581.88
ร.663ป
ร 3

ปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา

ปริญญานิพนธ์

ของ

อารีรัตน์ โรจน์เพ็ญเพียร

17 พ.ค 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

ธันวาคม 2530

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178421

ปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแกลือปลา

บทคัดย่อ

ของ

อารีรัตน์ โรจน์เพ็ญเพียร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

ธันวาคม 2530

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา คือ ระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร สภาพของแสง และปริมาณน้ำตาล โดยใช้ส่วนใบคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 1 ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาบนอาหารแข็งที่ปรับ pH ระหว่าง 4.0-8.0 พบว่า เนื้อเยื่อสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหารที่ปรับ pH ระหว่าง 5.0-6.0

การทดลองที่ 2 ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวที่ปรับ pH ระหว่าง 5.0-6.0 เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืดตลอดเวลา เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง pH 5.6 ในที่มีแสงมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด และเมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดโดยใช้ 6 × 2 × 2 Factorial Design พบว่าที่ระดับ pH 5.6 นี้จะมีค่าสูงกว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดตลอดเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01

การทดลองที่ 3 ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งที่เติมน้ำตาลซูโครสระหว่าง 0-10.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส เนื้อเยื่อจะไม่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส อาหารที่เติมน้ำตาล 1.5-10.5 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสได้ดี แต่อาหารที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคืออาหารที่เติมน้ำตาล 4.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ One-Way ANOVA และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

Some Factors Effecting Tissue Culture of *Phyla nodiflora* Greene.

AN ABSTRACT

BY

AREERATANA ROTPENPIAN

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree

at Srinakharinwirot University

December 1987

The purpose of this study was to investigate factors influencing the tissue culture of Phyla nodiflora Greene, on the modified MS media with 1 mg./litre of NAA and 1 mg./liter of BA as suggested by Phagamas Khemajaree's experiment (1986). However, variations on degrees of pH, types of media, light condition and quantities of sucrose were added to the experiment. Tissues of the second and third leave pairs were selected for this experiment. The room temperature was controlled within 28±2 degrees Celsius.

In the first experiment, the media's pH was varied from 4.0-8.0. It was found that calluses developed well on the media with 5.0-60 pH

In the second experiment, pH levels of both solid and liquid media were varied from 5.0 to 6.0. The first set of cultures was incubated within the room exposed to 12 hour continuous fluorescent light while the other was kept in the dark. The results showed that the solid media with 5.6 pH under the fluorescent light produced highest average fresh weights of calluses. In applying the 6×2×2 factorial design for an analysis of the differences of the average weights, it was found to be statistically significant at .01 level.

In the third experiment, quantities of sucrose were varied from 0 to 10.5% The results showed that no callus developed on the media without sucrose but it gave better results on the media with 1.5-10.5% of sucrose. However, best average fresh weights of calluses were obtained from the media with 3% and 4.5% of sucrose respectively. One-Way Analysis of Variance and Duncan's New Multiple Range Test were employed in pairwise analysis of the average weights. The results revealed that the difference of the weights obtained in both media were not statistically significant at 0.05 level.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา		คณะกรรมการสอบ	
.....	ประธาน	.....	ประธาน
.....	กรรมการ	.....	กรรมการ
		.....	กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก อาจารย์ อรพินท์ แก้วลาย อาจารย์เรณู ศรสำราญ และ ดร.คงศักดิ์ พร้อมเทพ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ละเอียด ปรารถนาดี และคุณวิไลพร วรจิตตานนท์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในด้านสถิติและคอมพิวเตอร์เป็นอย่างดียิ่ง

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอขอบคุณ คุณศรีสุวรรณา คั้นแหน รวมทั้งญาติมิตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

อารีรัตน์ โรจน์เพ็ญเพียร

สารบาญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	2
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
	สถานที่ทำการศึกษาค้นคว้า	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	8
	อุปกรณ์และสารเคมี	8
	การทดลองที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา	10
	การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสง ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา	11
	การทดลองที่ 3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา	12
	การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล	12
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	14
	ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา	14

บทที่ หน้า

ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสง ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา 20

ผลการทดลองที่ 3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา 41

5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 50

1. การศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา 50

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสง ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา 52

3. การศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา 54

ข้อเสนอแนะ 56

บรรณานุกรม 57

ภาคผนวก 62

ปัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ 15

2 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 18

3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 20

4 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ 23

5 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ 27

6 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ 30

7 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ ในที่มืดตลอดเวลาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ 34

8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงที่ระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสงแตกต่างกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 37

ตาราง หน้า

9 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงที่ระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสงแตกต่างกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 39

10 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ 42

11 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ... 47

12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 49

13 ส่วนประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) 63

14 น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 66

15 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 67

16 ค่า W ประกอบการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 68

17 น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่เพาะเลี้ยงในระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และสภาพของแสง แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 69

18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบอิทธิพลร่วมของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยง เมื่อมีระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และสภาพของแสงที่แตกต่างกัน 70

ตาราง หน้า

19 น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 72

20 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 73

21 ค่า w ประกอบการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ 74

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 ต้นหญ้าเกล็ดปลาแสดง ใบคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 8

2 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 17

3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลากับ pH ของอาหารแข็งที่ระดับต่าง ๆ 19

4 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 25

5 ลักษณะของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง pH 5.6 ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 26

6 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มืดตลอดเวลา เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 29

7 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 32

8 ลักษณะของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง pH 5.8 ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 33

9 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง ซึ่งปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ ในที่มืดตลอดเวลา เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 36

10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลา กับระดับ pH ของอาหาร ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพของอาหารและแสงแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 40

11 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 45

ภาพประกอบ หน้า

12 ลักษณะของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาล 6.0, 7.5 และ 9.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 46

13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลากับความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร 48

บทที่ 1

บทนำ

หญ้าเกล็ดปลามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Phyla nodiflora Greene. จัดอยู่ในวงศ์ Verbenaceae (เต็ม สมิตินันท์ 2523 261) ชื่ออื่น ๆ เช่น พันกระต่าย ก้อยกังตั้ง ใต้หยี่หนึ่งจี้ หญ้าเกล็ดปลาเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นำไปใช้ในการรักษาโรคได้หลายโรค เช่น โรคระบบทางเดินหายใจ ไอเป็นเลือด รักษาระบบทางเดินปัสสาวะ ขับปัสสาวะ แก้อาการบวมน้ำ ปัสสาวะเป็นเลือด แก้อาการลำไส้ผิดปกติ อาการปวดตามข้อ รักษาอาการทางผิวหนัง แก้ไข้หัวร้อน (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคนอื่น ๆ 2523 : 213 - 214, Pushpangadan and Atal. 1984 74) และใช้รักษาโรคเบาหวานตามตำรับยาของพระวัยจตุตาลโย วัดเทพพนมยงค์ จังหวัดสระบุรี

เนื่องจากหญ้าเกล็ดปลามีสรรพคุณในการรักษาโรคได้ จึงได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี พบว่าสารที่ให้ผลในการบำบัดรักษาโรคมีหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ เรซิน น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคนอื่น ๆ 2523 213 - 214) และจากการศึกษาหาปริมาณแอลคาลอยด์จากแคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาเปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ พบว่าแอลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสมีปริมาณมากกว่าต้นธรรมชาติ (ผกามาศ เขมะจารี 2530 39) อีกทั้งการสกัดสารแอลคาลอยด์จากต้นธรรมชาติจำเป็นต้องใช้พืชเป็นจำนวนมาก และยังมีปัญหาในเรื่องเนื้อที่เพาะปลูก การดูแลรักษา การควบคุมโรคและแมลง ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงหาระดับของสารเร่งการเจริญเติบโต พบว่าในอาหารที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้แคลลัสน้ำหนักสดมากที่สุด (ผกามาศ เขมะจารี 2530 24) แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถกระตุ้นหรือส่งเสริมให้เนื้อเยื่อเจริญได้ดี เช่น pH ของอาหาร สภาพของอาหาร แสงสว่าง เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ยังมิได้มีการทดลองกับต้นหญ้าเกล็ดปลา จึงเห็นสมควรให้

มีการศึกษาปัจจัยเหล่านี้ เพื่อให้เนื้อเยื่อเกล็ดปลาเจริญเป็นแคลลัสได้ดียิ่งกว่าเดิมและสามารถเพาะเลี้ยงให้มีปริมาณมากพอที่จะสกัดสารแอลคาลอยด์ในเชิงอุตสาหกรรมได้

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ ในส่วนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาไปเป็นแคลลัส

1. ระดับ pH ของอาหาร
2. สภาพของอาหาร
3. แสง
4. น้ำตาล

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้ทราบอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร แสง และปริมาณน้ำตาล ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา
2. ทำให้ทราบสภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา เพื่อให้ได้ปริมาณมาก
3. การศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้ในการผลิตแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาให้ได้ปริมาณมาก เพื่อการสกัดแอลคาลอยด์ในเชิงอุตสาหกรรมได้

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. พืชที่ใช้ในการทดลองคือ หญ้าเกล็ดปลา (Phyla nodiflora Greene.) เฉพาะใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากปลายยอด
2. สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา คือ สูตร MS (Murashige and Skoog. 1962 : 473 - 497) ดัดแปลง โดยการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่

NAA (α-naphthalene acetic acid) ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA (6-benzylamino purine) ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ

3.1 pH ของอาหาร ศึกษา pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ

3.2 สภาพของอาหาร ศึกษาเฉพาะการเจริญของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาบนอาหารแข็ง เปรียบเทียบกับที่เจริญในอาหารเหลวซึ่งเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที

3.3 แสง ศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน เปรียบเทียบกับการเจริญในที่มืด

3.4 น้ำตาลซูโครส ศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่อบนอาหารที่เติมน้ำตาลระดับความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 9.0 และ 10.5 เปอร์เซ็นต์

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. อาหารสูตร MS หมายถึง สูตรอาหารมาตรฐาน ของมูราชิกิ และ สกูก (Murashige and Skoog. 1962 473 - 497)

2. แคลลัส (Callus) หมายถึง กลุ่มของเซลล์ Parenchyma ที่รวมตัวกันอยู่โดยยังมิได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นหรือราก (อรดี สหวัชรินทร์ 2526 1)

สถานที่ทำการศึกษาค้นคว้า

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นประกอบด้วยปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ เช่น ค่า pH ของอาหาร สภาพของอาหาร แสงสว่าง และอุณหภูมิ กล่าวคือ

1. ค่า pH ของอาหาร เป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้เพราะเนื้อเยื่อพืชสามารถใช้ธาตุอาหารต่าง ๆ ได้ดี ในสภาพ pH ที่เหมาะสมเท่านั้น ค่า pH ของอาหารที่พืชแต่ละชนิดต้องการในการเจริญในขั้นที่จะสร้างอวัยวะนั้น โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 5.0 - 6.5 (Street. 1969 · 3 - 224) Murashige ได้รายงานไว้ว่า พืชจะสามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 5.0 - 6.0 (Murashige. 1974 135-166, 170) การเพิ่มปริมาณต้นเยอบีราเพื่อให้ได้ต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์และจำนวนต้นเฉลี่ยมาก ต้องปรับ pH ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 5.0 - 6.0 (สายสมร มุขลาย 2529 46) ใบอาฟริกันไวโอเลตจะพัฒนาเป็นต้นและรากได้มากที่สุดในอาหารที่ปรับ pH 5.5 (ธิดา ทัตตี และ อรดี สหวัชรินทร์ 2522 283 - 303)

2. สภาพของอาหาร อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลวก็ได้ เพราะเนื้อเยื่อบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารเหลว บางชนิดเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง และบางชนิดก็เจริญได้ดีทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว (Murashige. 1974 : 135-166, 170) ทั้งนี้ย่อมขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิด สภาพของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

2.1 อาหารแข็ง (Agar medium) ในการเตรียมอาหารแข็งต้องมีการเติมวุ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งนี้เนื้อเยื่อส่วนหนึ่งจะสัมผัสกับอาหารและได้รับอาหารตามปกติ แต่ต้องคอยระวังไม่ให้เนื้อเยื่อจมลงในอาหาร ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อขาดออกซิเจนและตายได้ (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา 2524 56 - 57)

2.2 อาหารเหลว (Liquid medium) เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลวทุกส่วนของเนื้อเยื่อจะได้รับอาหารแต่ต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Shaker) หรือล้อหมุน (Rotator)

เพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และเจริญเติบโตได้ (ไพบูลย์ กวินเสิศวัฒนา 2524 56 - 57)

แคลลัสของ Lilium sp. พันธุ์ Epress of India จะเจริญในอาหารเหลวได้ดีกว่าบนอาหารแข็ง (Simmonds and Cumming. 1976 161 - 170) ส่วนแคลลัสของลิลี่ (Lily) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปเมื่อเพาะเลี้ยงได้นาน 2 เดือน (นภดล ไกรพานนท์ 2527 38 - 39) เนื้อเยื่อส่วนใบและเนื้อเยื่อส่วนใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของโกโก้จะเจริญเป็นแคลลัสบนอาหารแข็งได้ดีกว่าในอาหารเหลว ซึ่งในอาหารเหลวจะไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น (Tungskul. 1983 11, 21, 30)

3. แสง เนื้อเยื่อพืชหลายชนิดสามารถเจริญได้ดีทั้งในที่มีแสงและที่มืด และพบว่าในพืชบางชนิดแสงไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส โดยทั่วไปแล้วการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มของแสงตั้งแต่ 300-1,000 ลักซ์ อาจให้แสงตลอดเวลาหรือให้แสงประมาณ 12-18 ชั่วโมงต่อวัน (Gamborg. 1986 7 - 8, Street. 1977 26) ส่วน Murashige ได้รายงานไว้ว่าความเข้มของแสง 1,000 ลักซ์ และช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันจะเหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืช แต่พืชบางชนิดอาจจะต้องการมากหรือน้อยกว่านี้ (Murashige. 1974 135 - 166) การเพาะเลี้ยงฐานรองดอกของเยอบีราในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสงตลอดเวลาปรากฏว่าเกิดแคลลัสได้ดี (Plerik, Steegmans and Marelis. 1973 117 - 119) การเพาะเลี้ยงอับเรณูของกุหลาบ 2 ชนิด คือ Rosa hybrida L. และ R. damacena Mill. พบว่า กุหลาบทั้งสองชนิดเกิดแคลลัสในที่มืดได้ดีกว่าในที่มีแสง (Tabaeezadeh and Khosh-Khui. 1980 61 - 66) ส่วนใบและปล้องของ R. hybrida L. และ R. manetti Hort. ระยะแรกของการเพาะเลี้ยงจะเกิดแคลลัสในที่มืดได้ดีกว่าในที่มีแสง แต่ในที่สุดขนาดของแคลลัสที่ได้ไม่แตกต่างกัน (Khosh-Khui and Sink. 1982 361 - 370) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแสงมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสแตกต่างกันคือ เอนโดสเปิร์มของข้าวโพดจะเกิดแคลลัสได้ดีในที่มืด ส่วนเอนโดสเปิร์มของ Ricinus sp. พบว่า แสงมีส่วนช่วยส่งเสริม

ให้เกิดแคลลัสได้ดี และการเกิดแคลลัสของ Lolium sp. ไม่ว่าจะเป็นที่มีแสงหรือที่มืด ก็ทำให้เกิดแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน (Vasil. 1980 175 - 176)

4. อุณหภูมิ พืชแต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส ส่วนการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณแคลลัสมาก จะปรับอุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงให้เป็น 25 องศาเซลเซียส (Dixon. 1985 : 2, Murashige. 1974 135-166, 170)

5 ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ น้ำตาล พืชแต่ละชนิดมีความต้องการน้ำตาลในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสของกุหลาบในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้หน่อกุหลาบสร้างรากได้ แต่เมื่อไม่เติมน้ำตาลซูโครสจะไม่มีการสร้างราก (วิไลภรณ์ อุทธยอด 2526 37) ในการขยายพันธุ์ Statice perezii Stapf. ในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล ต้นจะมีสีเหลืองแล้วตายไปในที่สุด ส่วนในอาหารที่เติมน้ำตาล 2-4 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลให้ต้น Statice perezii Stapf. เจริญเติบโตได้ดี และอาหารที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะเพิ่มจำนวนต้นได้เล็กน้อย (สุมนา กิจไพฑูรย์ 2528 44) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงใบอาฟริกันไวโอเลตในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ จะให้ต้นและรากมากที่สุด (ธิดา ทัตตี และ อรดี สหวัชรินทร์ 2522 283 - 303) ต้นเยอบีราจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 3-5 เปอร์เซ็นต์ (สายสมร มุขลาย 2529 54) ใบของโกโก้จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (Pence and others. 1981 378 - 384) เอมบริโอรูปกลม (Globular embryo) ของ Capsella sp. จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่สูง คือระหว่าง 12-18 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถส่งเสริมให้มีการพัฒนาการต่อไปได้ (Raghavan and Torrey. 1963 540 - 551) Pence และคนอื่น ๆ ได้กล่าวเช่นเดียวกันว่า การเพาะเลี้ยง Immature embryos ของโกโก้ต้องการอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่สูงเพื่อส่งเสริมให้มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อ (Pence and others. 1981 . 378 - 384) การเพาะเลี้ยง Leptopteris hymenophylloides พบว่า เนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน (Juvenile leaf) จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับต่ำและใน

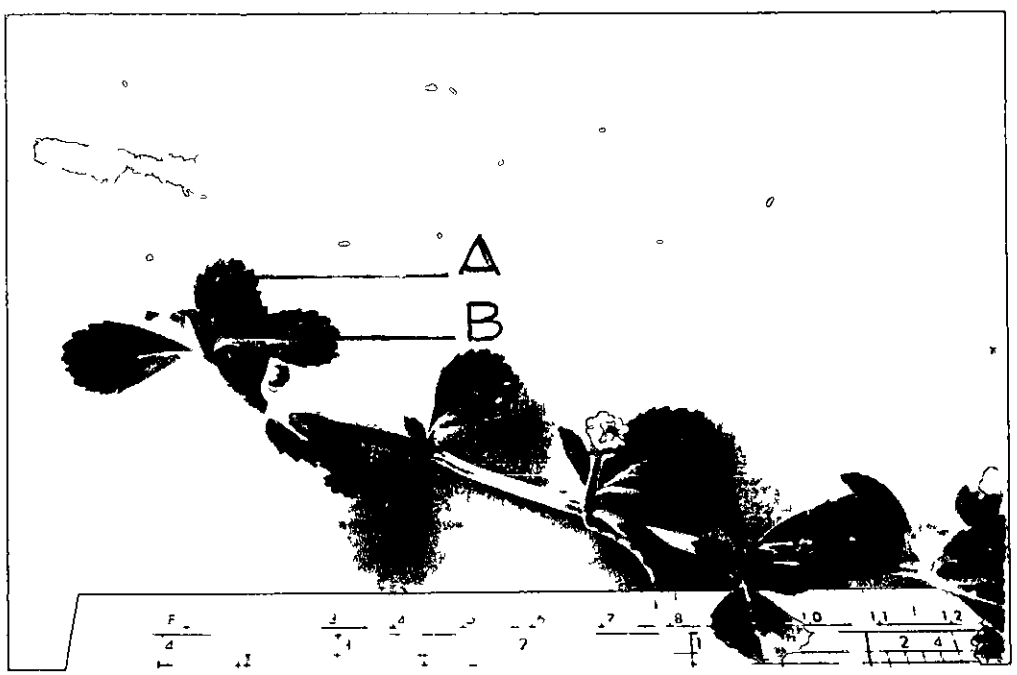
อาหารที่ปราศจากน้ำตาลซูโครส อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ จะส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนใบที่เจริญเต็มที่แล้ว (Street. 1969 · 95 - 96) การเพาะเลี้ยง Leaf primodia ของเฟิร์นในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าระดับน้ำตาล 0.006 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นต้นได้น้อยมาก แต่ที่ระดับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ จะส่งเสริมให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นเฟิร์นที่สมบูรณ์ที่สุด (Street. 1969 : 95 citing Sussex and Clutter. 1960 87 - 89)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชทดลองคือ ต้นหญ้าเกล็ดปลา (Phyla nodiflora Greene.) โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3



ภาพประกอบ 1 ต้นหญ้าเกล็ดปลาแสดงใบคู่ที่ 2 (A) และใบคู่ที่ 3 (B)

2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ
- ขวดรูปกรวยขนาดต่าง ๆ
- ขวดแก้วขนาดบรรจุ 60 มิลลิลิตร พร้อมฝาเกลียว
- หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)
- มาตรความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า
- สาลี
- อลูมิเนียมฟอยล์

2.2 สารเคมี สำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (ตาราง 13 ภาคผนวก)

2.3 สารเร่งการเจริญเติบโต

- NAA (α-naphthalene acetic acid)
- BA (6-benzylamino purine)

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- โซเดียมไฮโปคลอไรท์
- เอธิลแอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- ทวีน-20

2.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อพืช

- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
- มีดผ่าตัดเบอร์ 3 และเบอร์ 4
- ปากคีบ
- จานแก้ว
- ตะเกียงแอลกอฮอล์

- เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

- เมธิลแอลกอฮอล์

2.6 ห้องสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย

2.6.1 ชั้นวางขวดที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ควบคุมการเปิดปิดไฟด้วยเครื่องอัตโนมัติ โดยเปิด 12 ชั่วโมงต่อวัน

2.6.2 ชั้นวางขวด ใช้กระดาษสีน้ำตาลชนิดหนา 2 ชั้น ปิดชั้นวางขวดทุกด้าน ไม่ให้แสงเข้า เพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่มืดตลอดเวลา

2.7 เครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว

2.8 กล้องถ่ายภาพ

วิธีทดลอง

การทดลองที่ 1

การศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเนกลีดปลา

1. เตรียมอาหารสูตร MS ดัดแปลงเป็นอาหารแข็ง ดังแสดงในภาคผนวก

2. ปรับ pH ของอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ให้เป็น 9 ระดับ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8 0 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N NaOH

3. บรรจุอาหารลงในขวด ๆ ละ 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. ทำความสะอาดเนื้อเยื่อส่วนใบคู่ที่ 2 และ 3 ล้างด้วยผงซักฟอกให้สะอาด แล้วนำไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

5. นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นชิ้นกว้าง 7 มิลลิเมตร ยาว 7 มิลลิเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ซึ่งปรับ pH ในระดับต่าง ๆ กัน 9 ระดับ ทำการทดลองระดับ pH ละ 10 ขวด

6. นำขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ วันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร

<u>การทดลองที่ 2</u>

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสงที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา

1. เตรียมอาหารสูตร MS ดัดแปลง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 1. โดยเตรียมทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว

2. ปรับ pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่ระดับ 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8 และ 6.0 โดยใช้ 1 <u>N</u> HCl หรือ 1 <u>N</u> NaOH

3. บรรจุอาหารลงในขวด ๆ ละ 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. ทำความสะอาดชิ้นส่วนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 4.

5. นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นชิ้นกว้าง 7 มิลลิเมตร ยาว 7 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารที่มี pH ระดับต่าง ๆ ทำการทดลองระดับ pH ละ 40 ขวด ขวดละ 1 ชิ้นส่วน และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังนี้

5.1 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

5.2 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในที่มืดตลอดเวลา

5.3 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

5.4 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในที่มืดตลอดเวลา

การทดลองที่ 3

การศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา

1. เตรียมอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง เช่นเดียวการทดลองที่ 1 ข้อ 1. แต่เติมน้ำตาลให้มีความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน 8 ระดับ คือ 0, 1.5, 3.0 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 และ 10.5 เปอร์เซ็นต์

2. ปรับ pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อให้เป็น 5.6 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N NaOH

3. บรรจุอาหารลงในขวด ๆ ละ 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. ทำความสะอาดชิ้นส่วนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 4.

5. นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นชิ้นกว้าง 7 มิลลิเมตร ยาว 7 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน ระดับละ 10 ขวด

6. นำขวดอาหารไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ วันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บรวบรวมข้อมูล

1.1 บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนพืช เช่น สี ลักษณะของแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4

1.2 บันทึกภาพและชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 4

2. การวิเคราะห์ข้อมูล

2.1 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ 1 โดยการทดสอบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีค่า pH ของอาหารต่าง ๆ กัน โดยใช้ One-Way

Analysis of Variance (One-Way ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะทดสอบความแตกต่างของแต่ละคู่ โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

2.2 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ 2 โดยใช้ 6 × 2 × 2 Factorial Design

2.3 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ 3 โดยการทดสอบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลในความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ One-Way Analysis of Variance (One-Way ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะทดสอบความแตกต่างของแต่ละคู่ โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา (Phyla nodiflora Greene.) ปรากฏผลดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา

จากการนำใบคู่ที่ 2 และ 3 ของหญ้าเกล็ดปลามาตัดให้มีขนาดกว้าง 7 มิลลิเมตร ยาว 7 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง โดยปรับ pH ของอาหาร 9 ระดับ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ทุกชิ้นส่วนจะมีการเจริญเติบโตและเกิดแคลลัสที่มีขนาดแตกต่างกัน (ตาราง 1) และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ พบว่า ที่ระดับ pH 4.0, 4.5, 7.5 และ 8.0 จะให้แคลลัสที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยน้อยมาก แคลลัสที่ได้มีขนาดเล็ก สีเขียว บางแห่งเป็นสีดำแกมสีน้ำตาล ในระดับ pH 5.0 และ 6.0 จะได้แคลลัสที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยปานกลาง โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 แคลลัสที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด คือ แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับ pH 5.5 คือน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.64 กรัม และแคลลัสที่ได้จะมีสีเขียวแกมสีเหลืองขนาดใหญ่ เกาะรวมตัวกันแน่น มีการเจริญได้ดีกว่าแคลลัสอื่น ๆ

อนึ่ง เมื่อเพาะเลี้ยงได้นาน 10 วัน ชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อยตรงบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วน ส่วนในระดับ pH อื่น ๆ ชิ้นส่วนจะมีการม้วนงอ ยังไม่เกิดแคลลัส

ตาราง 1 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
4.0	+	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวเล็กน้อย รอบรอยตัด	++	เกิดแคลลัสมากขึ้นสีเขียวแกมสีน้ำตาลและสีดำ
4.5	+	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวเล็กน้อย รอบรอยตัด	++	แคลลัสใหญ่ขึ้นมีสีเขียวแกมสีน้ำตาลและสีเหลือง
5.0	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแก่แกมสีเขียวอ่อนขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
5.5	+++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเป็นกลุ่มสีเขียวรอบรอยตัด ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	++++	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นก้อนสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาลอ่อน
6.0	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแก่แกมสีเขียวอ่อนรอบรอยตัด ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	+++	แคลลัสขยายขนาดมากขึ้นมีสีเขียวแกมสีน้ำตาล

ตาราง 1 (ต่อ)

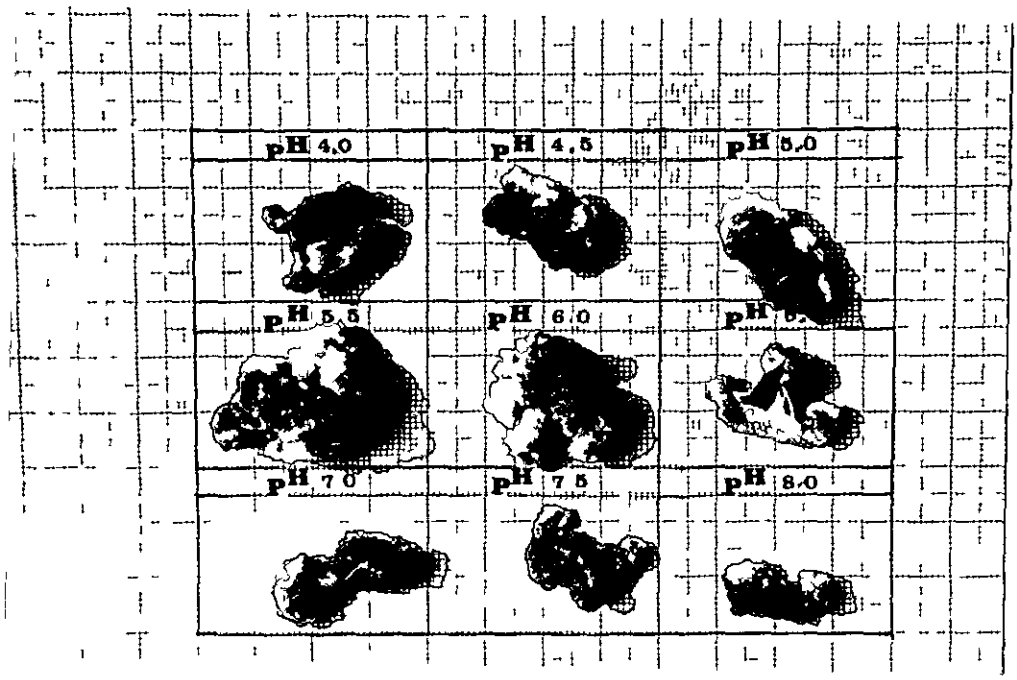
pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญ		การเจริญ	
	เติบโต	ลักษณะ	เติบโต	ลักษณะ
6.5	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียว บางบริเวณเป็นสีเหลืองรอบรอยตัด	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
7.0	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแก่แกมสีเขียวอ่อนและสีน้ำตาลรอบรอยตัด	++	แคลลัสมีสีเขียวแก่ บางบริเวณเป็นสีน้ำตาล
7.5	+	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวเล็กน้อยรอยรอยตัด	++	แคลลัสขยายขนาดเล็กน้อย มีสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
8.0	+	ชิ้นส่วนขยายขนาดเล็กน้อยและโค้งงอ เริ่มเกิดแคลลัส	++	เกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล

\+ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสน้อยมาก

++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างน้อย

+++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างมาก

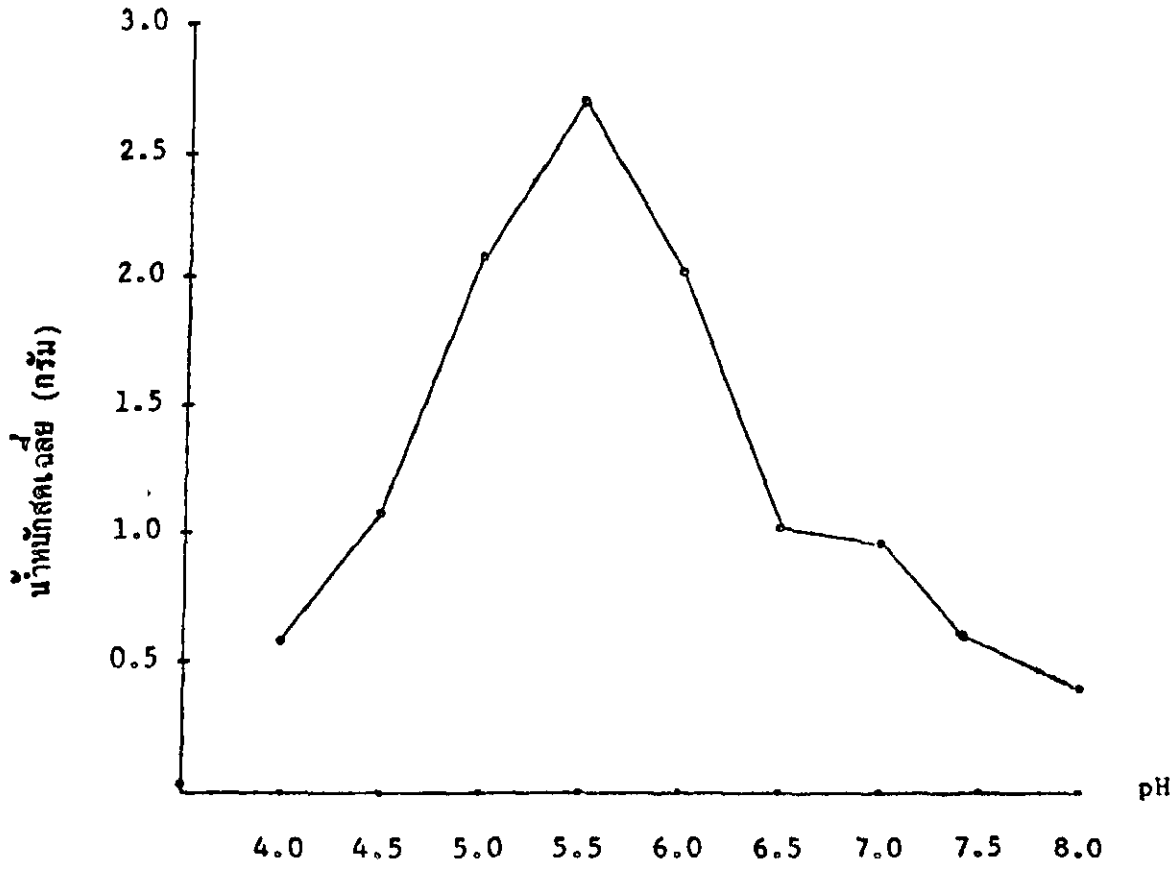
++++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสมาก



ภาพประกอบ 2 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 2 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

pH ของอาหาร	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส (กรัม)
4.0	0.63
4.5	1.21
5.0	2.04
5.5	2.64
6.0	2.00
6.5	1.11
7.0	0.94
7.5	0.67
8.0	0.48



ภาพประกอบ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลากับ pH ของอาหารแข็งที่ระดับต่าง ๆ

ตาราง 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	8	45.29	5.66	43.53**
Error	81	11.11	0.13	
Total	89	56.40		

**มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01

$F_{.01\ (8,81)} = 2.74$

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ พบว่า มีค่าเฉลี่ยอย่างน้อย 1 คู่ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 จึงได้นำไปทดสอบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (ตาราง 15 ภาคผนวก) และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยที่อยู่ในอันดับสูงสุด 3 อันดับแรกของการทดลอง 9 ระดับ pH ของอาหาร คือการทดลองที่ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0, 5.5 และ 6.0 พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปรับ pH 5.5 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยแตกต่างจากน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ระดับ pH 5.0 และ 6.0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ส่วนน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ระดับ pH 5.0 และ 6.0 ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงได้นำช่วง pH ของอาหารตั้งแต่ 5.0 - 6.0 ไปทดลองต่อในการทดลองที่ 2 ต่อไป

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสง ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกล็ดปลา

ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแกล็ดปลา ในอาหารที่มี pH ระดับต่าง ๆ จากการทดลองที่ 1 ได้ช่วง pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแกล็ดปลา คือ 5.0-6.0 จากช่วง pH ของอาหารดังกล่าว ได้นำมาศึกษาโดยปรับ pH เป็น 6 ระดับ คือ 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8 และ 6.0 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืดตลอดเวลา

2.1 การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ลักษณะของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้จะเป็นก้อนขรุขระ ด้านบนเป็นสีเขียว ด้านล่างเป็นสีเหลืองแกมสีน้ำตาล สำหรับการเจริญเติบโตของแคลลัส พบว่า ระดับ pH 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8 และ 6.0 จะให้แคลลัสน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.03, 2.07, 1.95, 2.92, 2.60 และ 2.04 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 4 ภาพประกอบ 4) ระดับ pH 5.6 จะให้แคลลัสน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด แคลลัสมีขนาดใหญ่สีเขียวเข้ม บางบริเวณมีสีเหลืองแกมสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 5)

2.2 การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในที่มืดตลอดเวลา ลักษณะของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้จะคล้ายคลึงกัน คือ เป็นก้อนขรุขระมีปุ่มปมทั่วทั้งก้อนสีเหลืองแกมน้ำตาลเข้ม และสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีสีเขียวบนก้อนแคลลัสเลย (ภาพประกอบ 6) สำหรับการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลง พบว่า ระดับ pH ของอาหารที่ 5.0, 5.2, 5.4 และ 6.0 จะให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 1.53, 1.84, 1.87 และ 1.79 กรัม ตามลำดับ และระดับ pH ของอาหารที่ให้แคลลัสน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดคือ ระดับ pH ที่ 5.6 ซึ่งจะได้น้ำหนักสดเฉลี่ย 2.37 กรัม รองลงมาคือ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ระดับ pH 5.8 ให้แคลลัสน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.13 กรัม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแกล็ดปลาบนอาหารแข็งในที่มืดนี้ ช่วงแรกเนื้อเยื่อจะมีการเปลี่ยนแปลงและเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้เร็วกว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 20 วัน แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดนี้จะมีการเจริญเติบโตน้อยมาก

2.3 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ลักษณะของแคลลัสมีการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกันมาก คือ ในสัปดาห์ที่ 1 ชิ้นส่วนเริ่มมีการม้วนตัวและพองบวมเล็กน้อย ซึ่งสังเกตจากชิ้นส่วนที่ความหนาเพิ่มขึ้น มีสีเขียว เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 10 วัน จะพบว่าแคลลัสที่

178421

เพาะเลี้ยงไว้บางขวดมีเนื้อเยื่อหลุดออกมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร (Cell suspension) และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ แคลลัสทุกชิ้นส่วนจะมีลักษณะม้วนงอและบวมเป็นก้อนมีสีเขียวแก่แกมสีน้ำตาลแก่ แข็งและกรอบ (ตาราง 6 ภาพประกอบ 7) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะมีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่มากนัก คือ ระดับ pH ที่ 5.0, 5.2, 5.4, 5.6 และ 6.0 แคลลัสจะมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.77, 0.12, 0.78, 0.98 และ 0.93 กรัม ตามลำดับ และน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดคือ อาหารที่มีระดับ pH 5.8 ซึ่งได้แคลลัสหนัก 1.29 กรัม (ภาพประกอบ 8) รองลงมาคือ ระดับ pH 5.4 ซึ่งได้แคลลัสหนัก 1.22 กรัม

2.4 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในที่มืดตลอดเวลา แคลลัสมีการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกับที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน กล่าวคือ ชิ้นส่วนจะมีการม้วนตัวและพองบวมเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 10 วัน จะเกิดเซลล์แขวนลอยในบางขวดอาหารที่เพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 2 แคลลัสจะมีสีเขียวอ่อนแกมสีเหลือง ผิวของแคลลัสมีลักษณะยุ่ยเล็กน้อย และมีบางส่วนหลุดออกมาในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ แคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้น หนาขึ้นและม้วนตัวเป็นก้อนมีสีน้ำตาลแกมสีเหลืองเล็กน้อย สำหรับน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้จะอยู่ในเกณฑ์ต่ำ คือ ที่ระดับ pH 5.0, 5.2, 5.6 และ 6.0 จะให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.64, 0.59, 0.51 และ 0.65 กรัม ตามลำดับ น้ำหนักสดเฉลี่ยที่สูงสุดคือ 1.39 กรัม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารระดับ pH 5.4 ส่วนรองลงมาคือ ที่ระดับ pH 5.8 แคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.36 กรัม (ตาราง 7, 8 และภาพประกอบ 9) และเมื่อเพาะเลี้ยงนานกว่า 4 สัปดาห์โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีดำ

ตาราง 4 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
5.0	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแก่แกมสีเขียวอ่อนรอบรอยตัด ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
5.2	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแก่แกมสีเขียวอ่อน ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
5.4	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแก่แกมสีเขียวอ่อนรอบรอยตัด ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
5.6	+++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสรอบรอยตัด สีเขียวแกมสีเหลือง ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	++++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นมาก สีเขียวเข้มแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล อัดตัวกันแน่น

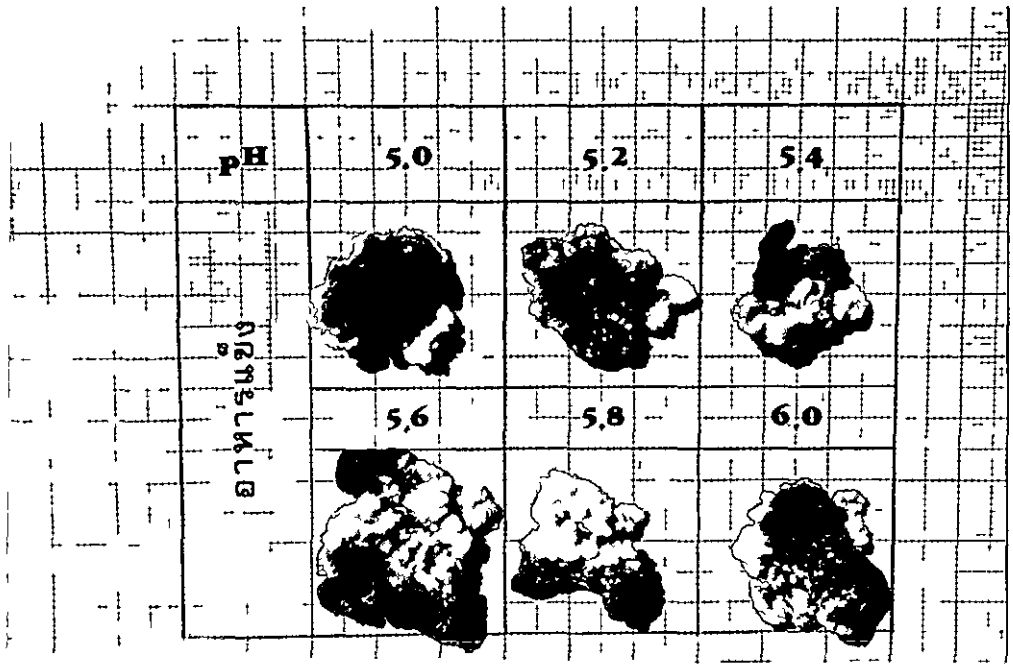
ตาราง 4 (ต่อ)

pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
5.8	+++	ชั้นส่วนเกิดแคลลัสรอบรอยตัด สีเขียวแกมสีเหลือง ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	++++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
6.0	++	ชั้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแกมสีเหลืองรอบรอยตัดขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล

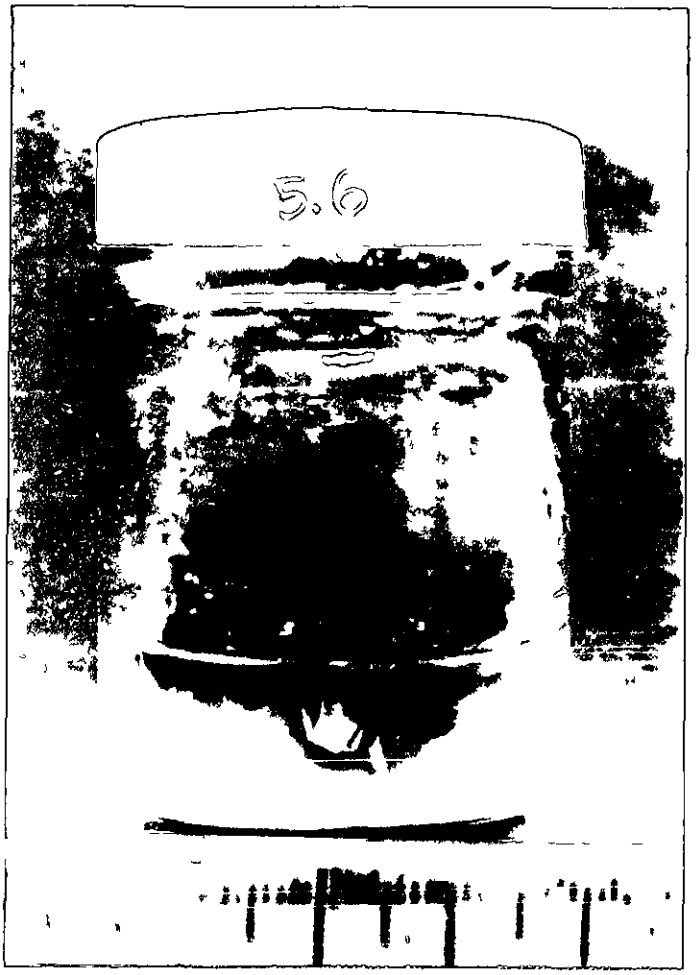
++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างน้อย

+++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างมาก

++++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสมาก



ภาพประกอบ 4 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพประกอบ 5 ลักษณะของแคลลัสหน่อเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ดัดแปลง pH 5.6 ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 5 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในที่มืดบนอาหารแข็ง สูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
5.0	+	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเล็กน้อยมีสีเขียวอ่อนรอบรอยตัด	+++	เกิดแคลลัสมากขึ้นและขยายใหญ่ มีสีน้ำตาลแกมสีเหลืองเข้มและสีเหลืองอ่อน
5.2	++	ชิ้นส่วนแคลลัสสีเขียวอ่อนแกมสีเหลืองรอบรอยตัด	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่กว่าเดิม มีสีน้ำตาลแกมเหลือง บางจุดเป็นสีดำ
5.4	+	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวอ่อนแกมสีเหลืองเล็กน้อยรอบรอยตัด	++	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นสีน้ำตาลแกมสีเหลือง
5.6	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสรอบรอยตัดเป็นกลุ่มก้อน	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่สีน้ำตาลแกมสีเหลือง
5.8	++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเหลืองอ่อนรอบรอยตัด	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นสีน้ำตาลแกมสีเหลือง

ตาราง 5 (ต่อ)

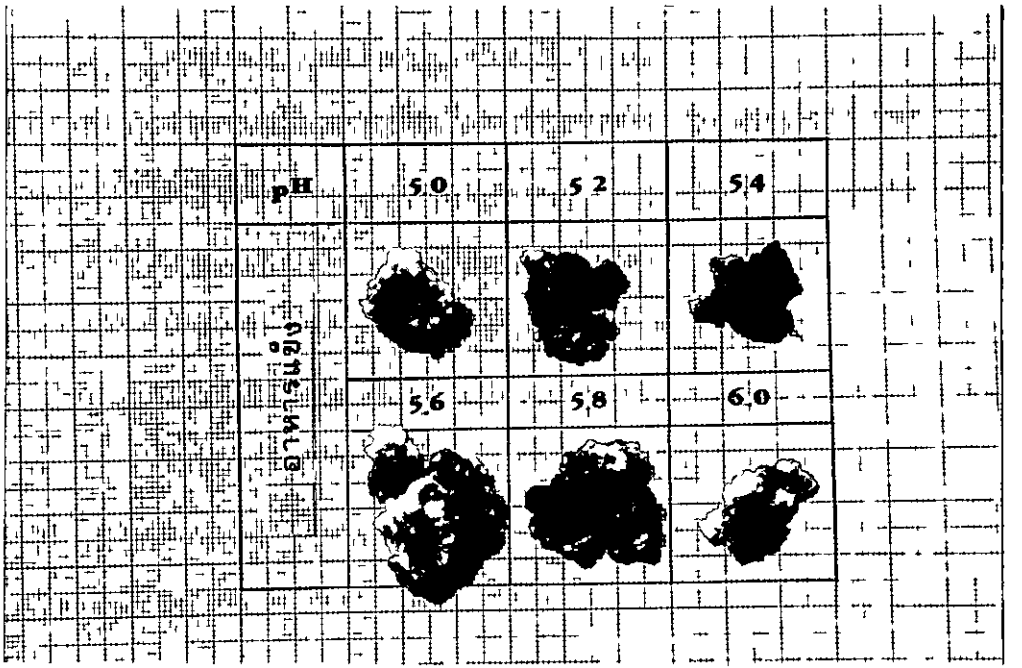
pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญ		การเจริญ	
	เติบโต	ลักษณะ	เติบโต	ลักษณะ
6.0	+	ชิ้นส่วนม้วนงอเกิดแคลลัสสีเหลืองอ่อนรอบรอยตัด	++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น สีน้ำตาลแกมสีเหลือง

\+ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสน้อยมาก

++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างน้อย

+++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างมาก

++++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสมาก



ภาพประกอบ 6 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ

ตาราง 6 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในอาหารเหลว สูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
5.0	+	ชิ้นส่วนม้วนงอและมีความหนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สีเขียว	++	แคลลัสขยายขนาดอีกเล็กน้อย มีสีเขียวแกมสีน้ำตาล
5.2	+	ชิ้นส่วนม้วนงอและมีความหนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สีเขียว	++	แคลลัสขยายขนาดอีกเล็กน้อย มีสีเขียวแกมสีน้ำตาล
5.4	++	ชิ้นส่วนม้วนงอและมีความหนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สีเขียว	+++	แคลลัสพองบวมและขยายขนาด มีสีเขียวแกมสีน้ำตาล
5.6	++	ชิ้นส่วนม้วนงอและขยายขนาดขึ้น มีความหนาเพิ่มขึ้น สีเขียว	+++	แคลลัสพองบวมและขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวแกมสีน้ำตาล
5.8	++	ชิ้นส่วนม้วนงอมีความหนาเพิ่มขึ้นและมีแคลลัสสีเขียวรอบรอยตัด	++++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวแกมสีน้ำตาล

ตาราง 6 (ต่อ)

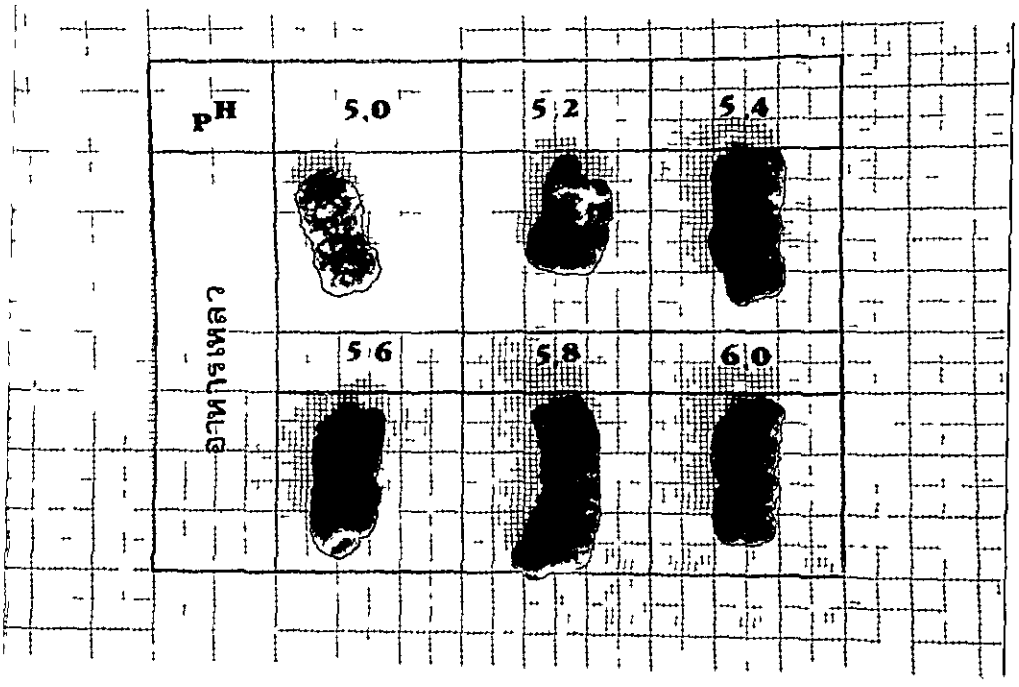
pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
6.0	+	ชิ้นส่วนม้วนงอ และขยายขนาดเล็กน้อยสีเขียว	++	แคลลัสขยายขนาดขึ้น มีสีเขียวแกมสีน้ำตาล

\+ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสน้อยมาก

++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างน้อย

+++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างมาก

++++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสมาก



ภาพประกอบ 7 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลา ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ดัดแปลง ซึ่งปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพประกอบ 8 ลักษณะของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ดัดแปลง pH 5.8 ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 7 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในอาหารเหลว สูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ ในที่มืดตลอดเวลาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
5.0	+	ชิ้นส่วนม้วนงอและมีความหนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สีเขียวแกมสีเหลือง	+++	ชิ้นส่วนขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเป็นปุ่มเล็ก ๆ ทั่วไป สีน้ำตาลแกมสีเขียว
5.2	+	ชิ้นส่วนม้วนงอและมีความหนาเพิ่มขึ้น สีเขียวแกมสีน้ำตาล	++	ขยายขนาดขึ้นอีกเล็กน้อยและม้วนงอ สีน้ำตาลแกมสีเขียว
5.4	++	ชิ้นส่วนม้วนงอและมีความหนาเพิ่มขึ้นสีเขียวแกมสีเหลือง	++++	แคลลัสม้วนงอและพองขยายขนาดขึ้นมาก สีน้ำตาลแกมสีเขียว
5.6	+	ชิ้นส่วนม้วนงอมีความหนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล	++	แคลลัสขยายขนาดขึ้นเล็กน้อย สีน้ำตาลแกมสีเขียว
5.8	++	ชิ้นส่วนม้วนงอมีความหนาเพิ่มขึ้น สีเขียวแกมสีเหลือง	++++	แคลลัสม้วนงอและปิดเล็กน้อย ขยายขนาดเพิ่มขึ้น มีสีน้ำตาลแกมสีเขียว

ตาราง 7 (ต่อ)

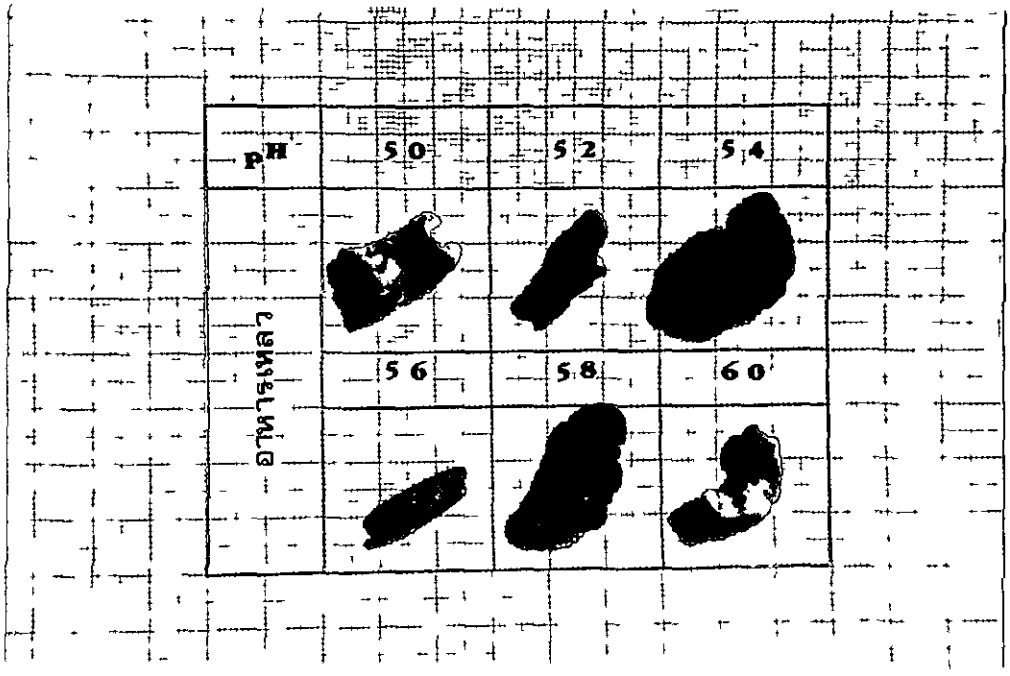
pH	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญ		การเจริญ	
	เติบโต	ลักษณะ	เติบโต	ลักษณะ
6.0	+	ชิ้นส่วนม้วนงอมีความหนาขึ้น สีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล	+++	แคลลัสมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น มีสีน้ำตาลแกมสีเขียว

\+ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสน้อยมาก

++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างน้อย

+++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างมาก

++++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสมาก



ภาพประกอบ 9 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ดัดแปลง ซึ่งปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ ในที่มืดตลอดเวลา เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงที่ระดับ pH ของอาหาร สภาพอาหาร และแสงแตกต่างกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source of Variation	SS	df	MS	F
A	11.437	5	2.287	22.785**
B	81.597	1	81.597	812.792**
C	3.616	1	3.616	36.021**
AB	8.932	5	1.786	17.794**
AC	1.632	5	0.326	3.252**
BC	0.689	1	0.689	6.864**
ABC	0.635	5	0.127	1.265
Residual	21.684	216	0.100	
Total	130.222	239	0.545	

**มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01

$F_{.01\ (1,216)} = 6.61$

$F_{.01\ (5,216)} = 3.02$

A ระดับ pH ของอาหาร

B สภาพของอาหาร

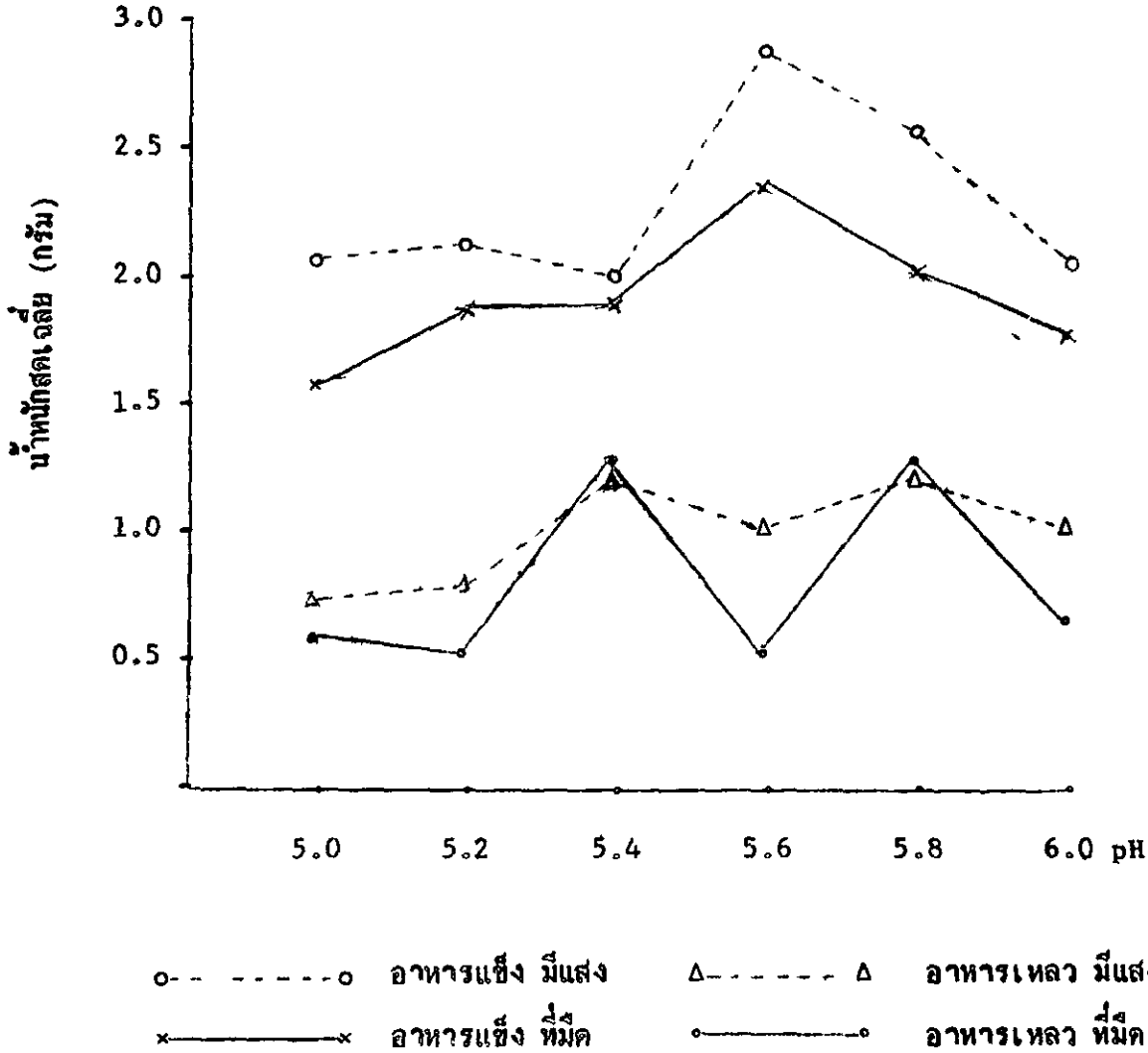
C สภาพของแสง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตาราง 8) ปรากฏว่า ระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหารและแสง ต่างก็มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา นอกจากนี้ยังพบว่า อิทธิพลร่วม (Interaction) ระหว่างระดับ pH ของอาหารกับสภาพของอาหาร สภาพของอาหารกับสภาพของแสง ต่างมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ อิทธิพลร่วมระหว่างระดับ pH ของอาหารกับสภาพของอาหาร น้ำหนักสดของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงที่ระดับ pH 5.6 ในสภาพอาหารแข็งจะมีค่าสูงกว่าในสภาพอาหารเหลว เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพของอาหารและสภาพของแสง พบว่า เมื่อให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในสภาพอาหารแข็งสูงกว่าอาหารเหลว ในประเด็นสุดท้ายเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างระดับ pH ของอาหารกับสภาพของแสง พบว่า ที่ระดับ pH 5.6 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน มีค่าสูงกว่าในที่มืด ดังแสดงในตาราง 9 และภาพประกอบ 10

ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสาม คือ pH ของอาหาร สภาพของอาหารและแสง ไม่พบว่ามีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 9 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงที่ระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสงแตกต่างกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

pH ของอาหาร	อาหารแข็ง		อาหารเหลว	
	มีแสง	ไม่มีแสง	มีแสง	ที่มืด
5.0	2.03	1.53	0.77	0.64
5.2	2.07	1.84	0.78	0.59
5.4	1.95	1.86	1.22	1.39
5.6	2.92	2.37	0.98	0.51
5.8	2.60	2.12	1.29	1.36
6.0	2.04	1.79	0.93	0.65



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลา กับระดับ pH ของอาหาร ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพของอาหารและแสงแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา

จากการนำส่วนใบคู่ที่ 2 และ 3 ของหญ้าเกล็ดปลามาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 8 ระดับ คือ 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 และ 10.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 5.6 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสแตกต่างกัน (ตาราง 10 และภาพประกอบ 11) กล่าวคือ เนื้อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาบนอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล (0 เปอร์เซนต์) เนื้อเยื่อจะไม่มีการเจริญเติบโตเลยและจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดแกมสีน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 1 เดือน ส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาล 1.5 เปอร์เซ็นต์สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ แต่น้ำหนักสดเฉลี่ยค่อนข้างต่ำ คือ 1.47 กรัม น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลระดับความเข้มข้น 6.0, 7.5 และ 9.0 เปอร์เซ็นต์ จะเท่ากับ 2.36, 2.15 และ 2.04 กรัม ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 6.0, 7.5 และ 9.0 เปอร์เซ็นต์นี้ ยังสามารถชักนำให้แคลลัสสร้างรากได้ รากที่เกิดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาล 7.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีขนาดใหญ่และยาวกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาล 6.0 และ 9.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพประกอบ 12) สำหรับแคลลัสที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดโดยที่ไม่มีรากเกิดขึ้น คือ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 2.91 กรัม ลักษณะของแคลลัสรวมกันแน่นเป็นก้อนขรุขระ รูปร่างไม่แน่นอน มีสีเขียว ด้านล่างที่ติดกับอาหารมีสีเหลืองแกมสีน้ำตาลอ่อน

ตาราง 10 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

น้ำตาล (%)	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
0	-	ชิ้นส่วนมีสีเขียวและขอบของเนื้อเยื่อเป็นสีเหลือง	-	ชิ้นส่วนโค้งงอเล็กน้อย มีสีเหลืองซีดแกมสีน้ำตาล
1.5	+	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวรอบรอยตัด	++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
3.0	+++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเป็นกลุ่มก้อนสีเขียวรอบรอยตัด ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	++++	แคลลัสมีขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น มีสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล
4.5	+++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเป็นก้อนสีเขียวแก่แกมสีเขียวอ่อนรอบรอยตัด ขยายเข้าหาส่วนกลางของชิ้นส่วน	++++	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นรอบ ๆ รอยตัด ตรงกลางคล้ายเนื้อเยื่อเดิมแต่หนากว่า เพราะเกิดการแบ่งเซลล์ขณะเพาะเลี้ยงแคลลัสมีสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล

ตาราง 10 (ต่อ)

น้ำตาล (%)	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
6.0	++	ชั้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแกมสีเหลืองรอบรอยตัด	+++	แคลลัสที่อยู่รอบรอยตัดขยายขนาดขึ้นมีสีเขียวแกมสีเหลืองและน้ำตาล บริเวณตรงกลางของแคลลัสยังพบเนื้อเยื่อเดิมแต่มีขนาดใหญ่ขึ้น และพบรากงอกออกมาด้วย
7.5	++	ชั้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแกมสีเหลืองรอบรอยตัด	+++	แคลลัสขยายขนาดขึ้นสีเขียวแกมสีน้ำตาล บริเวณตรงกลางยังพบเนื้อเยื่อเดิมแต่มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีรากงอกออกมามีขนาดใหญ่และยาว
9.0	++	ชั้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวแกมสีเหลืองรอบรอยตัด	+++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นสีเขียวแกมสีเหลืองและสีน้ำตาล ตรงกลางยังพบเนื้อเยื่อเดิมมีสีเขียว มีรากงอกออกมาจากแคลลัส

ตาราง 10 (ต่อ)

น้ำตาล (%)	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	การเจริญเติบโต	ลักษณะ	การเจริญเติบโต	ลักษณะ
10.5	+++	ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสสีเขียวอ่อนแกมสีเหลืองรอบรอยตัด	++++	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวแกมสีเหลืองและมีสีน้ำตาล ตรงกลางยังพบเนื้อเยื่อเดิมแต่มีขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียว

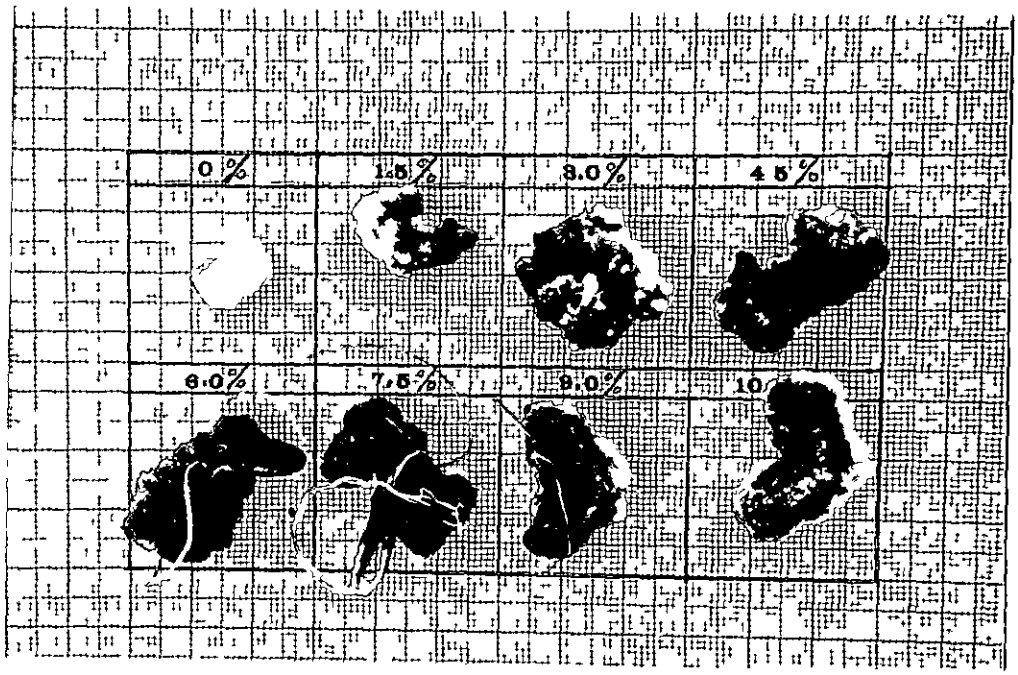
\- หมายถึง ชิ้นส่วนไม่มีการเจริญเติบโต

\+ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสน้อยมาก

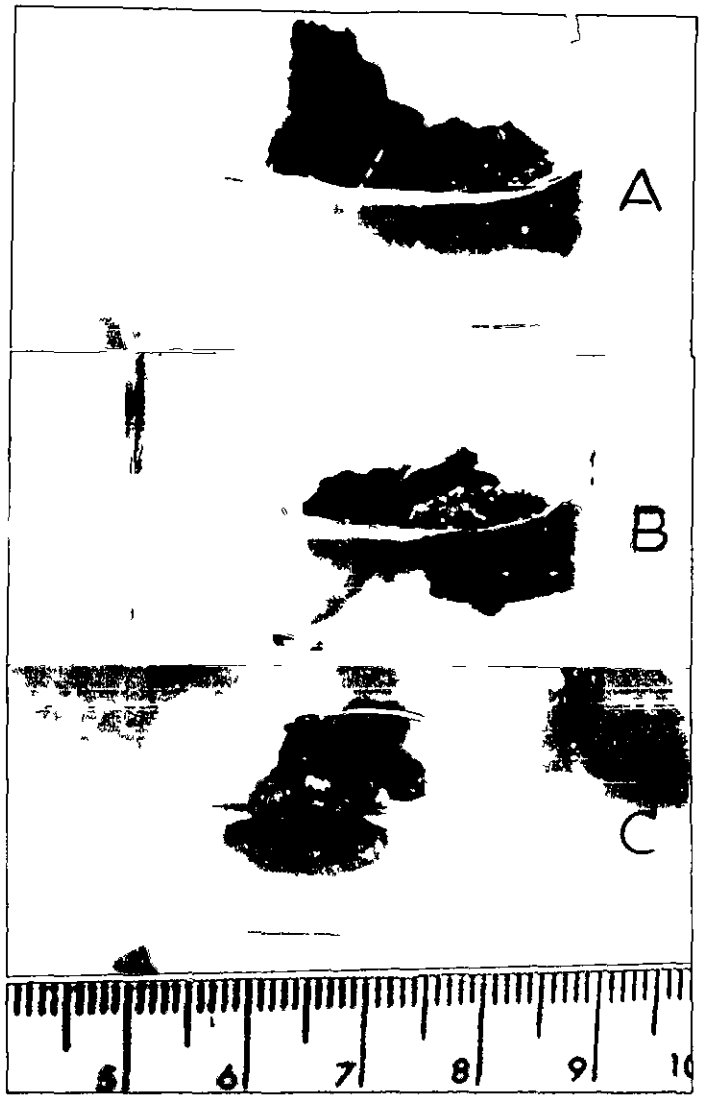
++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างน้อย

+++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสค่อนข้างมาก

++++ หมายถึง ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นแคลลัสมาก



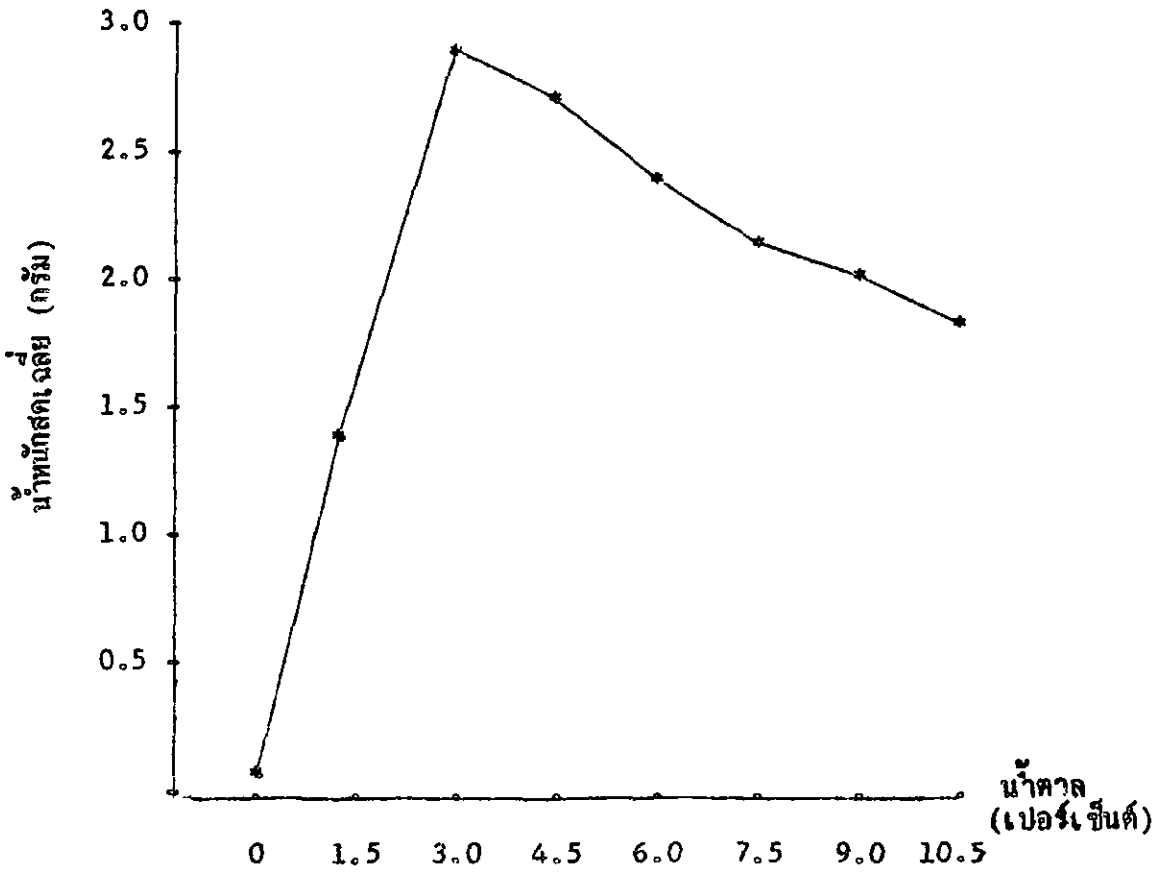
ภาพประกอบ 11 แคลลัสของหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพประกอบ 12 ลักษณะของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาล 6.0 (A), 7.5 (B) และ 9.0 เปอร์เซ็นต์ (C) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 11 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.08
1.5	1.47
3.0	2.91
4.5	2.65
6.0	2.36
7.5	2.15
9.0	2.04
10.5	1.82



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลากับความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร

ตาราง 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	7	53.48	7.64	109.14**
Error	72	5.72	0.07	
Total	79	59.20		

** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01

$F_{.01\ (7,72)} = 2.91$

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า มีค่าเฉลี่ยอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 จึงนำไปทดสอบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ด้วยวิธี Dancan's New Multiple Range Test (ตารางที่ 20 ภาคผนวก) พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 6.0 กับ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 7.5 กับ 9.0 เปอร์เซ็นต์ และระดับ 9.0 กับ 10.5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำตาลความเข้มข้นระดับ 4.5 กับ 6.0 เปอร์เซ็นต์ และระดับ 6.0 กับ 9.0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 น้ำตาลความเข้มข้นในระดับที่เหลือนอกจากนี้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ทุกค่า

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาปัจจัยบางประการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา ได้แก่ ระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร สภาพของแสง และน้ำตาลซูโครส ในส่วนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาเป็นแคลลัส ผู้วิจัยได้นำใบคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อ ตัดให้มีขนาดกว้าง 7 มิลลิเมตร ยาว 7 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

1. การศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา พบว่า เนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาสามารถตอบสนองต่อค่า pH ของอาหารได้ในช่วงกว้างคือระดับ pH 5.0-6.0 แคลลัสจะมีน้ำหนักสดไม่แตกต่างกัน แต่ที่ระดับ pH 5.5 ได้แคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 2.64 กรัม ที่ระดับ pH ที่สูงหรือต่ำกว่า pH 5.0-6.0 จะพบว่าเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตน้อยมาก เป็นไปตามที่ Murashige ได้กล่าวไว้ว่า pH ที่เหมาะสมที่พืชสามารถจะเจริญเติบโตจะอยู่ในช่วง 5.0-6.0 และการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ธิดา หัตตี และอรดี สหวัชรินทร์ ซึ่งได้เพาะเลี้ยงใบอาฟริกันไวโอเลต ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารต่างกัน ตั้งแต่ 4.0-6.5 ซึ่งพบว่าระดับ pH 5.0 และ 6.0 เป็น pH ที่สามารถเพาะเลี้ยงใบอาฟริกันไวโอเลตได้ดีพอสมควร แต่ใบจะเจริญเป็นต้นและเป็นรากได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 5.5 (ธิดา หัตตี และ อรดี สหวัชรินทร์ 2522 283 - 303) แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยิปโซฟิลลา (Gypsophila paniculata L.) โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีธาตุอาหารหลักของ White. ธาตุอาหารรองของสูตร MS และธาตุอาหารเสริมของ Nitsch and Nitsch. ปรับ pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อตั้งแต่ 5.0-7.0 พบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดในการส่งเสริมให้เนื้อเยื่อมีการเจริญมากที่สุดคือระดับ pH 6.5 (บรรเทิง บรรพศิริ 2527 47)

Vasil ได้รวบรวมผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอนโดสเปิร์มเพื่อเจริญไปเป็นแคลลัสในอาหารที่ปรับ pH ต่าง ๆ พบว่า เอนโดสเปิร์มของข้าวโพดจะเจริญได้ดีที่ระดับ pH 6.1 เอนโดสเปิร์มของ Asimina sp. จะเจริญได้ดีที่ระดับ pH 4.0 เอนโดสเปิร์มของ Ricinus sp.

จะเจริญได้ที่ pH 5.0 เอนโดสเปิร์มของ Jatropha sp. และ Putranjiva sp. และ Putrajiva sp. จะเจริญได้ดีที่ pH 5.6 ส่วนเอนโดสเปิร์มของแอปเปิ้ลจะเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาไปเป็นอวัยวะได้ที่ pH 6.0-6.2 (Vasil. 1980 : 175)

จะเห็นว่าพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อระดับ pH ของอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตกต่างกัน บางชนิดชอบสภาพอาหารที่เป็นกลาง บางชนิดชอบสภาพอาหารที่เป็นกรดเล็กน้อย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงต้องปรับ pH ของอาหารให้เหมาะสม เท่าที่ศึกษาและทำการทดลองไม่พบว่ามีพืชชนิดใดชอบสภาพอาหารที่เป็นด่าง ทั้งนี้เพราะระดับ pH ของอาหารมีผลต่อการแตกตัวของฟอสเฟต กล่าวคือ ที่ระดับ pH 5.7-5.8 สารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในอาหาร อาทิเช่น สารประกอบฟอสเฟตจะมีอยู่อย่างเพียงพอที่จะเป็นประโยชน์ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืชได้ (Murashige and Skoog. 1962 : 473 - 497) ระดับ pH ที่เป็นกลาง ๆ เช่น pH 6.8 ฟอสเฟตจะอยู่ในรูปของ $H_2PO_4^{-1}$ และ $H_3PO_4^{-2}$ ซึ่งพืชยังสามารถดูดไปใช้ได้ แต่ถ้า pH ของอาหารสูง ฟอสเฟตจะอยู่ในรูปของ PO_4^{-3} ซึ่งในสภาพเช่นนี้พืชจะไม่สามารถดูดเอาฟอสเฟตไปใช้ได้ (สัมพันธ์ คัมภิรานนท์ 2529 · 72) นอกจากนี้ระดับ pH ที่สูงยังมีผลต่อการตกตะกอนของแร่ธาตุที่เป็นโลหะในอาหาร เช่น เหล็ก สังกะสี ทองแดง ซึ่งธาตุอาหารที่ตกตะกอนแล้วพืชจะไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต (สัมพันธ์ คัมภิรานนท์ 2529 : 68-69, Nitsch and Nitsch. 1956 · 839 - 851) และถ้าระดับ pH ของอาหารต่ำจะมีผลทำให้พืชนำสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลงด้วย ตามที่ Martin และคนอื่น ๆ ได้กล่าวไว้ว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องปรับ pH ของอาหารให้สูงกว่า 5.0 เนื้อเยื่อพืชจึงจะสามารถนำไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ได้ (Martin and other. 1977 : 2838 - 2843)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา อาหารที่มี pH ต่ำกว่า 5.0 หรือสูงกว่า 6.0 การเจริญของเนื้อเยื่อจะลดลง ดังได้กล่าวมาแล้วว่าอาหารที่มีความเป็นกรดหรือด่างมากเกินไป พืชจะไม่สามารถนำแร่ธาตุที่มีอยู่ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ จึงทำให้การเจริญเติบโตลดลง และยังเป็นอันตรายต่อเซลล์พืชโดยตรงด้วย pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาที่เหมาะสมจึงอยู่ในช่วง 5.0 - 6.0

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสง ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา โดยปรับ pH ของอาหารเป็น 6 ระดับ คือ 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8 และ 6.0 ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืดตลอดเวลา พบว่า ระดับ pH ของอาหารตั้งแต่ 5.0 - 6.0 สามารถส่งเสริมให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสได้ทุกระดับ pH แต่เมื่อพิจารณาถึงสภาพของอาหารแข็งและอาหารเหลวร่วมกับสภาพของการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และที่มืดตลอดเวลา พบว่ามีข้อแตกต่างกันคือ เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ที่ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เนื้อเยื่อจะมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้และเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสได้ดีกว่าในอาหารเหลว อีกทั้งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงกว่าในอาหารเหลวด้วย นอกจากนี้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะเกิดเซลล์แขวนลอย (Cell Suspension) ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงได้ครบ 1 เดือนเนื้อเยื่อที่หลุดออกมาในอาหารจะตายไป การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองอีกหลายการทดลอง เช่น สุเม อรัญมารถ ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเยอบีราจาก ส่วนใบ ลำต้น และตาข้าง ในอาหารเหลวเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ปรากฏว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตและมีพัฒนาการได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตน้อยมาก มีการเกิดเซลล์แขวนลอย และแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแล้วตายไปในที่สุด (สุเม อรัญมารถ 2524 21 - 23) การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นเยอบีราในอาหารเหลวและบนอาหารแข็งสูตรของ White พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีขนาดใหญ่กว่าและมีสีเขียวเข้มกว่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและยังเกิดเซลล์แขวนลอยขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 1 เดือน แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (อุบลพงษ์ แสงวณิช 2519 30-40, 42) และจากการทดลองของ Jelaska และ Sutina ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดคาร์เนชั่นบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว แม้ว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะพัฒนาเป็นแคลลัสและเจริญได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ แคลลัสจะมีการเจริญเติบโตลดลงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Jelaska and Sutina, 1977 333 - 337) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Wang และ Janick ซึ่งเพาะเลี้ยง

เอมบริโอของ Jojoba ในอาหารสูตร MS พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจะได้น้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Wang and Janick. 1986 : 1048 - 1049)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในอาหารเหลวพบว่า บริเวณผิวของเนื้อเยื่อแคลลัสบางส่วนหลุดออกมาในอาหาร เนื่องจากต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ปั่นด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มออกซิเจนลงในอาหาร คาดว่าการปั่นแรงเกินไปจึงทำให้เซลล์บางส่วนหลุดออกมา การเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวทำให้ผิวของเนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารอย่างทั่วถึง และง่ายต่อการดูดซึมเข้าไปในเซลล์จึงทำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญได้ดีในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานเซลล์และเนื้อเยื่อจะปล่อยของเสียออกมาทำให้เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในเวลาต่อมา

เมื่อพิจารณาถึงสภาพของแสงที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และที่มืดตลอดเวลา พบว่า เนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลามีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ทั้งในที่มีแสงและในที่มืด แต่น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงจะมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในที่มืด ไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรือบนอาหารแข็งก็ตาม โดยทั่วไปเนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญได้ในที่มีแสง แต่มีนักวิจัยหลายท่านรายงานว่า เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญได้ทั้งในที่มีแสงและในที่มืด รวมทั้งความเข้มของแสงที่เหมาะสมนั้นก็ขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิดด้วย (Stohs. 1980 · 85 - 107) อย่างเช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร SH (Schenk and Hildebrandt) ของพืชต่อไปนี้ทั้งในที่มีแสงและในที่มืดคือ Medicago sativa, Opuntia subulata และยาสูบ (Nicotiana tobacum) เนื้อเยื่อสามารถเจริญทั้งในที่มีแสงและที่มืดได้ดีพอ ๆ กัน ส่วน Phytolacca americana และถั่วลิสง (Arachis hypogaea) แคลลัสจะเจริญในที่มีแสงได้ดีกว่าในที่มืด (Dixon. 1985 · 8) เนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของกุหลาบ 2 ชนิด คือ Rosa hybrida L. และ R. manetti Hort. จะเจริญในที่มืดได้ดีกว่าในที่มีแสง แต่ในที่สุดขนาดของแคลลัสจะไม่แตกต่างกัน (Khosh-Khui and Sink. 1982 361 - 370) Tabaeezadeh และ Khosh-Khui ได้อ้างถึงการทดลองของ Clapham ซึ่งเพาะเลี้ยง Hordeum vulgare L. Dunwell และ Sunderland ได้เพาะเลี้ยงมันฝรั่ง Kasperbauer และ Collins เพาะเลี้ยงยาสูบ Raina และ Lyer ได้เพาะเลี้ยง

มะเขือยาว ต่างรายงานสอดคล้องกันว่า แสงไม่มีความจำเป็นสำหรับการเกิดแคลลัส รวมทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญและการพัฒนาของแคลลัสในพืชดังกล่าวด้วย (Tabaeezadeh and Khosh-Khui. 1981 61 - 66)

ดังได้กล่าวมาแล้วว่าความจำเป็นของแสงต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิด หรืออาจจะเจริญได้ดีพอ ๆ กันทั้งในที่มีแสงหรือในที่มืด แต่แสงจะมีผลต่อขบวนการเมตาบอลิสมภายในเซลล์ของพืช (Gamborg. 1986 · 7) กล่าวคือ เนื้อเยื่อหรือแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้อาจมีสีเหลือง สีเขียว สีขาว สีน้ำตาล หรือไม่มีสีก็ได้ การที่เนื้อเยื่อจะมีสีเขียวนั้นขึ้นอยู่กับการให้แสงที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแครอทและยาสูบให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับการให้แสงแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น ธาตุอาหารเหล็ก Auxin, Cytokinin และน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลซูโครสจะยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ของเนื้อเยื่อ และแสงยังมีส่วนกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดการตรึงกาซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากกว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในที่มืด (Street. 1977 : 295 - 297 citing Hanson and Edelman. 1972 . 11 - 25) ซึ่งสอดคล้องกับ Dodds และ Roberts ที่กล่าวว่าคลอโรฟิลล์ในแคลลัสนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก ซึ่งรวมทั้งแสงที่มีความเข้มอย่างเพียงพอ และช่วงแสงสีน้ำเงินจะชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงของคลอโรพลาสต์ และการทำงานของเอนไซม์ (Dodds and Roberts. 1985 : 55 - 56) ด้วยเหตุนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา จึงพบว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงส่วนใหญ่จะมีสีเขียวแก่และสีเขียวอ่อน ในขณะที่เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในที่มืดตลอดเวลาจะมีสีเหลืองแกมสีน้ำตาล

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ อันได้แก่ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และแสง สรุปได้ว่าระดับ pH ของอาหารก่อนหนึ่งฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่สุด คือ 5.6 โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน จะได้แคลลัสน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดคือ 2.92 กรัม แคลลัสมีสีเขียวขนาดใหญ่และรวมตัวกันแน่น

3. การศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา

เมื่อนำเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลามาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสเนื้อเยื่อจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเจริญเติบโตเลยแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงจนครบ 4 สัปดาห์แล้ว ทั้งนี้เพราะ

น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่นิยมใช้กันทั่วไปในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งทำหน้าที่เป็นสารที่ให้พลังงานแก่เซลล์ (Murashige and Skoog. 473 - 497) ปริมาณน้ำตาลที่สูงมักจะส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดี และชนิดของน้ำตาลจะมีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อแตกต่างกันด้วย เช่น น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส จะส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดได้ดีพอ ๆ กัน ในขณะที่น้ำตาลแลคโตส กาแลคโตส อะราบิโนส และแรมโนส จะยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อเอนโดสเปิร์มของข้าวโพด (Straus and La Rue. 1954 . 687 - 694)

เนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1.5, 3.0, 4.5 และ 10.5 เปอร์เซ็นต์จะส่งเสริมให้เกิดแคลลัสได้ และที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จะให้แคลลัสน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด ตามที่ ผกามาศ เขมะจารี กล่าวว่า เนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาสามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (ผกามาศ เขมะจารี 2530 . 24) ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมลงในอาหารนั้น จะแตกต่างกันไปตามสูตรอาหารแต่ละสูตร เช่น สูตรอาหารของ Heller, White, Erikson และ Gamborg (B_5) จะใช้น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหาร Nitsch and Nitsch จะเติมน้ำตาล 3.4 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหารของ Gautheret จะเติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับสูตรอาหาร MS (Street. 1977 . 43)

ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในอาหารที่เติมน้ำตาลเข้มข้น 6.0, 7.5 และ 9.0 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาไปเป็นราก น่าจะเป็นเพราะว่าปริมาณน้ำตาลที่เติมลงไปทำให้อัตราส่วนระหว่าง Auxin และ Cytokinin เสียสมดุลย์ ตามที่ Takayama และ Misawa กล่าวว่า น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงที่เติมลงในอาหารจะยับยั้งการทำงานของ Cytokinin (Takayama and Misawa. 1983 . 353 - 362) ทั้งนี้เพราะพัฒนาการของเนื้อเยื่อนั้นขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่าง Auxin กับ Cytokinin ถ้าอัตราส่วนของ Auxin ต่อ Cytokinin สูงกว่าอัตราสมดุลย์ เนื้อเยื่อนั้นจะมีการพัฒนาไปเป็นราก (Skoog and Miller. 1957 118 - 131) นอกจากนี้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่ม Auxin และ Cytokinin จะทำงานร่วมกันใน

การส่งเสริมให้เกิด Morphogenesis ด้วย เช่น ในการสร้างเนื้อเยื่อลำเลียงน้ำและอาหาร (Xylem and Phloem) ในแคลลัสของ Lilac sp. นั้นพบว่า น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิด Xylem น้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์จะชักนำให้เกิด Phloem ส่วนน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะชักนำให้เกิดทั้ง Xylem และ Phloem (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา 2524 · 83 - 84)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาส่วนใบคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 เนื้อเยื่อสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่ระดับ 1.5 - 10.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดและน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดในอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงน่าจะมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งก่อนจนได้แคลลัสจึงย้ายแคลลัสลงไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้ได้แคลลัสมีปริมาณเพิ่มขึ้น

2. จากการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาที่เพาะเลี้ยงในที่มืดตลอดเวลา ในตอนแรกเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสได้เร็วกว่าที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสง ต่อมาการเจริญของแคลลัสจะชะงักลง จึงควรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาในที่มืดตลอดเวลาก่อน แล้วจึงย้ายเนื้อเยื่อลงบนอาหารที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงเพื่อให้ได้แคลลัสมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น

3. ควรศึกษากายวิภาคและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อขณะทำการเพาะเลี้ยง เพื่อทราบแบบแผนของการเจริญ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคนอื่น ๆ สมุนไพร โครงการวิจัยสมุนไพร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2523, 256 หน้า

เต็ม สมิตินันท์ ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง) พันนีพับลิชชิ่ง 2523, 379 หน้า

ธิดา หัตถี และ อรดี สหวัชรินทร์ ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของใบอาฟริกันไวโอเลตที่เพาะเลี้ยงแบบอินวิโทร รายงานผลการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 4 283 - 303, 2522.

นภดล ไกรพานนท์ การขยายพันธุ์ลิลลี่โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริญญานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2527, 47 หน้า อัดสำเนา

บรรเทิง บรรพศิริ การขยายพันธุ์ยิบโซฟิลลาโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริญญานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2527, 82 หน้า อัดสำเนา

ผกามาศ เชนะจารี การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าเกล็ดปลาเพื่อหาอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับสัมธรรมชาติ ปริญญานิพนธ์ กศ.น. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2530, 51 หน้า อัดสำเนา

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา หลักและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2524, 109 หน้า

วิไลภรณ์ อุทธยอด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบ ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2526, 66 หน้า อัดสำเนา

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์ หลักสรีรวิทยาของพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2529, 330 หน้า

สายสมร มุชลาย ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณต้นเยอบีราในสภาพปลอดเชื้อ ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2529, 87 หน้า

สุเม อรัญมารถ การขยายพันธุ์เบญจมาศโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริญญานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2524, 62 หน้า อัดสำเนา

สุมนา กิจไพฑูรย์ การขยายพันธุ์สแตติสเพอริไอโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริญญานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2528, 54 หน้า อัดสำเนา

อุบลหงษ์ แสงวณิช การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของเยอบีรา ปริญญานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2519, 70 หน้า อัดสำเนา

อรดี สหวัชรินทร์ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พันธุ์พับบลิชชิ่ง 2526, 17 หน้า

Butenko, R.C. Plant Cell Culture MIR Publishers Moscow USSR 1985, 207 p.

Dixon, R.A. Plant Culture A Practical Approach IRL Press England 1985, 236 p.

Dodds, J.H. and L.W. Roberts. Experiments in Plant Tissue Culture 2ed. Cambridge University Press 1985, 232 p.

Gamborg, O.L. "Cell Protoplasts and Plant Regeneration in Culture," in Plant Genetic Engineering unit National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, ed. The Workshop on Tissue Culture and Protoplast Technology march 17 - 21, p. 1 - 45 Kasetsart University 1986.

Hanson, A.D. and J. Edelman. "Photosynthesis by Carrot Tissue Culture," Planta 102 11 - 25, 1972.

Jelaska, S. and R. Sutina. "Maintained Culture of Multiple Plantlets from Carnation Shoot Tips," Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes. 333 - 337, 1977.

Kajita, M., S. Takio, S. Takami and S. Hino. "Establishment and Growth Characterization of Suspension Culture of Cells from The Moss Sphagnum Imbricatum," Physiol. Plantarum 70 21 - 26, 1987.

Khosh-Khui, M. and K.C. Sink. "Callus Induction and Culture of Rosa," Scientia Hortic. 17 361 - 370, 1982.

Leshem, B., H.Lilien-Kipnis and B. Steinitz. "The Effect of light and of Explant Orientation on the Regeneration and Subsequent Growth of Bulblets on Lilium longiflorum Thunb. Bulb Scale Sections Cultured in Vitro," Scientia Hortic. 17 129 - 136, 1982.

Martin, S.M., D. Rose and V. Hui. "Growth of Plant Cell Suspension Culture with Ammonium as The Sole Source of Nitrogen," Can. J. Bot. 55 2838 - 2843, 1977.

Murashige, T. and F. Skoog. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture," Physiol Plant. 15 . 473 - 497, 1962.

_____ "Propagation Through Tissue Cultures," Hort. Science. 9 : 170, 1974.

_____ "Plant Propagation Through Tissue Cultures," Ann. Rev. Plant. Physiol. 25 · 135 - 166, 1974.

_____ "Current Status of Plant Cell and Organ Culture," Hort. Science. 2 · 127 - 130, 1977.

Nitsch, J.P. and C. Nitsch. "Auxin-Dependent Growth of Excised Helianthus tuberosus Tissue I.," Amer. J. Botany 43 : 839 - 851 1956.

Pence, V.C., P.M. Hasegawa and J. Janick. "Sucrose-Mediated Regulation of Fatty Acid Composition in Asexual Embryos of Theobroma cacao," Physiol Plant. 53 378 - 384 1981.

Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans and J.J. Marelis "Gerbera Plantlets from in Vitro Cultivated Capitulum Explants," Scientia Hortic. 1 117 - 119, 1973.

Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans and J.A.J. Van der Meys. "Plantlet Formation in Callus Tissue of Anthurium andraeanum Lind," Scientia Hortic. 2 193 - 198, 1974.

Pushpangadan, P. and C.K. Atal. "Ethno-Medico-Botanical Investigation in Kerala I. Some Primitive Tribals of Western Ghats and Their Herbal Medicine," J. of Ethnopharmacology. 11 74, 1984.

Raghavan, V. and J.G. Torrey. "Growth and Morphogenesis of Globular and Older Embryos of Capsella in Culture," Amer. J. Botany 50 540 - 551, 1963.

Reinert J. and Y.P.S. Bajaj. Applied and Foundamental Aspect of Plant Cell Tissue and Organ Culture Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany 1977, 803 p.

Robbins W.J. and M.B. Schmidt. "Growth of Excised Root of Tomato," Botan. Gaz. 99 671 - 728, 1938.

Schenk R.U. and A.C. Hildebrandt. "Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures," Can. J. Bot. 50 199 - 204, 1971.

Simmonds, J.A. and B.G. Cumming "Propagation of Lilium hybrids. II. Production of Plantlets from Bulb-scale Callus for Increased Propagation Rates," Scientia Hortic. 5 161 - 170, 1976.

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

Stosh, S.J. "Metabolism of Steroids in Plant Tissue Cultures," in A.F. Fiechter ed. Plant Cell Cultures I. p. 85 - 107 Springer Verlag Berlin Heidelberg Germany 1980.

Straus J. and C.D. La Rue. "Maize Endosperm Tissue Grown in Vitro I Culture Requirements," Amer. J. Botany. 41 · 687 - 694, 1954.

Street, H.E. "Growth in Organized and Unorganized System Knowledge Gained by Culture of Organs and Tissue explants," in F.C. Steward, ed. Plant Physiology, Vol. 5B. p. 3 - 224 Academic Press, New York, 1969.

_____ Plant Tissue and Cell Culture 2nd ed. Blackwell Scientific Publications 1977, 614 p.

Tabaeezadeh Z. and M. Khosh-Khui. "Anther Culture of Rosa," Scientia Hortic. 15 61 - 66, 1981.

Takayama S. and M. Misawa. "A Scheme for Mass Propagation of Lilium in Vitro," Scientia Hortic. 18 · 353 - 362, 1983.

Tungskul P. Tissue Culture of an Agroforestry Species . Theobroma cacao L. Biotrop Seameo Regional Center for Tropical Biology Bogor Indonesia 1983, 44 p.

Vasil I.K. Perspective in Plant Cell and Tissue Culture. Acadamic Press, New York 1980, 257 p.

Wang Y.C. and J. Janick. "Sucrose Concentration and Osmolarity as Factors Affecting in Vitro Wax Accumulation in Jojoba Embryos," Hort Science. 21 1048 - 1049, 1986.

ภาคผนวก

การเตรียมเครื่องมือและอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียมเครื่องมือ

1. ใช้อลูมิเนียมฟอยล์ห่อ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว และขวดน้ำกลั่นนำไปนึ่ง ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที สำหรับอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำเข้าตู้ย้ายเนื้อเยื่อต้องเช็ดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

2. ขณะนำเครื่องมือมาตัดเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ ต้องทำความสะอาดปากคีบ มีดผ่าตัดทุกครั้งที่ใช้โดยจุ่มลงในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟทำซ้ำ 3 ครั้ง รอให้เย็นแล้วจึงนำมาใช้

การเตรียมอาหาร

1. เตรียมสารละลายเข้มข้น สูตร Murashige and Skoog ซึ่งมีสารละลายเข้มข้น 6 Stock Stock ที่ 1-5 เป็นสารอนินทรีย์ ส่วน Stock ที่ 6 เป็นสารอินทรีย์ ดังต่อไปนี้

ตาราง 13 ส่วนประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร สูตร Murashige and Skoog (1962)

Stock Solution	สารเคมี	กรัม	มิลลิลิตร
1	แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	165	
	โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	190	
	น้ำกลั่น		1,000

ตาราง 13 (ต่อ)

Stock Solution	สารเคมี	กรัม	มิลลิลิตร
2	แมกเนเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	37	
	แมงกานีสซัลเฟต ($MnSo_4 \cdot H_2O$)	1.690	
	ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.860	
	คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.0025	
	น้ำกลั่น		1,000
3	แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	44	
	โพแตสเซียมไอโอไดด์ (KI)	0.083	
	โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.0025	
	น้ำกลั่น		1,000
4	โพแตสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟา (KH_2PO_4)	17	
	กรดบริค (H_3BO_3)	0.620	
	โซเดียมโมลิบเดท ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.025	
	น้ำกลั่น		1,000
5	เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSo_4 \cdot 7H_2O$)	2.784	
	ไดโซเดียมอีดีทีเอ (Na_2EDTA)	2.724	
	น้ำกลั่น		1,000
6	อินโนซิทอล (inositol)	2.0	
	กรดนิโคทินิค (nicotinic acid)	0.01	
	ไพริดอกซิน (pyridoxin HCl)	0.01	
	ไทเอมิน (thiamine HCl)	0.002	
	ไกลซีน (glycine)	0.04	
	ซูโครส	30	
	น้ำกลั่น		100

2. เตรียมสารเร่งการเจริญเติบโตความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้

2.1 NAA 0.01 กรัม

H_2O (distill) 100 มิลลิกรัม

2.2 BA 0.01 กรัม

H_2O (distill) 100 มิลลิกรัม

3. การเตรียมอาหารสูตร MS ดัดแปลง ปริมาณ 1 ลิตร มีขั้นตอนดังนี้

3.1 ชั่งน้ำตาลซูโครส 30 กรัม

3.2 เติม Stock ที่ 1 10 มิลลิกรัม

3.3 เติม Stock ที่ 2 10 มิลลิกรัม

3.4 เติม Stock ที่ 3 10 มิลลิกรัม

3.5 เติม Stock ที่ 4 10 มิลลิกรัม

3.6 เติม Stock ที่ 5 10 มิลลิกรัม

3.7 เติม Stock ที่ 6 5 มิลลิกรัม

3.8 เติมสารเร่งการเจริญเติบโต คือ

- NAA 10 มิลลิลิตร

- BA 10 มิลลิลิตร

3.9 เมื่อเตรียมอาหารเหลวเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมอาหารแข็งเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3.10 ปรับ pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl

3.11 น้ำวุ้น 8 กรัม กับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย นำสารละลายที่ปรับ pH แล้ว 500 มิลลิลิตร ผสมกับวุ้นที่หลอมแล้วคนให้เข้ากัน เป็นการเตรียมอาหารแข็ง 1 ลิตร

3.12 บรรจุอาหารลงในขวด ปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ตาราง 14 น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชุดที่ \ pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
1	0.50	1.45	1.61	3.59	2.43	0.88	0.57	0.44	0.34
2	0.39	0.99	1.90	2.67	1.74	1.39	0.95	0.94	0.78
3	0.76	1.51	1.46	2.72	1.98	1.11	1.61	0.62	0.74
4	0.53	2.50	2.22	2.35	1.47	1.14	1.42	0.57	0.67
5	0.39	0.39	2.07	2.25	2.16	1.43	0.89	0.58	0.51
6	0.68	0.54	1.93	2.53	2.57	0.86	0.92	0.74	0.32
7	0.87	0.84	2.17	2.51	1.82	1.20	0.74	0.66	0.41
8	0.72	1.67	1.74	2.13	2.98	1.15	0.97	0.64	0.34
9	0.56	1.07	2.85	2.89	1.49	0.97	0.73	0.60	0.50
10	0.92	1.22	2.48	2.80	1.44	0.98	0.62	0.96	0.23
น้ำหนักเฉลี่ย	0.63	1.21	2.04	2.64	2.00	1.11	0.94	0.67	0.48

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ของอาหารในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	$\bar{X}_9$	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_8$	$\bar{X}_7$	$\bar{X}_6$	$\bar{X}_2$	$\bar{X}_5$	$\bar{X}_3$	$\bar{X}_4$
	0.48	0.63	0.67	0.94	1.11	1.21	2.00	2.04	2.64
$\bar{X}_9$ 0.48	-	0.15	0.19	0.46**	0.63**	0.73**	1.52**	1.56**	2.16**
$\bar{X}_1$ 0.63		-	0.04	0.31	0.48**	0.58**	1.37**	1.41**	2.01**
$\bar{X}_8$ 0.67			-	0.27	0.44*	0.54**	1.33**	1.37**	1.97**
$\bar{X}_7$ 0.94				-	0.17	0.27	1.06**	1.10**	1.70**
$\bar{X}_6$ 1.11					-	0.10	0.89**	0.93**	1.53**
$\bar{X}_2$ 1.21						-	0.79**	0.83**	1.43**
$\bar{X}_5$ 2.00							-	0.04	0.64**
$\bar{X}_3$ 2.04								-	0.60**
$\bar{X}_4$ 2.64									-

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

**มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01

$\bar{X}_1$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 4.0

$\bar{X}_2$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 4.5

$\bar{X}_3$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 5.0

$\bar{X}_4$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 5.5

$\bar{X}_5$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 6.0

$\bar{X}_6$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 6.5

$\bar{X}_7$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 7.0

$\bar{X}_8$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 7.5

$\bar{X}_9$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่ปรับ pH 8.0

ตาราง 16 ค่า W ประกอบการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่ปรับ pH ในระดับต่าง ๆ

$$W_r = qr\alpha : r\gamma \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

	นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 (α.05)	นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 (α.01)
W_2	0.3192	0.4229
W_3	0.3363	0.4400
W_4	0.3477	0.4537
W_5	0.3558	0.4628
W_6	0.3625	0.4685
W_7	0.3570	0.4753
W_8	0.3716	0.4799
W_9	0.3750	0.4845

ตาราง 17 น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่เพาะเลี้ยงในระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และสภาพของแสง แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์

pH	สภาพของอาหาร	สภาพของแสง	ข ว ด ที่										Treatment total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
a_1 5.0	b_1	c_1	1.65	1.46	2.31	1.83	2.07	1.94	2.15	1.74	2.75	2.48	20.38
		c_2	1.61	1.11	1.46	1.23	1.93	1.17	1.94	1.35	1.48	2.04	15.32
	b_2	c_1	0.88	0.90	0.53	0.45	0.92	0.89	0.72	0.67	0.82	0.95	7.73
		c_2	0.68	0.54	0.43	0.42	0.67	0.87	0.92	0.49	0.72	0.69	6.43
a_2 5.2	b_1	c_1	2.19	1.84	2.23	2.01	1.45	2.61	2.20	1.76	1.92	2.58	20.79
		c_2	1.34	2.53	1.47	1.58	1.51	1.25	1.99	1.93	2.40	2.42	18.42
	b_2	c_1	0.83	0.80	0.36	0.61	0.56	0.89	1.49	0.47	1.11	0.74	7.86
		c_2	0.47	0.52	0.45	0.79	0.67	0.41	0.66	0.48	0.81	0.68	5.94
a_3 5.4	b_1	c_1	1.89	1.63	1.54	2.45	2.25	2.14	1.62	2.54	1.64	1.83	19.53
		c_2	1.79	1.92	1.51	2.25	1.50	1.90	1.63	2.16	1.96	2.03	18.65
	b_2	c_1	1.70	0.86	0.87	0.62	0.99	1.37	0.71	1.62	1.38	2.14	12.26
		c_2	0.98	1.37	1.37	1.42	1.40	1.12	1.67	1.83	1.43	1.39	13.98
a_4 5.6	b_1	c_1	2.65	2.48	2.95	2.62	3.13	3.19	2.93	3.11	3.28	2.86	29.20
		c_2	2.66	2.36	2.13	2.61	2.14	2.42	2.20	2.33	2.83	2.06	23.74
	b_2	c_1	1.32	1.67	0.89	0.54	0.51	0.49	1.23	0.87	1.16	1.15	9.83
		c_2	0.37	0.29	0.32	0.47	0.73	0.39	0.33	0.82	0.64	0.75	5.11
a_5 5.8	b_1	c_1	2.91	2.63	2.59	2.37	2.49	2.45	2.18	2.64	2.93	2.87	26.06
		c_2	2.43	1.64	2.00	2.45	2.32	2.27	1.99	2.11	2.04	2.00	21.25
	b_2	c_1	1.46	0.81	1.40	0.89	1.73	1.46	0.95	1.45	0.83	1.95	12.93
		c_2	1.67	1.39	1.44	1.34	1.77	0.88	0.97	1.50	1.50	1.23	13.69
a_6 6.0	b_1	c_1	2.43	1.73	1.98	1.47	2.16	2.57	2.17	1.97	1.89	2.04	20.41
		c_2	2.23	1.64	1.76	1.93	1.29	1.41	1.70	2.40	1.91	1.66	17.93
	b_2	c_1	1.12	1.27	0.39	0.79	1.33	0.73	0.58	0.59	1.35	1.21	9.36
		c_2	0.42	0.37	0.48	0.55	0.94	0.56	0.71	0.76	0.92	0.81	6.52
Total			37.68	33.76	32.86	33.69	36.46	35.38	35.64	37.59	39.70	40.56	363.32

ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบอิทธิพลร่วมของน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเมื่อมีระดับ pH ของอาหาร สภาพของอาหาร และสภาพของแสง ที่แตกต่างกัน

Source of Variation	SS	df	MS	F
AB A at b_1	11.166	5	2.23	22.30**
A at b_2	9.31	5	1.86	18.60**
B at a_1	11.599	1	11.599	115.99**
B at a_2	16.142	1	16.142	161.42**
B at a_3	3.564	1	3.564	35.64**
B at a_4	36.10	1	36.10	361.00**
B at a_5	10.70	1	10.70	107.00**
B at a_6	12.61	1	12.61	126.10**
BC B at c_1	48.64	1	48.64	486.40**
B at c_2	33.75	1	33.75	337.50**
C at b_1	3.69	1	3.69	36.90**
C at b_2	0.57	1	0.57	5.70**
AC A at c_1	6.32	5	1.26	12.60**
A at c_2	1.75	5	1.35	13.50**
C at a_1	1.01	1	1.01	10.10**
C at a_2	0.46	1	0.46	4.60*
C at a_3	0.59	1	0.59	5.90*
C at a_4	2.59	1	2.59	25.90**
C at a_5	0.41	1	0.41	4.10*
C at a_6	0.70	1	0.70	7.0**
Within cell	21.684	216	0.10	

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

**มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01

$F_{.05\ (1,216)} = 3.84$ $F_{.01\ (1,216)} = 6.61$

$F_{.05\ (5,216)} = 2.21$ $F_{.01\ (5,216)} = 3.02$

A ระดับ pH ของอาหาร

a_1 5.0

a_2 5.2

a_3 5.4

a_4 5.6

a_5 5.8

a_6 6.0

B สภาพของอาหาร

b_1 อาหารแข็ง

b_2 อาหารเหลว

C สภาพของแสง

c_1 มีแสง

c_2 ที่มืด

ตาราง 19 น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ขวดที่	น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)							
	0	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0	10.5
1	0.05	1.65	2.58	2.21	2.19	1.86	1.87	1.70
2	0.10	1.77	2.45	2.87	2.71	2.40	1.84	2.05
3	0.05	1.63	2.78	2.87	2.74	1.91	2.56	2.28
4	0.11	1.57	2.70	2.84	2.74	2.53	2.54	1.14
5	0.08	1.19	3.46	2.91	1.96	1.89	1.81	1.53
6	0.12	1.48	2.91	2.53	2.36	2.00	1.97	1.96
7	0.10	1.27	2.86	2.26	2.31	2.07	1.76	1.67
8	0.11	1.59	3.20	2.55	2.42	2.66	1.53	2.13
9	0.12	1.22	3.25	2.63	2.11	1.86	2.22	1.59
10	0.05	1.34	2.98	2.86	2.07	2.33	2.30	2.23
น้ำหนักสดเฉลี่ย	0.08	1.47	2.91	2.65	2.36	2.15	2.04	1.82

ตาราง 20 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ ของน้ำหนักสดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{X}_8$	$\bar{X}_7$	$\bar{X}_6$	$\bar{X}_5$	$\bar{X}_4$	$\bar{X}_3$
	0.08	1.47	1.82	2.04	2.15	2.36	2.65	2.91
$\bar{X}_1$ 0.08	-	1.39**	1.74**	1.96**	2.07**	2.28**	2.57**	2.83**
$\bar{X}_2$ 1.47		-	0.35**	0.57**	0.68**	0.89**	1.18**	1.44**
$\bar{X}_8$ 1.82			-	0.22	0.33**	0.54**	0.83**	1.09**
$\bar{X}_7$ 2.04				-	0.11	0.32*	0.61**	0.87**
$\bar{X}_6$ 2.15					-	0.21	0.50**	0.76**
$\bar{X}_5$ 2.36						-	0.29*	0.55**
$\bar{X}_4$ 2.65							-	0.26
$\bar{X}_3$ 2.91								-

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

**มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01

$\bar{X}_1$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 0 เปอร์เซ็นต์

$\bar{X}_2$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 1.5 เปอร์เซ็นต์

$\bar{X}_3$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 3.0 เปอร์เซ็นต์

$\bar{X}_4$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 4.5 เปอร์เซ็นต์

$\bar{X}_5$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 6.0 เปอร์เซ็นต์

$\bar{X}_6$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 7.5 เปอร์เซ็นต์

$\bar{X}_7$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 9.0 เปอร์เซ็นต์

$\bar{X}_8$ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากอาหารที่มีน้ำตาล 10.5 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 21 ค่า W ประกอบการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแคลสัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

$$W_r = q_{r\alpha} \quad r_\gamma \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

	นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 (α.05)	นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 (α.01)
W_2	0.2365	0.3143
W_3	0.2491	0.3277
W_4	0.2574	0.3369
W_5	0.2625	0.3444
W_6	0.2675	0.3486
W_7	0.2708	0.3536
W_8	0.2742	0.3569