583.115048
ศ452ก
ฉ.3

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพญารากดำ

ปริญญานิพนธ์

ของ

ศิริชัย เขียวนิล

22 ส.ค. 2538

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

สิงหาคม 2532

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

171437

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพญารากดำ

บทคัดย่อ

ของ

ศิริชัย เขียวนิล

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

สิงหาคม 2532

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำ (Polyalthia cerasoides (Roxb.) Benth. ex Bedd.) บนอาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium) และ WPM ดัดแปลงโดยเติม BA (6 - benzyl adenine) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พร้อมทั้งปรับปริมาณสารอาหารและน้ำตาล พบว่า บนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อส่วนใบสามารถเกิดแคลลัสได้ดี มีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด (1.24 กรัมต่อขวด) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงดังกล่าวสามารถเกิดหน่อได้ หน่อที่เกิดขึ้นได้นี้สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นต้นขนาดเล็กได้บนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์และบนอาหารสูตร WPM ที่ลดธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งหนึ่งดัดแปลงโดยเติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ต้นที่ได้ไม่เกิดราก รากสามารถเกิดจากแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์

LEAF TISSUE CULTURE OF *Polyalthia cerasoides* (ROXB.) BENTH. EX BEDD.

AN ABSTRACT

BY

SIRICHAI KHAIVNIL

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree

at Srinakarinwirot University

August 1989

Leaf tissues of Polyalthia cerasoides (Roxb.) Benth. ex Bedd. were cultured on WPM (Woody Plant Medium) and modified WPM supplemented with BA (6-benzyl adenine) and 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) of varied concentrations plus nutrients and sugar adjustment. Results revealed that leaf tissues formed calluses of maximum average weight (1.24 g/ bottle) on the modified WPM with 3 mg/l BA plus 1 mg/l 2,4-D and 2 per cent of sugar. The calluses could be cultured to form small shoots on the modified WPM with 3 mg/l BA plus 0.1 mg/l 2,4-D and 2 per cent of sugar and on the modified WPM with half reduction of macronutrient and micronutrient supplemented with 3 mg/l BA plus 1 mg/l 2,4-D and 3 per cent of sugar. However, roots were not formed from these shoots. Best results were obtained when calluses were cultured on the modified WPM with 0.1 mg/l BA plus 1 mg/l 2,4-D and 2 per cent of sugar.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัยศรินครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน
(อ. อรพินท์ แก้วลาย)

..... กรรมการ
(รศ.ดร. เสนาะ บุญมี)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน
(อ. อรพินท์ แก้วลาย)

..... กรรมการ
(รศ.ดร. เสนาะ บุญมี)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อ. เรญ ศรสำราญ)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรินครินทรวิโรฒ

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

วันที่ ...29.. เดือน...กันยายน.....พ.ศ. 2532

ประกาศคุณูปการ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ อรพินท์ แก้วลาย ประธานกรรมการที่ปรึกษา รศ.ดร. เสนาะ บุญมี กรรมการที่ปรึกษา อาจารย์เรณู ศรสำราญ ที่ได้ช่วยกรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัยและตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณสมพงษ์ ยังประเสริฐ คุณเจริญ อิ่มพันธ์แบน คุณทัศนีย์ เปาสมบัติ และคุณสุคนธา อรุณภู่ ที่ช่วยเหลือระหว่างการทำการทดลองและถ่ายภาพ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณพี่ และน้อง ๆ ที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนด้านการศึกษา และการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศิริชัย เขียวนิล

สิงหาคม 2532

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	การเจริญเป็นแคลลัส	5
	การเจริญเป็นต้นพืช	7
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	10
	อุปกรณ์ และสารเคมี	10
	วิธีการทดลอง	11
	การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบน อาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เพื่อหาปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส หน่อ และต้น	11
	การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบน อาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหาร และน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส	13
	การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงแคลลัสใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและน้ำตาลต่อการเกิดหน่อ	14

สารบัญ

บทที่		หน้า
	การทดลองที่ 4 การทดลองเพาะเลี้ยงหน่อพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสมเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโต ต่อการเกิดต้น	15
	การเก็บรวบรวมข้อมูล	15
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	17
	การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เพื่อหาปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ต่อการเจริญเป็นแคลลัส หน่อ และต้น	17
	การเจริญเป็นแคลลัส	17
	การเกิดหน่อ	31
	การเกิดต้น	39
	การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ที่เหมาะสมเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหาร และน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส	45
	การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงแคลลัสใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหาร และน้ำตาลต่อการเกิดหน่อ	50
	การทดลองที่ 4 การเพาะเลี้ยงหน่อพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบสารอาหาร และสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการเกิดต้น	54

สารบัญ

บทที่		หน้า
5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	57
	สรุป และอภิปรายผล	57
	การชักนำเนื้อเยื่อให้เจริญเป็นแคลลัส	57
	การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นหน่อ	58
	การชักนำหน่อให้เจริญเป็นต้น	59
	ข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม		63
ภาคผนวก		68
ประวัติย่อของผู้วิจัย		76

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณ BA, 2,4-D ที่เติมลงในอาหารสูตร WPM	13
2	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหาร WPM ที่เติม BA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	18
3	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เป็นเวลา 6 สัปดาห์	26
4	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบนอาหาร WPM ที่เติม BA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 9 และ 12 สัปดาห์	32
5	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบนอาหาร WPM ที่เติม BA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 15 และ 18 สัปดาห์	40
6	น้ำหนักสดของแคลลัสใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{20} ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและความเข้มข้นของน้ำตาล ต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส เป็นเวลา 6 สัปดาห์	46
7	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{20} ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเกิดหน่อ ระยะเวลา 6 สัปดาห์	51
8	ส่วนประกอบ และปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร WPM	70
9	ปริมาณสารอาหาร และสารเร่งการเจริญเติบโต จากการที่พัฒนาจากหน่อเป็นต้น เป็นเวลา 6 สัปดาห์	73
10	การเปรียบเทียบสารอาหารและปริมาณที่ใช้ในอาหารสูตร WPM, MS, WM	74

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 29

2 ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{20} เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 30

3 ลักษณะของตุ่มบนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{20} เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นหน่อในเวลา 12 สัปดาห์ 37

4 ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{20} เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ซึ่งให้หน่อเล็ก ๆ จำนวนมาก 38

5 ลักษณะของหน่อที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{13}) เป็นเวลา 18 สัปดาห์ 43

6 ลักษณะของรากที่เกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหาร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{20}) เป็นเวลา 18 สัปดาห์ 44

7 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสใบที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM และ WPM/2 ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{20}, $WPM_{20/2}$) ที่ปริมาณน้ำตาล 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ 47

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

8 ลักษณะของเนื้อเยื่อใบที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 8.1) น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 8.2) น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 8.3) 48

9 ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์บนอาหารสูตร WPM/2 ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.1) น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.2) น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.3) 49

10 น้ำหนักสดเฉลี่ยสของแคลลัสและหน่อที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM และ WPM/2 ดัดแปลง โดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{20} และ $WPM_{20/2}$) ที่ระดับน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ 52

11 ลักษณะของแคลลัสและหน่อที่เกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{20}) และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 53

12 ลักษณะของต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{13}) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 55

13 ลักษณะของต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงหน่อบนอาหาร WPM ดัดแปลง โดยการลดธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งหนึ่ง และเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ($WPM_{20/2}$) และ น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 56

บทที่ 1

บทนำ

พืชหลายชนิดโดยเฉพาะพืชสมุนไพรมีบทบาทอย่างกว้างขวางในการผลิตยาและสารอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ โดยมนุษย์รู้จักใช้พืชสมุนไพรบำบัดรักษาโรคมาตั้งแต่สมัยโบราณ จากประสบการณ์ลองผิดลองถูก การบอกเล่าและจดบันทึกต่อ ๆ กันมา ถอปรกับความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรด้านวิทยาศาสตร์ยังไม่เจริญพอโดยเฉพาะด้านเคมี จึงทำให้ไม่ทราบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชวิทยาอย่างแท้จริง และวงการแพทย์แผนปัจจุบันของไทยยังไม่ยอมรับ ปัจจุบันวิชาการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และเทคโนโลยีเจริญก้าวหน้าสามารถสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาใช้เป็นยารักษาโรคได้รวดเร็วเป็นผลดีมาก แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในบางกรณีโรคบางอย่างไม่อาจรักษาให้หายได้ด้วยยาแผนปัจจุบัน เมื่อทำการรักษาด้วยยาประเภทสมุนไพรตามตำรับแผนโบราณผู้ป่วยหายเป็นปกติได้ (พยอม ตันติวัฒน์. 2521 : 202) ทั้งนี้เพราะพืชสมุนไพรมีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloid) กลูโคไซด์ (glucoside) เรซิน (resin) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติรักษาโรคได้ถ้าใช้ในปริมาณที่เหมาะสม (บันทวัน บุญยะประภัศร. ม.ป.ป. : 5) นอกจากนี้ยังมีสารอีกจำนวนมากที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้หรือทำได้ก็ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงนิยมสกัดสารจากพืชสมุนไพรแทน (จำลอง เพ็งคล้าย. 2516 : 2)

พญารากดำเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่แพทย์แผนโบราณใช้รากต้มกินเป็นยาแก้กษัย เปลือกเข้ายาพื้นเมืองบางชนิด และใช้เนื้อไม้มาเคี่ยวเอายางสีดำชงน้ำรับประทานแก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย ปวดหลังปวดเอว กษัย โรคไตพิการ ปัสสาวะพิการ มิรสขมและกลิ่นหอม (บุศบรรณ ณ สงขลา. 2525 : 88 ; คณะอาจารย์หมอแผนโบราณ. 2518 : 578 - 579) และตามตำรับพระวัย จตุตาลโย แห่งวัดเทพพนมยงค์ อำเภอหินกอง จังหวัดสระบุรี ใช้ยางสีดำที่เคี่ยวออกจากเปลือกต้นและรากพญารากดำสำหรับรักษาโรคเบาหวาน โดยใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ ได้แก่ ข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้ เชือกเขาหนัง ทองพันชั่ง แก่นสัก หัวร้อยรู และหญ้าเกล็ดปลา ได้มีรายงานผลการทดลองของ สมบัติ พุ่มสาขา ว่าหนูที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยแอลลอกแซน

(alloxan) แล้วใช้สมุนไพรตำรับ พระวัย จตุตาลโย รักษา ผลจากการทดลองพบว่าสามารถลดน้ำตาลในเลือดของหนูได้อย่างมีผลทางการรักษา (สมบัติ พุ่มสาขา. 2530 : 24 - 46)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเปลือกต้นและรากพญารากดำไปเคี่ยวเพื่อเอายางสีดำไปขายในราคาแพงทั้งในกรุงเทพฯ (วัดมหาธาตุ ร้านจำหน่ายยาแผนโบราณทั่วไป) และต่างจังหวัด (ลพบุรี สระบุรี ฯลฯ) ดังนั้นพืชชนิดนี้จึงถูกทำลายไปอย่างรวดเร็วจนกลายเป็นพืชที่หายาก และเนื่องจากพืชชนิดนี้ขึ้นเองตามธรรมชาติไม่มีการปลูกทดแทน หากถูกทำลายไปเรื่อย ๆ อย่างนี้จะเป็นสาเหตุให้เหลือน้อยหรืออาจสูญพันธุ์ได้ในที่สุด พญารากดำจึงเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่น่าสนใจควรแก่การนำมาศึกษาวิจัยด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเชื่อว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพญารากดำจะเป็นแนวทางช่วยในการขยายพันธุ์เพื่อทดแทนปัญหาการถูกทำลาย และเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่น ๆ ต่อไป

<u>จุดมุ่งหมายของการศึกษา</u>

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Woody Plant Medium (WPM) และ WPM ดัดแปลง

2. เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำเป็นแคลลัส (callus) และพัฒนาเป็นต้นพืชได้

<u>ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า</u>

1. ทำให้ทราบสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของสูตรอาหาร WPM และ WPM ดัดแปลง ที่มีความเหมาะสมในการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำเป็นแคลลัส แล้วพัฒนาเป็นต้นพืชได้

2. เป็นแนวทางของวิธีการขยายพันธุ์ต้นพญารากดำวิธีหนึ่ง

3. เป็นการเพิ่มพูนความรู้ เทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ยืนต้น

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ พญารากดำ (Polyalthia cerasoides (Roxb.) Benth. ex Bedd.) โดยใช้เฉพาะใบอ่อนที่แผ่นใบคลี่เต็มที่แล้วประมาณ 7 - 10 วัน ของต้นที่ปลูกไว้ในเรือนเพาะชำมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

2. สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำ คือ

2.1 สูตรอาหาร WPM (1981)

2.2 สูตรอาหาร WPM (1981) ดัดแปลงโดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่

- BA (6 - benzyladenine)
- 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)
- น้ำตาลซูโครส

2.3 สูตรอาหาร WPM และ WPM ดัดแปลงที่ลดธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. แคลลัส หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) ที่เกาะรวมกันอยู่ และยังมิได้เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524 : 10)

2. สูตรอาหาร WPM หมายถึง สูตรอาหาร Woody Plant Medium ของ ลอยด์ และแมคคาวน์ (Lloyd and McCown. 1981 : 421 - 427)

3. แคลลัสใบ หมายถึง แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พญารากดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Polyalthia cerasoides (Roxb.) Benth. ex Bedd. จัดอยู่ในวงศ์ Annonaceae มีชื่อพื้นเมืองแตกต่างกัน เช่น กระเจียน (ชลบุรี) สปันงาป่า (ภาคเหนือ) ค่าสามชึก (เชียงใหม่) ไม้เหลือง (ลำปาง) ทรายเด่น (ขอนแก่น) แคหาง (ราชบุรี) โมดดง (ระยอง) เส่โพลส่า (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง พบตามป่าเต็งรังและป่าผสมผลัดใบ สูง 12 - 20 เมตร เปลือกสีเทา ส่วนที่ยังอ่อนอยู่มีขนสีน้ำตาล กิ่งแก่เกลี้ยง ใบรูปหอกหรือยาวรี ปลายใบเรียวแหลม โคนใบแหลมหรือมน ด้านบนเกลี้ยง ด้านล่างมีขน ใบยาว 6.5 - 15 เซนติเมตร กว้าง 2.5 - 5 เซนติเมตร ดอกออกที่เดียวกัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 - 1.5 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 2.5 - 3 เซนติเมตร กลีบดอก 6 กลีบ เรียงเป็น 2 วง กลีบดอกรูปไข่ โคนกลีบกว้าง ปลายกลีบแหลม ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยงสีเขียวอมเหลือง ยาว 4 เซนติเมตร เกสรตัวผู้และรังไข่มีจำนวนมากอยู่บนฐานส้น ๆ ผลรูปกลมรีกว้าง 0.5 - 0.8 เซนติเมตร ยาว 0.7 - 1 เซนติเมตร ผลเมื่อดิบสีเขียว สุกสีแดง รสหวานอมฝาด (กรมป่าไม้. 2491 : 393 ; เต็ม สมิตินันทน์. 2523 : 270 ; บุศบรรณ ณ สงขลา. 2525 : 88 - 89 ; สมจิต พงษ์พงัน และ สุภาพ ภู่ประเสริฐ. 2515 : 153)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) เป็นการนำอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งที่มีชีวิตของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่ควบคุม ได้แก่ แสงสว่าง ความชื้น ความเป็นกรด เบส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ชิ้นส่วนของพืชจะเจริญเติบโตเป็นแคลลัสและเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์หรือเอมบริออยด์ (embryoid) (อรดี สหวัชรินทร์. 2522 : 34 - 43)

การเจริญเป็นแคลลัส

คาร์โปเนตติ (Carponetti. 1971 : 313 - 318) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคมเบียม (cambium) จากลำต้นของ Prunus serotina Ehrh. บนอาหารสูตร Wetmore และ Rier ที่เติมน้ำมะพร้าว Casein hydrolysate (CH) และ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ไม่มีแสง เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดี เนื้อเยื่อแคมเบียมจากกิ่งของ Pinus strobus และ Paulowia tomentosa เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Reiner and White ก็เจริญเป็นแคลลัสได้ (Isikawa and others. 1987 : 119 - 154)

ลี และ โฟส์สาร์ด (Lee and Fossard. 1973 : 707 - 717) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำต้นยูคาลิปตัส (Eucalyptus bancrofftii Maiden.) บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม NOA (2-naphtoxy acetic acid) 2 x 10^{-5} M และ BAP (benzylaminopurine) 10 X 10^{-6} M สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี และเนื้อเยื่อจากต้นกล้าอายุ 6 เดือน ของยูคาลิปตัส (E. teresticornis Smith.) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BAP อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ หรือถ้าเติม NAA (α-naphthalene acetic acid) 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเช่นกัน (Ilahi and Sabana. 1987 : 67 - 74)

ตาข้างของ Pseudotsuga taxiflora ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ถ้ามี auxin ระดับความเข้มข้นสูง ๆ จะกระตุ้นเนื้อเยื่อให้เกิดแคลลัสได้ดี (Al-talib and Torry. 1959 : 630 - 637) สูตรอาหาร MS ปกติจะใช้น้ำตาลซูโครสผสมในอาหาร แต่ โอกะ และ โอยามา (Oka and Ohyama. 1977 : 15 - 20) ใช้น้ำตาลฟรุคโตสแทนน้ำตาลซูโครสผสมในอาหารสูตร MS แล้วนำไปเพาะเลี้ยงตาข้างของต้นหม่อน พบว่าเจริญเป็นแคลลัสได้ นอกจากนี้แล้วการเพาะเลี้ยงตายอดตาข้างของต้นเลี่ยน (Melia azedarach Linn.) บนอาหารสูตร MS พบว่าการลดความเข้มข้นของธาตุหลักและธาตุรองลงเหลือ 1 ใน 4 และเติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและมีปริมาณมาก (วิลาศ วิชญะเตชา. 2526 : 52 - 55)

เนื้อเยื่อส่วนใบของไม้ยืนต้นที่ได้มีการนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ โกโก้ (Teobroma cacao Linn.) จากการทดลองเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 5 X 10^{-7} - 10^{-6} M และ 2,4-D 0-5 X 10^{-7} M สามารถเกิดแคลลัสได้ดี (Tungskul. 1983 : 11 - 40) ใบของยูคาลิปตัส (E. camaldulensis Dehnh.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยการเติม CH 1 กรัมต่อลิตร NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ในที่ไม่มีแสง เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสจำนวนมาก (Muralidaran and Mascarenhas. 1987 : 256 - 259)

นอกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าวของพืชยืนต้นที่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้แล้วยังมีเนื้อเยื่อและอวัยวะอื่น ๆ สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสได้อีก เช่น หน่ออ่อนที่เจริญมาจากเมล็ดของ Abies balsamea เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Bonga. 1977 : 41 - 48) คัพภะ (embryo) ของทุเรียนนก (Durio lowianus Scort. ex King.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0 - 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA 0 - 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือบนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA 1 - 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และบนอาหารสูตร Vieitez and Vieitez ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นคัพภะสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ (ประยงค์ คงนคร. 2526 : 4 - 6, 2528 : 18 - 35)

Hypocotyl และ Cotyledon ของสัก (Tectona grandis Linn.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA หรือ 2,4-D 0.1 - 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Gupta. 1980 : 259 - 268) hypocotyl ของโกโก้ ถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2.5 X 10^{-7} -10^{-8} M และ 2,4-D 5 - 7.5 X 10^{-7} M (Tungskul. 1983 : 11 - 40) hypocotyl และ cotyledon ของ Pinus strobus Linn. นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเช่นเดียวกัน (Kaul. 1987 : 5 - 7)

การเจริญเป็นต้นพืช

ไอลาฮี และ ชาบานา (Ilahi and Sabana. 1987 : 67 - 74) รายงานว่า แคลลัสของยูคาลิปตัส (E. tereticornis Smith.) สามารถเกิดหน่อได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin และ BAP อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AS 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าเติม NAA 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นตา แคลลัสใบของยูคาลิปตัส (E. camaldulensis Dehnh.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ในที่มีแสงจะเกิดหน่อแต่ไม่เกิดราก เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร WPM ที่เติม NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ไม่มีแสงหน่อจะเกิดรากได้ (Muralidaran and Mascarenhas. 1987 : 256 - 259) ส่วนแคลลัสของ Acacia melanoxylon จะเกิดหน่อและรากได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 uM IAA (indole acetic acid) 1 uM (Meyer. 1987 : 206 - 209)

คุปตา และ คนอื่น ๆ (Gupta and others. 1980 : 259 - 268) ได้รายงานผลการทดลองเพาะเลี้ยงปลายยอดสัก บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin และ BAP อย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดหน่อจำนวนมาก เมื่อนำหน่อไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร White's Medium (WM) ลดธาตุให้เหลือน้อย แล้วเติม IAA, IPA (indole-3-propionic acid) และ IBA อย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อจะเกิดราก สามารถนำออกปลูกเพื่อใช้ขยายพันธุ์ได้ ปลายยอดและตาข้างของ Kalmia lotifera Linn. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม isophenyl adenine (2iP) จะเกิดยอดจำนวนมากแล้วเจริญไปเป็นต้นและรากที่สามารถนำไปปลูกขยายพันธุ์ได้ (Lloyd and McCown. 1981 : 421 - 427) วิลาศ วิชญะเตชา (2526 : 52 - 55) เพาะเลี้ยงปลายยอดและตาข้างของต้นเลี่ยน บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดหน่อจำนวนมาก เมื่อนำหน่อไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุหลักและธาตุรองเหลือ 1 ใน 4 ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต พบว่าสามารถเจริญไปเป็นต้นและราก ที่นำออกปลูกเพื่อขยายพันธุ์ได้ การเพาะเลี้ยงปลายยอดทุเรียนนก

ของประยงค์ คงบคร (2528 : 18 - 35) บนอาหารสูตร WPM โดยใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหาร เป็น 1.5 เท่า เติมน้ำตาลซูโครส 5 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 5 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 2iP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลายยอดสามารถเจริญได้ดีแต่ไม่สามารถนำไปใช้ขยายพันธุ์ได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงปลายยอดของสนญี่ปุ่น (Cryptomeria japonica) บนอาหารสูตร Walter and Skoog ที่มี IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดรากได้ สำหรับ Myrica rubra ซึ่งเป็นพืชยืนต้นใบกว้างที่เกิดรากได้ยาก จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดของพืช ชนิดนี้ให้เกิดรากได้นั้น ต้องแช่เนื้อเยื่อในสารละลายที่มี IBA 100 - 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Isikawa and others. 1987 : 119 - 154)

การ์ตอน และ คนอื่น ๆ (Garton and others. 1981 : 758 - 759) เพาะเลี้ยงตาข้างของ Alnus glutinosa Gaertn. บนอาหารสูตร WPM ที่ลดธาตุให้เหลือน้อยลง และเติม BA 1 µM สามารถเกิดต้นและรากได้ ตาข้างของเกาลัด (Castanea sativa Mill.) สามารถเจริญได้ดี เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3.5 เปอร์เซ็นต์ ในที่ไม่มีแสง อุณหภูมิต่ำ ๆ แต่ไม่เกิดราก ถ้านำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเดิมแต่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตสามารถเจริญไปเป็นต้นและรากได้ (Chevre and others. 1983 : 23 - 29)

การนำเมล็ดมาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารปรากฏว่าสามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ จากรายงานผลการทดลองของสาขาพฤกษชีพวิทยา กองวิชาการ กรมวิชาการเกษตร (2524 : 20 - 25) พบว่าเมล็ดมังคุดที่ตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ หน่ออ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดของ Abies balsamea ถ้านำไปแช่ในสารละลายที่มี IBA, Alar-85 (N-dimethylaminosuccinamic acid) หรือ PPZ (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ caffeic acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นเวลา 15 นาที ถึง 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS จะเกิดตาและรากได้ (Bonga. 1977 : 41 - 48) นอกจากนี้แล้วยังสามารถเพาะเลี้ยง ovule ของมะม่วง (Mangifera indica Linn.) ให้เจริญเป็นต้นได้ โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้น

ของธาตุหลัก และ chelated iron ลงครึ่งหนึ่ง เติมน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ glutamine 400 มิลลิกรัมต่อลิตร วิตามินบี 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ และ BA 1 - 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Litz and others. 1982 : 264 - 266)

Hypocotyl และ cotyledon ก็สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดต้นได้ เช่น การเพาะเลี้ยง hypocotyl และ cotyledon ของสักบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin และ BAP อย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดหน่อได้ แล้วนำหน่อไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร WM ที่ลดธาตุให้น้อยลง และเติม IAA, IBA และ IPA อย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อจะเกิดราก แล้วนำออกปลูกขยายพันธุ์ได้ (Gupta and others. 1980 : 259 - 268) hypocotyl ของ Pinus strobus Linn. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถเกิดหน่อได้ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร Litvay's Medium (LM) หน่อเจริญต่อไปได้แต่ไม่เกิดราก นำหน่อไปเพาะเลี้ยงต่ออีกบนอาหารสูตร Gresshoff and Doy ที่ลดความเข้มข้นของธาตุลงครึ่งหนึ่ง และเติม inositol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อสามารถเกิดรากได้ แต่รากไม่เจริญ ต้องนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต รากจะเจริญได้ดีสามารถนำออกปลูกได้ ในทำนองเดียวกันนี้ hypocotyl ของ Larix dicidua และ Pinus bankisiana ก็สามารถเพาะเลี้ยงได้ผลเช่นกัน (Kaul. 1987 : 5 - 7)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชทดลอง คือ พญารากดำ (Polyalthia cerasoides (Roxb.) Benth. ex Bedd.) โดยใช้ใบอ่อนที่แผ่นใบคลี่เต็มที่แล้วประมาณ 7 - 10 วัน

2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ทดลอง

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- ปีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ
- ขวดรูปกรวยขนาดต่าง ๆ
- ขวดแก้วพร้อมฝาปิดขนาด 60 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วพร้อมฝาปิดขนาด 120 มิลลิลิตร
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- เครื่องวัดความเป็นกรด - เบส (pH - meter)
- เครื่องชั่งละเอียด
- ส้าลี
- อลูมินัมฟอยล์

2.2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร WPM ตาราง 2 (ภาคผนวก)

2.3 สารเร่งการเจริญเติบโต

- BA
- 2,4-D

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- คลีนาไซด์ (kleenacide)

- โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite)
- เอธิลแอลกอฮอล (ethyl alcohol) 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- ทวีน-20 (tween-20)

2.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ

- ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ
- มีดผ่าตัดเบอร์ 3 และ 4
- ปากคีบ
- จานแก้ว (petri dish)
- ตะเกียงแอลกอฮอล
- เอธิลแอลกอฮอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- เมธิลแอลกอฮอล

2.6 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยชั้นวางขวดที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ชั้นละ 2 หลอด เปิดไฟ 12 ชั่วโมงต่อวัน

2.7 กล้องถ่ายภาพ

2.8 เครื่องชั่งละเอียด

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญาราก ดำบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เพื่อหาปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส หน่อ และต้น

1. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง (ตาราง 1) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก

2. ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.6 ด้วย 0.5 N HCl หรือ 0.5 N NaoH

3. บรรจุอาหารลงขวด ขวดละ 15 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. ทำความสะอาดเนื้อเยื่อส่วนใบด้วยน้ำยา ไลปอน-วี 5 เปอร์เซ็นต์ นำเนื้อเยื่อแช่ในน้ำยาคลินาไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำยาออกด้วยน้ำประปา แล้วนำแช่ในเอธิลแอลกอฮอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 15 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมทวีน-20 0.5 มิลลิลิตรต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 และ 25 นาที ตามลำดับ เขย่าชิ้นส่วนเบา ๆ ขณะที่แช่เนื้อเยื่อ เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

5. นำชิ้นส่วนใบที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.7 X 0.7 ตารางเซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 3 จำนวน 48 สูตร (ตาราง 1) ทดลองสูตรละ 10 ขวดละ 1 ชิ้นส่วน

6. นำขวดอาหารที่ใส่ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ชั้นละ 2 หลอด เปิดไฟ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 18 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 6 สัปดาห์

7. คัดเลือกอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนใบของพญารากดำเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

8. คัดเลือกอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง ที่สามารถชักนำแคลลัสใบพญารากดำให้เกิดหน่อได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

9. คัดเลือกอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง ที่สามารถชักนำหน่อให้เกิดต้นได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 สัปดาห์

ตาราง 1 ปริมาณ BA, 2,4-D ที่เติมลงในอาหารสูตร WPM

BA (มิลลิกรัมต่อลิตร) \ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0	0.1	0.5	1	3	5
0	WPM_1	WPM_9	WPM_{17}	WPM_{25}	WPM_{33}	WPM_{41}
0.1	WPM_2	WPM_{10}	WPM_{18}	WPM_{26}	WPM_{34}	WPM_{42}
0.5	WPM_3	WPM_{11}	WPM_{19}	WPM_{27}	WPM_{35}	WPM_{43}
1	WPM_4	WPM_{12}	WPM_{20}	WPM_{28}	WPM_{36}	WPM_{44}
3	WPM_5	WPM_{13}	WPM_{21}	WPM_{29}	WPM_{37}	WPM_{45}
5	WPM_6	WPM_{14}	WPM_{22}	WPM_{30}	WPM_{38}	WPM_{46}
7	WPM_7	WPM_{15}	WPM_{23}	WPM_{31}	WPM_{39}	WPM_{47}
10	WPM_8	WPM_{16}	WPM_{24}	WPM_{32}	WPM_{40}	WPM_{48}

WPM 2, 3, 4, ... , 48 เป็นหมายเลขแสดงลำดับอาหารสูตรที่เติม BA กับ 2,4-D โดยให้ WPM_1 เป็นสูตรที่ 1 ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 2

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและน้ำตาลที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส

1. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ดัดแปลง ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ข้อ 7 เตรียมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 1, 2, 3 และในอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์

2. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตรที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ข้อ 7 แต่ลดความเข้มข้นของธาตุลงครึ่งหนึ่ง และเติมน้ำตาลซูโครส 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์

3. ทำความสะอาดเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 4

4. นำเนื้อเยื่อส่วนใบที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.7 X 0.7 ตารางเซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 1 และ 2 จำนวนสูตรละ 10 ขวด ขวดละ 1 ชิ้นส่วน

5. นำขวดอาหารที่ใส่ชิ้นส่วนพืชแล้วนั้นเพาะเลี้ยงในห้องและให้แสงสว่าง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยมีการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3 สัปดาห์

<u>การทดลองที่ 3</u>

การเพาะเลี้ยงแคลลัสใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและน้ำตาลที่มีผลต่อการเกิดหน่อ

1. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ดัดแปลงที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ข้อ 8 เตรียมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 1, 2, 3 และในอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์

2. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตรที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ข้อ 8 แต่ลดความเข้มข้นของธาตุลงครึ่งหนึ่ง เติมน้ำตาลซูโครส 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์

3. นำแคลลัสใบที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาตัดแบ่งเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นขนาด 0.4 X 0.4 X 0.4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เตรียมไว้ในข้อ 1 และ 2 จำนวนสูตรละ 10 ขวด ขวดละ 1 ชิ้นส่วน

4. นำขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของแคลลัสเพาะเลี้ยงในห้องให้แสงสว่างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยมีการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3 สัปดาห์

การทดลองที่ 4

การเพาะเลี้ยงหน่อพญาราก่ำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสมเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเกิดต้น

1. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ดัดแปลง ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ข้อ 9 เติมน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่ช่วยให้แคลลัสใบพัฒนาเป็นหน่อได้ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3

2. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตรที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ข้อ 9 เติมน้ำตาลเท่าข้อ 1 โดย

2.1 ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต (สูตร WPM)

2.2 ลดความเข้มข้นของธาตุลงครึ่งหนึ่ง

2.3 ลดความเข้มข้นของธาตุลงครึ่งหนึ่ง และไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต

3. นำหน่อที่ได้จากการทดลองที่ 3 มาตัดแบ่งออกเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นของหน่อ ชิ้นส่วนละ 3 หน่อ นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 1 และ 2 จำนวนสูตรละ 10 ขวด ขวดละ 1 ชิ้นส่วน

4. นำขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของหน่อเพาะเลี้ยงในห้อง ให้แสงสว่างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยมีการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3 สัปดาห์

การเก็บรวบรวมข้อมูล

การทดลองที่ 1

1. บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงชิ้นส่วนของใบ เช่น สี ลักษณะของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 3 และ 6

2. บันทึกภาพและชั่งน้ำหนักของเนื้อเยื่อในสัปดาห์ที่ 6

3. บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส เช่น สี ลักษณะของแคลลัส และจำนวนหน่อ ในสัปดาห์ที่ 9 และ 12

4. บันทึกภาพเฉพาะที่เกิดหน่อในสัปดาห์ที่ 12

5. บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของหน่อ และจำนวนต้นในสัปดาห์ที่ 15 และ 18

6. บันทึกภาพเฉพาะที่เกิดต้น เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 18 สัปดาห์

<u>การทดลองที่ 2</u>

ชั่งน้ำหนักและบันทึกภาพเนื้อเยื่อ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์

<u>การทดลองที่ 3</u>

นับจำนวนหน่อ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์

<u>การทดลองที่ 4</u>

นับจำนวนต้น เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

<u>การทดลองที่ 1</u> การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เพื่อหาปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นแคลลัส หน่อและต้น

<u>การเจริญเป็นแคลลัส</u>

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง พบว่า ในเวลานาน 3 สัปดาห์ เนื้อเยื่อบนอาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต (WPM_1) ขยายขนาดมากขึ้น มีสีเขียว ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น บนอาหารสูตร WPM_{2-48} (ตาราง 1) เนื้อเยื่อสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 6 สัปดาห์ เนื้อเยื่อบนอาหารสูตร WPM_1 มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย ส่วนบนอาหารสูตร WPM_{2-48} แคลลัสเจริญเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีและลักษณะของแคลลัสเปลี่ยนแปลงไปตามระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต โดยพบว่า ที่ความเข้มข้นของ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักของแคลลัสมากกว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 7 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสได้ดีมีน้ำหนักมากที่สุด คือ สูตรอาหาร WPM ดัดแปลงที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{29}) (ตาราง 2 และ 3 ภาพประกอบ 1 และ 2)

ตาราง 2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
1	0	0	เนื้อเยื่อขยายขนาดมากขึ้น มีสีเขียว	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดเล็กน้อย สีเขียวอ่อน
2	0.1	0	เกิดแคลลัสเล็กน้อยบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียว	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย สีเหลืองปนเขียว
3	0.5	0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียว	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
4	1.0	0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียว	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
5	3.0	0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียว	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียว บนแคลลัสประมาณ 3-5 ตุ่ม
6	5.0	0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียว	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียว บนแคลลัสประมาณ 3-5 ตุ่ม
7	7.0	0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียว	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
8	10.0	0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
9	0	0.1	เกิดแคลลัสเล็กน้อยบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย เนื้อเยื่อแคลลัสและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
10	0.1	0.1	เกิดแคลลัสเล็กน้อยบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย มีสารสีน้ำตาลอ่อน
11	0.5	0.1	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อ แคลลัสและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
12	0.1	0.1	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อ แคลลัสและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
13	3.0	0.1	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เกิดตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวบนแคลลัสจำนวนมาก (มากกว่า 20 ตุ่ม)

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
14	5.0	0.1	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวบนแคลลัสจำนวนมาก (มากกว่า 20 ตุ่ม)
15	7.0	0.1	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
16	10.0	0.1	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
17	0	0.5	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
18	0.1	0.5	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียว	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
19	0.5	0.5	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
20	1.0	0.5	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวบนแคลลัส 5 - 10 ตุ่ม

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
21	3.0	0.56	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวบนแคลลัส 5 - 10 ตุ่ม
22	5.0	0.5	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อ แคลลัสและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
23	7.0	0.5	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อ แคลลัสและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
24	10.0	0.5	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
25	0	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนม่วงอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
26	0.1	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีน้ำตาลอ่อน บนแคลลัสประมาณ 10 ตุ่ม

171437

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
27	0.5	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
28	1.0	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด และด้านบนเนื้อเยื่อมี สีเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวบน แคลลัสจำนวนมาก (มากกว่า 20 ตุ่ม)
29	3.0	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด และด้านบนเนื้อเยื่อมี สีเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียว บนแคลลัสจำนวนมาก
30	5.0	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด และด้านบนเนื้อเยื่อมี สีเขียวอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียว บนแคลลัสจำนวนมาก
31	7.0	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย
32	10.0	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย
33	0	1.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองปนม่วงอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีน้ำตาล อ่อน ประมาณ 10 ตุ่ม

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
34	0.1	3.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
35	0.5	3.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
36	1.0	3.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
37	3.0	3.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียว บนแคลลัสจำนวนมาก
38	5.0	3.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียว จำนวนมาก บนแคลลัส
39	7.0	3.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อ แคลลัส และอาหาร เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
40	10.0	3.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อแคลลัส และอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
41	0	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อแคลลัส และอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
42	0.1	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและด้านบนเนื้อเยื่อ สีเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื้อเยื่อแคลลัส และอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
43	0.5	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและด้านบนเนื้อเยื่อ สีขาวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
44	1.0	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและด้านบนเนื้อเยื่อ สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวจำนวนมาก บนแคลลัส

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	3 สัปดาห์	6 สัปดาห์
45	3.0	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและด้านบนเนื้อเยื่อ สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวจำนวนมาก บนแคลลัส
46	5.0	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและด้านบนเนื้อเยื่อ สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวจำนวนมาก บนแคลลัส
47	7.0	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและด้านบนเนื้อเยื่อ สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
48	10.0	5.0	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและด้านบนเนื้อเยื่อ สีเขียวปนเหลืองอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น

ตาราง 3 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

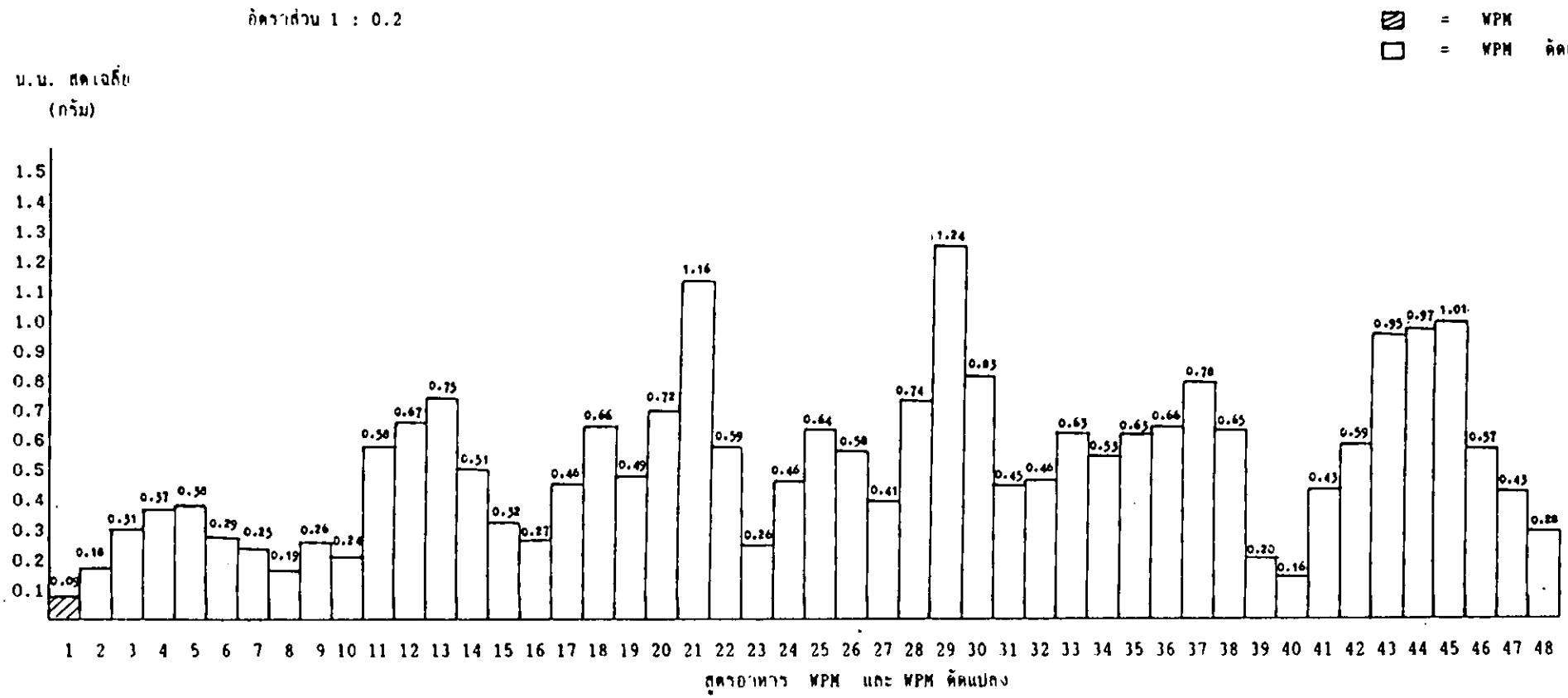
สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส (กรัม)
	BA	2,4-D	
1	0	0	0.09
2	0.1	0	0.18
3	0.5	0	0.31
4	1.0	0	0.37
5	3.0	0	0.38
6	5.0	0	0.29
7	7.0	0	0.25
8	10.0	0	0.19
9	0	0.1	0.26
10	0.1	0.1	0.24
11	0.5	0.1	0.58
12	1.0	0.1	0.67
13	3.0	0.1	0.75
14	5.0	0.1	0.51
15	7.0	0.1	0.32
16	10.0	0.1	0.27
17	0	0.5	0.46

ตาราง 3 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส (กรัม)
	BA	2,4-D	
18	0.1	0.5	0.66
19	0.5	0.5	0.49
20	1.0	0.5	0.72
21	3.0	0.5	1.16
22	5.0	0.5	0.59
23	7.0	0.5	0.26
24	10.0	0.5	0.46
25	0	1.0	0.64
26	0.1	1.0	0.58
27	0.5	1.0	0.41
28	1.0	1.0	0.74
29	3.0	1.0	1.24
30	5.0	1.0	0.83
31	7.0	1.0	0.49
32	10.0	1.0	0.46
33	0	3.0	0.63
34	0.1	3.0	0.53
35	0.5	3.0	0.63

ตาราง 3 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส (กรัม)•
	BA	2,4-D	
36	1.0	3.0	0.63
37	3.0	3.0	0.78
38	5.0	3.0	0.65
39	7.0	3.0	0.21
40	10.0	3.0	0.17
41	0	5.0	0.44
42	0.1	5.0	0.60
43	0.5	5.0	0.95
44	1.0	5.0	0.97
45	3.0	5.0	1.01
46	5.0	5.0	0.58
47	7.0	5.0	0.43
48	10.0	5.0	0.28



ภาพประกอบ 1 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสใบ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ภาพประกอบ 2 ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{20} เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การเกิดหน่อ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเป็นเวลา 9 และ 12 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อแคลลัสและอาหารเป็นสีน้ำตาล มากน้อยตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ พบว่า มีตุ่มสีเขียวเล็ก ๆ เกิดขึ้นบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_5 และ WPM_6) หรือ BA ความเข้มข้น 1, 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{13}, WPM_{14}, WPM_{20}, WPM_{21}, WPM_{28}, WPM_{29}, WPM_{30}, WPM_{37}, WPM_{38}, WPM_{44}, WPM_{45} และ WPM_{46}) รวม 14 สูตร และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 - 12 สัปดาห์ ตุ่มสีเขียวเล็ก ๆ จะเพิ่มปริมาณและยืดยาวออกมากกว่าเดิม แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{29}) ตุ่มสีเขียวเล็ก ๆ บนแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นหน่อ ซึ่งมีใบขนาดเล็ก 1-2 ใบ (ตาราง 4 ภาพประกอบ 3 และ 4)

ตาราง 4 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 9 และ 12 สัปดาห์

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	9 สัปดาห์	12 สัปดาห์
1	0	0	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย เนื้อเยื่อแคลลัสและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	แคลลัสไม่เพิ่มปริมาณ
2	0.1	0	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้นเล็กน้อย สีเหลืองปนเขียวและสีน้ำตาลอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย
3	0.5	0	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเหลืองปนน้ำตาล	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย
4	1.0	0	เหมือน WPM_3	เหมือน WPM_3
5	3.0	0	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเหลืองปนเขียว และมีตุ่มสีเขียวบนแคลลัสประมาณ 10 ตุ่ม	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น ตุ่มขาวขึ้นเล็กน้อย เนื้อเยื่อแคลลัส และอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
6	5.0	0	เหมือน WPM_5	เหมือน WPM_5
7	7.0	0	เหมือน WPM_3	เหมือน WPM_3
8	10.0	0	เหมือน WPM_3	เหมือน WPM_3
9	0	0.1	เหมือน WPM_3	เหมือน WPM_3

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	9 สัปดาห์	12 สัปดาห์
10	0.1	0.1	เหมือน WPM_3	เหมือน WPM_3
11	0.5	0.1	เหมือน WPM_3	เหมือน WPM_3
12	1.0	0.1	เหมือน WPM_3	เหมือน WPM_3
13	3.0	0.1	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสยาวกว่าเดิม	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสยาวกว่าเดิม ประมาณ 0.1 - 0.3 เซนติเมตร
14	5.0	0.1	เหมือน WPM_{13}	เหมือน WPM_{13}
15	7.0	0.1	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเขียวปนน้ำตาลอ่อน	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย สีเขียวปนน้ำตาลมากขึ้นกว่าเดิม
16	10.0	0.1	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
17	0	0.5	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเหลืองปนม่วงอ่อน บนแคลลัสเกิดตุ่มสีน้ำตาลอ่อน 3-5 ตุ่ม	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เล็กน้อยตุ่มสีน้ำตาลยาวกว่าเดิมเล็กน้อย ขับสารสีน้ำตาลเล็กน้อย
18	0.1	0.5	เหมือน WPM_{17}	เหมือน WPM_{17}

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	9 สัปดาห์	12 สัปดาห์
19	0.5	0.5	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
20	1.0	0.5	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเหลืองปนเขียว ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสยาวกว่าเดิมเล็กน้อย	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย ตุ่มสีเขียวยาวกว่าเดิมเล็กน้อย ขับสารสีน้ำตาลเล็กน้อย
21	3.0	0.5	เหมือน WPM_{20}	เหมือน WPM_{20}
22	5.0	0.5	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
23	7.0	0.5	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
24	10.0	0.5	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
25	0	1.0	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเหลืองปนม่วงอ่อน บนแคลลัสเกิดตุ่มสีน้ำตาลประมาณ 10 ตุ่ม	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย ตุ่มสีน้ำตาลบนแคลลัสยาวกว่าเดิม
26	0.1	1.0	เหมือน WPM_{25}	เหมือน WPM_{25}
27	0.5	1.0	เหมือน WPM_{25}	เหมือน WPM_{25}

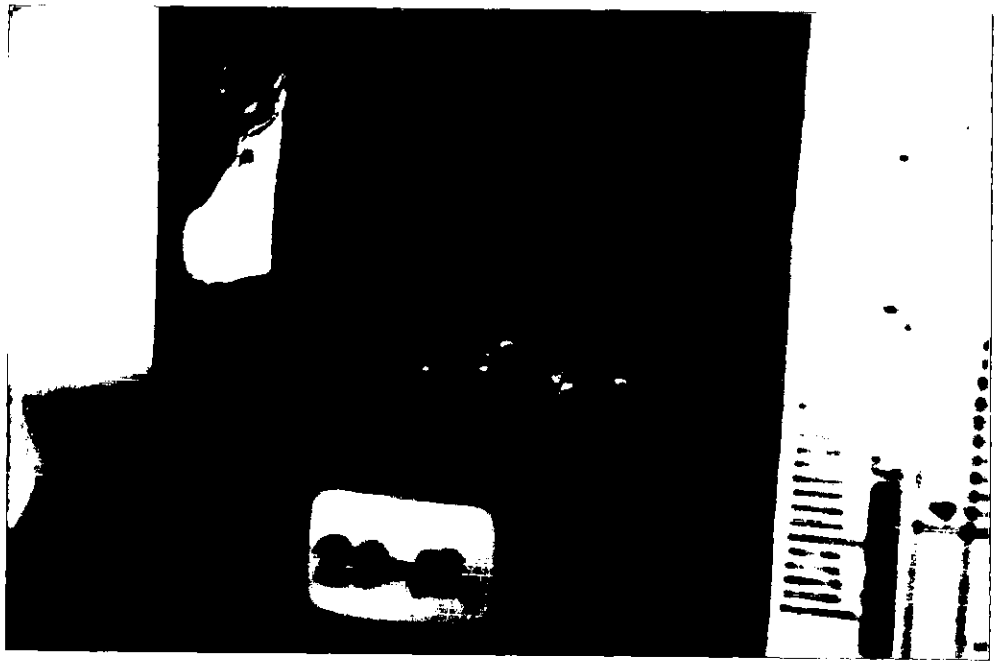
ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	9 สัปดาห์	12 สัปดาห์
28	1.0	1.0	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ตุ่มบนแคลลัสยาวกว่าเดิม เล็กน้อย	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย ตุ่มสีเขียวยาวกว่าเดิม
29	3.0	1.0	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เล็กน้อย ตุ่มสีเขียวเจริญไปเป็นลักษณะคล้ายใบขนาดเล็กสีเขียวย่อน	ใบขยายใหญ่ขึ้นและยาวขึ้น เล็กน้อย ส่วนตุ่มที่เหลือก็จะเจริญไปเป็นใบ 1-2 ใบ ขนาดเล็กเป็นลักษณะของ primodium shoot
30	5.0	1.0	เหมือน WPM_{26}	เหมือน WPM_{26}
31	7.0	1.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
32	10.0	1.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
33	0	3.0	เหมือน WPM_{26}	เหมือน WPM_{26}
34	0.1	3.0	เหมือน WPM_{25}	เหมือน WPM_{25}
35	0.5	3.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
36	1.0	3.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
37	3.0	3.0	เหมือน WPM_{20}	เหมือน WPM_{20}
38	5.0	3.0	เหมือน WPM_{20}	เหมือน WPM_{20}

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	9 สัปดาห์	12 สัปดาห์
39	7.0	3.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
40	10.0	3.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
41	0	5.0	เหมือน WPM_{25}	เหมือน WPM_{25}
42	0.1	5.0	เหมือน WPM_{25}	เหมือน WPM_{25}
43	0.5	5.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
44	1.0	5.0	เหมือน WPM_{20}	เหมือน WPM_{20}
45	3.0	5.0	เหมือน WPM_{20}	เหมือน WPM_{20}
46	5.0	5.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
47	7.0	5.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}
48	10.0	5.0	เหมือน WPM_{15}	เหมือน WPM_{15}

ภาพประกอบ 3 ลักษณะของตุ่มบนแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{29} เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นหน่อ ในเวลา 12 สัปดาห์



ภาพประกอบ 4 ลักษณะเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{29} เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ซึ่งให้หน่อเล็ก ๆ จำนวนมาก

การเกิดต้น

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเป็นเวลา 15 และ 18 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่อยู่บนอาหารส่วนใหญ่ยังขับสารสีน้ำตาล เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตร WPM_{13}) เป็นเวลา 18 สัปดาห์ สามารถพัฒนาไปเป็นลักษณะคล้ายต้นแต่ไม่มีราก และการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 สัปดาห์ ตุ่มสีเขียวที่เกิดขึ้นบนแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นโครงสร้างลักษณะคล้ายใบขนาดเล็ก แล้วจะพัฒนาไปเป็นใบที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ไม่พบว่ามีลำต้นเกิดขึ้นบนอาหารสูตรใดเลยในสัปดาห์ที่ 18 (ตาราง 5 ภาพประกอบ 5) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตร WPM_{17}, WPM_{18}, WPM_{25}, WPM_{26}, WPM_{33}, WPM_{34}, WPM_{41}, และ WPM_{42}) เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ จะเกิดตุ่มเล็ก ๆ สีน้ำตาลบนอาหารสูตร WPM_{26} และในสัปดาห์ที่ 12 จะเกิดตุ่มตังกล่าวบนอาหารสูตร WPM_{17}, WPM_{18}, WPM_{25}, WPM_{33}, WPM_{34}, WPM_{41} และ WPM_{42} เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 สัปดาห์ ตุ่มสีน้ำตาลนั้น จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นราก และสูตร WPM ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{26}) จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากได้เร็วกว่าสูตรอื่น ๆ และมีจำนวนมากกว่าด้วย (ตาราง 2, 4 และ 5 ภาพประกอบ 6)

ตาราง 5 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 15 และ 18 สัปดาห์

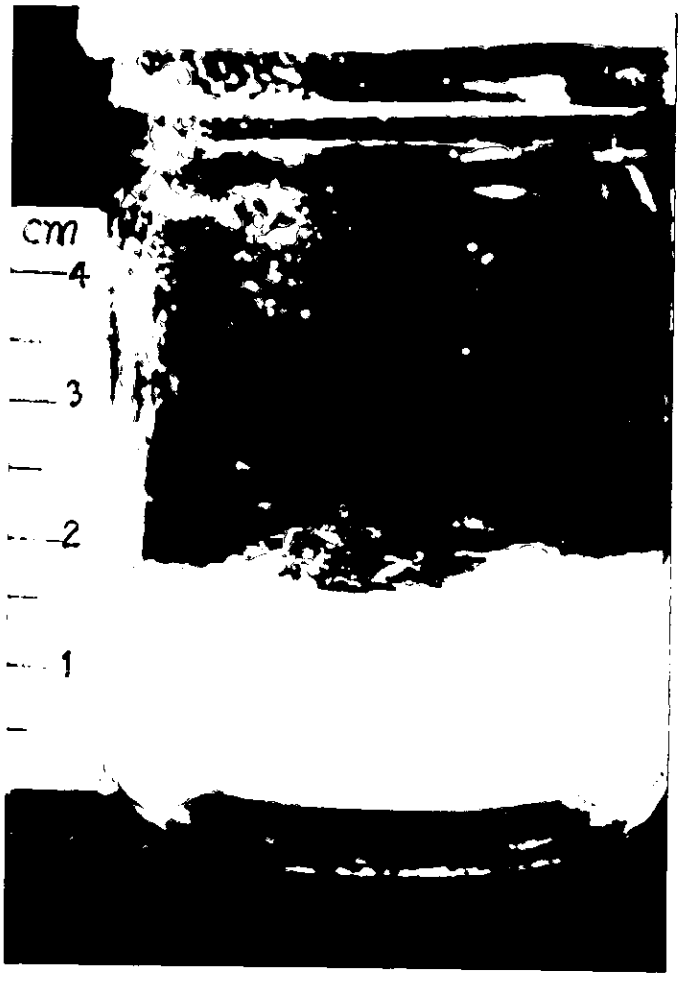
สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	15 สัปดาห์	18 สัปดาห์
5	3.0	0	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย สีเหลืองปนน้ำตาล ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่เปลี่ยนไปเป็นสีเขียวเข้ม	แคลลัสไม่เพิ่มปริมาณ สีน้ำตาลเข้ม ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสเริ่มตาย
6	5.0	0	เหมือน WPM_5	เหมือน WPM_5
13	3.0	0.1	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากกว่าเดิม ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสยาวมากขึ้นประมาณ 0.3 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายใบสีเขียว	ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสเปลี่ยนไปเป็นใบมียอดขนาดเล็กเกิดขึ้น
14	5.0	0.1	เหมือน WPM_{13}	เหมือน WPM_{13} ไม่มียอด
17	0	0.5	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีเหลืองปนม่วง ตุ่มสีน้ำตาลบนแคลลัสยาวมากกว่าเดิมเล็กน้อย	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย ตุ่มยาวขึ้นกว่าเดิม ลักษณะคล้ายรากแทงลงไปในอาหาร

ตาราง 5 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	15 สัปดาห์	18 สัปดาห์
18	0.1	0.5	เหมือน WPM_{17}	เหมือน WPM_{17}
20	1.0	0.5	เหมือน WPM_{5}	เหมือน WPM_{5}
21	3.0	0.5	เหมือน WPM_{5}	เหมือน WPM_{5}
25	0	1.0	เหมือน WPM_{17}	เหมือน WPM_{17}
26	0.1	1.0	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย ตุ่มสีน้ำตาลบนแคลลัสยาวขึ้นโดยเจริญลงไปในอาหาร เป็นลักษณะของการเกิดราก	การเจริญของรากที่เกิดขึ้นจะยาวกว่าเดิมเล็กน้อย และมีจำนวนเพิ่มขึ้น
28	1.0	1.0	แคลลัสเพิ่มปริมาณเล็กน้อย สีเขียวปนน้ำตาลอ่อนเล็กน้อย ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสยาวกว่าเดิมเล็กน้อย	แคลลัสไม่เพิ่มปริมาณ สีเขียวปนน้ำตาลมากขึ้น ตุ่มสีเขียวบนแคลลัสไม่ยาวกว่าเดิม
29	3.0	1.0	แคลลัสไม่เพิ่มขนาด แต่หน่อมีความยาวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สีเขียวปนสีน้ำตาล	แคลลัสและหน่อไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ตาราง 5 (ต่อ)

สูตรอาหาร WPM	สารเร่งการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) BA	2,4-D	15 สัปดาห์	18 สัปดาห์
33	0	3.0	เหมือน WPM_{17}	เหมือน WPM_{17}
34	0.1	3.0	เหมือน WPM_{17}	เหมือน WPM_{17}
37	3.0	3.0	เหมือน WPM_{28}	เหมือน WPM_{28}
38	5.0	3.0	เหมือน WPM_{28}	เหมือน WPM_{28}
41	0	5.0	เหมือน WPM_{17}	เหมือน WPM_{17}
42	0.1	5.0	เหมือน WPM_{17}	เหมือน WPM_{17}
44	1	5.0	เหมือน WPM_{28}	เหมือน WPM_{28}
45	3	5.0	เหมือน WPM_{28}	เหมือน WPM_{28}



ภาพประกอบ 5 ลักษณะของหน่อที่เกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร WPM ดัดแปลง โดยเติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{13}) เป็นเวลา 18 สัปดาห์

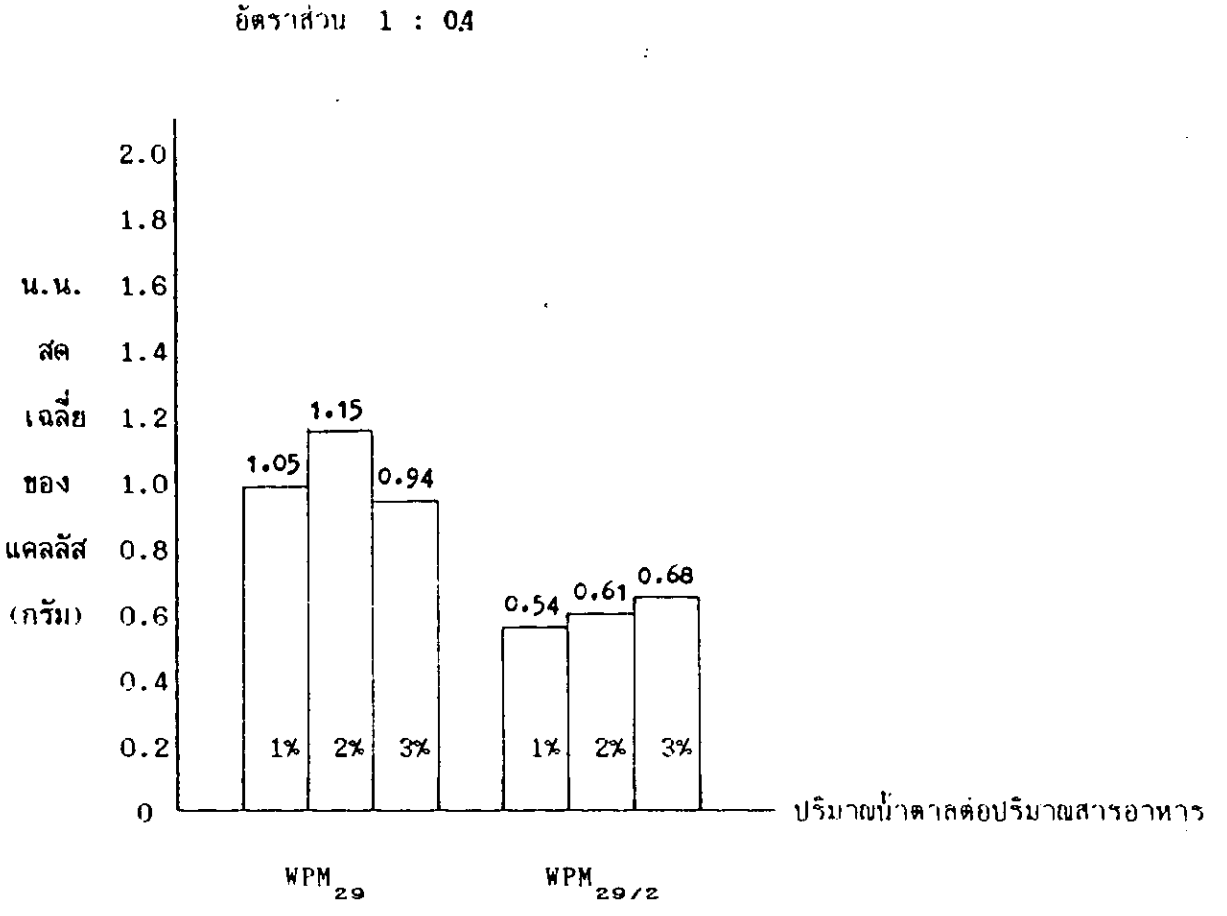
ภาพประกอบ 6 ลักษณะของรากที่เกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{20}) เป็นเวลา 18 สัปดาห์

<u>การทดลองที่ 2</u> การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเพญาราก(ต่ำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและน้ำตาลที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส

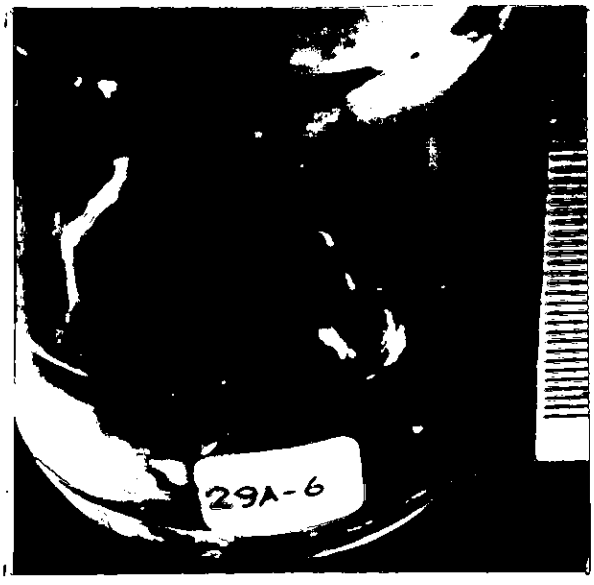
จากการทดลองที่ 1 ได้คัดเลือกสูตรอาหาร WPM_{29} (เป็นสูตรที่ทำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ดีมีน้ำหนักมากที่สุด) นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยการลดปริมาณสารอาหาร และเพิ่มหรือลดปริมาณน้ำตาล จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร WPM_{29} น้ำตาล 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากกว่าอาหารสูตร $WPM_{29/2}$ (สูตร WPM_{29} ที่ลดธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองลงครึ่งหนึ่ง) น้ำตาล 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 6 ภาพประกอบ 7) เนื้อเยื่อบนอาหารสูตร WPM_{29} น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จะได้แคลลัสที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด 1.15 กรัม และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำหนักน้อยที่สุด เฉลี่ย 0.94 กรัม ส่วนเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร $WPM_{29/2}$ น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำหนักแคลลัสสดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.68 กรัม และน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำหนักน้อยที่สุด เฉลี่ย 0.54 กรัม จากการทดลองสูตรอาหารที่ให้น้ำหนักแคลลัสมากที่สุด คือ สูตรอาหาร WPM_{29} น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 6 ภาพประกอบ 7, 8 และ 9)

ตาราง 6 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{29} ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส ระยะเวลา 6 สัปดาห์

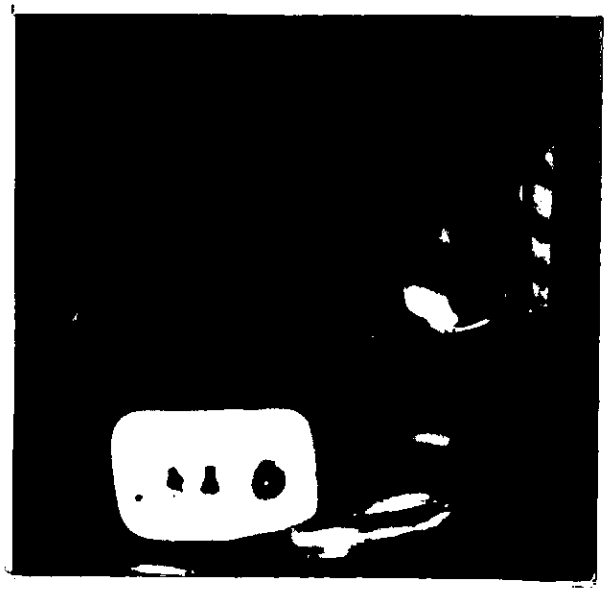
สูตรอาหาร	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)		
	น้ำตาล 1%	น้ำตาล 2%	น้ำตาล 3%
WPM_{29}	1.05	1.15	0.94
$WPM_{29/2}$	0.54	0.61	0.68



ภาพประกอบ 7 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสใบที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM และ WPM/2 ดัดแปลงโดยเติม BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{29} และ $WPM_{29/2}$) มีปริมาณน้ำตาล 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์



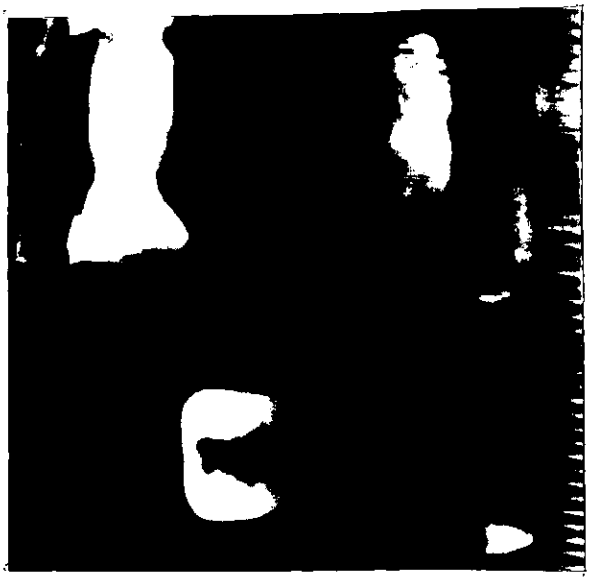
8.1



8.2

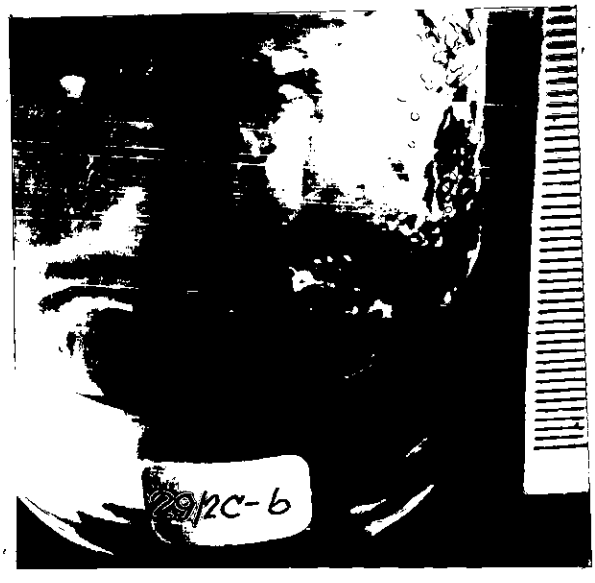
8.3

ภาพประกอบ 8 ลักษณะของเนื้อเยื่อใบที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 8.1) น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 8.2) และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 8.3)



9.1

9.2



9.3

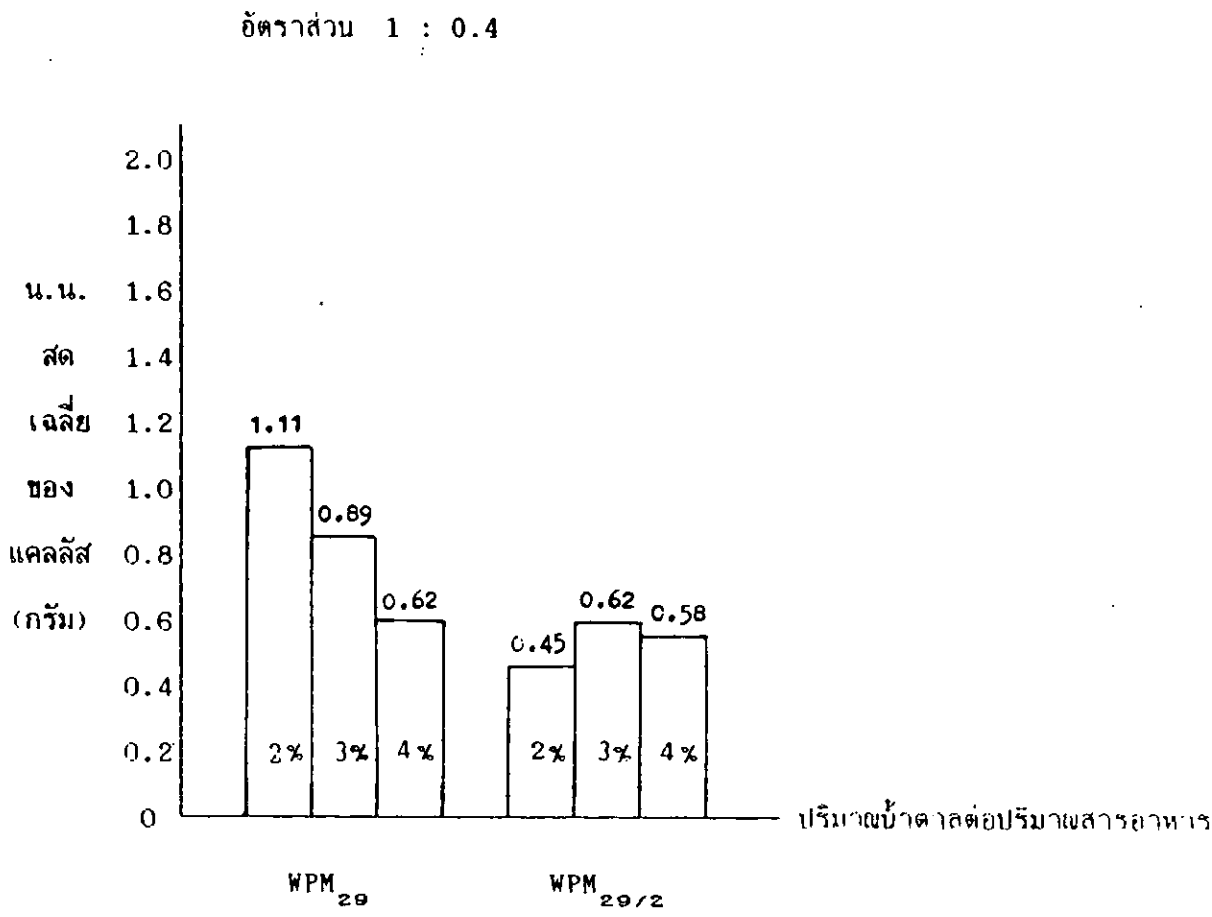
ภาพประกอบ 9 ลักษณะของเนื้อเยื่อใบที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM/2 ดัดแปลงโดยเติม BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.1) น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.2) และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.3)

<u>การทดลองที่ 3</u> การเพาะเลี้ยงแคลลัสใบพญาราก่ำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหาร และน้ำตาลที่มีผลต่อการเกิดหน่อ

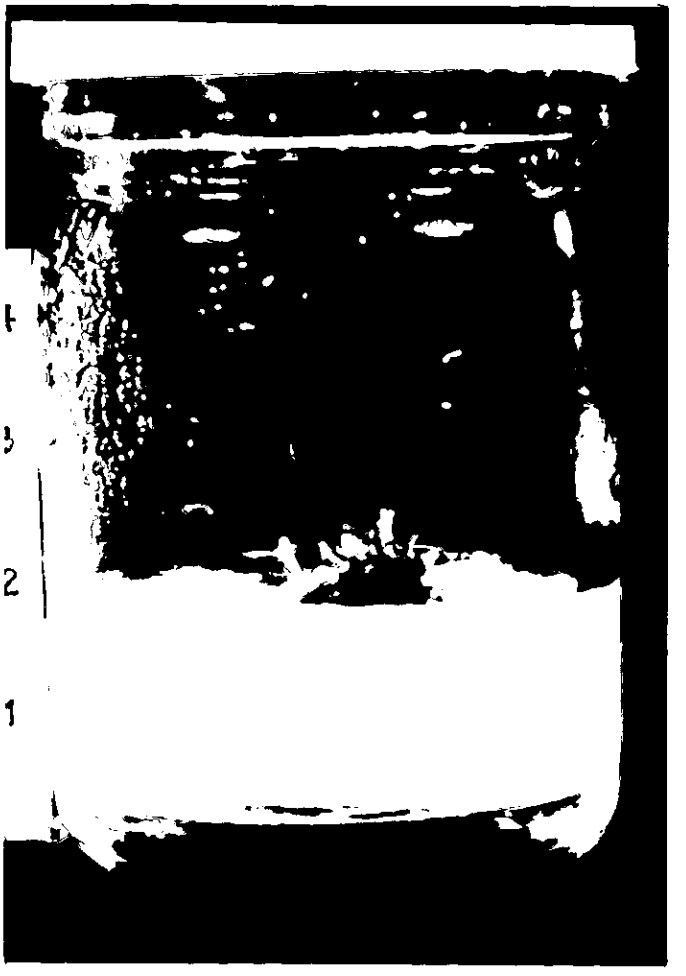
อาหารสูตร WPM_{20} ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 (เนื้อเยื่อสามารถพัฒนาไปเป็นหน่อได้ดี) นำมาเพาะเลี้ยงแคลลัส เพื่อเพิ่มปริมาณการเกิดหน่อ โดยการลดปริมาณสารอาหาร และเพิ่มหรือลดปริมาณน้ำตาล จากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร WPM_{20} และ $WPM_{20/2}$ ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร WPM_{20} ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ได้น้ำหนักแคลลัสมากกว่าที่เติมน้ำตาล 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร $WPM_{20/2}$ พบว่าใช้น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำหนักแคลลัสมากกว่าใช้น้ำตาล 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาพประกอบ 10) นอกจากนี้ พบว่าสูตรอาหาร WPM_{20} ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสูตรที่ให้น้ำหนักแคลลัสมากที่สุด และอาหารดังกล่าวนี้แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นหน่อจำนวนมาก (มากกว่า 10 หน่อ) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัส 1.11 กรัม ส่วนอาหารสูตร WPM_{20} น้ำตาล 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร $WPM_{20/2}$ น้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นหน่อเลย (ตาราง 7 ภาพประกอบ 10 และ 11)

ตาราง 7 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{20} ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและน้ำตาลต่อการเกิดหน่อ ระยะเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ปริมาณน้ำตาล					
	2%		3%		4%	
	น.น.สด เฉลี่ย (กรัม)	จำนวนหน่อ เฉลี่ย (ต้น)	น.น.สด เฉลี่ย (กรัม)	จำนวนหน่อ เฉลี่ย (ต้น)	น.น.สด เฉลี่ย (กรัม)	จำนวนหน่อ เฉลี่ย (ต้น)
WPM_{20}	1.11	มากกว่า 10	0.89	0	0.62	0
$WPM_{20/2}$	0.49	0	0.70	0	0.58	0



ภาพประกอบ 10 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสและหน่อที่เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM และ WPM/2 ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{29} และ $WPM_{29/2}$) ที่ระดับน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์

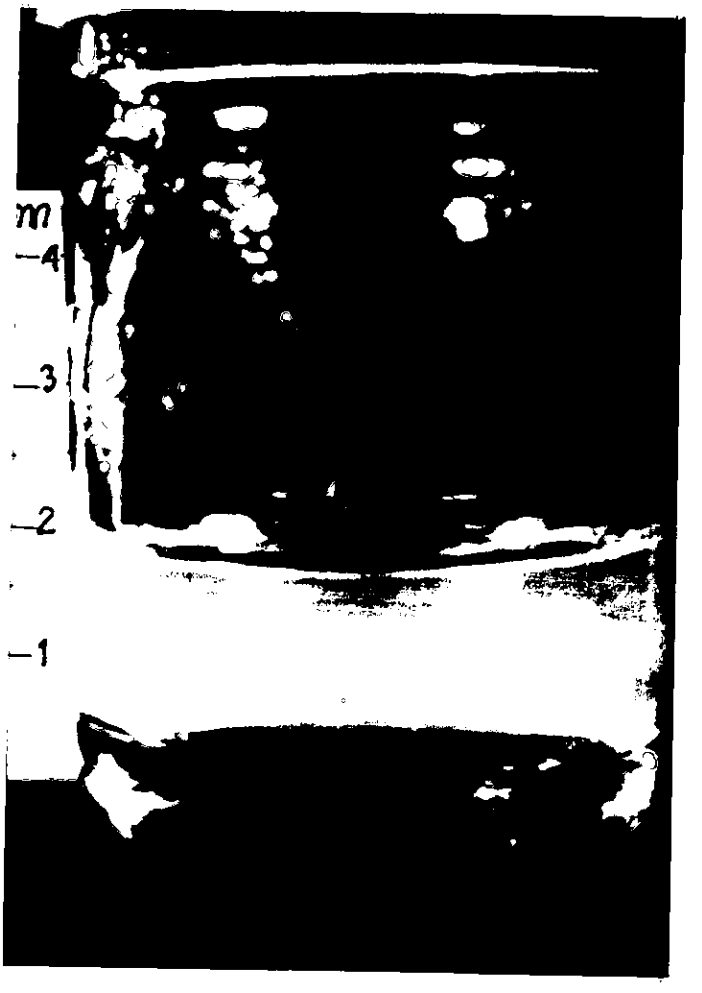


ภาพประกอบ 11 ลักษณะของแคลลัส และหน่อที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร WPM ดัดแปลงโดยเติม BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{29}) และ น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

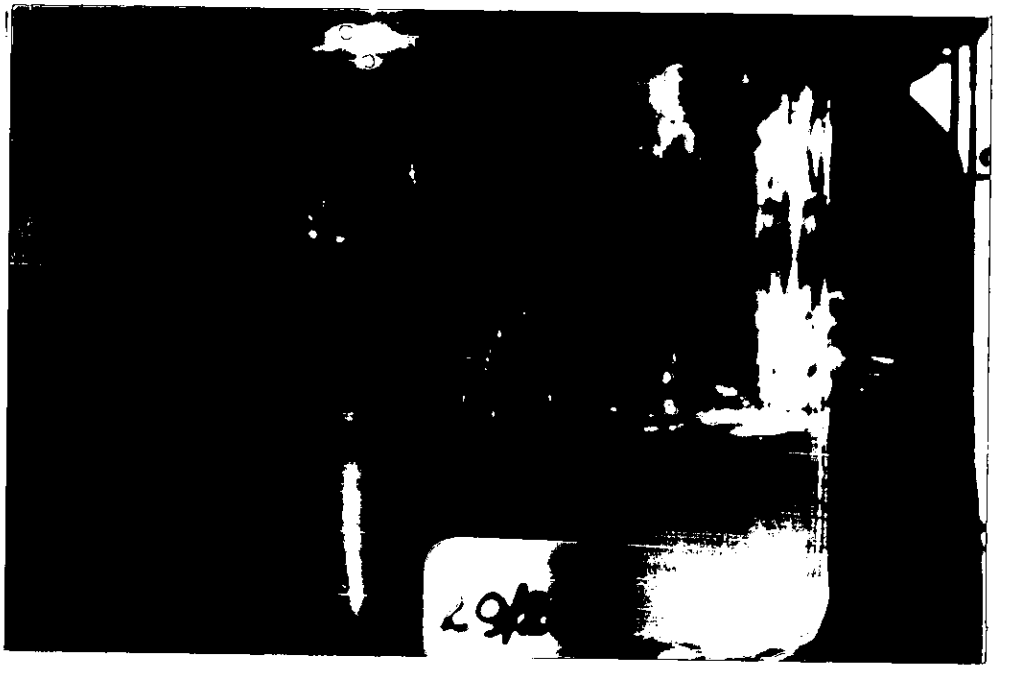
<u>การทดลองที่ 4</u> การเพาะเลี้ยงหน่อพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เหมาะสมเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเกิดต้น

จากการนำอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{13}) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 และเติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ มาเพาะเลี้ยงหน่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{29} จากการทดลองที่ 3 เพื่อเพิ่มปริมาณการเกิดต้น โดยได้ทดลองเปรียบเทียบกับการใช้อาหารสูตร WPM_{13} ที่ลดธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งหนึ่ง ($WPM_{13/2}$) อาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต WPM และอาหารสูตร WPM ที่ลดธาตุลงครึ่งหนึ่ง (WPM/2) โดยที่ทุกสูตรใช้ปริมาณน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าหน่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{13} สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้เฉลี่ยขวดละ 1.5 ต้น และบนอาหารสูตร $WPM_{13/2}$ หน่อพัฒนาเป็นต้นได้เฉลี่ยขวดละ 0.4 ต้น ส่วนหน่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM และ WPM/2 ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ (ตาราง 9 ภาพประกอบ 12)

เนื่องจากการทดลองดังกล่าวยังไม่เป็นที่พอใจ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำหน่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{29} (จากการทดลองที่ 3) ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM_{29} ที่ลดธาตุหลัก และธาตุรองลงครึ่งหนึ่ง ($WPM_{29/2}$) และที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3 สัปดาห์ พบว่าหน่อสามารถพัฒนาไปเป็นต้นเฉลี่ยขวดละ 3 ต้น (ภาพประกอบ 13) และต้นที่ได้จะเจริญได้ดีกว่าสูตร WPM_{13} แต่ก็ไม่เกิดราก



ภาพประกอบ 12 ลักษณะของต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (WPM_{13}) เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพประกอบ 13 ลักษณะของต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงหน่อบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงโดยลดธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองลงครึ่งหนึ่ง และเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ ($WPM_{29/2}$) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

การชักนำเนื้อเยื่อให้เจริญเป็นแคลลัส

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM และ WPM ดัดแปลง เนื้อเยื่อสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้บนอาหารทุกสูตร ในการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต จะเกิดแคลลัสรอบ ๆ บริเวณรอยตัด เวลาที่ใช้ในการเจริญเป็นแคลลัสจะมากกว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง และน้ำหนักของแคลลัสสดเฉลี่ยก็น้อยกว่าด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายการของ Strell (1977 : 271) ว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตจะสามารถสร้างแคลลัสได้นั้น เนื่องจากบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อพืชจะมีการสร้างสารเร่งการเจริญเติบโตขึ้น ที่ประกอบด้วยไซโตไคนินและออกซินเป็นสำคัญ จึงทำให้เนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์ได้ และการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อจะเกิดอย่างต่อเนื่องไปได้ จะต้องมีสารเร่งการเจริญเติบโตเข้าไปช่วยส่งเสริมการทำงาน

เนื้อเยื่อใบพญารากดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง โดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ด้วย BA และกลุ่มออกซิน ด้วย 2,4-D พบว่าทุก ๆ กลุ่มความเข้มข้นของ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ จะให้น้ำหนักแคลลัสสดเฉลี่ยมากกว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 7 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้ตรงกับรายงานของ Okazawa และ คณะ (1966 : 862 - 869) ว่าอัตราส่วนระหว่างไซโตไคนินและออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่างกันจะทำให้การเจริญของเนื้อเยื่อแตกต่างกันไป อัตราส่วนของไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นสูงกว่าออกซิน จะช่วยให้เนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์ได้ดีขึ้น เนื่องจากไซโตไคนินจะไป

ช่วยส่งเสริมปฏิกริยาการทำงานของออกซิน (Hussey. 1976 : 253 - 262) เนื้อเยื่อพืช ที่มีการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง และสามารถเกิดแคลลัสได้ดี เช่น เนื้อเยื่อใบ ยูคาลิปตัส (E. camaldulensis Dehnh.) ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (Nuralidaran and Mascalenhas. 1987 : 256 - 259) เนื้อเยื่อคัพภะของทุเรียนบก (D. lowianus Scort. ex King.) ที่เติม BAP 1 - 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (ประยงค์ คงนคร. 2528 : 18 - 35) ผลการเพาะเลี้ยงดังกล่าว จะขัดแย้งกับการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพญารากดำและเนื้อเยื่อใบ พญารากดำที่เพาะเลี้ยงครั้งนี้จะเกิดแคลลัสได้ดี และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์

การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นหน่อ

เมื่อนำแคลลัสใบพญารากดำที่คัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร WPM ดังกล่าว มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงด้วยการลดธาตุหลัก และธาตุรองลงครึ่งหนึ่ง พร้อมทั้งเพิ่มและลดปริมาณน้ำตาลจากเดิม 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้ปริมาณสาร เร่งการเจริญเติบโตเท่าเดิม คือ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า แคลลัสใบสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นหน่อได้ จำนวนมากกว่า 10 หน่อ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่ใช้ธาตุหลักและธาตุรอง เต็มสูตร เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งการทดลองนี้จะสอดคล้องกับคำกล่าวที่ว่า ถ้าในอาหารมีปริมาณ ออกซินน้อยมีไซโตไคนินมาก ทำให้อัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินต่ำ จะทำให้เนื้อเยื่อเจริญไปเป็น ยอดได้มาก (Miller and Skoog. 1957 : 118 - 130) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ถ้าปริมาณ น้ำตาลเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือสารอาหารลดลงจะทำให้น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยลดลง และไม่มีการพัฒนา ไปเป็นหน่อได้ มีแต่การเพิ่มขนาดของแคลลัสไปเรื่อย ๆ

การเกิด morphogenesis เพื่อพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืชจะดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ แสง อุณหภูมิ สารควบคุมการเจริญเติบโต

ปริมาณสารอาหาร ชนิดของอาหาร ปริมาณน้ำตาล และอื่น ๆ จะต้องอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524 : 76 - 84) แต่ความต้องการของพืชแต่ละชนิดต่ออาหาร สารเร่งการเจริญเติบโต และปัจจัยอื่น ๆ นั้น จะมีความเหมาะสมไม่เหมือนกัน (บุญยืน กิจวิจารณ์. 2528 : 13) จึงทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน อันได้แก่การนำแคลลัสใบของยูคาลิปตัส (E. camaldulensis Dehnh.) ไปเพาะเลี้ยงในที่ไม่มีแสงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง โดยเติมน้ำมะพร้าว 5 - 10 เปอร์เซ็นต์ BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ และ 2iP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดหน่อจำนวนมากและเจริญเติบโตได้ดี

จะเห็นว่าอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากจะช่วยให้เนื้อเยื่อใบสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีแล้ว ยังช่วยให้เจริญและพัฒนาไปเป็นหน่อได้ด้วย

การชักนำหน่อให้เจริญเป็นต้น

เมื่อนำหน่อพญารากดำที่ได้ในการเพาะเลี้ยง (การทดลองที่ 3) ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง พบว่าอาหารสูตรที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ และบนอาหารสูตร WPM ที่ลดธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งหนึ่ง ดัดแปลงโดยเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้หน่อเจริญไปเป็นต้นได้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเกิดต้นและรากจะเกิดจากอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินที่สมดุลและเหมาะสม นอกจากนั้นแล้ว ออกซินและไซโตไคนินยังมีความสำคัญในการควบคุม morphogenesis ของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเทียม และเชื่อกันว่าความสมดุลของออกซินและไซโตไคนินที่ใส่ลงไปในอาหารนั้น ๆ จะต้องมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโตที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชนั้นด้วย คือถ้าเนื้อเยื่อใดมีสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใดชนิดหนึ่งมาก ก็จะใส่สารเร่งการเจริญเติบโตชนิดนั้นลงไปในอาหารที่เพาะเลี้ยงเป็นปริมาณน้อย (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524 : 81 - 84)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่ได้มีการทดลองและสามารถเกิดต้นได้ เช่น การเพาะเลี้ยงตาข้างของ A. glutinosa Gearth. บนอาหารที่ลดธาตุหลัก

และธาตุรองลงครึ่งหนึ่ง แล้วเติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยงหน่อพญารากดำที่สามารถเกิดต้นได้บนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง จะต้องลดธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งหนึ่งด้วยเช่นกัน แต่การเติมสารเร่งการเจริญเติบโตหรืออื่น ๆ เช่น ปริมาณน้ำตาลอาจจะแตกต่างกันบ้าง ในการทดลองเพาะเลี้ยงหน่อพญารากดำครั้งนี้ปรากฏว่าบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่ไม่ลดธาตุหลักและธาตุรองก็สามารถเกิดต้นได้ แต่ลักษณะของต้นพร้อมทั้งการเจริญเติบโตของต้นที่เกิดขึ้นจะไม่สมบูรณ์เหมือนต้นที่เกิดขึ้นบนอาหารที่ลดธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งหนึ่งของสูตรอาหารดังกล่าว อาจจะเป็นเพราะว่าการพัฒนาเป็นต้นนั้น ต้องการปริมาณเกลือแร่น้อยกว่าการเกิดเป็นแคลลัสและหน่อ ในสูตรอาหารอื่น ๆ ที่มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เกิดต้นได้ ต้องลดธาตุหลักและธาตุรองให้น้อยลงด้วย เช่น การเพาะเลี้ยงหน่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดสัก (T. grandis Linn.) บนอาหารสูตร WPM ที่ลดธาตุหลักและธาตุรองลง แล้วเติม IAA, IPA และ IBA อย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญเป็นต้นและรากได้ดี (Gupta and others. 1980 : 259 - 268) หน่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของเสี้ยน (M. azedarach Linn.) นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดธาตุหลักและธาตุรองลงเหลือ 1 ใน 4 ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต หน่อสามารถพัฒนาไปเป็นต้นและรากได้ (วิลาศ วิชญะเตชา. 2526 : 52 - 55) การเกิดต้นบนอาหารแต่ละชนิดของพืชแต่ละชนิดจะมีความเหมาะสมไม่เหมือนกัน (บุญยืน กิจวิจารณ์. 2528 : 13) ถ้านำอาหารสูตร WPM, MS และ WM มาเปรียบเทียบสารอาหารและปริมาณสารอาหาร จะเห็นว่าอาหารสูตร WPM จะมีปริมาณมากกว่า MS และ WM ถึงแม้ว่าจะมีสารบางอย่างไม่เหมือนกัน แต่ส่วนใหญ่แล้วส่วนประกอบของสารจะเหมือนกัน (ตาราง 10)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่จะให้ผลดีนั้น ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะต้องมีรากเกิดขึ้นและสามารถนำออกปลูกตามธรรมชาติได้ ในการทดลองครั้งนี้ต้นที่เพาะเลี้ยงได้มีขนาดเล็กไม่เกิดราก แต่จะพบว่ารากเกิดขึ้นได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.5, 1, และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์หรือบนอาหารดังกล่าวถ้าไม่มี BA ร่วมอยู่ด้วยแคลลัสก็สามารถเกิดรากได้ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ รากสามารถเกิดได้เร็วและเจริญได้ดีกว่าสูตรอื่นที่เกิดราก ซึ่งตรงกับคำกล่าวที่ว่า ถ้าอัตราส่วนของ

ออกซินมากกว่าไซโตไคนิน จะทำให้อัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงกว่าสมดุล ทำให้เนื้อเยื่อเจริญและพัฒนาไปเป็นราก (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524 : 81 - 82) และ 2,4-D เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มออกซินที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดราก (Linser. 1966 : 776 - 784) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจำพวกไม้ยืนต้นที่สามารถเกิดรากได้แก่ การเพาะเลี้ยงแคลลัสใบของยูคาลิปตัส (E. camaldulensis Dehnh.) บนอาหารเหลวสูตร WPM ที่เติม NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถเกิดรากได้ (Muralidaran and Mascarenhas. 1987 : 256 - 259) นอกจากนั้น การเพาะเลี้ยงปลายยอดสนญี่ปุ่น (C. japonica) บนอาหารสูตร Walter and Skoog ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถเกิดรากได้เช่นกัน (Isikawa and others. 1987 : 119 - 154)

การเพาะเลี้ยงหน่อพญารากดำที่สามารถเกิดต้นได้บนอาหารสูตร WPM ดัดแปลงที่ลดธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งหนึ่ง และเติม BA 3 มิลลิกรัม ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่เพาะเลี้ยงได้มีขนาดเล็กและไม่เกิดราก จึงไม่สามารถนำออกปลูกภายนอกตามธรรมชาติได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต้นที่ได้ต่อไปอีกพบว่าต้นจะหยุดการเจริญเติบโตแล้วค่อย ๆ ตายไปในที่สุด ส่วนรากนั้นจะเกิดได้ดีจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเกิดต้นและรากที่ได้จากการทดลองครั้งนี้จะเกิดขึ้นบนอาหารที่ดัดแปลงด้วยการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต และอื่น ๆ ต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าสิ่งที่นำมาใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพญารากดำครั้งนี้ ไปกระตุ้นการเกิดเป็น meristematic cell ที่จะพัฒนาไปเป็นต้นและรากไม่เป็นไปตามธรรมชาติของพืช (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524 : 76 - 78)

ข้อเสนอแนะ

1. จากการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อใบพญารากดำบนอาหารสูตร WPM ดัดแปลง ที่ได้แคลลัสมากที่สุดนั้น ยังมีน้ำหนักน้อยมาก ควรหาสารเร่งการเจริญเติบโตอื่น ๆ มาใช้ในการทดลองครั้งต่อไป ควรมีการลดธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองให้น้อยกว่าเดิมที่สามารถเกิดต้นได้

เพื่อหาปริมาณการเจริญของต้นที่ดีกว่า

2. น่าจะใช้สูตรอาหารอื่น สารเร่งการเจริญเติบโตอื่นหรือสารอื่น ๆ ที่ช่วยในการพัฒนาต้นที่เพาะเลี้ยงเจริญได้ดีและมีรากที่สมบูรณ์

3. ควรหาสูตรอาหารอื่น นอกจากสูตร WPM มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส หน่อ และต้น เพื่อการพัฒนาที่ได้ผลดีที่สุดต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จำลอง เพ็งคล้าย และ ธวัชชัย สันติสุข. พฤกษศาสตร์ป่าไม้เบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์การศาสนา, 2516.

เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ – ชื่อพื้นเมือง). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัดพันนี่พับบลิชชิ่ง, 2523.

นันทวัน บุญยะประภัศร. ก้าวไปกับสมุนไพร. กรุงเทพฯ : ธรรมกมลการพิมพ์, ม.ป.ป.

บุญยืน กิจวิจารณ์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2528.

บุศบรรณ ณ สงขลา. สมุนไพร ตอนที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัดพันนี่พับบลิชชิ่ง, 2525.

ป่าไม้, กรม. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย เล่ม 1. ม.ป.ป., 2491

ประยงค์ คงนคร. การเพาะเลี้ยงเอมบริโอทุเรียนนกในหลอดทดลอง. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526. ถ่ายเอกสาร.

_____. การเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดทุเรียนนก. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2528. ถ่ายเอกสาร.

พยอม ตันติวัฒน์. สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2521.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. หลักการ และวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2524.

วิชาการเกษตร, กรม. ศึกษาเร่งการขยายพันธุ์มังคุดโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ. กรุงเทพฯ : กองวิชาการเกษตร, 2524.

วิลาศ วิชญะเดชา. การขยายพันธุ์ต้นเลี่ยน แบบไม่ใช้เพศ เพื่อหาแนวทางผลิตเป็นจำนวนมาก. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526. อัดสำเนา.

สมจิตร พงษ์พงัน และสุภาพ ภู่ประเสริฐ. พืชกินได้และพืชมีพิษในป่าเมืองไทย. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คุรุสภา, 2515.

สมบัติ พุ่มสาขา. การศึกษาผลของสมุนไพรต่อหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยแอลลอกแซน. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

หมอแผนโบราณ, คณะอาจารย์. ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ : บุญชัยการพิมพ์, 2518.

อรดี สหวัชรินทร์, "ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทางการเกษตร," วารสารพืชสวน. 14(4) : 34 - 43 : กันยายน 2522.

Al-Talib, K.H. and J.G.Torry. "The Aseptic Culture of Isolated Buds of Pseudotsuga taxifolia," Plant Psysiol. 34 : 630 - 637 ; May, 1959.

Bonga, J.M. "Organogenesis in In Vitro Culture of Embryonic Shoot Abies balsemea (balsam fir)," Biol. Abstr. 65(8) : 4770 ; April, 1978.

Caponetti, James D., G.C.Hall and R.E. Farmers, JR. "In Vitro Growth of Black Cherry Callus : Effects of Medium, Environment and Clone," Bot. Gaz. p : 132 - 138 : December, 1971.

Chevre, A.M. and others. "In Vitro Vegetative Multiplication of Chestnut," Hort. Science. 58(1) : 23 - 29 ; January, 1983.

Garton, S. and others. "In Vitro Propagation of Alnus qlutinosa Gaerth.," Hort. Science. 16(6) : 758 - 759 ; December, 1981.

Gupta, P.K.and others. "Tissue Cuture of Forest Trees : Clonal Multi - plication of Tectona grandis Linn. (Teak) by Tissue Culture," Plant Science Letters. 17 : 259 - 268 ; July 15, 1980.

Hussey, G. "Totipotency in Tissue Explants and Callus of Some Member of the Liliaceae Iridaceae and Amaryllidaceae," J. Exp. Bot. 29(91) : 253 - 262 : 1975.

Ilahi, I. and S. Jamal. "Mass Propagation of Eucalyptus tereticornis Smith," Biol. Abstr. 84(10) : AB - 396 ; November, 1987.

Isikwa, H. "Generation of Adventitious Plant Organs by Tissue Culture Methods in Forest Trees," Biol. Abstr. 84(10) : AB - 392 ; November, 1987.

Kaul, K. "Plant Regeneration from Cotyledon, Hypocotyl Explants of Pinus strobus Linn.," Plant Cell Reports. 6 : 5 - 7 ; February. 1987.

Lee, E.C.M. and R.A.De Fossard. "The Effect of Various Auxin and Cytokinin on the In Vitro Culture of Stem and Lignotuber Tissue of Eucalyptus bancreftii Maiden.," New Phytol. 73(4) : 707 - 717 ; June, 1974.

Linser, II. "The Hormonal of Plants," Angrew Chem. Int. Ed. English. 5 : 776 - 754, 1966.

Litz, R.E.,Robert L. Knight and Shmuel Gazit. "Somatic Embryos form Culture Ovules of Polyembryonic Mangifera indica Linn.," Plant Cell Reports. 1 : 264 : 266 ; September, 1982.

Lloyd, G. and B.H. McCown. "Commercially Feasible Micropropagation of Mountain Laurel (Kalmia latifolia) by Use of Shoot Tip Culture," Proc. Intern. Plant. Prop. Soc. 30 : 421 - 427 ; October, 1981.

Meyer, H.J. and Van Staden. "Regeneration of Acacia melanoxylon Plantlet In Vitro," Biol. Abstr. 84(10) : AB - 395 ; November, 1987.

Muralidhalam, E.M. and A.F. Mascarenhas. "In Vitro Plantlet Formation by Organogenesis in Eucalyptus camaldulensis and by Somatic Embryogenesis in Eucalyptus citriodora," Plant Cell Reports. 6 : 256 - 259 ; September, 1987.

Oka, S. and K. Ohyama. "Studies on In Vitro Culture of Exised Buds of Mulberry Tree. III Effects of Agar Concentration, pH and Sugar of Medium on the Development of Shoots from Winter Buds," J. Sericultural Sci. 47 : 15 - 20 ; August, 1977.

Okazawa, Y. and others. "Effects of Auxin and Kinetin on the Development and Differentation of Potato Tissue Culture in Vitro," Physiologia Plantarum. 20 : 862 - 869, 1966.

Skoog F. and C.O. Miller. "Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Culture in Vitro," Sym. Soc. Exp. Biol. 11 : 118 - 131 ; 1957.

Street, H.E. Plant Tissue and Cell Culture. 2nd ed. Berkley and Los Angeles : University of California Press, 1977.

Tungskul, P. Tissue Culture of an Agroforestry Species : Theobroma cacao Linn. Biotrop Seameo Regional Center for Tropical Biology Bogor : Indonesia, 1983.

ภาคผนวก

การเตรียมเครื่องมือและอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียมเครื่องมือ

1. ใช้อลูมินัมฟอยล์หรือถุงพลาสติกทนความร้อนห่อมีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ผ้าขาว สำหรับชุบแอลกอฮอล และขวดน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ด้วยความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที สำหรับอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำเข้าตู้ต้องเช็ดด้วย เอธิลแอลกอฮอล 95 เปอร์เซ็นต์

2. ทำความสะอาดปากคีบ มีดผ่าตัดทุกครั้งก่อนและหลังใช้ โดยจุ่มในเอธิลแอลกอฮอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟทำซ้ำ 3 ครั้ง รอให้เย็นก่อนนำมาใช้

การเตรียมอาหาร

1. เตรียมสารละลายเข้มข้นสูตร WPM ซึ่งมีสารละลายเข้มข้น 8 Stocks โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ของความเข้มข้นในอาหาร ดังต่อไปนี้

ตาราง 8 ส่วนประกอบและปริมาณสารเคมี ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร WPM

Stock Solution	สารเคมี	กรัม	มิลลิลิตร
1	NH_4NO_3	20	
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	27.8	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
2	K_2SO_4	49.50	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	19.20	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
4	KH_2PO_4	34.00	
	H_3BO_3	1.24	
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_4O$	0.05	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	74.00	
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	4.46	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.72	

ตาราง 8 (ต่อ)

Stock Solution	สารเคมี	กรัม	มิลลิลิตร
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.05	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
6	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.56	
	Na. EDTA	7.46	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
7	Thiamine. HCl	0.20	
	Nicotinic acid	0.10	
	Pyridoxine. HCl	0.10	
	Glycine	0.40	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
8	Myo-inositol	20.00	
	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว		1000
	ซูโครส	20.00	
	วุ้นผง	6.00	

2. เตรียมสารเร่งการเจริญเติบโตความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้

2.1 2,4-D 0.1 กรัมต่อน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร

2.2 BA 0.1 กรัมต่อน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ปริมาณ 1 ลิตร มีขั้นตอนดังนี้

3.1 เติม stock ที่ 1 20 มิลลิลิตร

3.2 เติม stock ที่ 2 20 มิลลิลิตร

3.3 เติม stock ที่ 3 5 มิลลิลิตร

3.4 เติม stock ที่ 4 5 มิลลิลิตร

3.5 เติม stock ที่ 5 5 มิลลิลิตร

3.6 เติม stock ที่ 6 5 มิลลิลิตร

3.7 เติม stock ที่ 7 5 มิลลิลิตร

3.8 เติม stock ที่ 8 5 มิลลิลิตร

3.9 ชั่งน้ำตาลซูโครส 20 กรัม

3.10 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

3.11 ปรับ pH ด้วย 0.5 N NaOH หรือ 0.5 N HCl

3.12 นำวุ้นผง 6 กรัม ใส่ในอาหารคนให้เข้ากัน อุ่นให้ร้อนจนวุ้นหลอมเข้ากันดีน้ำอาหารตวงปริมาตรด้วยกระบอกตวง (ถ้าปริมาตรไม่ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ต้มร้อน)

3.13 บรรจุอาหารขวดละ 15 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 - 20 นาที ปิดฝาขวดให้แน่น

4. การเตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ดัดแปลง (ตาราง 1) ดังนี้

4.1 เตรียมเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ข้อ 3.1 - 3.13

4.2 เตรียมสารเร่งการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้นสารเร่งการเจริญเติบโตดังแสดงไว้ในตาราง 1 สูตร 2-48 โดยเติมสารเร่งการเจริญเติบโตหลังจากเติม stock 1-8 เสร็จเรียบร้อยแล้ว

ตาราง 9 ปริมาณสารอาหาร และสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาจากหน่อเป็นต้นเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ขวดที่	ปริมาณสารอาหาร และสารเร่งการเจริญเติบโต			
	WPM	WPM/2	WPM	WPM/2
	BA_3 : $2,4\text{-}D_{0.1}$ (ขวดต่อต้น)	BA_3 : $2,4\text{-}D_{0.1}$ (ขวดต่อต้น)	- (ขวดต่อต้น)	- (ขวดต่อต้น)
1	1	0	0	0
2	2	0	0	0
3	2	1	0	0
4	1	1	0	0
5	1	0	0	0
6	1	0	0	0
7	2	1	0	0
8	2	0	0	0
9	3	0	0	0
10	0	1	0	0
รวม	15	4	0	0
เฉลี่ย	1.5	0.4	0	0

ตาราง 10 แสดงเปรียบเทียบสารอาหาร และปริมาณที่ใช้ ของสูตร WPM, MS และ WM

สารอาหาร	ปริมาณที่ใช้ในอาหารแต่ละสูตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	WPM	MS	WM
K_2SO_4	990	-	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	556	-	300
NH_4NO_3	400	1650	-
$MgSO_4.7H_2O$	370	370	720
KH_2PO_4	170	170	-
$CaCl_2.2H_2O$	96	440	-
KNO_3	-	1900	80
$MnSO_4.H_2O$	22.3	6.9	7.0
Na_2SO_4	-	-	200
KCl	-	-	65
$ZnSO_4$	8.6	6.14	3
H_3BO_3	6.2	6.2	1.5
$CuSO_4.5H_2O$	0.25	0.025	-
KI	-	0.83	0.75
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	16.5
$CoCl_2.6H_2O$	-	0.025	-
Na_2EDTA	37.3	37.25	-
$FeSO_4$	27.8	27.85	-

ตาราง 10 (ต่อ)

สารอาหาร	ปริมาณที่ใช้ในอาหารแต่ละสูตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	WPM	MS	WM
$Fe_2(SO_4)_3$	-	-	2.25
Thiamine.HCl	1.0	0.1	-
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine.HCl	0.5	0.5	-
Glycine	2.0	2.0	3.0
Myo-inosital	100	100	-
Cysteine	-	-	1.0
Vit. B1	-	-	0.1
Vit. B6	-	-	0.1
Ca d-pantothenic acid	-	-	1.0
Sucrose	20(g.)	30(g.)	30(g.)

WPM = Woody Plant Medium (1981) MS = Murashige and Skoog (1962)

WM = White's Medium (1963)

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นายศิริชัย ชื่อสกุล เขียวนิล

เกิดวันที่ 22 เดือน เมษายน พุทธศักราช 2494

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดอุทัยธานี

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 24/1 หมู่ที่ 1 ตำบลหนองยาง
อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี 61110

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน ศึกษานิเทศก์

สถานที่ทำงานปัจจุบัน สำนักงานการประถมศึกษาอำเภอหนองฉาง
อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี 61110

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2510 มัธยมศึกษาปีที่ 3 จากโรงเรียนทองประสาทเวทย์

พ.ศ. 2512 ประกาศนียบัตรวิชาการศึกษา จากวิทยาลัยครูนครสวรรค์

พ.ศ. 2515 พ.ม. จากการศึกษาด้วยตนเอง

พ.ศ. 2519 กศ.บ. เกียรตินิยม อันดับ 2 (วิชาเอกชีววิทยา
โภชนาการ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน

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