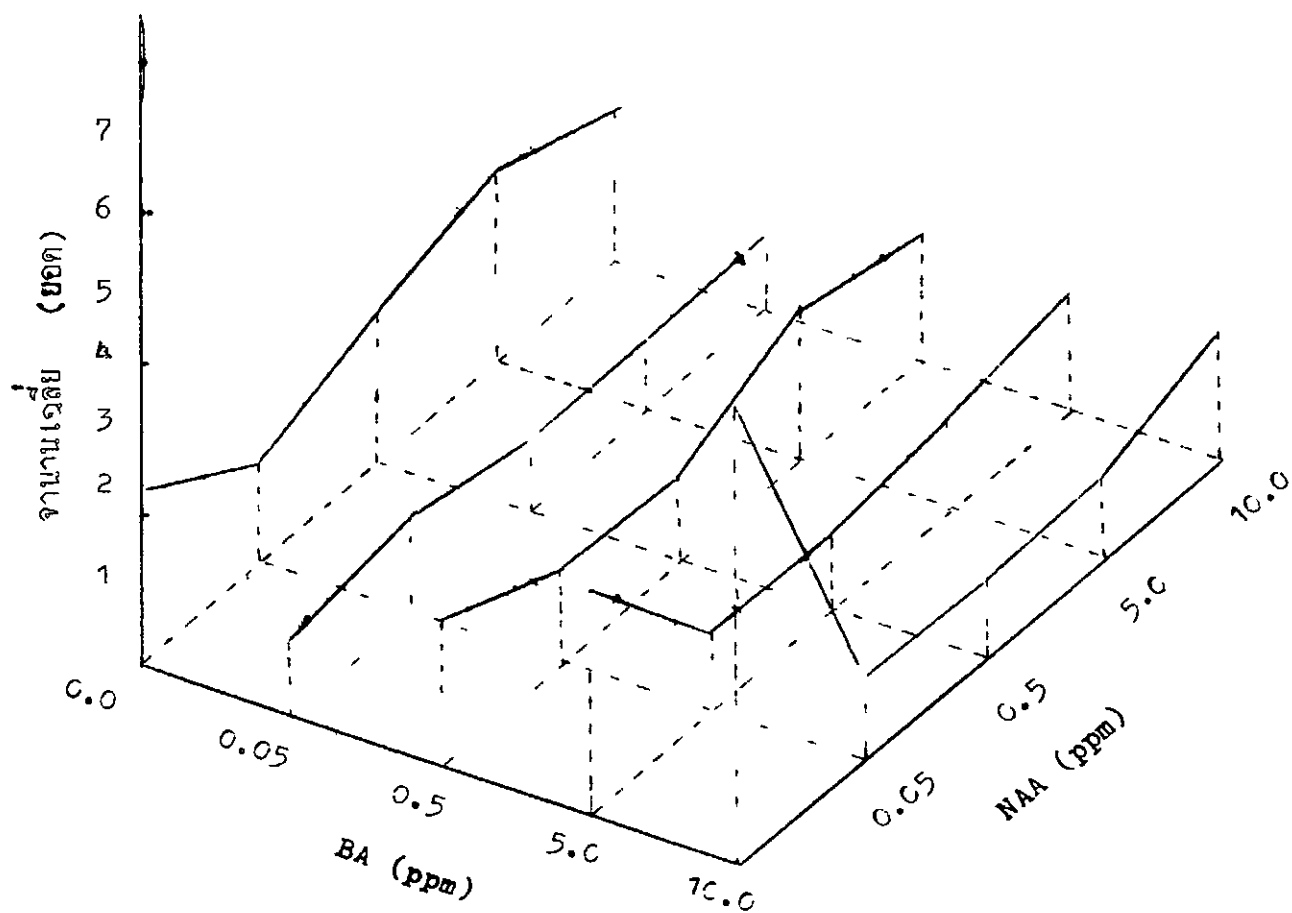
W = น้ำหนักสเกลลี (กรัม)



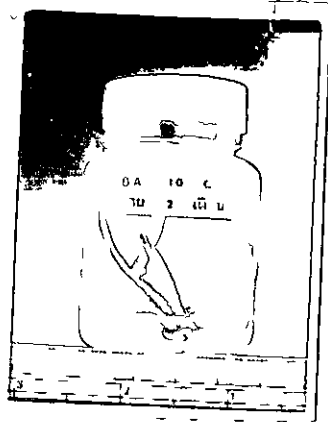
ภาพประกอบ 13 น้ำหนักเฉลี่ยของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS
 คัดแปลงสูตร 15 - 39 MSRA MSB MSJ MSK เป็นเวลา 2 เดือน

1.2 การเกิดยอดใหม่

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดในอาหารสูตร MS มียอดเกิดใหม่ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน โดยยอดใหม่จะเกิดจากกระเปาะสีเขียวอ่อนที่โคนต้นบริเวณที่สัมผัสกับอาหาร จำนวน 1 - 2 ยอด (ภาพประกอบ 13) ส่วนในอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม BA อย่างเดียว พบว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดเกิดการเจริญเติบโตสร้างยอดใหม่ มีจำนวนเฉลี่ยมากที่สุดจำนวน 6 ยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10 ppm (ตาราง 3 และภาพประกอบ 15) แต่ยอดที่ได้ไม่เกิดใบลักษณะของยอดอวบอ้วนสีเขียวอ่อนและไม่สร้างราก (ภาพประกอบ 16) สำหรับเนื้อเยื่อส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm พบว่าการเจริญเป็นยอดได้มีลักษณะแข็งแรง ลำต้นอวบอ้วน มีใบใหญ่ สีเขียวสด และสร้างรากสีขาวเล็กน้อย (ภาพประกอบ 16A) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าเนื้อเยื่อส่วนยอดเก่าเริ่มเหลืองหรือตายจะเกิดกระเปาะใหม่ สีเขียวอ่อนบริเวณโคนต้นแล้วเกิดยอดใหม่ในอาหารทุกสูตร ยกเว้นในเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสบริเวณโคนยอดจะไม่เกิดยอดใหม่ เช่น ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm (ภาพประกอบ 17) การเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA อย่างเดียวได้ยอดไม่อวบอ้วน แต่เกิดรากได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA ร่วมกับ NAA เกิดยอดมากกว่าเกิดราก ได้ยอดอวบอ้วน การเจริญทางยอดมากกว่าที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว ในการทดลองนี้ยังพบอีกว่า ถ้าไม่ตัดแบ่งชิ้นส่วนเดิมของส่วน ค ออก พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS



ภาพประกอบ 15 จำนวนเฉลี่ยของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS
 คัดแปลงสูตร 15 - 39 เป็นเวลา 2 เดือน



ภาพประกอบ 16 ลักษณะของคองคิงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSBA 10.0
เป็นเวลา 2 เดือน



ภาพประกอบ 16 A ลักษณะของคองคิงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSBA 5.0
เป็นเวลา 2 เดือน

ภาพประกอบ 17 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอกของคองคิงที่เพาะเลี้ยงใน
อาหารสูตร MS MSBA 0.05^N₅ เป็นเวลา 2 เดือน

ถั้ดแปลงที่เติม BA กับ I74A เกิดการสร้างแคลสสิสเฮอร์ริงบริเวณโคนยอด
ลักษณะเขตที่เกาะรวมกันเป็นแคลสสิสเกาะกับแกน มีลักษณะแข็ง สังกะไดจากการ
ย้ายเนื้อเยื่อแคลสสิสไม่ยุบลงไป

สำหรับน้ำหนักสดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อส่วนปลายที่เกาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS
และ MS ถั้ดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความ
เข้มข้น 0.05 ppm เป็นน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด 4.82 กรัม น้ำหนักสดเฉลี่ยน้อยที่สุด
0.23 กรัม ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm (ตาราง 3
และภาพประกอบ 13) จำนวนเฉลี่ยของต้นที่สมบูรณ์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ส่วนยอดของกิ่งในอาหารสูตร MS และ MS ถั้ดแปลงที่เติม BA และ NAA
พบว่าจำนวนเฉลี่ยของต้นที่สมบูรณ์มากที่สุด 4.0 ต้น ในอาหาร MS ที่เติม BA
ความเข้มข้น 10.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm (ตาราง 4)
ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm (ตาราง 4) น้ำหนัก
สดเฉลี่ยของต้นที่สมบูรณ์พบว่าในอาหารสูตร MS มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด 2.86 กรัม
และพบว่าอาหารทุกสูตรไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของต้นที่สมบูรณ์ (ตาราง 4)

ตาราง 4 เปรียบเทียบจำนวนและน้ำหนักสดเฉลี่ยของคนไข้ที่สมัครเข้าโครงการเพาะเลี้ยง
 ยอดของกองคิ่งในอาหารสูตร IIS MSEA MSN และ MSEAII (สูตร 15-39)
 เป็นเวลา 2 เดือน

EA (ppm)	ปริมาณและ คุณภาพ	NAA (ppm)				
		0.0	0.05	0.5	5.0	10.0
0.0	N	3.6	1.3	4.0	2.0	1.5
	W	2.86	2.15	1.81	1.75	1.40
0.05	N	1.0	1.5	2.0	0.0	0.0
	W	0.23	0.41	2.33	0.00	0.00
0.5	N	1.0	3.0	2.0	0.0	0.0
	W	0.13	1.29	0.85	0.00	0.00
5.0	N	1.0	2.0	0.0	0.0	1.0
	W	1.93	0.62	0.00	0.00	1.01
10.0	N	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0
	W	0.00	1.03	0.00	0.00	0.00

N = จำนวนเฉลี่ยของคนไข้ที่สมัคร (คน)

W = น้ำหนักสดเฉลี่ยของคนไข้ที่สมัคร (กรัม)

ผลการทดลองที่ 4 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิงในอาหาร
สูตร MS MSEA MSN MSBAN (สูตร 15 - 39)

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิงในอาหารสูตร
MS และ MS คัดแปลงสูตร 15 -39 มีผลการทดลองดังนี้

1.1 การเกิดแคลลัส

เนื้อเยื่อส่วน ก และ ข จะขยายขนาดใหญ่ขึ้นและสร้างเนื้อเยื่อ
นิวโทมีสีขาว ลักษณะผิวไม่เรียบ ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น
0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm และสูตร MS ซึ่งเติม BA
ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm เมื่อเพาะเลี้ยง
เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อส่วน ก และ ข สร้างแคลลัสในอาหารสูตร MS
ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 5.0 ppm BA ความเข้มข้น 0.05 ppm
ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ
NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm และ BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ
NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm การเกิดแคลลัสจะเกิดบริเวณผิวขอบนอกของเนื้อเยื่อ
ยกเว้นบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อภายใน แคลลัสมีสีเหลืองอ่อน ผิวไม่เรียบ
การรวมตัวของเซลล์ที่เป็นแคลลัส จะเกาะกันอย่างหลวม ๆ สังเกตได้ชัดเจนย้าย
เนื้อเยื่อเซลล์จะยุบและหลุดออกจากกันง่าย สำหรับเนื้อเยื่อส่วน ค เมื่อเพาะเลี้ยง
ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm
NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm และในอาหาร MS คัดแปลง สูตร BA ความ
เข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm BA ความเข้มข้น
0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm BA ความเข้มข้น 0.5 ppm
ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ
NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA
ความเข้มข้น 10.0 ppm BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA

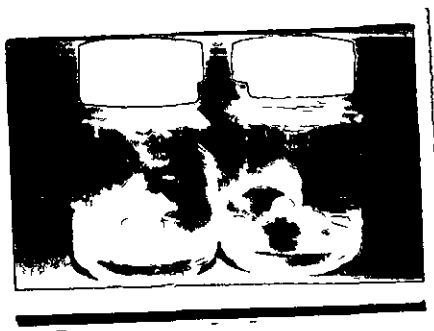
ความเข้มข้น 5.0 ppm และ BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm พบว่าเกิดแคลลัสบริเวณโคนยอด เนื้อเยื่อของชิ้นส่วนเดิมและแคลลัสลักษณะแข็งมีสีเหลืองอ่อน แต่ไม่มีการสร้างราก (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 ลักษณะยอดและแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดในอาหารสูตร MS MSBA_{0.5} N_{0.5} เป็นเวลา 2 เดือน

1.2 การเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก และ ข พบว่าไม่มีการเจริญพัฒนาไปเป็นยอดเลยไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารสูตรใด ๆ แต่เนื้อเยื่อส่วน ค เจริญเป็นยอด 1 ยอด นอกจากนี้ยังพบแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณชิ้นส่วนเดิม และโคนยอด แต่ไม่พบการสร้างราก (ภาพประกอบ 18) ในอาหารสูตร MS และ MS ทดลองที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm อาหารสูตร MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น

0.05 ppm MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm และ MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm ยกเว้นในอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm เกิดรากเล็กน้อยและเกิดยอดใหม่อีก 1 ยอด (ภาพประกอบ 19)



ภาพประกอบ 19 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอด ยอดใหม่และแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS MSBA_{5.0} N_{10.0} เป็นเวลา 2 เดือน

จากการทดลองพบว่าเกิดต้นที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm โดยเกิด 1 ยอด มีสีเขียว ลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง มี 3 ใบ เกิดราก 4 ราก และเกิดต้นที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm

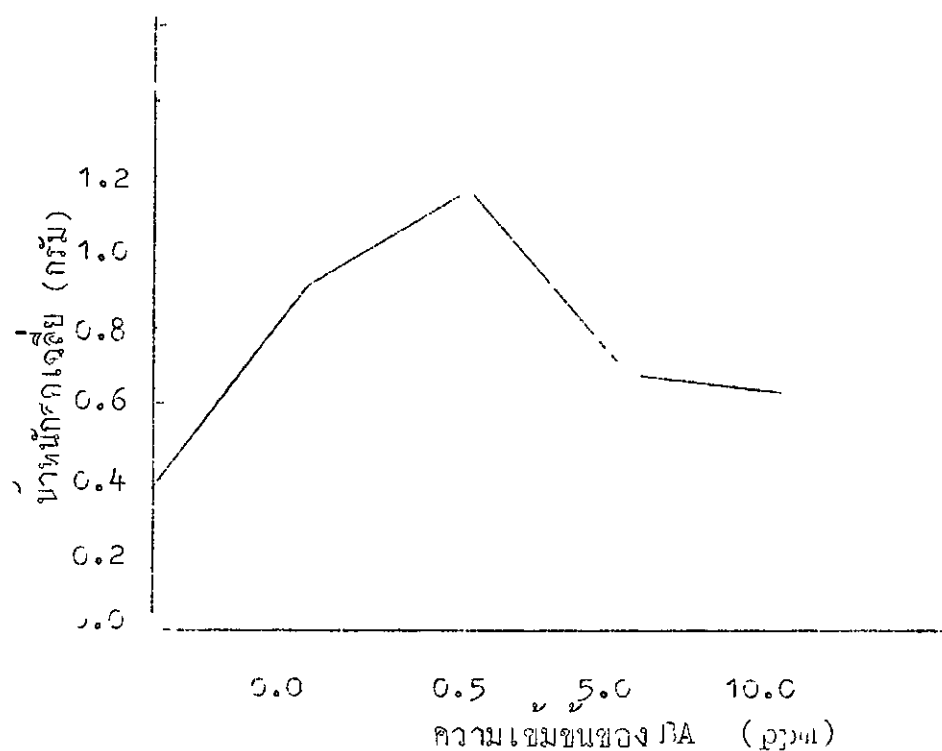
น้ำหนักสดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค - ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง
 ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงสูตรที่เติม BA กับ NAA ความเข้มข้น
 ต่าง ๆ กัน พบว่าเนื้อเยื่อส่วน ก มีน้ำหนักสดมากที่สุด 1.35 กรัม ในอาหารสูตร
 MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0
 ppm (ตาราง 5) สำหรับอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นสูง (MSBA₁₀)
 มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (MS)
 (ตาราง 5) และในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียวมีผลทำให้
 น้ำหนักสดลดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA (ตาราง 5) สำหรับเนื้อเยื่อส่วน ข
 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm
 ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด 1.27 กรัม
 (ตาราง 5) สำหรับอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียวพบว่า BA
 ความเข้มข้นต่ำทำให้น้ำหนักสดเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ทำให้
 น้ำหนักสดลดลง (ตาราง 5 และภาพประกอบ 20) ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม
 NAA อย่างเดียว น้ำหนักสดเพิ่มมากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA
 ความเข้มข้น 5 ppm และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA น้ำหนักสดลดลง (ตาราง 5
 และภาพประกอบ 21) เมื่อใช้ BA ร่วมกับ NAA ในอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่า
 ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความ
 เข้มข้น 0.05 ppm อาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm
 ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm และอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA
 ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm ทำให้น้ำหนักสด
 เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ยกเว้นสูตร MS ซึ่งเติม BA ความ
 เข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm ทำให้น้ำหนักสดลดลง
 (ตาราง 5) และยังพบว่าน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA
 ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 0.5 และ 5.0 ppm

ยกเว้นสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm (ตาราง 5)

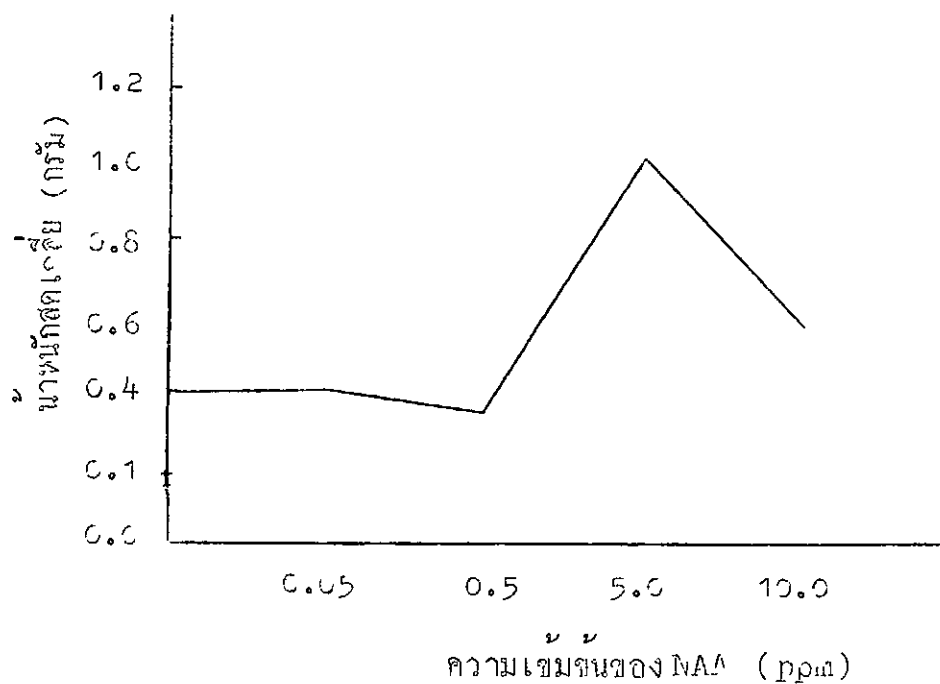
สำหรับเนื้อเยื่อส่วน ค พบว่ามีน้ำหนักสดมากที่สุด 4.07 กรัม ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ BA ร่วมกับ NAA คือ BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm (ตาราง 5 และภาพประกอบ 22) และพบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ NAA และใช้ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ทำให้น้ำหนักสดลดลง (ตาราง 5 และภาพประกอบ 22) เพื่อเปรียบเทียบกับการควบคุมพบว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อ

ตาราง 5 เปรียบเทียบน้ำหนักสเกลลีย์ของเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS MBA MSN และ MSBAN เป็นเวลา 2 เดือน

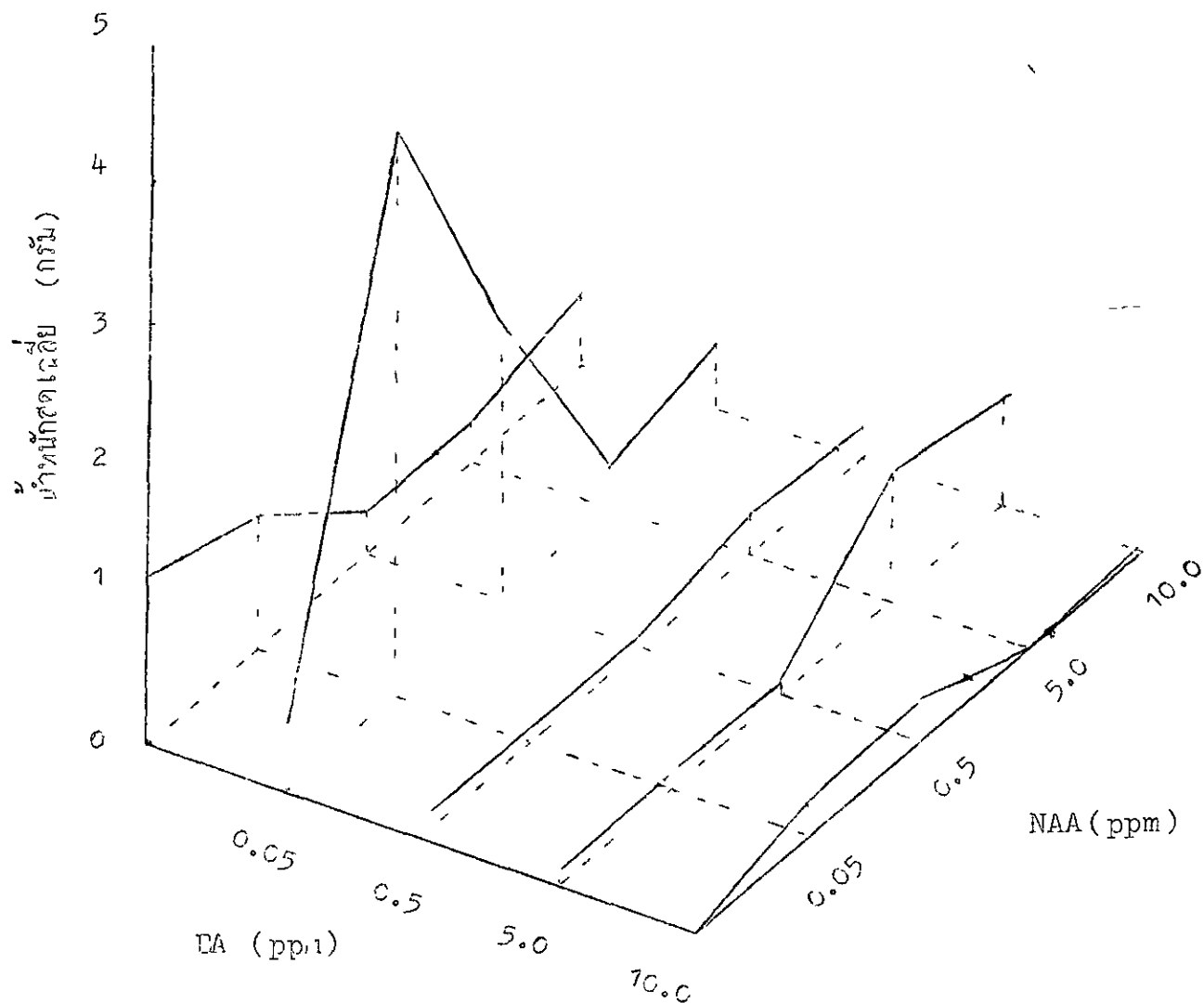
BA (ppm)	น้ำหนักเฉลี่ย ของชิ้นส่วน (กรัม)	NAA (ppm)				
		0.0	0.05	0.5	5.0	10.0
0.0	ก	0.36	0.61	0.58	0.62	0.30
	ข	0.38	0.40	0.44	1.01	0.57
	ค	1.20	0.95	0.30	0.25	0.52
0.05	ก	0.32	0.25	0.17	0.36	0.39
	ข	0.91	0.07	0.41	0.23	1.05
	ค	0.41	4.07	1.93	0.29	0.46
0.5	ก	0.23	0.34	0.08	0.91	1.35
	ข	1.16	0.41	0.47	0.64	0.45
	ค	0.13	0.19	0.10	0.28	0.21
5.0	ก	0.34	0.22	0.23	0.33	0.58
	ข	0.67	0.29	0.71	1.27	0.47
	ค	0.10	0.10	0.30	0.91	0.74
10.0	ก	0.44	0.26	0.22	0.25	0.81
	ข	0.62	1.09	0.32	0.33	0.99
	ค	0.02	0.25	0.25	0.02	0.06



ภาพประกอบ 20 น้ำหนักทดสอบของเนื้อเยื่อส่วน ข ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS-A เป็นเวลา 2 เดือน



ภาพประกอบ 21 น้ำหนักทดสอบของเนื้อเยื่อส่วน ข ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS1 เป็นเวลา 2 เดือน



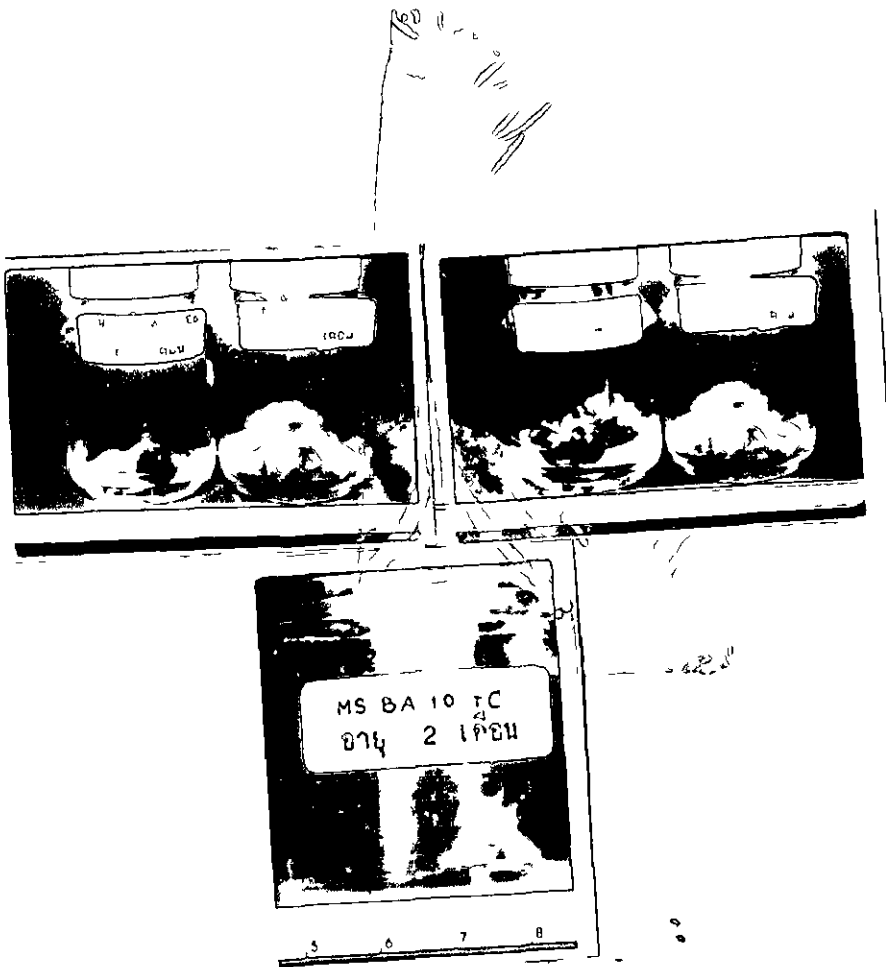
ภาพประกอบ 22 เปรียบเทียบน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อส่วน ค ขวงหัวคองคิงที่
เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSBA MSN MSPAT เป็นเวลา 2 เดือน

ผลการทดลองที่ 5 การเพาะเลี้ยงแกลสส์ที่เกิดจากการบดครั้งที่ 4 ในอาหาร

หรือ MS และ MS คัดแปลง ที่เติม BA และ NAA

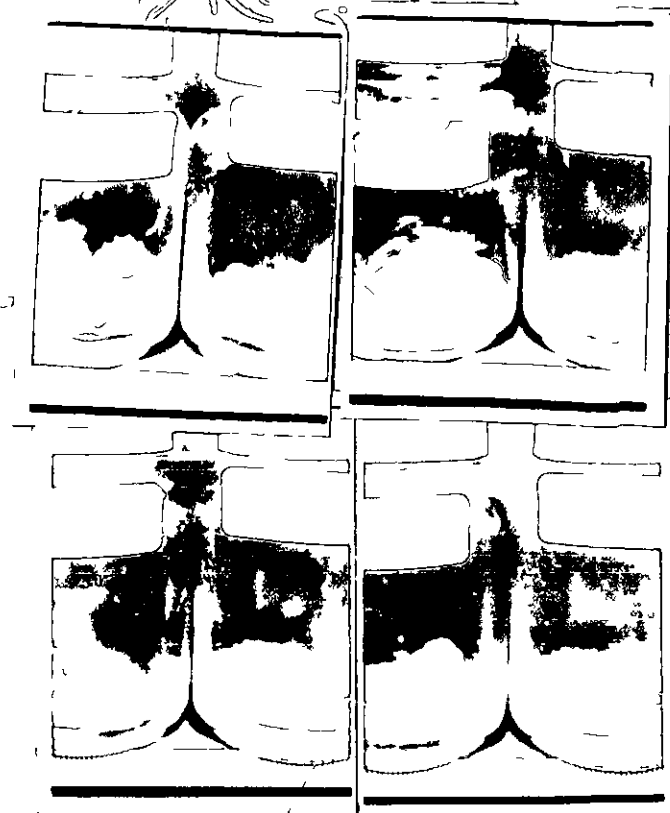
เมื่อนำแกลสส์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่วน ก และ ค ของหัวคองคิง มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงที่เติม BA และ NAA มีผลการทดลองดังนี้

1.1 การเกิดยอดจากเนื้อเยื่อพืชในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm แกลสส์ที่ได้เพาะเลี้ยงเกิดจากส่วน ก และมีสีเขียวเข้มของเนื้อเยื่อส่วนต้นเกิดอยู่จะเจริญเป็นยอด 1 ยอด มี 3 ใบ ลำต้นเจริญด้านความสูงอย่างรวดเร็ว และบริเวณโคนลำต้นมีสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 23) ยังพบว่า ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm พบว่าเกิดยอด 1 ยอดจากแกลสส์ของส่วน ค ที่ใช้ลักษณะอ่อน เจริญขึ้นมาเกาะกันเป็นแกลสส์เกาะกันอย่างหนาแน่น สืบเนื่องจากการย้ายเนื้อเยื่อ แกลสส์จะหลุดออกจากกันได้ง่าย แกลสส์เจริญเป็นยอดขนาดเล็กสีเขียวเมื่อเกิดรากและเนื้อเยื่อเริ่มเป็นสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 24) และพบว่าในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 10.0 ppm เกิดยอด 1 ยอด ไม่เกิดรากจากแกลสส์สีเหลืองที่มีบางส่วนเปลี่ยน (ภาพประกอบ 25)



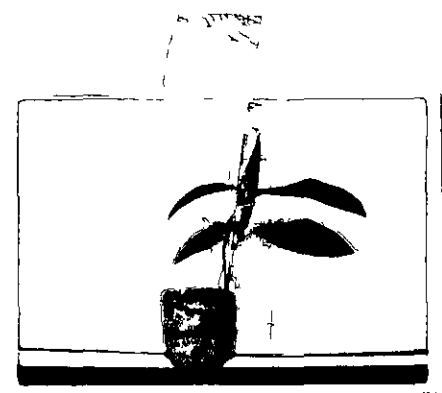
ภาพประกอบ 23 24 25 เปรียบเทียบยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียของคองคิง
 ในอาหารสูตร MSBA 5.0 MSBA 5.0 N 0.5 MSBA 10.0 เป็นเวลา 2 เดือน

1.2 การเกิดราก การพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสเจริญไปเป็นรากใน
อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต (ภาพประกอบ 26)



ภาพประกอบ 26 27 28 และ 29 เปรียบเทียบลักษณะรากและแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยง
แคลลัสในอาหารสูตร MSBA_{0.05} MS MSBA_{0.5} MS และ MSBA_{0.05} MS
ตามลำดับ เป็นเวลา 2 เดือน

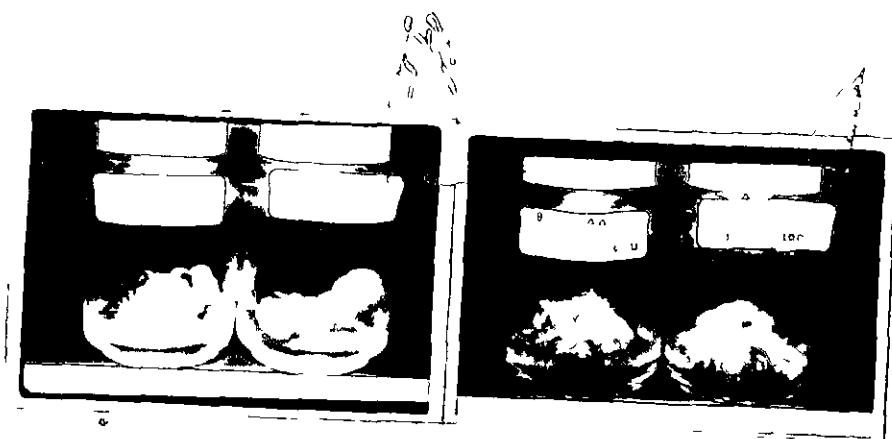
และพบการเกิดรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม BA หรือ
เพียงอย่างเดียวในความเข้มข้นต่ำ คือในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น
0.05 ppm MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm และ MS ที่เติม NAA ความ
เข้มข้น 0.05 ppm (ภาพประกอบ 27 28 และ 29) แคลลัสสร้างรากจำนวนมาก
ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm กับ NAA ความเข้มข้น
0.05 ppm (ภาพประกอบ 30)



ภาพประกอบ 30 ลักษณะรากที่มีสีขาวและเขียวที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของคองคิง ในอาหารสูตร MSBA $_{0.05N}$.005 และ MS เป็นเวลา 2 เดือน

ลักษณะรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm เป็นเส้นสีขาวอวบอ้วน บางส่วนสีเหลืองและเขียว ขนาดใหญ่ แต่รากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm และ MSNAA ความเข้มข้น 0.05 ppm ทั้งที่ใช้เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกันพบว่าลักษณะรากเป็นเส้นเล็ก เป็นกระจุก ส่วนใหญ่สีขาวเหลือง และบางส่วนมีสีเขียว

นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารสูตร MSN₅ และในอาหารสูตร MSBA ความเข้มข้นต่ำ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นสูง สูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm และสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm เกิดลักษณะคล้ายรากมีสีขาวเป็นก้อนอวบอ้วนขนาดใหญ่ หรือเป็นปุ่มปมสีขาวขนาดใหญ่อยู่ติด ๆ กันจำนวนมาก (ภาพประกอบ 31) และยังพบลักษณะเดียวกันนี้ในอาหารที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นสูงคือ BA ความเข้มข้น 5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5 ppm สูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10 ppm



ภาพประกอบ 31 32 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของราก และแคลลัสที่มีสีเขียว
 ในอาหารสูตร MSBA 0.05 N 5.0 MS MSBA 10.0 N 0.05 MS
 เป็นเวลา 2 เดือน

สำหรับในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นสูงกับ NAA ความเข้มข้น
 ต่ำ สูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 10.0 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น
 NAA 0.05 ppm พบลักษณะคล้ายรากเป็นเส้นสีขาวขนาดเล็กใหญ่ จำนวนมาก
 บางส่วนมีสีเขียว (ภาพประกอบ 32)

1.3 การเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่ามีการเพิ่มปริมาณแคลลัสเมื่อ
 เติบโตเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียว สูตร MS ซึ่งเติม BA
 ความเข้มข้น 10.0 ppm แคลลัสมีสีเขียวเหลืองและสีเขียวอ่อน ขนาดใหญ่ (ภาพประกอบ 33)



ภาพประกอบ 33 ลักษณะของแคลลัสที่มีสีเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 2 เดือน

การเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm แคลลัสจะมีสีเหลือง การใช้ BA ร่วมกับ NAA ยังพบว่าแคลลัสเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 10.0 ppm ร่วมกับ NAA 0.5 ppm MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 10 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5 ppm MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 10 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm แคลลัสมีสีเหลือง น้ำตาลอ่อน ข้ำตาลเข้ม

น้ำหนักสดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อแคลลัสที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงที่เติม BA กับ NAA พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด 7.23 กรัม (ตาราง 6 และภาพประกอบ 34) และพบว่าเนื้อเยื่อมีน้ำหนักน้อยที่สุด 0.53 กรัม ในอาหารสูตร ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ NAA น้ำหนักสดลดลงตามลำดับ (ตาราง 6) ส่วนในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียว พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อ

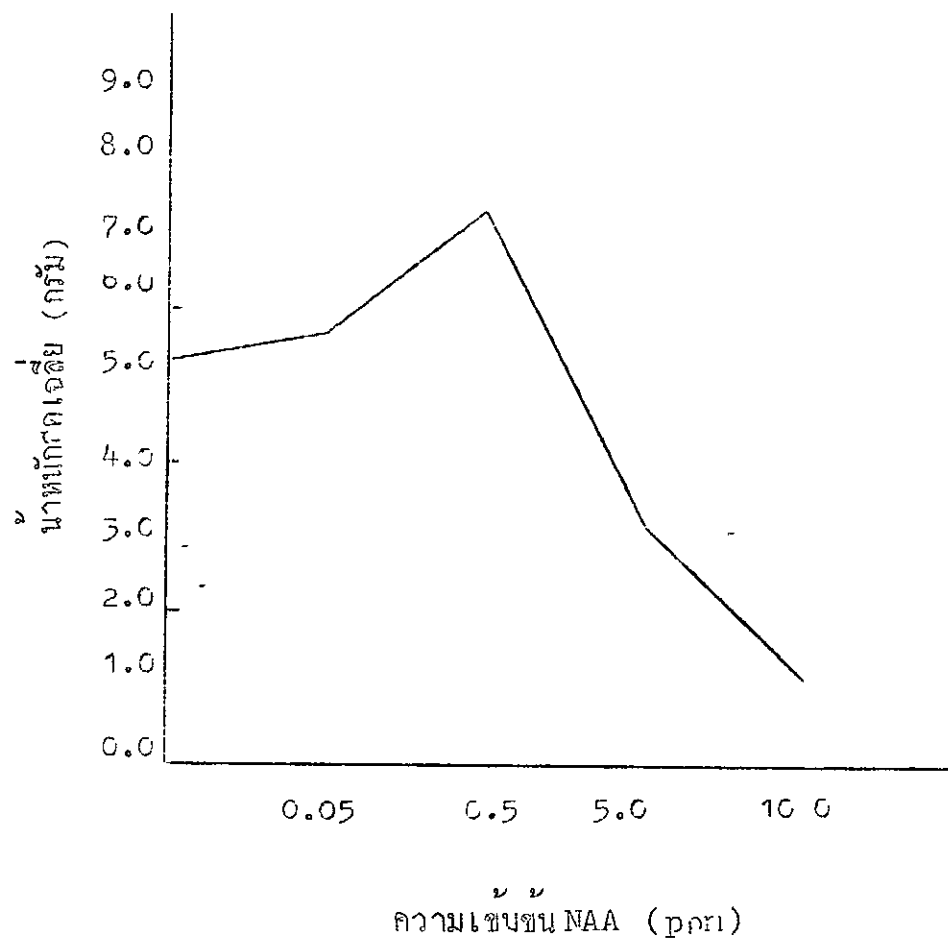
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แก้วน้ำ BA ร่วมกับ NAA ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.05 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm และที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA 0.5 ppm น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเป็น 7.16 และ 6.77 กรัม ตามลำดับ เมื่อใช้ BA ความเข้มข้นสูง ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่ำ ทำให้น้ำหนักสดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ BA ความเข้มข้นสูงร่วมกับ NAA ความเข้มข้นสูง น้ำหนักสดลดลงตามลำดับ (ตาราง 6 และภาพประกอบ 35)

ตาราง 6 เปรียบเทียบจำนวนเฉลี่ยของยอดและน้ำหนักสดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง สูตร 15 - 39 (MSEAN) เป็นเวลา 2 เดือน

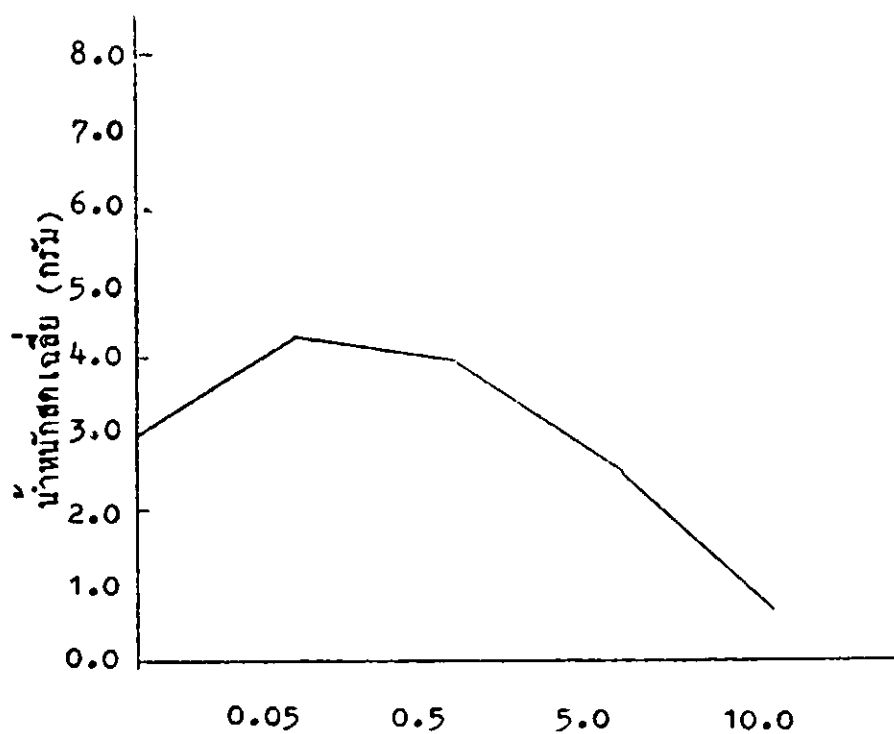
BA (ppm)	คุณภาพและ ปริมาณ	NAA (ppm)				
		0.0	0.05	0.5	5.0	10.0
0.0	W	5.25	5.61	7.23	3.90	1.09
	N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.05	W	2.98	7.16	2.58	2.74	1.87
	N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	W	3.01	2.13	6.77	2.88	2.09
	N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5.0	W	3.33	0.53	2.60	3.46	1.94
	N	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0
10.0	W	2.96	4.25	3.91	2.57	0.62
	N	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0

W = จำนวนยอดเฉลี่ยต่อขวด (ยอด)

N = น้ำหนักสดเฉลี่ยที่เก็บขึ้น (กรัม)



ภาพประกอบ 34 น้ำหนักสดของเนื้อเยื่อเมล็ดพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSN
เป็นเวลา 2 เดือน



BA_{5.0}N_n (n = ความเข้มข้นของ NAA ตั้งแต่ 0 - 10.0 ppm)

ภาพประกอบ 35 น้ำหนักสดของเนื้อเชื้อคลอสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSBA MSBAN
เป็นเวลา 2 เดือน

การนำต้นออกปลูก

จากการนำเอาต้นกองคิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (การทดลองที่ 3,4) ซึ่งมีใบและรากสมบูรณ์ ย้ายลงปลูกในกระถางนาไปไว้ในห้องที่อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส ในที่มีแสง 1,000 จักซ์ ตลอดเวลาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าทุกต้นรอดชีวิต และเมื่อย้ายกระถางออกมาไว้ในที่มีแสงแดดรำไร อุณหภูมิปกติ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีบางต้นตายไป หลังจากเลี้ยงได้ 2 เดือน พบว่า ต้นมีการเจริญเติบโตดี ใบมีขนาดใหญ่ ลักษณะแข็งแรง (ภาพประกอบ 36) พร้อมทั้งจะย้ายต้นลงปลูกในดินต่อไป

ภาพประกอบ 36 ต้นกองคิง Gloriosa superba Linn. ที่ย้ายลงปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร เป็นเวลา 2 เดือน

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการศึกษาครั้งนี้

1. เพื่อหาว่าสูตรอาหาร MS และ MS คัดแปลง สูตรที่ทำให้ขึ้นส่วนแต่ละส่วนของหัวคองคิงเจริญไปเป็นต้นและแคลลัส เห็นว่าปริมาณมากที่สุดและมีน้ำหนักสคมมากที่สุด

2. เพื่อคัดเลือกรูปร่างอาหาร MS คัดแปลง สูตรที่ทำให้แคลลัสจากข้อ 1 เจริญไปเป็นต้น เป็นจำนวนมากที่สุดและมีน้ำหนักสคมมากที่สุด

3. เพื่อคัดเลือกรูปร่างอาหาร MS คัดแปลง สูตรที่ทำให้ต้นจากข้อ 1 เจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์เป็นจำนวนมากที่สุด และมีน้ำหนักสคมมากที่สุด

4. เพื่อคัดเลือกรูปร่างอาหาร MS คัดแปลง สูตรที่ทำให้ขึ้นส่วนแต่ละส่วนของหัวคองคิงเจริญไปเป็นต้น และมีน้ำหนักสคมมากที่สุด

5. เพื่อคัดเลือกรูปร่างอาหาร MS คัดแปลง สูตรที่ทำให้แคลลัสจากข้อ 3 เจริญไปเป็นต้นและมีน้ำหนักสคมมากที่สุด

วิธีดำเนินการศึกษากัน

นำเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง นำมาใช้โดยแช่ในเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แลในกลอรอกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ฆ่าเชื้อแล้วในอาหารแข็งสูตร MS และ MS คัดแปลง ภายในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส ให้แสงที่มีความเข้ม 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง สูตรที่ 1 - 8 ซึ่งเติม 2,4- D

การทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์จากส่วน ก ข และ ค ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง สูตรที่ 9 - 14 ซึ่งเติม BA

การทดลองที่ 3 เพาะเลี้ยงยอดที่ได้จากการทดลองที่ 1 ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง สูตรที่ 15 - 39 ซึ่งเติม BA และ NAA

การทดลองที่ 4 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงสูตรที่ 15 - 39 ซึ่งเติม BA และ NAA

การทดลองที่ 5 เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทดลองที่ 3 ในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลงสูตร 15 - 39 ซึ่งเติม BA และ NAA

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัส ยอด และต้นที่สมบูรณ์
2. หาค่าเฉลี่ยจำนวนยอด
3. หาค่าเฉลี่ยจำนวนต้นที่สมบูรณ์
4. บรรยายลักษณะชิ้นส่วนของพืชจากภาพถ่าย

สรุปและอภิปรายผล

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS คัดแปลง ที่เติม 2,4-D พบว่า 2,4-D ให้อัตราการกระตุ้นเนื้อเยื่อให้สร้างแคลลัส แต่ไม่มีการกระตุ้นให้เกิดยอดหรือรากเลย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ สตีมาร์ท และคนอื่น ๆ (Stewart and others. 1980 313 - 315) ที่รายงานไว้ว่า 2,4-D ไม่สนับสนุนการเกิดยอดและราก และในการ

ทดลองนี้ การเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.05 - 1.0 ppm จะกระตุ้นให้น้ำเนื้อเยื่อ มีการสร้างแคลลัส แคลลัสมีน้ำหนักสดโดยเฉลี่ยมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 ppm ซึ่งสอดคล้องกับการ ทดลองของรัสเซย์ (Russey. 1975 253 - 262) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แกลดิโอลัส และกระตุ้นให้มีการสร้างแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความ เข้มข้น 0.12 - 2.0 ppm ทั้งนี้เนื่องจาก 2,4-D มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการ แบ่งตัวของเซลล์ (Leopold. 1967 361) เมื่อพิจารณาบริเวณที่เกิดแคลลัส พบว่าแคลลัสจะเกิดบริเวณผิวนอกของชิ้นส่วน ยกเว้นรอยตัดของผิวเนื้อเยื่อภายใน ซึ่ง ตรงกับการทดลองของ อนันธิตา โปษภุมณะ ที่รายงานว่าแคลลัสเกิดจากเซลล์ผิวได้ (อนันธิตา โปษภุมณะ 2522 : 91) และแคลลัสเกิดจากชิ้นส่วน ก ไคตี้ โดยถือน้ำหนักเป็นการเปรียบเทียบ จะเกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 ppm ส่วนการเพาะเลี้ยงส่วน ค พบว่าพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัส ยอกและต้นโกลยเกิดยอดในอาหาร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ ตั้งแต่ 0.05 0.1 และ 0.2 ppm และเมื่อเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นสูง เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสมากกว่าเจริญเป็นยอดหรือต้นใหม่ ความแตกต่างในการ เปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วน ก ข และ ค น่าจะเป็นผลมาจากส่วนที่ถูกกระตุ้นมีเนื้อเยื่อเจริญ หรืออาจเกิดจากความเปลี่ยนแปลงทางระบบสรีรวิทยาภายใน เช่น การเปลี่ยนแปลงระดับ ของฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อพืช (endogenous hormone) ระดับสารเคมีต่าง ๆ รวมทั้งอาหารที่สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อ (Wareing and Saunders. 1971 261 - 288) และอิทธิพลของ 2,4-D ในความเข้มข้นสูง ไม่เหมาะสมในการทำให้ เกิดยอด เนื้อเยื่อจึงเจริญเป็นแคลลัสมากกว่าเจริญเป็นยอดหรือต้น

การเกิดยอดและแคลลัสของส่วน ค น่าจะเป็นเพราะ 2,4-D ไปกระตุ้นการ แบ่งเซลล์บริเวณปลายสุดของส่วน ค ซึ่งมีจุดกำเนิดลักษณะกอด้ายตาหรือหน่อขนาดเล็กที่พร้อมจะ แบ่งเซลล์และเจริญเติบโต (ปรีดี เอกะวิภาต 2526 : 60) จากผลการทดลองพบว่า

เนื้อเยื่อส่วน ค สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสและยอดได้ในอาหารสูตรเดียวกัน อาจเป็นเพราะอายุการแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) ของส่วน ค ปริมาณออกซินและไซโตไคนินแตกต่างกัน จึงทำให้การตอบสนองของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญแตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ พีริค (Pierik. 1977 193 - 198) ที่ให้รายงานว่าอายุของเนื้อเยื่อมีอิทธิพลในการชักนำให้เกิดแคลลัสเพิ่มปริมาณแคลลัสตลอดจนการเกิดต้น จากการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อส่วน ค ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เกิดยอดเมื่อเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ยอดเจริญเป็นต้นและเกิดรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ นกกล ไกรพานนท์ (นกกล ไกรพานนท์ 2527 : 47) ที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ของกล้วยไม้ในอาหารสูตร MS จนเกิดห้วขยคมและห้วขยจะเจริญเป็นใบและรากสมบูรณ์ภายในเวลา 2 เดือน นอกจากนี้พีริค (Pierik. 1976 80 - 82) ให้รายงานว่าปริมาณไซโตไคนินมีผลในการชักนำให้เกิดต้น ส่วนการเกิดรากไปเกี่ยวข้องกับไซโตไคนิน ดังนั้น การเกิดรากจึงเกิดขึ้นได้ภายหลังและปริมาณรากที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการเติมออกซินหรืออาจเกิดขึ้นเองโดยไม่ต้องเติมออกซิน ในการทดลองนี้พบว่าในช่วงที่มีการเจริญของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วน ค ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.05 ppm จะประมาณหนึ่งที่ยอดนี้เริ่มแสดงอาการเหี่ยวเฉา ใบเหลือง แล้วกลับมีการสร้างเนื้อเยื่อบริเวณโคนยอดปัดกับกะเป็นกระเปาะสีเขียว และต่อมาเกิดยอดใหม่จำนวน 2 ยอด ลักษณะการเจริญเช่นนี้อาจอธิบายได้ว่าการปลุกหัวคองคิงในธรรมชาติ เมื่องอกลำต้นขึ้นมาแล้วจะมีรากหัวใหม่สีขาวเกิดขึ้นด้วยทันที (ปรีดี เอกะวิภาต 2526 : 60)

การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.01 0.1 1.0 5.0 และ 10.0 ppm พบว่าส่วน ก และ ข ของหัวคองคิงไม่เกิดยอดหรือต้น แต่แคลลัสเพิ่มปริมาณขึ้นเล็กน้อย และพบส่วนที่มีลักษณะคล้ายรากในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 ppm แสดงว่า BA อาจให้ผลในการกระตุ้นแคลลัส

ให้สร้างรากได้ ซึ่งตรงกับบททดลองของสตีมาร์ทและคนอื่น ๆ (Stamart and others. 1980 313 - 315) ซึ่งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกกึ่งหนึ่งของลิลลี่ (hybrid Lilium "Black Beauty") ในอาหาร LS (Linsmaier and Skoog. 1965) ซึ่งเติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วได้พบว่า BA ทำให้เกิดราก และเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ให้สูงขึ้นพบว่าเกิดรากน้อยลง การที่ไม่เกิดยอดหรือที่อาจจะเป็นเพราะมีปริมาณ 2,4-D พอเหมาะในการกระตุ้นเนื้อเยื่อและส่งเสริมให้เกิดการสร้างแคลลัส สอดคล้องกับรายงานของแกมบอร์คและเวดเดอร์ (Gamborg and Wether. 1975 1 - 40) ที่รายงานว่า 2,4-D ถูกทำลายได้เร็วกว่าออกซินชนิดอื่น และอาจจะเป็นไปได้ที่ BA มีอิทธิพลโดยตรงในการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ ฮัสเซย์ (Hussey. 1976 1323 - 1325) ที่ว่าการใช้ BA ที่ความเข้มข้นมาก จะชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อเลี้ยงแคลลัสต่อไปเป็นเวลา ๔ เดือน แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวตาล และตายในที่สุดอาจเป็นไปได้ว่าแคลลัสที่นำมาเลี้ยงในปิเปตที่ใกล้จะตายหรือตายไปเป็นบางส่วน เนื่องจากเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานานเกินไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ได้จากการทดลองที่ 1 ในอาหารสูตร MS MSBA MSN และ MSBAN พบว่าอาหารสูตร MSBA ซึ่งมี BA เพียงอย่างเดียว เป็นแนวโน้มเกิดยอดใหม่มากที่สุด ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10.0 ppm ก็อาจพบยอดเป็นเกณฑ์ จึงมักจะยอดที่เกิดขึ้นโดยไม่ตั้งใจ ยอดอาจมีสีเขียวสด แต่ยังไม่สร้างราก ซึ่งอธิบายได้ว่า BA กระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ก่อนที่จะเกิดการสร้างยอด (Hussey. 1976 : 1323 - 1325, 1977 : 287 - 296) และไซโตไคนิน (BA) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงมาก แต่ไม่สามารถทำงานโดยลำพัง (Hall. 1973 : 415 - 444) จึงทำให้ยอดที่ได้มีข้อสันนิษฐานเป็นแบบ multiple shoots และยังไม่เกิดราก และผลจากการทดลองพบว่า มีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณโคนยอด ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่ำ

ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นสูง และในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นต่ำ ตั้งแต่ 0.05 0.5 และ 5 ppm สามารถกระตุ้นให้เกิดรากได้เช่นเดียวกับการใช้ BA ร่วมกับ NAA ในความเข้มข้นต่ำและในอาหารสูตร MSN ซึ่งมี NAA เพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 0.05 และ 0.5 ppm แต่พบว่าในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm เกิดรากและมี น้ำหนักลดเฉลี่ยมากที่สุด ลักษณะรากที่เกิดขึ้นมีสีขาวและต่อไปจะมีสีเขียวอ่อน สีนํ้าตาล การเกิดรากในอาหารที่เติม NAA สอดคล้องกับการรายงานของ สกุกและมิลเลอร์ (Skooog and Miller, 1957 118 - 131) ที่รายงานว่า NAA ชักนำให้เกิดจุดกำเนิดราก ทำให้เนื้อเยื่อมีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก แต่ในอาหารที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปก็จะยับยั้งการเกิดรากได้ และการเกิดแคลลัสบริเวณโคนยอดในอาหาร MSBA ความเข้มข้นต่ำและ NAA ความเข้มข้นสูงอาจเป็นไปได้ว่าอัตราส่วนของออกซิน (NAA) ต่อไซโตไคนิน (BA) สูงกว่าอัตราส่วนสมดุล เนื้อเยื่อของยอดจึงเกิดรากและแคลลัส (Miller and Skooog, 1957 118 - 131) ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5 และ 10 ppm มีแนวโน้มที่สร้างใบและเจริญทางยอดมากกว่าในอาหารสูตร MSN ส่วนอาหารที่ใส่ BA ร่วมกับ NAA ยกดมีการเจริญเติบโตดีขึ้น ทั้งทางรากและทางใบ น่าจะอธิบายได้ว่าไซโตไคนิน (BA) และออกซิน (NAA) ส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน (Okazawa and others, 1966 862 - 869)

ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิงในอาหารสูตร MS และ MSBA MSN และ MSBAN คือ เนื้อเยื่อส่วน ก และ ข เกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm และ MS ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 5 ppm สอดคล้องกับการทดลองของซิมมอนส์และคัมมิง (Simmonds and Cumming, 1976 167 - 170) ซึ่งได้ทดลองเพาะเลี้ยงลิลี (Lilium hybrid II) ในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วได้พบว่าเนื้อเยื่อมีการสร้างแคลลัสได้ พบว่าเนื้อเยื่อส่วน ก เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดใน

อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ppm โดยเปรียบเทียบจากน้ำหนักเนื้อเยื่อส่วน ข เกิดแคลลัสได้ก่ที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5 ppm และส่วน ค เกิดแคลลัสและยอดไค้ที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่ำกว่าที่ใช้กับส่วน ก และส่วน ข คือ ใช้ BA และ NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm เท่ากัน จึงอธิบายได้ว่าออกซิน (NAA) และไซโตไคนิน (BA) ส่งเสริมการทำงานร่วมกันและกัน (Okazawa and others. 1966 862 - 869) จึงทำให้เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ BA ร่วมกับ NAA มีน้ำหนักสดมากกว่าเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่มี BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ค ในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 5.0 ppm NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm และ PA ร่วมกับ NAA ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าเนื้อเยื่อพัฒนาเป็นยอดไค้ 1 ยอดในเวลาต่อมาเมื่อแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิด และฐานของส่วนยอดไค้ไม่พบการสร้างราก อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณของออกซิน ไซโตไคนินและสารอื่น ๆ ในส่วน ค ของหัวคอดึงแต่ละหัวไปเท่ากัน จึงทำให้เกิดยอด และแคลลัสแตกต่างกัน (Murashige. 1977 17 - 30) นอกจากนี้การเกิด แคลลัสและต้นของเนื้อเยื่อส่วน ค ในอาหารสูตรเดียวกันนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการทำงานร่วมกันระหว่างออกซิน (NAA) และไซโตไคนิน (BA) ที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่อยู่บริเวณปลายสุดของส่วน ค เจริญเติบโตเป็นต้นโดยไม่ต้องผ่านการเป็นแคลลัส และอาจเนื่องจากอายุเนื้อเยื่อต่างกันซึ่งทำให้มีปริมาณออกซินและไซโตไคนินแตกต่างกัน จึงมีผลทำให้การตอบสนองของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญแตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ พีริก (Pierik. 1971 193 - 198) ที่ว่าอิทธิพลต่าง ๆ เช่น สูตรอาหารคักแปลงของ MS ปริมาณไซโตไคนิน อายุของเนื้อเยื่อมีผลชักนำให้เกิดแคลลัสเพิ่มปริมาณแคลลัสตลอดจนการเกิดต้น

การเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MSBA MSN และ MSBAN พบว่า การเติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm และ 10.0 ppm มีผลในการกระตุ้นแคลลัสที่มีสีเขียว ซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ค ให้เกิดยอดได้แต่ไม่สร้างราก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิลสัน (Wilson 1966) ที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของก้านช่อกกอนแกลดิโอลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม BA แล้วแคลลัสเจริญเป็นยอดแต่ไม่เกิดราก น่าจะอธิบายได้ว่า BA เป็นไซโตไคนินซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์เพื่อให้เจริญเป็นยอดแต่ไม่เกิดราก จึงอาจเป็นได้ว่า BA ยังยับยั้งการเกิดราก (Biale. 1978 1-23, Pierik. 1974 193 - 198) และพบว่าการเติม BA ร่วมกับ NAA ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 5.0 ppm กับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm มีผลในการกระตุ้นแคลลัสซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ค ให้เกิดยอดได้ แคลลัสชนิดนี้ประกอบด้วยเซลล์ที่ผนังเซลล์ไม่แข็งและมีสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสก็อตและมิลเลอร์ (Skog and Miller. 1957 118 - 131) ที่ได้รายงานไว้ว่าการเกิดเป็นต้น ราก หรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณไซโตไคนินกับออกซินในอาหาร ถ้าอัตราของไซโตไคนินและออกซินมีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้นและมีรากที่สมบูรณ์ แต่ถ้าไซโตไคนินมีปริมาณมากกว่าออกซิน เนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นยอด และถ้าออกซินมีปริมาณมากกว่าไซโตไคนิน เนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นแคลลัสและราก การเกิดยอดอย่างเดียวน่าจะเป็นเพราะว่าไซโตไคนิน (BA) และออกซิน (NAA) ที่เติมลงในอาหารมีอัตราส่วนไม่เหมาะสมต่อการเกิดต้นและราก

ผลการทดลองนี้พบว่าการเลี้ยงแคลลัสให้เกิดรากในอาหารที่เติม BA หรือ NAA ความเข้มข้นต่ำ (0.05 ppm) และในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นต่ำ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นสูง (MSBA 0.05N 10.0) ทำให้มีรากเพิ่มขึ้นมีการสร้างแคลลัสและรากมากขึ้นตามความเข้มข้นของ NAA ที่สูงขึ้น ตรงกับรายงานของ

โอกาซาวาและคนอื่น ๆ (Okazawa and others. 1966 862 - 869) ได้อธิบายว่าจำเป็นที่จะต้องเสริมปริมาณออกซินเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและจะช่วยกระตุ้นให้เกิดแคลลัส นอกจากนี้ยังช่วยให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตอีกด้วย แต่เนื้อเยื่อจะมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเดิม เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมทั้งออกซินและไซโตไคนิน เนื่องจากไซโตไคนินจะส่งเสริมปฏิกิริยาในการทำงานของออกซิน ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตดีขึ้น จึงทำให้แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นราก อัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินในระดับต่าง ๆ ทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อแตกต่างกันไป คือถ้าใช้ออกซิน (PAA) ความเข้มข้นสูงร่วมกับไซโตไคนิน (BA) ความเข้มข้นต่ำ จะช่วยให้เนื้อเยื่อมีการสร้างแคลลัสและมีรากเจริญขึ้นมา การที่แคลลัสเกิดรากเมื่อเลี้ยงใน BA ความเข้มข้นต่ำสอดคล้องกับรายงานของเดลิน (DeLvin. 1969) ที่พบว่าเมื่อใช้ไซโตไคนิน (BA) ที่มีความเข้มข้นต่ำทำให้ประสิทธิภาพต่อการเกิดจุดกำเนิดของราก (root initiation)

การนำต้นออกปลูก

เมื่อนำต้นคองคิงที่มีลำดับ ใบ และรากสมบูรณ์ปลูกในกระถางซึ่งบรรจุกลบดินร่วน และทรายในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 ในที่แสงและอุณหภูมิเช่นเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทุกต้นยังคงมีชีวิตอยู่ ทั้งนี้เป็นเพราะต้นคองคิงมีอาหารสะสมไว้ในหัว และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพภายในกระถางที่ปลูกซึ่งมีสภาพเหมือนในขวดอาหารได้ง่ายและเร็ว ดังนั้นภายใน 2 สัปดาห์ จึงสามารถย้ายกระถางออกมาไว้ในที่มีแสงรำไร อุณหภูมิปกติ เพื่อให้ต้นคองคิงสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพธรรมชาติได้ หลังจากนั้นเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนมีบางต้นตายไป อาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการบอบช้ำของเนื้อเยื่อในขณะย้ายปลูกและต้นเหล่านี้ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้ หรืออาจเป็นเพราะในขณะที่พืชกำลังปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่นี้ พืชได้รับเชื้อราจึงต้านทานโรคไม่ได้

ดังนั้นคนที่รอดตายจึงเป็นคนที่แข็งแรงและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในธรรมชาติได้

จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าเทคนิคที่จำเป็นในการขยายพันธุ์ของกิ่งด้วยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อควรปฏิบัติดังนี้

1. หากความสะอาดเนื้อเยื่อส่วน ก ข และ ค ของหัวคองคิง โดยแช่ในเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แล้วแช่ครั้งที่สองในคลอโรกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที
 2. กระตุ้นเนื้อเยื่อส่วน ค ให้สร้างยอดโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10.0 ppm
 3. กระตุ้นให้ขึ้นส่วนที่เป็นการสร้างยอดแล้วสร้างรากเพื่อให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS ถัดแปลง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5ppm
- จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของคองคิง *Gloriosa superba* Linn. พบว่าเนื้อเยื่อส่วน ก 1 ชิ้นส่วน จะให้ต้นใหม่ 6 ต้นในเวลา 3 เดือน ถ้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ค ในเวลา 1 ปี จะได้ต้นคองคิงถึง 1,296 ต้น และถ้าใช้คองคิง 1 หัว ซึ่งมีชิ้นส่วน ค 2 ส่วน จะได้คองคิงจำนวน 2,592 ต้น ในเวลา 1 ปี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ปริมาณต้นมากกว่าการขยายพันธุ์โดยการแยกหัว

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของออกซินและไซโตไคนินชนิดอื่นในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสและกระตุ้นแคลลัสให้เกิดต้น
2. ควรศึกษาอิทธิพลของน้ำตาล น้ำมะพร้าว ค่า pH ที่มีผลต่อเนื้อเยื่อของคองคิง
3. ควรศึกษาปริมาณสารโคคลิซินที่อาจมีในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงหัวคองคิงเปรียบเทียบกับหัวคองคิงในธรรมชาติ

พรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เต็ม สมิตินันท์ สัมมนาภาษาไทย อักษรพิเศษ 2513, 226 หน้า
- นภค ไกรหาญ การขยายพันธุ์สัตว์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปรินญาณพนธ์
วท.ม. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 2526,
47 หน้า อักสาเนา
- ประยุทธ์ สุวรรณวิบูลย์ วิจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลง
ของแอลกอฮอล์ในแก้ว ปัญหาพิเศษ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2524, 17 หน้า อักสาเนา
- ปรีดี เอกะวิภาส "กอดริโอสา" ใน ชีวิตที่ต้องรอน้ำ หน้า 29 กรุงเทพมหานคร
การพิมพ์ 2525
- _____ "การคั่งกล" วารสารพืชสวน 18(4) : 58 - 67 2526
- พยอม ศันตวิวัฒน์ สมุนไพรรักษาโรค จัดพิมพ์โดยสมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย 2521,
202 หน้า
- พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ "คองคิง" คู่มือการปลูกสมุนไพร 2 193 หน้า
- บริษัทสารมวลชน จำกัด 2524
- ไพฑูริย์ กวินเดชาวัณนา หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อักษรพิเศษ
พืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2524, 133 หน้า
- ลักคาลัย บุรณกรกรัง และกมลวิทย์ สุภาวตา ใบเลี้ยงใบของพืช
แผนกวิชาเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2521, 109 หน้า
- วิไลลักษณ์ ชื่นะจิตร การศึกษากายการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อักษรพิเศษ
วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 2524, 96 หน้า อักสาเนา
- อนินทิศา โปษะภณ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อักษรพิเศษ วท.ม.
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2524, 6 หน้า อักสาเนา

อธิ สหวัชรินทร์ "ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อทางด้านการเกษตร"

วารสารพืชสวน 14(4) : 34 - 43, 2522

Aartrijk J.V. and G.J. Blom - Barmhoorn "Growth Regulator Requirements for Adventitious Regeneration From Lilium Bulb-Scale Tissue," In Vitro, In Relation to Duration of Bulb Storage and Cultivar. Scientia Horticulturae. 11 261 - 268, 1981.

Eiale J.B. 'On the Interface of Horticulture and Plant Physiology. Ann. Rev. Plant Physiol. 29 1 - 23, 1978.

Cecile, W. and H. Marja. 'Growth and Morphogenesis of Asparagus Cells Cultured In Vitro," Nature. Lond. 217 369 - 370, 1968.

Delvin, R.M. Plant Physiology. 2nd.ed. Van Nostrand Reinhold Company Copy Right, 1969.

Dunstan, D.I. and K.C. Smart. "Improved Growth of Tissue Cultures of the Onion, Allium cepa L.," Physiologia Plantarum. 41 70 - 72, 1977.

____ "Shoot Production from Cultured Allium porrum Tissues," Scientia Horticulturae. 11 37 - 43, 1979.

Evert, R.D. and A.H. Mary. "Aseptic culture of chrysanthemums in the plant propagation class," The International plant Propagation Society. 25 444 - 447, 1975.

Gamborg, O.L. and L.R. Waller. Plant Tissue Culture Method. Ottawa, Ontario, 1 - 40 p, 1975. ✓

Hall, R.H. 'Gytokinins as a Probe of Developmental Processes,' Ann. Rev. Plant. Physiol. 24 415 - 444, 1973.

Hussey, G. "In Vitro Release of Axillary Shoots From Apical Dominance in Monocotyledonous Plantlets," Annual Botany 40 1323 - 1325, 1976.

____ "In Vitro Propagation of Gladiolus by Precious Axillary Shoot Formation," Scientia Horticulture. 6 287 - 296, 1977.

- Hussey, G. "Totipotency in Tissue Explants and Callus of Some Members of the Liliaceae, Iridaceae, and Amaryllidaceae," Journal of Experimental Botany. 29 (91) 253 - 262, 1975.
- Kaul, K. and P.S. Sabharwal. "Morphogenetic Studies on Haworthia Establishment of Tissue and Control of Differentiation," American Journal Botany. 59 . 377 - 385, 1972.
- Leopold, A.C. Auxin and Plant Growth. Berkeley, ✓ University of California Press, 1967. 361 p.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. "Organic Growth Factor Requirement of Tobacco Tissue Cultures," Physiologia Plantarum. 18 100 - 126, 1965.
- Meyer, Jr. M.M. "Propagation of Daylilies by Tissue Culture," Horticultural Science. 11(5) 485 - 487, 1976.
- Meyer, Jr.M.M. and others. "Propagation of Tall Bearded Irises by Tissue Culture," Hortscience. 10 479 - 480, 1975.
- Miller, C.O. and F. Skoog. "Chemical Control of Bud Formation in Tobacco Stem Segment," American Journal Botany. 40 768 - 773, 1953.
- Murashige T. "Plant Propagation Through Tissue Culture," Annual Review Plant Physiology. 25 135 - 166. 1974.
- _____ "Propagation Through Tissue Culture," Horticultural Science. 9(3) . 170, 1974.
- _____ "Current Status of Plant Cell and Organ Culture," Horticultural Science. 12(2) 127 - 130, 1977.
- _____ "Plant Cell and Organ Culture as Horticultural Practice," Symposium on Tissue Culture of Horticultural Purposes. 17 - 30, 1977.
- Murashige T. and F. Skoog. "A Revised Medium for Rapid . Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture," Physiologia Plantarum. 15 473 - 497, 1962.

- Niimi, Y. "Influence of Low and High Temperatures on Initiation and the Development of a Bulb Primordium in Isolated Tulip Embryos," Scientia Horticulturae. 9 61 - 69, 1978.
- Okazawa, Y and others. "Effects of Auxin and Kinetin on the Development and Differentiation of Potato Tissue Culture In Vitro," Physiologia Plantarum. 20 862 - 869, 1966.
- Pierik, R.L.M. "Anthurium andraeanum Plantlets Produced from Callus Tissue Cultivated In Vitro," Physiologia Plantarum. 57 80 - 82, 1976.
- _____. "Callus Multiplication of Anthurium andraeanum Linn.," Scientia Horticulturae. 2 193 - 198, 1977.
- Pierik, P. L. M. and H. A. Ruibing. "Regeneration of Bulblets on Bulbscale Segments of Hyacinth In Vitro," Netherland Journal Agriculture Science. 21 129 - 138, 1973.
- Puhan, Z. and S. M. Martin. The Industrial Potential of Plant Cell Culture. In Fockenhull, D.J.D. Progress in Industrial Microbiology. London, J & A. Churchill, 9 13, 1967.
- Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. Plant Cell tissue and Organ Culture. Berlin, Heidelberg Springer - Verlag. 144 - 159, 1977.
- Seabrook, J.E.A., and others. "The In Vitro Induction of Adventitious Shoot and Root Apices on Narcissus (Daffodil and Narcissus) Cultivar Tissue," Canadian Journal Botany. 54 814 - 819, 1976.
- Simmonds, J.A. and L.G. Cumming. "Propagation of Lilium Hybrids II Production of Plantlets from Bulbscale Callus Cultures for Increased Propagation Rates," Scientia Horticulturae. 5 161 - 170, 1976.
- Simonsen, J.A. and P.C. Hildebrandt. "In Vitro Growth and Differentiation of Gladiolus Plants from Callus Cultures," Canadian Journal Botany. 49 1817 - 1819, 1971.

- 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. ✓
- Stewart D.P. and others. "Plants from Callus of the Interspecific Hybrid Lilium Black beauty," Horticulture Science. 15 (3) 313 - 315, 1930.
- Takayama, S. and M. Misawa. "Differentiation in Lilium bulbocaulis Grown In Vitro Effect of Activated Charcoal, Physiological age of Bulbs and Sucrose Concentration on Differentiation and Scale Leaf Formation In Vitro," Physiologia Plantarum. 48 121 - 125, 1930.
- Wareing, P.W. and P.F. Saunders "Hormone and Dormancy," Ann. Rev. Plant Physiol. 22 261 - 288, 1971.
- White, P.R. "Nutritional Requirement of Isolated Plant Tissue and Organ," Annual Review Plant Physiology. 2 231 - 242, 1951. ✓
- "Potentially Unlimited Growth of Elongated Tomato Root Tips in a Liquid Medium," Plant Physiology Lancaster. 9 585 - 600, 1934.
- Ziv, I. and others. "Organs and Plantlets Regeneration of Gladiolus Through Tissue Culture," Annual Botany. 34 671 - 676, 1970.

การผนวกรวม

ตาราง 1 การเตรียม Stock solution และสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

Stock solution	สารเคมี	ปริมาณสารเคมีใน สูตรอาหาร (mg/l)	ปริมาณสารเคมีใน สูตรอาหาร (mg/l)	ปริมาณสารเคมีใน สูตรอาหาร (mg/l)
(10x)	แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4^+NO_3)	16.5		1,650
	โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3)	15.0		1,500
	แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4.4	100	440
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.7		370
	โพแทสเซียมไกลโฟเฟอเนตไฮโดรเจน (KHP_2PO_4)	1.7		170
2(1,000x)	บอแรกซ์ (H_2BO_3)	6.2		6.2
	โซเดียมไธโอไซยาไนด์ (ST)	0.23		0.23
	โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25	1	0.25
	โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025		0.025
	แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3		22.3
	สังกะสีซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6		8.6
	คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025		0.025

ตาราง 1 (ต่อ)

Stock solution	สารเคมี	ปริมาณสารเคมีใน Stock solution (g/l)	ปริมาณ Stock solution ที่ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร (ml)	ปริมาณสารเคมีในอาหาร (% g/l)
3(200x)	โพแทสเซียมเอ็ดทีเอ (Na_2EDTA) เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7.46 5.56	5	37.3 27.8
4(1,000x)	โซเดียมไฮโดรคลอไรด์ ($\text{NaCl} \cdot \text{HCl}$)	0.1		0.1
	นิโคตินิกแอซิด (nicotinic acid)	0.5	1	0.5
	ไพริดอกซอล ไฮโดรคลอไรด์ ($\text{Pyridoxine} \cdot \text{HCl}$)	0.5		0.5
	ไกลซีน (Glycine)	2.0		2.0
	ไมไอินโนสึทอล (Myo-Inositol)	100.0		100.0
จุลินทรีย์		-		3%
	วุ้น	-		1%

ตาราง 2 การเตรียมอาหารสูตร MS คัดแปลง โดยการเติม 2,4-D(D) BA และ NAA (N) ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

สูตรที่	สูตรอาหาร	ปริมาณที่เติมลงในอาหารสูตร MS คัดแปลง		
		2,4-D	BA	NAA
1	MS	-	-	-
2	MSD _{0.05}	0.05	-	-
3	MSD _{0.1}	0.1	-	-
4	MSD _{0.2}	0.2	-	-
5	MSD _{0.3}	0.3	-	-
6	MSD _{0.4}	0.4	-	-
7	MSD _{0.5}	0.5	-	-
8	MSD _{1.0}	1.0	-	-
9	MSBA ₀	-	-	-
10	MSBA _{0.01}	-	0.01	-
11	MSBA _{0.1}	-	0.1	-
12	MSBA _{1.0}	-	1.0	-
13	MSBA _{5.0}	-	5.0	-
14	MSBA _{10.0}	-	10.0	-

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรที่	สูตรอาหาร	ปริมาณที่เติมลงในอาหารสูตร MS คัดแปลง		
		2,4-D	BA	NAA
15	MSBA ₀	-	-	-
16	MSBA _{0.05}	-	0.05	-
17	MSBA _{0.5}	-	0.5	-
18	MSBA _{5.0}	-	5.0	-
19	MSBA _{10.0}	-	10.0	-
20	MSN _{0.05}	-	-	0.05
21	MSN _{0.5}	-	-	0.5
22	MSN _{5.0}	-	-	5.0
23	MSN _{10.0}	-	-	10.0
24	MSBA _{0.05} N _{0.05}	-	0.05	0.05
25	MSBA _{0.05} N _{0.5}	-	0.05	0.5
26	MSBA _{0.05} N _{5.0}	-	0.05	5.0
27	MSBA _{0.05} N _{10.0}	-	0.05	10.0
28	MSBA _{0.5} N _{0.05}	-	0.5	0.05
29	MSBA _{0.5} N _{0.5}	-	0.5	0.5

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรที่	สูตรอาหาร	ปริมาณที่เติมลงในอาหารสูตร MS คัดแปลง		
		2,4-D	BA	NAA
30	MSBA _{0.5} ^N _{5.0}	-	0.5	5.0
31	MSBA _{0.5} ^N _{10.0}	-	0.5	10.0
32	MSBA _{5.0} ^N _{0.05}	-	5.0	0.05
33	MSBA _{5.0} ^N _{0.5}	-	5.0	0.5
34	MSBA _{5.0} ^N _{5.0}	-	5.0	5.0
35	MSBA _{5.0} ^N _{10.0}	-	5.0	10.0
36	MSBA _{10.0} ^N _{0.05}	-	10.0	0.05
37	MSBA _{10.0} ^N _{0.5}	-	10.0	0.5
38	MSBA _{10.0} ^N _{5.0}	-	10.0	5.0
39	MSBA _{10.0} ^N _{10.0}	-	10.0	10.0