

การขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
PROPAGATION OF DISEASE-FREE HONEY MURCOTT
(*Citrus reticulata* Blanco.) BY TISSUE CULTURE
TECHNIQUE



นางสาววรุณดร เอี่ยมไพบุณย์
MISS VARUNDAT EAMPAIBOON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2541

ISBN 974-622-110-8

เลขที่.....
เลขทะเบียน.....31007
วัน, เดือน, ปี.....๒๕ ๘ ๐.๕ 2541

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PROPAGATION OF DISEASE-FREE HONEY MURCOTT
(*Citrus reticulata* Blanco.) BY TISSUE CULTURE
TECHNIQUE**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

1998

ISBN 974-622-110-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในห้องสมุดเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การขยายพันธุ์สัมพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
นักศึกษา	นางสาววรรุณรรช เอี่ยมไพบูลย์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม
ระดับการศึกษา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.	2541

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์สัมพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการเพาะเมล็ด สัมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ Murashige & Skoog (MS , 1962) และสูตรดัดแปลง MS (MS1) พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS1 ให้อัตราการงอกสูงกว่าสูตร MS แต่ให้ การเจริญเติบโตของต้นกล้าต่ำกว่าสูตร MS จากนั้นตัดตาข้างและข้อจากต้นกล้าที่มีอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ เบนซิลอะดีนีน (BA) 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการชักนำยอดให้ เกิดรากทำโดยตัดยอดเดี่ยวๆ ยาวประมาณ 2.0 เซนติเมตร จากต้นกล้าที่มีอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของแนฟทาลีนแอซิดิกแอซิด (NAA) 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงตาข้างและปล้อง อายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยได้สูงที่สุด เท่ากับ 23.33 และ 20.00 ยอดตามลำดับ ส่วนยอดเดี่ยวๆ อายุ 6 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยได้สูง ที่สุด เท่ากับ 32.50 ราก จากนั้นได้นำวิธีการต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อมาช่วยทำให้สัม ปลอดโรคอีกวิธีหนึ่ง ทำโดยการตัดปลายยอดสัมพันธุ์น้ำผึ้ง ยาวประมาณ 0.1-0.2 มิลลิเมตร มา วางลงในรอยกรีดรูปตัวทีที่หัวกลับบนต้นกล้าของสัมต้นตอพันธุ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์ อายุ 2 สัปดาห์ ที่ ตัดปลายยอดออก และเลี้ยงต้นกล้าสัมที่ต่อปลายยอดแล้วในอาหารสูตรดัดแปลง MS (MS2) ภายหลังการต่อปลายยอดประมาณ 3-5 สัปดาห์ ต้นกล้าที่ต่อปลายยอดสำเร็จจะมีใบคล้อออกมา อย่างน้อย 2-3 ใบ โดย 43.54 เปอร์เซ็นต์สามารถต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อได้เป็นผลสำเร็จ จากนั้น นำต้นที่ต่อปลายยอดสำเร็จย้ายปลูกลงดินในกระถางได้

Thesis Title	Propagation of Disease-Free Honey Murcott (<i>Citrus reticulata</i> Blanco.) by Tissue Culture Technique
Student	Miss Varundat Eampaiboon
Thesis Advisor	Assistant Professor Nauowarat Panyam
Level of Study	Master of Science in Biotechnology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Year	1998

Abstract

Disease-free Honey Murcott (*Citrus reticulata* Blanco.) was propagated by tissue culture technique. Seeds of Honey Murcott were cultured on Murashige & Skoog (MS , 1962) and modified MS (MS1) media. It was found that embryos cultured on MS1 medium gave higher germination rate but lower growth percentage than MS medium. Multiple shoots of excised cotyledonary nodes and internodes of 2 , 4 , 6 , 8 and 10 week-old seedlings were induced on MS medium with 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 and 5.0 mg/l BA. Perfect roots of excised single shoots (approximately 2.0 cm. long) of 2 , 4 , 6 , 8 and 10 week-old seedlings were induced on MS medium with 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 and 1.5 mg/l NAA. After 90 days of culturing , it was found that 0.5 mg/l BA promoted shoot proliferation in 4 week-old of both cotyledonary nodes and internodes , with 23.33 and 20.00 shoots respectively. For root induction , it was observed when 6 week-old single shoots were cultured on MS medium with 1.0 mg/l NAA(32.50 roots.) Shoot tip grafting *in vitro* method was applied in order to obtain disease-free Honey Murcott. Excised shoot tip (0.1-0.2 mm.) was placed in inverted T incision of the decapitated epicotyl 's Carrizo citrange rootstock seedlings (2 week-old). The grafted seedlings were cultured on modified MS medium (MS2). After 3-5 weeks of graftings , grafted seedlings showed at least 2-3 expanded leaves on scion of successful grafts. Frequency of successful grafts under aseptic condition was 43.54% . These grafted plants were successfully established in the soil.

II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จล่วงไปด้วยดี เพราะได้รับความเมตตาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เนาวรัตน์ ปานแย้ม ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่าน และกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. คุณฉวี ชนะบริพัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวพลพรณ ฌ ระนอง และ ดร. สุมะ อรัญนารถ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน และบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่นและรุ่นน้องที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจต่อผู้วิจัยอย่างใกล้ชิดตลอดมา

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือรวมทั้งกำลังใจ ทำให้ผู้วิจัยมีวันแห่งความสำเร็จได้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบอบแด่บิดามารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วรัญชรราช เขียมไพบูลย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	VIII
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.5 ขั้นตอนของการวิจัย.....	2
2. วรรณกรรมและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สัม.....	4
2.1.1 ความสำคัญของสัม.....	4
2.1.2 สาเหตุการทรุดโทรมของสัม.....	5
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	7
2.2.1 ประวัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	7
2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	11
2.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	17
2.2.4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	20
2.2.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	23
2.2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	28
2.2.7 การผลิตพืชปลอดโรค.....	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2.3 การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์ส้ม.....	33
2.4 การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตส้มปลอดโรค.....	37
3. ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	41
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	41
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	43
3.2.1 ศึกษาการออกของกัณพละส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร.....	43
3.2.1.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงกัณพละส้มพันธุ์น้ำผึ้ง.....	43
3.2.1.2 การเตรียมกัณพละส้มพันธุ์น้ำผึ้ง.....	43
3.2.1.3 การถ่ายกัณพละส้มพันธุ์น้ำผึ้งลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	43
3.2.2 ศึกษาการเจริญของต้นกล้าส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร.....	44
3.2.3 การขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	44
3.2.3.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ ตาข้างอายุต่างๆ เกิดยอด.....	44
3.2.3.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ ปล้องอายุต่างๆ เกิดยอด.....	44
3.2.3.3 การศึกษาระดับความเข้มข้นของแนฟทาลีนแอซิดิกแอซิดที่เหมาะสมต่อการ ชักนำให้ยอดอายุต่างๆ เกิดราก.....	44
3.2.4 การต่อปลายยอดส้มพันธุ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ.....	45
3.2.4.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงต้นที่ต่อปลายยอด.....	45
3.2.4.2 การเตรียมต้นคอส้มพันธุ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์.....	45
3.2.4.3 การเตรียมปลายยอดส้มพันธุ์น้ำผึ้ง.....	45
3.2.4.4 ขั้นตอนการต่อปลายยอดส้มพันธุ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ.....	45

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.2.4.5 การดูแลต้นที่ต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อ.....	46
3.2.4.6 การย้ายต้นที่ต่อปลายยอดสำหรับลงปลูกในดิน.....	46
3.2.5 การเก็บรวบรวมผลการวิจัย และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ.....	47
4. ผลการวิจัย.....	48
4.1 ผลการศึกษาการงอกของลัพพะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	
2 สูตร.....	48
4.2 ผลการศึกษาการเจริญของต้นกล้าสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	
2 สูตร.....	49
4.3 ผลการขยายพันธุ์สัมพันธ์น้ำผึ้งปลอดโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	52
4.3.1 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้	
ตาข้างอายุต่างๆ เกิดยอด.....	52
4.3.2 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้	
ปล้องอายุต่างๆ เกิดยอด.....	60
4.3.3 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของแนฟทาลีนแอซิดิกแอซิดที่เหมาะสม	
ต่อการชักนำให้ยอดอายุต่างๆ เกิดราก.....	68
4.4 ผลการต่อปลายยอดสัมพันธ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ.....	76
5. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	80
บรรณานุกรม.....	83
ภาคผนวก.....	89
ภาคผนวก ก อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	90
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	92
ประวัติผู้เขียน.....	93

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1. แสดงจำนวนการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร
ในสปีดต่างๆ.....49
2. แสดงการเจริญเติบโตของต้นกล้าสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร
ในสปีดต่างๆ.....52
3. แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตาข้างของสัมพันธ์น้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บน
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ เมื่อเพาะ
เลี้ยงนาน 90 วัน.....60
4. แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงปล้องของสัมพันธ์น้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บน
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ เมื่อเพาะ
เลี้ยงนาน 90 วัน.....68
5. แสดงจำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดของสัมพันธ์น้ำผึ้งที่มีอายุต่าง ๆ บน
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ เมื่อเพาะ
เลี้ยงนาน 90 วัน.....76
6. แสดงเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการต่อปลายยอดสัมพันธ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ.....79

สารบัญภาพ

หน้า

1. แสดงลักษณะผลของสัมพันธุ์น้ำผึ้ง.....	6
2. แสดงโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวาน.....	8
3. แสดงโรคกรีนนิงของส้มเขียวหวาน.....	9
4. แสดงโรคทริสเทซ่าของส้มเขียวหวาน.....	10
5. แสดงการนำ T-DNA จากทีโอพลาสมิดของแบคทีเรียเข้าไปยังเซลล์พืช.....	14
6. แสดงการเกิดไซมาโคลนอลแวร์ิชั่นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	16
7. แสดงปลายยอดของพืช ประกอบด้วยตายอด และตาข้าง.....	24
8. แสดงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญและเนื้อเยื่อปลายยอด.....	25
9. แสดงการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและละอองเรณู.....	26
10. แสดงการวางปลายยอดในรอยกรีดรูปตัวที่หัวกลับบนต้นต่อส้ม.....	39
11. แสดงการวางปลายยอดในรอยกรีดรูปสามเหลี่ยมบนต้นต่อส้ม.....	39
12. แสดงขั้นตอนการต่อปลายยอดสัมพันธุ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ.....	46
13. แสดงจำนวนการงอกของกัณเฑาะสัมพันธุ์น้ำผึ้งที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร ในสัปดาห์ต่างๆ.....	50
14. แสดงการเจริญเติบโตของกัณเฑาะสัมพันธุ์น้ำผึ้งในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	51
15. แสดงการเจริญของต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร ในสัปดาห์ต่างๆ.....	53
16. แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธุ์น้ำผึ้งอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร ของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิด ยอดจำนวนมาก.....	55
17. แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธุ์น้ำผึ้งอายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร ของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิด ยอดจำนวนมาก.....	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

18. แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์น้ำฝิ่งอายุ 6 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....57
19. แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์น้ำฝิ่งอายุ 8 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....58
20. แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์น้ำฝิ่งอายุ 10 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....59
21. แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตาข้างของสัมพันธ์น้ำฝิ่งที่มีอายุต่างๆ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน.....61
22. แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัมพันธ์น้ำฝิ่งอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....63
23. แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัมพันธ์น้ำฝิ่งอายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....64
24. แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัมพันธ์น้ำฝิ่งอายุ 6 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....65
25. แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัมพันธ์น้ำฝิ่งอายุ 8 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....66

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

26. แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัณฐานน้ำผึ้งอายุ 10 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก.....67
27. แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงปล้องของสัณฐานน้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน.....69
28. แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัณฐานน้ำผึ้งอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก.....71
29. แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัณฐานน้ำผึ้งอายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก.....72
30. แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัณฐานน้ำผึ้งอายุ 6 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก.....73
31. แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัณฐานน้ำผึ้งอายุ 8 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก.....74
32. แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัณฐานน้ำผึ้งอายุ 10 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก.....75
33. แสดงจำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดของสัณฐานน้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน.....77
34. แสดงต้นสัณฐานน้ำผึ้งที่ชักนำให้เกิดราก และย้ายปลูกลงดินในกระถาง.....78
35. แสดงการต่อปลายยอดสัณฐานน้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ.....79

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พืชตระกูลส้มเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของโลก เนื่องจากเป็นผลไม้ที่ให้วิตามินซีและมีรสชาติดี จึงมีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลาย เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย อิสราเอล สเปน ฯลฯ (ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ 2528) ซึ่งในการทำสวนส้มในประเทศไทยนั้น นิยมขยายพันธุ์ส้มด้วยวิธีการตอน เนื่องจากต้นส้มที่ได้จะให้ผลผลิตเร็ว และคงลักษณะพันธุ์เดิม แต่จากกิ่งตอนเหล่านี้มักประสบกับปัญหาการติดเชื้อ และการระบาดของโรคที่เกิดจากการขนย้ายกิ่งตอนที่เป็นโรคจากแหล่งปลูกหนึ่งไปยังอีกแหล่งปลูกหนึ่ง (Knorr และคณะ 1973 ; Schwarz และคณะ 1973 ; Maitree 1990) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีใดใช้กำจัดได้ ยังผลให้ต้นส้มโทรม อายุสั้น และผลผลิตลดลง (อุบล และคณะ 2532 ; อุบล และคณะ 2538)

จากการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อบางชนิดของพืชสามารถทำให้พืชหายจากโรคได้ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหรือมายโคพลาสมา ดังนั้นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับโรค โดยมีการศึกษาพัฒนาในเรื่องการขยายพันธุ์ส้มปลอดโรคเพื่อแก้ปัญหาในเรื่องสวนส้มทรุดโทรมจึงเกิดขึ้น (จารุวรรณ จาติเสถียร 2538) และวิธีผลิตส้มปลอดโรคที่นิยมทำและให้ผลสำเร็จได้วิธีหนึ่งก็คือ วิธีการต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อ (Shoot-Tip Grafting *in vitro* : STG) โดยวิธีนี้สามารถกำจัดโรคไวรัสของส้มได้เกือบทุกชนิด (Murashige และคณะ 1972 , Navarro และคณะ 1975 , Navarro และคณะ 1976 , Roistacher และคณะ 1976) นอกจากนี้ ต้นส้มยังเจริญเติบโต คงลักษณะพันธุ์เดิม และออกดอกออกผลได้ทันทีในเวลาอันรวดเร็ว โดยไม่ต้องผ่านความเขี่ยวร้ายอีกด้วย (Bitter และคณะ 1972)

งานวิจัยในครั้งนี้ จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรค และศึกษาวิธีการต่อปลายยอดของส้มพันธุ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อค้นคว้าหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ

1.2.2 เพื่อศึกษาถึงการผลิตส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่ปลอดโรค โดยวิธีการต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เพื่อสามารถเพาะเลี้ยงส้มพันธุ์น้ำผึ้ง และใช้ปลายยอดเป็นแหล่งผลิตต้นส้มปลอดโรค

1.3.2 เพื่อเพิ่มส้มพันธุ์ที่ปลอดโรคในประเทศไทย

1.3.3 เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการศึกษาเรื่องส้มปลอดโรคต่อไป

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเตรียมต้นกล้าด้วยวิธีเพาะเลี้ยงคัพภะในอาหารเพาะเลี้ยง ทำการทดลองโดยนำตาข้างและปล้องที่มีอายุแตกต่างกัน มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ เพื่อให้ได้ยอดจำนวนมาก นำยอดอายุต่างๆ มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดราก ทำการต่อปลายยอดส้มพันธุ์น้ำผึ้งบนต้นตอของส้มพันธุ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ งานวิจัยนี้ทำ ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี

1.5 ขั้นตอนของการวิจัย

1.5.1 ตรวจสอบเอกสาร เตรียมอุปกรณ์ สารเคมี พันธุ์พืช เพื่อใช้ในการงานวิจัย

1.5.2 วางแผนการวิจัยแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

1.5.3 ทำการเตรียมต้นกล้าส้มพันธุ์น้ำผึ้ง และพันธุ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์

1.5.4 ทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะคิโนน (BA) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ตาข้าง และปล้องของส้มพันธุ์น้ำผึ้งอายุต่างๆ เกิดเป็นยอดจำนวนมาก

1.5.5 ทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของแนฟทาลีนแอซิด (NAA) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ยอดของส้มพันธุ์น้ำผึ้งอายุต่างๆ เกิดราก

1.5.6 ทำการต่อปลายยอดสัมพันธ์น้ำผึ้งบนต้นต่อสัมพันธ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์ ในสภาพ
ปลอดเชื้อ

1.5.7 เก็บรวบรวมผลการวิจัย และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ

1.5.8 สรุปผลการวิจัย



บทที่ 2

วรรณกรรมและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ส้ม

2.1.1 ความสำคัญของส้ม

ส้ม (*Citrus*) อยู่ในตระกูล Rutaceae มี 130 สกุล และ 1,500 ชนิด (เปรมปรี ฌ สงขลา 2532) มีแหล่งกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย คือแถบตะวันตกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย แล้วแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของโลก เช่น แอฟริกา อเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย และรัสเซีย (Chen และคณะ 1990) ส้มยังเป็นแหล่งวิตามินซีที่สำคัญของมนุษย์ โดยในน้ำส้มประกอบไปด้วยกรดแอสคอร์บิกประมาณ 40-60 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 100 กรัม (Kefford และ Chandler 1970) ผลิตภัณฑ์หลักของส้มคือ น้ำส้มและผลส้มสด ผลพลอยได้ที่สำคัญในอุตสาหกรรมส้ม ได้แก่ essential oil , เพกติน , เปลือกส้มแห้ง , ส้มเชื่อม และผลิตภัณฑ์แปรรูปพวกแยมผิวส้ม โดยส้มที่ผลิตได้ทั่วโลกมีมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ของการผลิตผลไม้ตระกูลส้มทั้งหมด (Barlass และ Skene 1986) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหาวิธีเพื่อนำมาใช้ขยายพันธุ์ส้มให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วกันอย่างกว้างขวาง

การปลูกส้มในประเทศไทยมีมานาน และได้ทำกันอย่างแพร่หลาย โดยส้มที่ปลูกกันมากมีอยู่ 4 ชนิด (ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ 2528) ได้แก่

2.1.1.1 พวกส้มหวาน (Sweet orange) ที่ปลูกกันมากคือ ส้มตรา สำหรับส้มเกลี้ยงในปัจจุบันมีปลูก บ้าง แต่ไม่มากนัก

2.1.1.2 พวกส้มเขียวหวาน (Tangerine) โดยที่ปลูกกันมากที่สุดมีเพียงชนิดเดียวคือ ส้มเขียวหวาน ส่วนพวกส้มจีน (Mandarin) เช่น ส้มจู๊ก ส้มแก้ว เคยปลูกกันมาก แต่ปัจจุบันมีน้อย

2.1.1.3 พวกส้มโอ (Pomelo) ยังแยกเป็นพวกย่อยๆ อีกหลายพวก แต่ที่ปลูกกันในบ้านเราคือ ส้มโอไทย (Thailand group) ได้แก่ส้มโอพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบัน

2.1.1.4 พวงมะนาว (Lime) โดยที่นิยมปลูกกันมาก คือ มะนาวไทย เช่น มะนาวหนั่ง มะนาวไข่

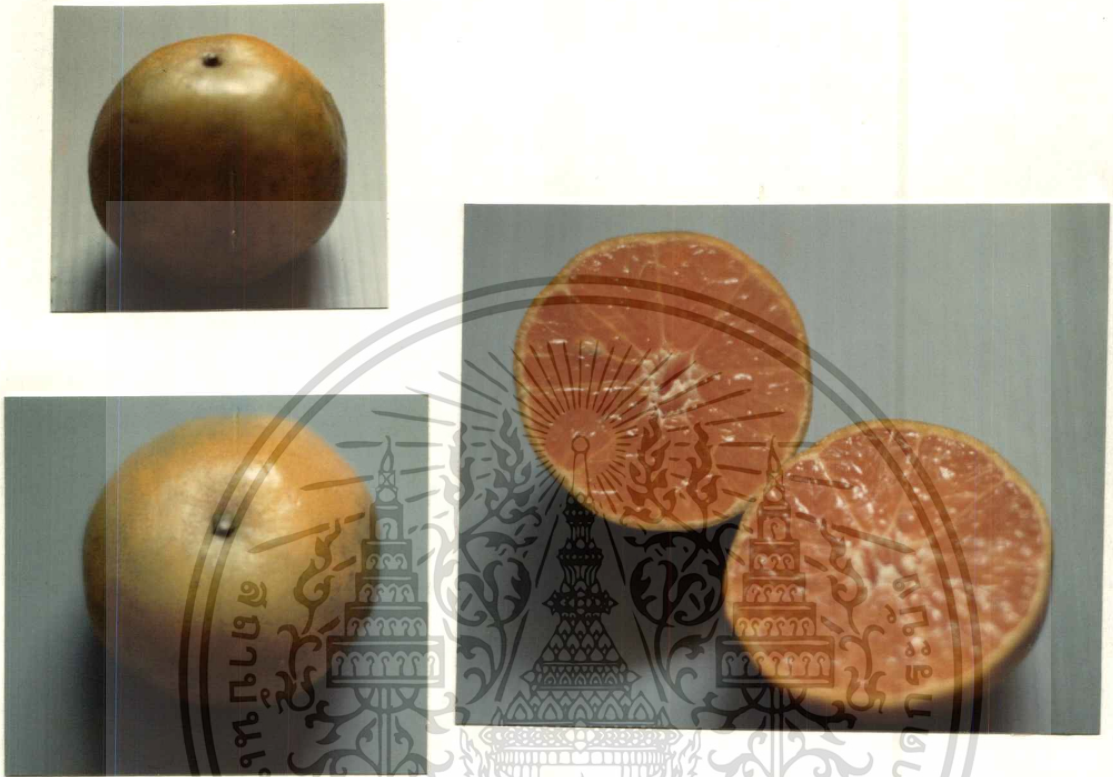
ส้มเขียวหวานจัดเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก ซึ่งหลายจังหวัดในประเทศไทย ปลูกส้มเขียวหวานเป็นอาชีพหลัก เนื่องจากมีความต้องการบริโภคผลส้มเฉลี่ยคนละประมาณ 11 กิโลกรัมต่อปี (Aubert 1989) และเพื่อสนับสนุนการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ซึ่งนับวันยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ปัจจุบันได้มีการนำเข้าส้มพันธุ์ต่างประเทศ เพราะมีรสชาติ และต้านทานต่อโรคได้ดีกว่า โดยส้มพันธุ์น้ำผึ้ง (Honey Murcott) ก็เป็นส้มเขียวหวานพันธุ์ดีพันธุ์หนึ่งที่น่าเข้ามาจากต่างประเทศ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus reticulata* Blanco. (เปรมปรี ฌ สงขลา 2532) เจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและกึ่งร้อน ต้องการอุณหภูมิสูงสำหรับการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และต้องการอุณหภูมิต่ำช่วงระยะเวลาหนึ่งของการเจริญเติบโต เพื่อช่วยให้มีการพักตัวก่อนการสร้างดอกหรือให้ผลมีคุณภาพดีขึ้น เป็นไม้ผลที่มีทรงพุ่มขนาดกลาง มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 4.0-8.0 เมตร ทรงพุ่มแน่นทึบ ใบมีขนาดเล็กบาง ดอกเดี่ยวขนาดเล็กสีขาว ผลรูปทรงกลมค่อนข้างแบน เปลือกผลบริเวณที่ติดกับขั้วจะยังคงสีเขียวอยู่ ผิวเปลือกโดยทั่วไปเป็นสีส้มแก่ มีลักษณะบาง ทำให้ปอกได้ง่าย รสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย กลีบแยกออกจากกันได้ง่าย โดยทั่วไปมีประมาณ 10-11 กลีบ ผนังกลีบบาง มีเส้นใยน้อย นุ่มฉ่ำน้ำและมีเมล็ดน้อย ดังแสดงในภาพที่ 1 (ไชยา อุ้ยสูงเนิน 2531) แต่เนื่องจากอ่อนแอต่อโรค ดังนั้น จึงได้มีการนำมาต่อยอดบนต้นต่อส้มที่แข็งแรง และต้านทานต่อโรคได้ดี

ส้มพันธุ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์ เป็นส้มลูกผสมของส้มเกลี้ยง (Washington navel) และส้มสามใบ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] พันธุ์ส้มที่ปลูกเพื่อทำต้นตอ โดยอยู่ในกลุ่มพันธุ์ส้มที่ปลูกเพื่อทำต้นตอ เนื่องจากทนทานต่อโรครากเน่าโคนเน่าและไส้เดือนฝอยได้ดี (เปรมปรี ฌ สงขลา 2532)

2.1.2 สาเหตุการทรุดโทรมของส้ม

ผู้ปลูกส้มเป็นอาชีพมักประสบปัญหา ส้มแสดงอาการทรุดโทรมหลังจากปลูกเพียง 4-5 ปี หรือหลังจากต้นส้มให้ผลผลิตแล้ว 1-2 ปี ต้นส้มจะทรุดโทรมลงไปเรื่อยๆ ผลผลิตลดลงจนกระทั่งไม่ให้ผลผลิตและตายในที่สุด สวนส้มเขียวหวานโดยเฉลี่ยมีอายุเพียง 8 ปีเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากต้นส้มเป็นโรคนั่นเอง โดยโรคส้มที่สำคัญมี 4 โรคด้วยกัน (อุบล และคณะ 2538) คือ

ภาพที่ 1



แสดงลักษณะผลของส้มพันธุ์น้ำผึ้ง

2.1.2.1 โรคแคงเกอร์ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* โดย การฉีดพ่นสารประกอบทองแดงในช่วงที่ส้มแตกใบอ่อน และฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดหนอนชอน ใบควบคุมไปด้วย จะลดความเสียหายจากโรคนี้ได้

2.1.2.2 โรครากเน่าโคนเน่า เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (ภาพที่ 2) ซึ่ง จะระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน การใช้ต้นตอส้มต้านทานโรคจะช่วยแก้ปัญหาโรคนี้นในระยะยาว

2.1.2.3 โรคกรีนนิ่ง เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย มีเพลี้ยกระโดดส้มเป็นพาหะ (ภาพที่ 3) โดย เชื้อสาเหตุอาศัยอยู่ในท่ออาหารของต้นส้มและติดไปกับส่วนของส้มที่นำไปขายพันธุ์

2.1.2.4 โรคทริสเทซ่า เกิดจากเชื้อไวรัส และมีเพลี้ยอ่อนส้มเป็นพาหะ (Fawcett และ Wallace 1946 ; Dickson และคณะ 1951) ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยเชื้อสาเหตุอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อส้ม จึงระบาดโดยติดไปกับกิ่งพันธุ์ (Kitajima และคณะ 1964)

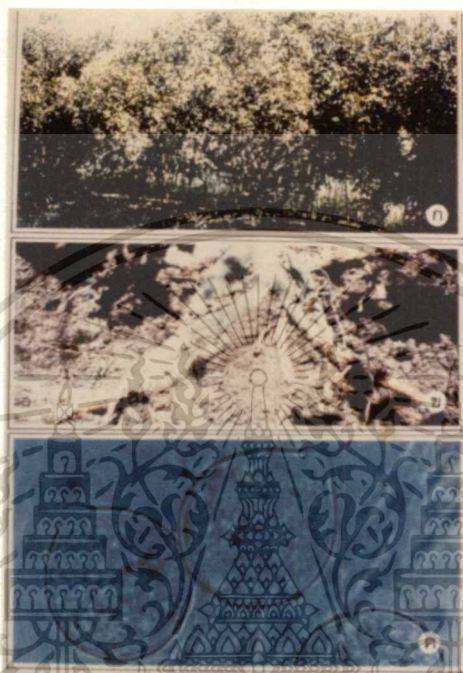
ทั้งนี้ โรคทริสเทซ่า ถือได้ว่าเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของส้ม (McClean 1974) ทำให้เกิดความเสียหายและมีผลกระทบกระเทือนต่อการปลูกส้มทั่วโลก (Costa 1956 ; Knorr 1961) และ จากผลการสำรวจโรคส้ม เมื่อปีพ.ศ. 2533 ฝ่ายวิเคราะห์ข้อมูลส่งเสริมการเกษตร (กรมส่งเสริม การเกษตร 2533) พบว่า โรคกรีนนิ่งและโรคทริสเทซ่าระบาดทำความเสียหายให้แก่สวนส้มโดย ทั่วไปมากที่สุด ซึ่งโรคทั้งสองชนิดนี้ป้องกันและกำจัดได้ยากที่สุด เนื่องจากเชื้อสาเหตุอาศัยอยู่ใน เนื้อเยื่อพืช และปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการรักษา

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.1 ประวัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1902 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Gottlieb Haberlandt ที่ได้ทำการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยง เพื่อจะทำการศึกษาคูสมบัติของเซลล์ แต่เขาพบ ความสำเร็จเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ต่อมาในปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจาก รากของพืชหลายชนิด โดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นอีก 8 ปี สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะและ เอกสารเป็นเอกสารที่ส่งวันไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นานนักเขาได้ไปเขียนงานด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2



แสดงโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวาน

ก. ส้มเขียวหวานที่เป็นโรครากเน่าโคนเน่า

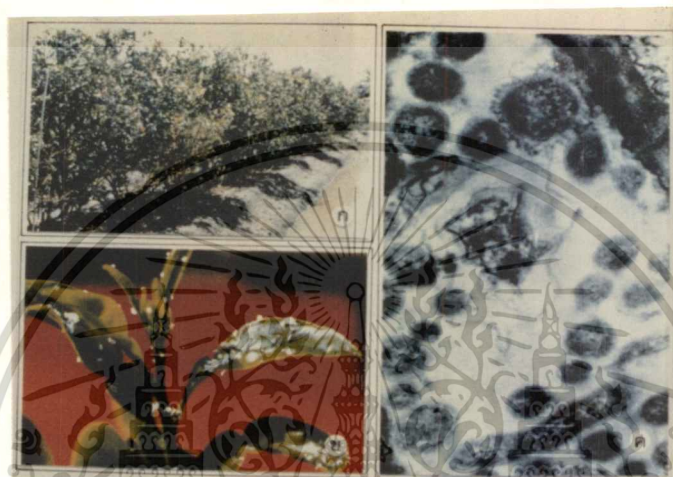
ข. ลักษณะอาการรากเน่าของส้ม

ค. เชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dastur

สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้ม

ที่มา : สัตยชัย และคณะ (2538)

ภาพที่ 3



แสดงโรคกรีนนิ่งของส้มเขียวหวาน

ก. ส้มเขียวหวานที่เป็นโรคกรีนนิ่ง

ข. เพลี้ยกระโดดส้ม (*Diaphorina citri* Kuway)

พาหะโรคกรีนนิ่ง

ค. เชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคกรีนนิ่งของส้ม

ที่มา : สันุชัย และคณะ (2538)

ภาพที่ 4



แสดงโรคทริสเตซ่าของส้มเขียวหวาน

ก. ส้มเขียวหวานที่เป็นโรคทริสเตซ่า

ข. เพลี้ยอ่อนส้ม (*Toxoptera citricidus* Kirk)

พาหะโรคทริสเตซ่า

ค. เชื้อไวรัส สาเหตุโรคทริสเตซ่าของส้ม

ที่มา : สัตยชัย และคณะ (2538)

แคลลัสของพืชได้หลายชนิด และนับตั้งแต่นั้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง มีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆ อีกมากมาย จวบจนกระทั่งถึงปัจจุบัน (ประศาสตร์ เกี่ยมณี 2536)

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจุบันนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทอย่างมากทั้งในด้านอุตสาหกรรม ด้านการแพทย์ และโดยเฉพาะในด้านเกษตรกรรม ซึ่งมีประโยชน์(ประศาสตร์ เกี่ยมณี 2536; สิริบุษ ลามศรีจันทร์ 2536) ดังนี้

2.2.2.1 เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชที่โดยการเพาะเมล็ด การปักชำ การตอน การติดตา การทาบกิ่ง ราก ไหล ลำต้น ฯลฯ การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ โดยอาศัยอาหารสูตรที่เพิ่มจำนวนต้น ก็ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนพืชได้อย่างรวดเร็ว

2.2.2.2 เพื่อการผลิตพืชที่ปลอดโรคและการแลกเปลี่ยนกิ่งพันธุ์ระหว่างประเทศ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ช่วยในกำจัดโรคและแมลงได้ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงจะต้องมีการกำจัดโรคที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชด้วยการฆ่าเชื้อที่ผิว หรือใช้ความร้อน และการเพาะเลี้ยงส่วนของพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถช่วยในการกำจัดเชื้อโรคที่ติดมากับชิ้นส่วนของพืช ทำให้สามารถส่งพืชข้ามประเทศได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อพืช เช่น มันฝรั่ง อ้อย เป็นต้น

2.2.2.3 เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่

2.2.2.3.1 การเชื่อมโปรโทพลาสต์เข้าด้วยกัน

เทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโทพลาสต์ และเชื่อมโปรโทพลาสต์เข้าด้วยกัน สามารถช่วยแก้
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปัญหาพืชหลายชนิดที่ผสมกันในธรรมชาติไม่ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างสารเคมี
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในเกสรตัวเมีย ทำให้ละอองเรณูไม่สามารถงอกลงไปถึงรังไข่ได้ หรืออาจเกิดจากความแตกต่างของลักษณะทางกายวิภาคที่เป็นอุปสรรคต่อการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ การเชื่อมโพรโทพลาสต์เข้าด้วยกัน ทำได้โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ออก เหลือแต่โพรโทพลาสต์ใช้สารพีอีจี (PEG) เติมลงในอาหารเหลว หรือใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น ทำให้โพรโทพลาสต์ของเซลล์ต่างชนิดกันมาเชื่อมกันได้ และบังคับให้เซลล์ถูกผสมเกิดเป็นต้นพืชที่มีโครโมโซมจากพ่อและแม่มาอยู่ด้วยกัน โดยไม่ต้องผสมเกสรหรือโดยอาศัยเพศ สามารถสร้างพืชชนิดใหม่ขึ้นมาได้ โดยไม่เคยมีมาก่อนในธรรมชาติ และสามารถทำการผสมข้ามชนิด ข้ามพันธุ์หรือสกุลได้ เช่น การผสมระหว่างทานตะวันกับถั่ว หรือระหว่างมะเขือเทศกับมันฝรั่งเป็นต้น เทคนิคการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์และบังคับให้พัฒนาเป็นต้นพืชได้ มีความสำคัญยิ่งต่อการนำไปใช้ในการสร้างพืชโดยวิธีพันธุวิศวกรรม

2.2.2.3.2 การสร้างพืชโครโมโซมเดียว

การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู ไมโครสปอร์ รังไข่หรือไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของพืช ช่วยให้ได้พืชที่มีโครโมโซมชุดเดียวได้ เมื่อนำมาเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็น 2 ชุดแล้ว จะได้พันธุ์แท้ในทันที เนื่องจากโครโมโซมทั้งสองจำลองมาจากชุดเดียวกัน โดยปกติการได้พันธุ์แท้เช่นนี้ต้องอาศัยการผสมตัวเองเป็นเวลา 6-7 ครั้ง ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและไมโครสปอร์ ทำให้ได้พันธุ์พืชออกมาเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศจีนได้ใช้เทคนิคดังกล่าวผลิตพันธุ์พืชใหม่จากพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวสาลี ยางพารา แอปเปิ้ล เป็นต้น บริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ของสหรัฐอเมริกาได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของข้าวโพดมาใช้ในการสร้างสายพันธุ์แท้ของข้าวโพดขึ้นมา เพื่อใช้ผลิตลูกผสม นอกจากนี้ยังใช้เป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับการสร้างพันธุ์พืชชนิดใหม่โดยวิธีพันธุวิศวกรรม

2.2.2.3.3 การสร้างพืชทรานส์เจนิค

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ แคลลัส และโพรโทพลาสต์เป็นเทคนิคที่มีส่วนช่วยอย่างมากในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม พืชพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากวิธีการทางพันธุวิศวกรรมมีชื่อเรียกว่า “พืชทรานส์เจนิค”(Transgenic Plant) โดยพันธุวิศวกรรม หมายถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงด้านสารพันธุกรรม เพื่อให้ได้สิ่งมีชีวิตใหม่ ซึ่งมีคุณสมบัติตามที่ประสงค์ โดยการนำจีน(Gene)ที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปสู่อีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งโดยไม่จำกัดว่าต้องเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทเดียวกัน เมื่อจีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิตใหม่แล้ว จีนยังคงสามารถแสดงลักษณะที่ตนเองควบคุมอยู่

วิธีการทางพันธุวิศวกรรมประกอบด้วย การแยกจีโนมหรือสร้างจีโนมที่ต้องการขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงนำจีโนมที่ต้องการเข้าสู่พืชด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

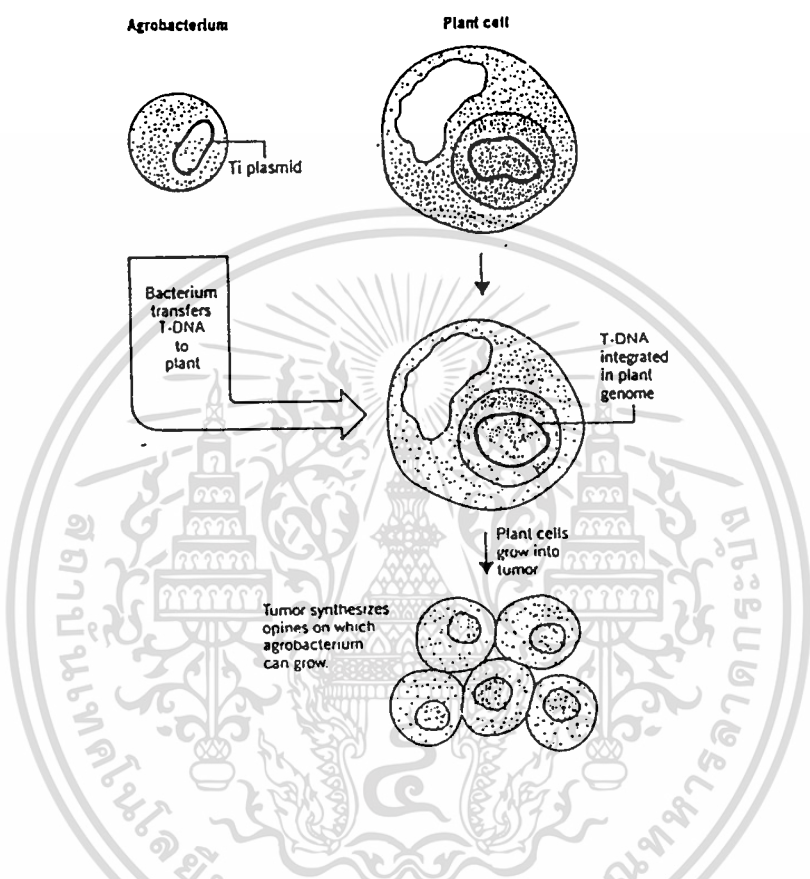
- การตัดต่อจีโนมเข้ากับดีเอ็นเอ (DNA) ของพาหะ โดยพาหะที่ใช้ในพันธุวิศวกรรมของพืชจะเป็นพวกไวรัส หรือที่โอพลาสมิด (Ti-Plasmid) ของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ในการใช้ที่โอพลาสมิด อาศัยคุณสมบัติที่แบคทีเรียชนิดนี้เมื่อสัมผัสกับเซลล์ของพืชใบเลี้ยงคู่ส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียจะปลดปล่อยทีดีเอ็นเอ (T-DNA) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของที่โอพลาสมิด เข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชและอยู่อย่างถาวร ทำให้เซลล์พืชสร้างไฟโตฮอร์โมน (Phytohormones) และพัฒนาเป็นก้อนเนื้องอกขึ้นมา ในการนำเอาที่โอพลาสมิดมาใช้ ได้กำจัดจีโนมที่สร้างไฟโตฮอร์โมนออก หรือกำจัดจีโนมที่สร้างเนื้องอกออกนั่นเอง เรียกว่า “ดิซาม” (Disarm) ซึ่งสามารถนำเอาที่โอพลาสมิดมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ภาพที่ 5)
- การใช้ไมโครอินเจกชัน (Microinjection) โดยใช้ไมโครปิเปตต์นำจีโนมเข้าไปยังนิวเคลียสของเซลล์โดยตรง
- วิธีอิเล็กโตรโพรเซชัน (Electroporation) หรือการใช้กระแสไฟฟ้าสูงในระยะเวลาสั้น กระตุ้นให้เซลล์รับเอาดีเอ็นเอ หรือจีโนมเข้าไปในตัวเองได้
- การใช้ปืนกัน (Gene Gun) เป็นปืนสำหรับยิงจีโนมเข้าสู่เซลล์พืชได้โดยตรง ประกอบด้วยการนำพลาสมิด (Plasmid) ที่สอดใส่จีโนมที่ต้องการรวมทั้งโปรโมเตอร์สำหรับควบคุมการทำงานของยีนไว้เรียบร้อยแล้ว นำมาหุ้มด้วยอนุภาคทองคำหรือทอง และยิงเข้าไปยังเซลล์เพาะเลี้ยงหรืออาจเป็นเนื้อเยื่อของพืชโดยตรง พลาสมิดที่มีจีโนมที่ต้องการจะเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืช สามารถทำงานโดยการสร้างเอนไซม์หรือแสดงลักษณะต่างๆ ออกมาได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของจีโนมที่สอดใส่เข้าไป

2.2.2.3.4 การได้ลักษณะที่เป็นประโยชน์จากการแปรผันทางพันธุกรรม เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงในลักษณะที่เป็นแคลลัสหรือในลักษณะที่เป็นเซลล์แขวนลอยมาก่อน เมื่อนำมาเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นพืช พบว่าพืชที่เกิดใหม่มีสลักษณะแตกต่างไปจากเดิม การแปรผันที่เกิดในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหรือในพืชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง เรียกว่า “โซมาติกโคลนอลแวริเอชัน” (Somaclonal Variation) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Genetic) หรือไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Epigenetic) ก็ได้ โดยพวกที่

ไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม คือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นไม่ถาวร เป็นการชั่วคราว ไม่ถ่ายทอดถึงรุ่นลูกอีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5



แสดงการนำที-ดีเอ็นเอจากทีโอพลาสมิดของแบคทีเรียเข้าไปยังเซลล์พืช
ที่มา : สิริनुช ลามศรีจันทร์ (2536)

แปรผันที่เกิดจากการปรับตัวของเซลล์หรือการคัดแปลงขององค์ประกอบของเซลล์ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอ การแปรผันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงของลักษณะที่ควบคุมทั้งคุณภาพและปริมาณ หรือเป็นได้ทั้งโฮโมไซกัสและเฮเทโรไซกัส การเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดขึ้นได้ในเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง หรือในต้นพืชต้นใดต้นหนึ่ง หรืออาจเกิดกับพืชหลายๆ ต้นพร้อมกันได้ การแปรผันทางพันธุกรรมอาจเป็นความแตกต่างของลักษณะทางสรีระ เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในจำนวนโครโมโซม หรือการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโครโมโซมก็ได้ มีความถี่ของการเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างซิสเตอร์โครมาติด (Sister Chromatid Exchange) เข้าเกี่ยวข้องก็ได้ หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบของดีเอ็นเอเป็นการเปลี่ยนแปลงของจีน หรืออาจเป็นการเปลี่ยนแปลงของไซโตพลาสซึมก็ได้ (Cytoplasmic Change)

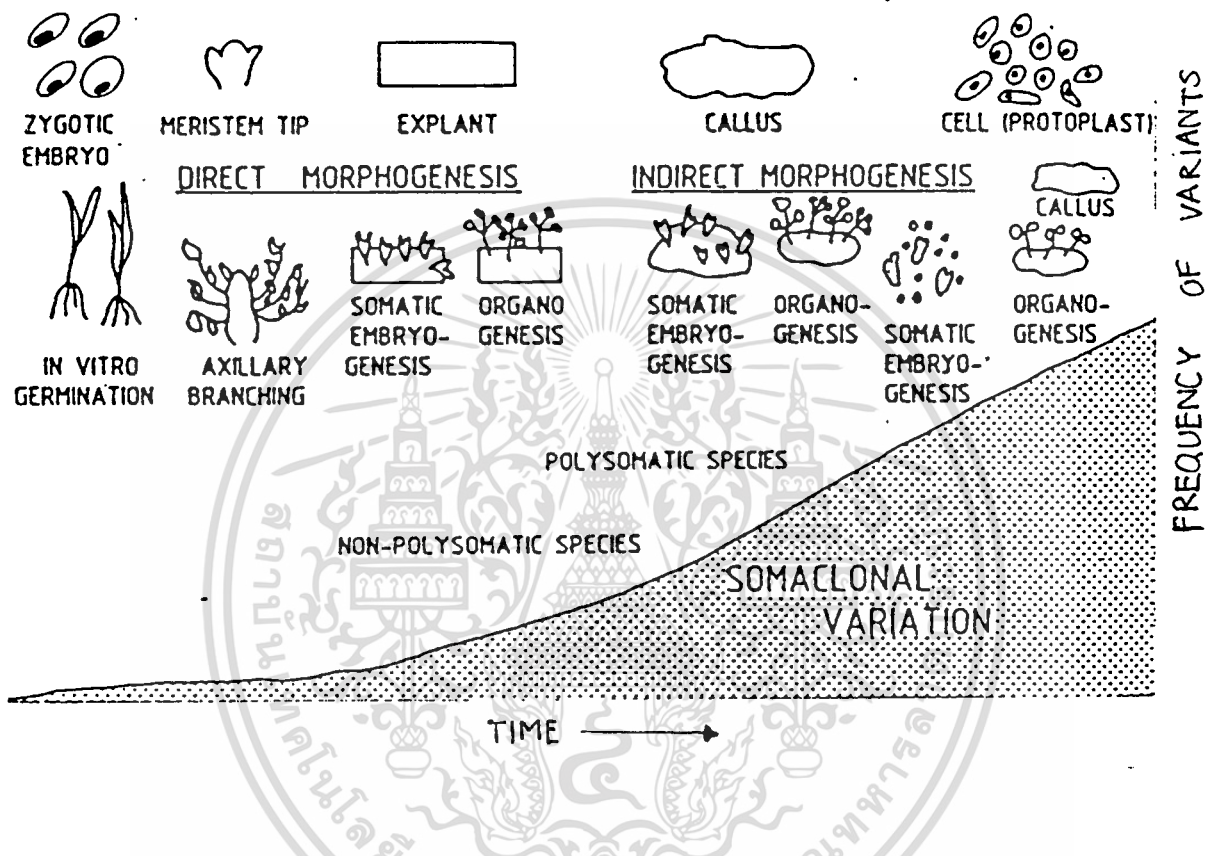
วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีส่วนในการทำให้เกิดไซมาโคลนอลแวลวเรชัน โดยการเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง มีการเกิดได้มากขึ้นขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายและไซโกติกเอ็มบริโอ (Zygotic Embryo) เพื่อให้เกิดเป็นส่วนของต้นพืช โดยไม่ผ่านสภาพเป็นแคลลัสมาก่อน มีโอกาสของการเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมได้น้อย แต่ถ้าวการเพาะเลี้ยงโดยผ่านแคลลัส หรือผ่านสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย หรือการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ ทำให้ต้นพืชที่เกิดมา มีการแปรผันทางพันธุกรรมสูง ยิ่งเวลาที่ใช้เลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงจนถึงระยะเวลาที่ได้ต้นพืชยังใช้เวลานาน ยังมีโอกาสทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมสูงขึ้น (ภาพที่ 6)

การแปรผันที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงมีแหล่งที่มา 3 แหล่ง คือ การแปรผันทางพันธุกรรมเกิดอยู่แล้วในเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง การแปรผันทางพันธุกรรม เกิดจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีคุณสมบัติเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์ และการแปรผันเกิดจากการตอบสนองของจีโนมพืชต่อความเครียด (Stress) ต่างๆ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดในสภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.2.2.4 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน เราสามารถชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่างๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช เป็นต้น

2.2.2.5 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อม เช่นการคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น โดยทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 6



แสดงการเกิดโซมาโคลนอลแวริเอชันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ที่มา : Novak (1990)

2.2.2.6 เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช โดยเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชเหล่านั้นในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้มากขึ้น

2.2.2.7 เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองสามารถที่จะติดตามการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและอย่างใกล้ชิด เช่นการศึกษาคาบตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการควบคุมตัวแปรต่างๆ ในหลอดทดลองกระทำได้ง่ายกว่าในแปลงทดลอง

2.2.2.8 เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช ทุกวันนี้พืชพรรณหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง ด้วยเหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเติบโตบางชนิด หรือมีสารที่ทำให้เกิดความเครียดของน้ำขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามาก ๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อบ่อยๆ จนกว่าเมื่อใดที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อ ก็ย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ อีกวิธีหนึ่งคือการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในสภาพเช่นนี้เซลล์และเนื้อเยื่อจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

ถึงแม้ว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีประโยชน์มากมาย แต่ต้องอาศัยผู้ชำนาญในการทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยต้นพืชที่ได้มีขนาดค่อนข้างเล็ก อาจทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดน้อยเมื่อนำพืชลงปลูก นอกจากนี้การดูแลรักษาต้นพืช ค่อนข้างยุ่งยาก

2.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไปประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน ซึ่งเป็นสารประกอบพวกอนินทรีย์ และพวกอินทรีย์ นอกจากนี้ยังอาจมีส่วนประกอบอื่นๆ ที่ใส่ลงในอาหารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้ประสบความสำเร็จ (ประศาสตร์ เกื้อมณี 2536) ดังนี้

2.2.3.1 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ ประกอบด้วยธาตุต่างๆ ดังนี้

2.2.3.1.1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม กำมะถัน แคลเซียม แมกนีเซียม

2.2.3.1.2 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก คลอรีน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โบรอน และโมลิบดีนัม

2.2.3.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์

2.2.3.2.1 พวกวิตามิน มีหน้าที่ในการช่วยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ ดำเนินไปได้ด้วยดี วิตามินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ไทอามีน นิโคตินิกแอซิด ไพริดอกซิน อินซิทอล แอสคอร์บิกแอซิด เป็นต้น

2.2.3.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (นพดล จรัสสมุทร 2537) ได้แก่

2.2.3.2.2.1 สารพวกออกซิน เช่น อินโดลแอซิดิกแอซิด อินโดล-บิวทริกแอซิด แนฟเทอีนแอซิดิกแอซิด และ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีแอซิดิกแอซิด เป็นต้น โดยทำให้เนื้อเยื่อขยายตัวเพิ่มขึ้น ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นราก และช่วยชักนำให้เกิดอเอ็มบริโอเจเนซิส (Embryogenesis)

2.2.3.2.2.2 สารพวกไซโตไคนิน เช่น เบนซิลอะดีนีน ไคเนติน ซิติน ไอโซเพนทิลอะดีนีน เป็นต้น โดยทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ชักนำให้เกิดยอด ช่วยยับยั้งการเกิดราก และการแก่ชรา

2.2.3.2.2.3 จิบเบอเรลลิน ตัวที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ จิบเบอเรลลิกแอซิด (GA_3) โดยทำให้ข้อปล้องยืดยาวและออกรากข้างล่าง ช่วยหยุดการพักตัวของ กัณหา ช่วยชักนำให้เกิดกระบวนการออกดอก นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเกิดยอดและการเกิด แคลลัสได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2.2.4 สารยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น แอบซิสสิกแอซิด โดยทำให้เกิดการพักตัวของตาและเมสส์พีช และบางครั้งช่วยกระตุ้นให้เกิดแคลลัสและเอ็มบริโอเจเนซิส

2.2.3.2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ สารประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส ซัคคาโรส และแมนนิทอล เป็นต้น

2.2.3.2.4 พวกกรดอะมิโน ได้แก่ กลูตามีน แอสพาราจีน อะคิโนน ไกลซีน และเคซีนไฮโดรไลเซส เป็นต้น

2.2.3.2.5 พวกสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำคั้นมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ กล้วยหอมบด สารสกัดจากยีสต์และจากมอลต์ เป็นต้น

2.2.3.3 สารที่ทำให้อาหารแข็งตัว เช่น ผงวุ้น ใช้ประมาณ 0.6-0.8 เปอร์เซ็นต์

2.2.3.4 ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่

2.2.3.4.1 ผงถ่าน ใช้ดูดสารพิษต่างๆ เช่น กรดฟีนอลิก เป็นสารสีน้ำตาลที่เกิดจากบาดแผลของพืช ซึ่งมีผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช และทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีสีดำ ช่วยกระตุ้นให้เกิดรากได้ ในกรณีที่พืชเขามีผลต่อชิ้นส่วน ผงถ่านยังช่วยทำให้พืชในอาหารมีค่าคงที่

2.2.3.4.2 สารกำจัดศัตรูพืช เช่น สารฆ่าเชื้อราและแบคทีเรีย ช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์โดยใส่ขณะฟอกฆ่าเชื้อ หรือใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงก็ได้

2.2.3.4.3 สารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารฟีนอล เช่น แอสคอร์บิกแอซิด และซีตริกแอซิด

ถึงแม้ว่าพืชทุกชนิดจะต้องการธาตุอาหารหลักที่เหมือนกัน แต่จะต้องการในความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจะมีความแตกต่างกันไป ฉะนั้นจึงต้องมีการศึกษาคัดเลือก และพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เหมาะสมกับการเจริญ ไม่ว่าจะเป็นเนื้อเยื่อใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติบโตที่แตกต่างกันของชนิดพืช อายุพืช ขึ้นส่วนพืช และสถานะของอาหาร โดยวัตถุประสงค์ในการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะขึ้นอยู่กับเป้าหมายที่ต้องการของการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ต้องการชักนำให้ขึ้นส่วนเกิดเป็นยอด แคลลัส ราก โชมاتิกอเมบริโอเจเนซิส และการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู เป็นต้น (Roberta 1992)

2.2.4 เทคนิคของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อและขึ้นส่วนของพืชในสภาพปลอดเชื้อ เลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและในสภาพที่พอเหมาะ ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ เซลล์มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ และเป็นต้นพืชขึ้นได้ในที่สุด (สิรินุช ลามศรีจันทร์ 2536)

โดยทั่วไป เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมี 4 ขั้นตอน ดังนี้ (Murashige 1974)

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเริ่มต้น

ก. ขึ้นส่วนเริ่มต้น โดยพิจารณาความแตกต่างของขึ้นส่วน อายุของขึ้นส่วน การปฏิบัติขึ้นส่วนก่อนการเพาะเลี้ยง และเป้าหมายในการเพาะเลี้ยง (Bhojwani และ Razdan 1983)

ข. การฟอกฆ่าเชื้อ เป็นการทำให้ขึ้นส่วนพืชที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์จากในสภาพธรรมชาติ อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยง เพราะเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำให้อาหารเน่าเสียเร็ว และขึ้นส่วนพืชเน่าตายไปด้วย

วิธีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อมีหลายวิธี ได้แก่ การฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) การเผาไฟ แต่ทั่วไปมักใช้สารเคมี เช่น แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ คลอโรกซ์ แอลกอฮอล์ โดยความเข้มข้นและเวลาที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างของขึ้นส่วนเริ่มต้น (ประศาสตร์ เกี่ยมณี 2536)

ค. การเกิดสีน้ำตาลในอาหาร ซึ่งเป็นสารที่ผิวรอยตัดของขึ้นส่วนปล่อยออกมาในอาหาร โดยสารสีน้ำตาลนี้เกิดจากการออกซิเดชันของฟีนอล ทำให้อาหารมีสีน้ำตาลดำและเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช มักพบในอาหารที่เพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็งและกล้วยไม้บางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีที่ใช้ในการลดปริมาณสารประกอบฟีนอลในอาหาร และความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช

(Bhojwani และ Razdan 1983) ได้แก่

- การเพาะเลี้ยงเริ่มต้นในที่มืด เนื่องจากแสงช่วยส่งเสริมการออกซิเดชันของฟีนอล
- การย้ายชิ้นส่วนลงอาหารใหม่ 2-3 ครั้งในช่วงเวลา 2-3 วัน
- การใส่สารแอนติออกซิแดนท์ลงในอาหาร เช่น กรดแอสคอร์บิก (50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร) , กรดซิตริก (150 มิลลิกรัมต่อลิตร)
- การใส่สารพอลิไวนิลไพโรลิโดน (PVP) เพื่อดูดซับสารประกอบฟีนอล

ขั้นตอนที่ 2 การเพิ่มจำนวนยอด เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำโดยเลี้ยงชิ้นส่วนให้เจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนยอดให้มีปริมาณมากในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดได้ 2 แบบ คือ (สิรินุช ลามศรีจันทร์ 2536)

ก. การเจริญของออร์แกไนซ์เซลล์ (Organized Cells) ได้แก่ เซลล์เริ่มต้นที่มีอยู่แล้วในเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย (Meristem Tip) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นส่วนของสมบูรณ์ เช่น เป็นยอด ใบ หรือเป็นราก ในการแยกไซโกติกเอมบริโอ (Zygotic Embryo) มาเลี้ยง และได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ จัดว่าเป็นการเพาะเลี้ยงของพวกออร์แกไนซ์เซลล์

ข. การเจริญของอันออร์แกไนซ์เซลล์ (Unorganized Cells) ได้แก่ การนำส่วนต่างๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยง เซลล์เนื้อเยื่อร่างกายมีการแบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวนเป็นก้อนเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน แคลลัสเกิดได้จากทุกส่วนของพืช เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม โดยแคลลัสจัดเป็นพวกอันออร์แกไนซ์เซลล์ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวกลายเป็นเซลล์แขวนลอย เมื่อนำเอาผนังเซลล์ออกกลายเป็นโปรโทพลาสต์

ขั้นตอนที่ 3 การชักนำให้ยอดเกิดเป็นราก พืชไม้พุ่มเนื้ออ่อนหลายชนิดออกรากได้เอง หลังจากย้ายยอดจากอาหารเดิมลงอาหารใหม่ที่ไม่มีการควบคุมการเจริญเติบโต แต่พืชส่วนใหญ่ต้องย้ายยอดลงอาหารที่ชักนำให้เกิดราก จึงเกิดรากได้ เพื่อให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ (Bhojwani และ Razdan 1983)

เอกสารนี้เป็นการพัฒนาของเซลล์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเพื่อเกิดเป็นต้นพืชมี 2 ประบวนการประกอบ คือ (สิรินุช ลามศรีจันทร์ 2536) ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ออร์แกโนเจเนซิส (Organogenesis) เป็นการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อในทิศทางเดียว (Unipolar) ได้แก่ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก หรือการพัฒนาของเซลล์เป็นส่วนของต้นพืช หรือเป็นส่วนของราก เป็นการพัฒนาที่แยกจากกัน อาจเกิดเฉพาะส่วนของต้นพืช หรืออาจเกิดเฉพาะราก เมื่อได้ส่วนของต้นพืช ต้องนำมาชักนำให้เกิดรากจึงจะได้ต้นพืชที่สมบูรณ์

ข. โซมาติกเอมบริโอเจเนซิส (Somatic Embryogenesis) เป็นกระบวนการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นสองทิศทาง (Bipolar) พร้อมๆกันของโครงสร้างที่คล้ายคลึงเอมบริโอที่เรียกว่า “โซมาติก-เอมบริโอ” (Somatic Embryo) เนื่องจากเกิดจากโซมาติกเซลล์ (Somatic Cell) การเกิดต้นและรากเป็นการพัฒนาพร้อมๆ กัน เมื่อได้ต้นก็จะมีรากเกิดขึ้นด้วย

กระบวนการออร์แกโนเจเนซิสและโซมาติกเอมบริโอเจเนซิสเป็นได้ทั้งชนิดโดยตรงและโดยอ้อม ดังนี้

- โดยตรง

การเกิดออร์แกโนเจเนซิส

ชิ้นส่วนเริ่มต้น → ส่วนของตา → ต้นพืช

การเกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส

ชิ้นส่วนเริ่มต้น → โซมาติกเอมบริโอ → ต้นพืช

- โดยอ้อม

การเกิดออร์แกโนเจเนซิส

ชิ้นส่วนเริ่มต้น → แคลลัส → ยอด → ชักนำเกิดราก → ต้นพืช

การเกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส

ชิ้นส่วนเริ่มต้น → แคลลัส → (เซลล์แขวนลอย) → โซมาติกเอมบริโอ → ต้นพืช

ขั้นตอนที่ 4 การย้ายต้นพืชออกปลูก การผลิตต้นเล็กๆ และย้ายจากสภาพปลอดเชื้อเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ประสบผลสำเร็จ ทำโดยย้ายพืชจากภาชนะเพาะเลี้ยงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ล้างอาหารวันที่ติดมากับรากให้สะอาด แล้วนำลงปลูกในกระถางที่มีวัสดุปลูก วางในที่ที่มีความชื้นสูง (90-100 เปอร์เซ็นต์) ประมาณ 10-15 วัน ก็ย้ายออกไปวางในเรือนกระจกที่มีวัสดุพรางแสง จนกระทั่งพืชแข็งแรงดีแล้วจึงนำต้นพืชออกสู่สภาพธรรมชาติ (Bhojwani และ Razdan 1983)

2.2.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

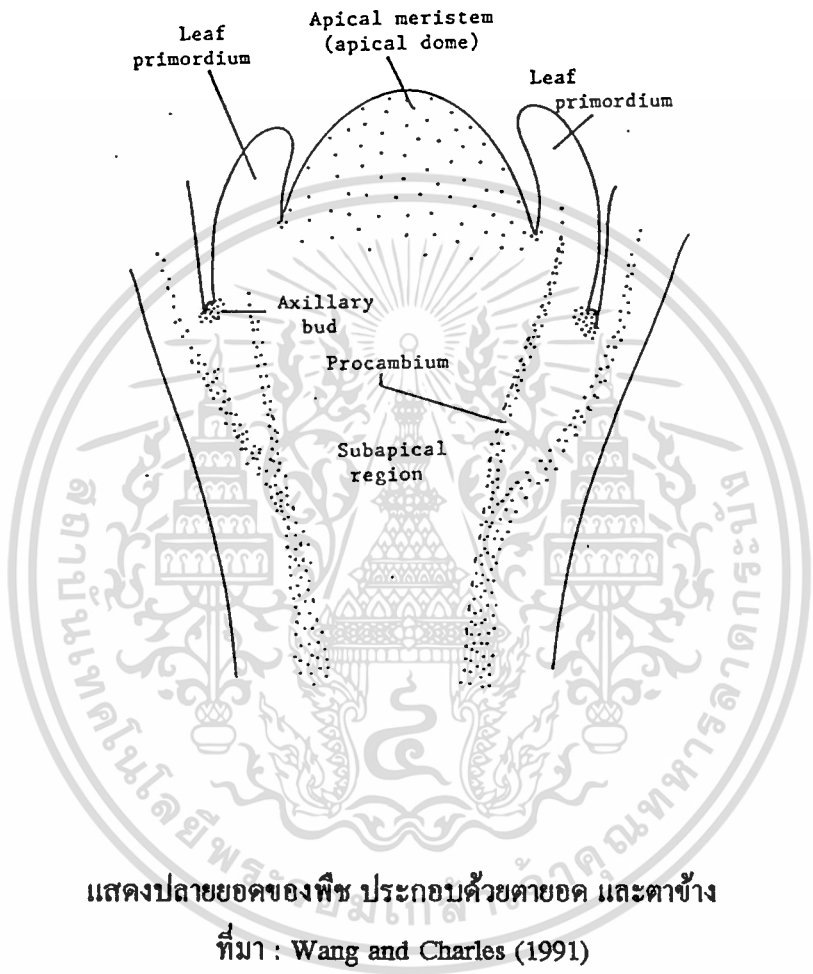
วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แบ่งออกเป็นวิธีการใหญ่ๆ ได้ 5 วิธี คือ (สิรินุช ลามศรีจันทร์ 2536)

2.2.5.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ได้แก่ การนำเอาเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ประกอบด้วยตายอด (Apical Bud) และตาข้าง (Axillary Bud) เนื้อเยื่อเจริญมีลักษณะเป็นโคน (ภาพที่ 7) ถูกห่อหุ้มไว้ด้วยใบอ่อน (Leaf Primordium) หรือเกล็ดหุ้มตา (Scale) เมื่อตัดแยกออกมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารเหลว ประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนตายอดและการเกิดราก โดยปกติใช้ไซโตไคนินในปริมาณค่อนข้างสูง (10-30 มิลลิกรัมต่อลิตร) กระตุ้นให้เกิดการแตกตาและมีการพัฒนาเป็นยอด (Shoot) ที่สมบูรณ์ต่อไป (ภาพที่ 8)

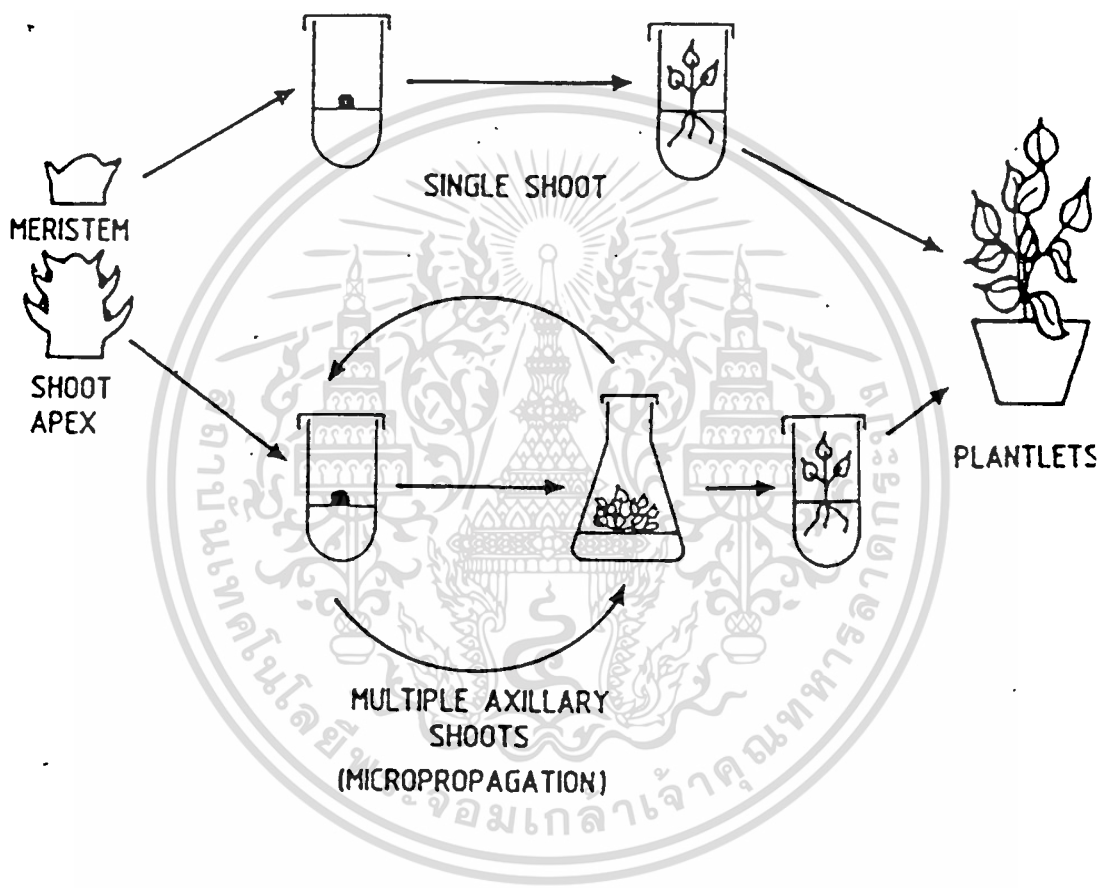
2.2.5.2 การเพาะเลี้ยงส่วนของพืช ได้แก่ การนำเอาส่วนของพืช เช่น ราก ยอด แกนคัพภะ (Embryo Axis) อับละอองเรณู (Anther) ไมโครสปอร์ รังไข่ ไข่ (Ovules) ฯลฯ มาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวหรืออาหารเหลว ภายในสภาวะที่เหมาะสมมีการพัฒนาต่อไปได้ เช่น การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและไมโครสปอร์ โดยการนำอับละอองเรณูแยกเฉพาะไมโครสปอร์มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ทำให้มีการพัฒนาโดยกระบวนการเอมบริโอเจเนซิส หรือออร์แกโนเจเนซิสได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแฮพลอยด์ ต้นพืชที่ได้อาจเป็นดิพลอยด์หรือโพลีพลอยด์ (ภาพที่ 9) ก็ได้

2.2.5.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส นำชิ้นส่วนของพืช เช่น ลำต้น ราก ใบ ใบเลี้ยง เนื้อเยื่อสปีพันธุและอื่นๆ นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มเซลล์เรียกว่า “แคลลัส” (Callus) สามารถเลี้ยงแคลลัสให้อยู่ในสภาพนี้ไปได้เป็นเวลานาน โดยการตัดแยกลงเลี้ยงในอาหารใหม่ เซลล์แคลลัสจัดเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อมีการปรับเปลี่ยนสมดุลและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารให้เหมาะสม ทำให้แคลลัสกลับสภาพไปเป็นโครงสร้าง หรือส่วนต่างๆ ของพืชได้ เช่น เปลี่ยนไปเป็นยอด ราก ขั้ว ตา ยอด หรือออร์แกโนออยด์ได้ โดยการพัฒนาผ่านกระบวนการออร์แกโนเจเนซิส และเอมบริโอเจเนซิส

ภาพที่ 7

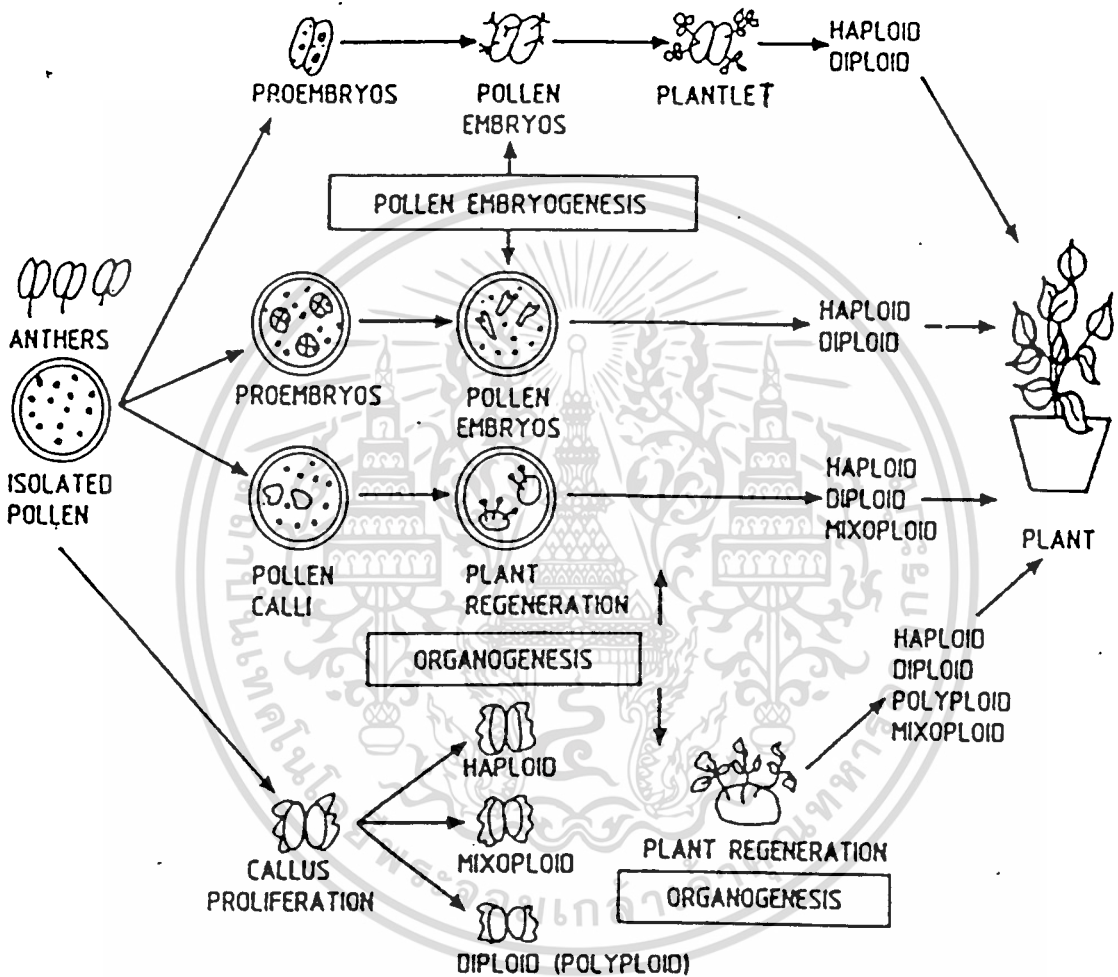


ภาพที่ 8



แสดงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ และเนื้อเยื่อปลายยอด
ที่มา : Novak (1990)

ภาพที่ 9



แสดงการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู และละอองเรณู

ที่มา : Novak (1990)

2.2.5.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ทำได้โดยการย้ายส่วนของพืช หรือก้อนแคลลัส ลงเลี้ยงในอาหารเหลวที่อยู่ในขวดเลี้ยงหรือในหลอดทดลอง ซึ่งวางบนเครื่องเขย่าเพื่อให้เซลล์ กระจายตัว มีการแลกเปลี่ยนแก๊ส เซลล์แขวนลอยประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดต่างๆ กัน และ รวมทั้งเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ด้วย โดยปกติการเลี้ยงเซลล์ในสภาพแขวนลอยจะมีอัตราการเจริญเติบโต มากกว่าการเลี้ยงในสภาพกึ่งแข็ง เนื่องจากทุกๆ เซลล์สัมผัสกับอาหารโดยทั่วถึงกัน เซลล์ในสภาพ แขวนลอยนี้เป็นแหล่งสำคัญในการให้ต้นพืช โดยผ่านกระบวนการออร์แกโนเจนซิสหรือ เอ็มบริโอเจนซิส การเลี้ยงแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยเป็นเวลานานๆ จะทำให้คุณสมบัติในการ พัฒนาเป็นต้นพืชลดลง

2.2.5.5. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

โพรโทพลาสต์ คือเซลล์เปลี่ยนที่ไม่มีผนังเซลล์ห่อหุ้ม มีคุณสมบัติในการสร้างผนังเซลล์ และมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ โพรโทพลาสต์แยกออกมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจากเซลล์ เพาะเลี้ยง หรือจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง เมื่อแยกโพรโทพลาสต์มาแล้ว ก็นำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดการ แบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นโคโลนีเล็กๆ และสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้

การแยกโพรโทพลาสต์ทำได้โดยการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์เช่น เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) และเพกตินเอส (Pectinase) ความสำเร็จในการแยกเลี้ยง โพรโทพลาสต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สภาพทางสรีระของส่วนของพืชที่นำมาแยก โพรโทพลาสต์ แหล่งหรือที่มาของ เอนไซม์และออสโมติกสแตบิไลเซอร์ (Osmotic Stabilizer) โพรโทพลาสต์สามารถเลี้ยงได้ในอาหารกึ่งแข็งหรือเหลว เช่นเดียวกับการเลี้ยงเซลล์ โพรโท- พลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ได้รวดเร็ว การตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ด้วย calcafluor ซึ่งจะย้อมติดเฉพาะผนังเซลล์ แต่ไม่ติดส่วนอื่นๆ ของเซลล์ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต หากมีผนังเซลล์เกิดขึ้นก็จะทำให้ผนังเซลล์เรืองแสง และจะ ไม่เห็นการเรืองแสงถ้าไม่มีการสร้างผนังเซลล์ โดยทั่วไปการสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้นภายใน 24-96 ชั่วโมง ภายใน 1-3 สัปดาห์ มีการเกิดโคโลนีของเซลล์ ต่อมากลายเป็นแคลลัส เมื่อย้ายลงสู่อาหารเหลวก็จะเกิดเป็นเซลล์แขวนลอย ความสำเร็จในการทำให้เกิดเป็นต้นพืชจากโพรโทพลาสต์ มีน้อยมาก จำกัดอยู่เพียงไม่กี่ชนิด ซึ่งได้แก่พืชชนิด Solanaceae ต่อมาเป็น Leguminosae และ Gramineae ตามลำดับ

โพรโทพลาสต์สามารถนำมารวมกัน เพื่อให้เกิดเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส หรือเพื่อใช้ในการ สร้างเซลล์ลูกผสมระหว่างโพรโทพลาสต์จากแหล่งต่างกัน การเชื่อมโพรโทพลาสต์เข้าด้วยกันอาจ

เกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติ หรืออาจเหนี่ยวนำโดยใช้สารต่างๆ เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) โดยที่พีอีจีช่วยให้โพรโทพลาสต์เข้ามารวมกันเป็นกลุ่มเล็กๆ การเชื่อมต่อของโพรโทพลาสต์เกิดขึ้นระหว่างที่เงาของพีอีจีด้วยค่าที่มีแคลเซียมไอออนในความเข้มข้นสูง เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมโพรโทพลาสต์เข้าด้วยกัน สามารถสร้างผนังเซลล์และแบ่งตัวได้

2.2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

มีปัจจัยหลายอย่างที่ควบคุมการเจริญของเนื้อเยื่อพืช (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา 2524 , Bhojwani และ Razdan 1983) ดังนี้

2.2.6.1 ปัจจัยภายใน

ก. ลักษณะทางพันธุกรรม การเกิดเป็นยอดและ/หรือรากนั้นขึ้นกับชนิดของพืช โดยพืชบางชนิดเกิดเป็นยอดและ/หรือรากง่ายกว่าพืชอีกชนิดหนึ่ง แม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและ/หรือรากก็ตาม

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโตในพืช โดยระดับและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตในชิ้นส่วนพืชมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สภาพเนื้อเยื่อ และอื่นๆ

2.2.6.2 ปัจจัยภายนอก

ก. แสง การให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนั้น เชื่อกันว่าไม่ได้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เนื้อเยื่อใช้แสงในการปรุงอาหาร แต่เพื่อช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืชมากกว่า ซึ่งการให้แสงแก่เนื้อเยื่อนี้ควรพิจารณาถึง

- คุณภาพแสง จากการทดลองพบว่า แสงสีแดงและสีน้ำเงินมีความสำคัญต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงหลายชนิดเกิดยอด ในขณะที่แสงฟาร์เรดมักทำให้การเกิดยอดหยุดชะงัก แต่ผลของแสงสีแดงและแสงฟาร์เรดนั้นสามารถลบล้างกันได้ ขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อได้รับแสงชนิดใดหลังสุด ด้วยเหตุนี้หลอดฟลูออเรสเซนต์ จึงเป็นที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป อย่างไรก็ตาม การให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ก็ทำให้ความสมดุลของแสงดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับเอกสารที่สงวนไว้เพื่อการใช้งานเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ความเข้มแสง โดยปกติในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เริ่มแรกจะให้ความเข้มแสงที่ต่ำคือประมาณ 1,000 ลักซ์ เพื่อให้เกิดตายอด หลังจากนั้นจะให้ความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 3,000-10,000 ลักซ์ เพื่อช่วยให้ตายอดเจริญได้ดี ความเข้มแสงที่สูงสามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้ดี ดังการทดลองของเนื้อเยื่อช่อดกต้น จะเกิดรากได้ดีเมื่อได้รับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ นอกจากนี้ความเข้มแสงสูงยังทำให้พืชมีการเจริญเติบโตช้า และแสดงอาการคลอโรซิสเล็กน้อย ในขณะที่ความเข้มแสงต่ำจะทำให้พืชมีลำต้นที่ยืดยาว

- ช่วงเวลาการให้แสง โดยทั่วไป มักให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชประมาณ 16 ชั่วโมง และมีช่วงมืด 8 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลดีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในพืชหลายชนิด แต่มีบางพืชที่ต้องการแสงต่ำกว่า 16 ชั่วโมง เช่น ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของกะหล่ำดอก ต้องได้รับแสง 9 ชั่วโมง จึงจะเกิดตายอด ส่วนเนื้อเยื่อของช่อดกต้น ต้องได้รับแสง 12 ชั่วโมง จึงจะเกิดรากได้ เป็นต้น

ข. อุณหภูมิ การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไป มักจะใช้อุณหภูมิคงที่ ประมาณ 25 องศาเซลเซียส แต่ก็มีพืชอีกหลายชนิดที่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดความสำเร็จนี้

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นใช้กันมานานแล้วแต่เพิ่งจะนำมาใช้กันอย่างจริงจัง โดย Skoog และ Miller (1957) ได้เสนอไว้ว่า การเกิดเป็นต้น รากหรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดนั้น ขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซินและไซโตไคนินในอาหาร หากอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินมีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินไม่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นยอดหรือรากมาก ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณออกซินและไซโตไคนินว่ากลุ่มใดมีมากกว่ากัน หากปริมาณออกซินมาก ทำให้อัตรส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงกว่าอัตราสมดุล เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นก้อนแคลลัสและราก แต่ถ้ามีปริมาณออกซินน้อย ไซโตไคนินมาก ทำให้อัตรส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำ ก็จะทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นยอดมาก จึงเห็นได้ว่าความสมดุลของออกซินและไซโตไคนินมีความสำคัญมากในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เป็นที่เชื่อกันว่าความสมดุลของออกซินและไซโตไคนินที่ใส่ลงไปในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ภายในชั้นเนื้อเยื่อ เช่น ชั้นเนื้อเยื่อมีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใดชนิดหนึ่งมาก ก็อาจมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดนั้นในอาหารต่ำ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความสมดุลที่แท้จริงของสารควบคุมการเจริญเติบโตในชั้นของเนื้อเยื่อ

นอกจากออกซินและไซโตไคนินแล้ว สารตัวอื่นๆ ก็มีความสำคัญในการควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืชด้วย เช่น เมื่อมีจิบเบอเรลลินในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาเป็นไปได้ยากขึ้น การใส่แอบซิสสิกแอซิดลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการเกิดต้น และ/หรือราก แต่ในพืชบางชนิด จะช่วยกระตุ้นให้เกิดต้นดีขึ้น ส่วนเอทิลีน ไม่ว่าจะใช้ในรูปแก๊สหรือรูปสารที่ปล่อยแก๊สเอทิลีนออกมา เช่น เอทิลฟอนจะไปยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจนซิสในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของแครอท และการงอกของสปอร์เพิร์น เป็นต้น

2.2.6.3 ปัจจัยอื่นๆ

ก. ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง โดยชิ้นส่วนขนาดใหญ่มีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาได้ดีกว่าชิ้นส่วนเล็ก

ข. สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อบางชนิดเมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาได้ แต่ไม่เกิดเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เช่น กกล้วยไม้ เป็นต้น แต่ในพืชบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารเหลว เช่น พืชพวกสับปะรดสี (Murashige 1974) และในพืชบางชนิดสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาได้ทั้งในอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว นอกจากนี้ ปริมาณอากาศที่อยู่ในภาชนะเพาะเลี้ยงก็มีส่วนควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาด้วย เช่น ปริมาณออกซิเจนมาก เนื้อเยื่อมักจะเกิดเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซิเจนน้อย เนื้อเยื่อจะเกิดเป็นยอด

ค. การถ่ายย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าลงสู่อาหารใหม่ ซึ่งการย้ายเนื้อเยื่อลงสู่อาหารใหม่หลายๆ ครั้ง จะทำให้ความสามารถในการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อนั้น ลดลงหรือหายไป โดยยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใด อาจจะเป็นไปได้ที่เนื้อเยื่อเกิดมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมขึ้น

ง. ส่วนประกอบของอาหาร การให้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไอออนปริมาณมากในอาหารจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดเอ็มบริโอเจนซิสมากกว่าการเกิดออร์แกโนเจนซิส การผสมอะคิโนลงในอาหารจะช่วยทำให้เนื้อเยื่อเกิดยอดได้ดีขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลก็มีส่วนใน

การควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาด้วย คือ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดขึ้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้อย แต่ที่น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ขยับยั้งการเกิดขึ้น ในทำนองเดียวกัน พบว่า แคลลัสของไม้ดอกพวกไลแล็ก ถูกชักนำให้เกิดท่อน้ำ เมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 4 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดท่ออาหาร ส่วนน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดทั้งท่อน้ำและท่ออาหาร

2.2.7 การผลิตพืชปลอดโรค

การติดเชื้อภายในของพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส มายโคพลาสมา แบคทีเรียและรา นั้น ยากที่จะป้องกันและกำจัดด้วยการใช้สารเคมี โดยทั่วไป เชื้อไวรัส แบคทีเรียและรามักถ่ายทอดโดยการขยายพันธุ์ที่ไม่อาศัยเพศ เมื่อพืชติดเชื้อโรคแล้ว โดยเฉพาะเชื้อไวรัส จะส่งผลให้เกิดความเสียหายอย่างมากแก่พืช และเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตมีคุณภาพต่ำ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นและสำคัญอย่างมากต่อการเริ่มใช้กิ่งพันธุ์ที่ปลอดโรค

วิธีที่ใช้ในการผลิตพืชปลอดไวรัส มีด้วยกัน 5 วิธี (Pierik 1987) ดังนี้

2.2.7.1 การให้ความร้อน สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้บางชนิด ในพืชพวกไม้ผล พบว่าการปฏิบัติด้วยความร้อนมีประสิทธิภาพต่อเชื้อไวรัสและมายโคพลาสมา โดยความร้อนที่นำมาใช้ในการผลิตพืชปลอดโรคนั้นมี 2 แบบ คือ ความร้อนชื้น และความร้อนแห้ง การนำต้นไม้มารอบด้วยความร้อนดังกล่าว ต้องทำให้พืชปรับตัวที่อุณหภูมิต่ำก่อน เพื่อพืชจะได้ทนกับความร้อนที่ได้รับสูงขึ้น (Nyland and Goheen 1969) การให้ความร้อนในการผลิตสัปปรดโรคนั้น พบว่าสัปปรดชนิดกันต้องใช้เวลาและความร้อนและระยะเวลาต่างกัน และการใช้อุณหภูมิสูงต่ำสลับกันจะให้ผลดีกว่าการใช้ที่อุณหภูมิเดียวกันตลอด (Calavan และคณะ 1972) นอกจากนี้ ในสัปปรดไม่ทนความร้อน ต้องทำให้พืชปรับตัวที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานกว่าพวกทนความร้อน และในพวกทนความร้อนต้องใช้ระยะเวลาในการอบที่อุณหภูมิสูงนานขึ้น เพื่อจะได้ขึ้นส่วนที่ปลอดไวรัส (Ieki และคณะ 1980)

ในปี 1969 Nyland และ Goheen พบว่าการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน สามารถกำจัดเชื้อไวรัสทริสเทซ่าได้ ต่อมา Calavan และคณะ (1972) ให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 40 และ 30 องศาเซลเซียสสลับกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถกำจัดเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในสัปปรด Hinckley และลูกผสมของสัปปรดกับสัปปรดแมนดาริน

2.2.7.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ White (1934) พบว่า ส่วนปลายรากของ

มะเขือเทศที่ติดเชื้อโรคนั้นปลอดโรค และการแพร่เชื้อไวรัส Tobacco Mosaic Virus (TMV) ในเนื้อเยื่อเจริญ White (1934) พบว่า ส่วนปลายรากของมะเขือเทศที่ติดเชื้อโรคนั้นปลอดโรค และการแพร่เชื้อไวรัส Tobacco Mosaic Virus (TMV) ในเนื้อเยื่อเจริญ White (1934) พบว่า ส่วนปลายรากของมะเขือเทศที่ติดเชื้อโรคนั้นปลอดโรค และการแพร่เชื้อไวรัส Tobacco Mosaic Virus (TMV) ในเนื้อเยื่อเจริญ

ชั้นเนื้อเยื่อของรากยาสูบนั้นไม่เท่ากัน โดยความเข้มข้นของเชื้อไวรัสจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงปลายราก ทำให้ปลายรากปลอดไวรัส จากงานทดลองนี้ ทำให้เกิดทฤษฎีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อกำจัดเชื้อไวรัสขึ้น ต่อมา Limasset และ Cornuet (1949) พิสูจน์ได้ว่า ไวรัสไม่เพียงลดลงในปลายรากเท่านั้น แต่ในเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดก็ไม่มีไวรัสด้วยเช่นกัน ในปี 1952 Morel และ Martin ได้ทำให้อยอดของพืชพวกกรักร์และมะเขือเทศที่ติดเชืื่อนั้น ปลอดเชื้อไวรัสได้ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องต่อยอดบนต้นกล้าที่ปลอดไวรัสอีกครั้ง เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้แก่พืช

Morel (1960) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด เพื่อผลิตกล้วยไม้สกุลชิมบิเดียมให้ปลอดไวรัส และต่อมาในปี 1963 เขาได้เสนอขั้นตอนการขยายพันธุ์กล้วยไม้ปลอดไวรัสและต้นที่ได้มีลักษณะที่เหมือนกันทุกประการ นับตั้งแต่นั้นมา งานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญก็ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ มะเขือเทศ ยาสูบ เซอร์รี แรสบอร์รี และองุ่น เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นพื้นฐานของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อการขยายพันธุ์อีกด้วย

2.2.7.3 การให้ความร้อน และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ

ในพืชบางชนิดทำให้ปลอดไวรัสได้ยาก โดยเฉพาะเมื่อพืชติดเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด การให้ความร้อนกับพืชก่อนตัดเนื้อเยื่อเจริญจะช่วยให้มีโอกาสดำเนินขั้นตอนที่ปลอดไวรัสมากขึ้น ความร้อนที่นิยมใช้ คือที่อุณหภูมิ 35-38 องศาเซลเซียส นาน 5-10 สัปดาห์ ประสบผลสำเร็จในมะเขือเทศ เบญจมาศ คาร์เนชัน และสตอเบอรี่ เป็นต้น

2.2.7.4 การเพาะเลี้ยงแคลลัสและโปรโตพลาสต์

การย้ายแคลลัสของยาสูบที่ติดเชื้อจากอาหารเก่าลงสู่อาหารใหม่นั้น สามารถทำให้เนื้อเยื่อแคลลัสกลับมาปลอดไวรัสได้ โดยเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่อ่อนและแข็งแรง จะต้านทานต่อ TMV ได้มากกว่าเซลล์ที่แก่และอ่อนแอ นอกจากนี้ยังพบว่า ยาสูบที่ติดเชื้อ TMV สามารถหายจากโรคได้เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบยาสูบที่ติดเชื้อ TMV

อย่างไรก็ตาม พืชปลอดไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส และโปรโตพลาสต์เหล่านี้ มักเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นได้

2.2.7.5 การต่อเนื่องเจริญส่วนยอดในหลอดแก้ว

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของพืชพวกไม้เนื้อแข็งยุ่งยากกว่าพืชพวกอื่นๆ โดย Morel และ Martin (1952) ได้ทำการต่อเนื่องเจริญส่วนยอดของรักเร่ในหลอดแก้วขึ้นเป็นกลุ่มแรก ต่อมา Murashige และคณะ (1972) กับ Navarro และคณะ (1975) ได้ทำการต่อเนื่องเจริญส่วนยอดของพืชตระกูลส้มได้เป็นผลสำเร็จครั้งแรก ซึ่งจากการกระทำนี้ สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ถึง 2 ชนิด หลังจากนั้น ก็ประสบผลสำเร็จในยูคาลิปตัส แอปเปิ้ล ต้นท้อ เป็นต้น

2.3 การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์ส้ม

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส้ม เป็นเทคนิคการขยายพันธุ์พืชชนิดหนึ่งที่สามารถเพิ่ม ได้เป็นจำนวนมาก ในระยะเวลาจำกัด โดยนำเนื้อเยื่อส่วนใดส่วนหนึ่งไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์และสภาพแวดล้อม ที่สามารถควบคุมได้ พืชจะพัฒนาไปเป็นต้นเล็กๆ ในปริมาณมากมาย (จารุวรรณ จาติเสถียร 2538)

โดยทั่วไป มักใช้ต้นกล้าเป็นแหล่งชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในพืชตระกูล ส้ม พบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เป็นแหล่งเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก มักเป็นส่วนของ ช่อและปล้อง (Barlass และ Skene 1982) และใช้อาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตรของ Murashige และ Skoog (MS) ในการชักนำชิ้นส่วนของส้มให้พัฒนาเป็นยอด แต่ถ้าต้องการชักนำให้เกิดราก จะเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรของ White หรือ MS นอกจากนี้ ยังมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต พวกออกซินและไซโตไคนิน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของส้มอีกด้วยเช่นการใช้เบนซิลอะดีนีน (BA) เพื่อให้ชิ้นส่วนพัฒนาเป็นยอด ทั้งนี้อาจมีการเติมระดับออกซินที่ต่ำลงในอาหารด้วยก็ได้ แต่ พบว่าไม่มีผลมากนัก ส่วนการเติมแนฟทาลีนแอซิดิกแอซิด (NAA) ในอาหาร สามารถชักนำให้ เกิดรากได้ (Barlass และ Skene 1986)

การขยายพันธุ์ส้มในสภาพปลอดเชือนั้น ได้มีผู้ทำการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยในปี ค.ศ. 1971 Altman และ Goren ได้ศึกษาผลของการใช้อินโดลบีวทีริกแอซิด (IBA) ชนิดเดียว และ ใช้ร่วมกับอินโดลแอซิดิกแอซิด (IAA) และเบนซิลอะดีนีน (BAP) เพื่อชักนำส่วนตาของ พืชตระกูลส้มให้เกิดเป็นแคลลัส และในปีค.ศ. 1974 พวกเขาพบว่า แอปซิสติกแอซิดสามารถ ชักนำแคลลัสให้ขยายเพิ่มขึ้นในการเพาะเลี้ยงส่วนตาของ *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ในอาหาร สูตรพื้นฐานที่มีน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และในปีเดียวกันนี้ Chaturvedi และ Mitra ได้ทำ การแยกแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนลำต้นและใบของ *C. grandis* (L.) Osbeck และ *C. sinensis* จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในอาหารสูตรของ MS ที่มี BAP 0.25 และ

เอกรังไข่ของแมลงวันผลไม้ (Drosophila melanogaster) เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์แมลงวันผลไม้ที่มีลักษณะที่ต้องการ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการชักนำรากเกิดขึ้นในอาหารที่มี NAA 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Giladi และคณะ (1977) ได้ทำการศึกษาต่อพบว่า การเพาะเลี้ยงส่วนตาของ *C. sinensis* (L.) Osbeck ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่มีน้ำตาลซูโครสก็สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ โดย BA ชักนำการเกิดแคลลัสได้เล็กน้อย เมื่อน้ำตาลซูโครสเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึง 5 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม การเจริญของยอดจากการเพาะเลี้ยงส่วนตาทั้งในอาหารที่มี BA และในอาหารสูตรพื้นฐานนั้นต้องการระดับน้ำตาลซูโครสที่สูง

ต่อมา Kitto และ Young (1981) ได้นำชิ้นส่วนยอดของต้นกล้าที่เกิดจากเนื้อเยื่อนิวเคลลัสของส้มเปรี้ยว (*C. aurantium* L.) , Carrizo citrange {Washington navel x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.} และ Cleopatra mandarin (*C. reshni* Hort. ex Tanaka) มาเพาะเลี้ยง โดยส้มพันธุ์ Carrizo citrange ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารอินทรีย์สูตรของ Knop และสารอนินทรีย์สูตรของ MS ที่มี BAP 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3-4 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2.2 กิโลกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก และเมื่อนำยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตรของ Murashige และ Tucker (MT) ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ก็ชักนำให้เกิดรากได้ หลังจากนั้น Annie และคณะ (1982) ได้นำเนื้อเยื่อเจริญส่วนรากของส้ม *C. sinensis* cv. Trovita , *C. limon* cv. Eureka , *Poncirus trifoliata* และ Troyer citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรของ MS , MT และ Navarro พบว่า เนื้อเยื่อเจริญส่วนรากของมะนาวฝรั่งและ Troyer citrange เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสูตรของ Navarro ส่วนส้ม *Poncirus* เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสูตรของ MT ที่มีจิบเบอเรลลินแอซิด 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และความยาวของเนื้อเยื่อเจริญส่วนรากที่มีขนาด 500 ไมครอน มีผลต่อการยืดยาวของเนื้อเยื่อเจริญได้ดีที่สุด ส่วนการพัฒนาเป็นยอดนั้น พบว่าเนื้อเยื่อเจริญที่ยืดยาวจะเจริญไปเป็นจุดเจริญที่จะเติบโตไปเป็นตา และเจริญเป็นยอดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรของ Favre แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรของ MS ที่มี BAP 1.0 และ 2 , 4-ไดคลอโรฟีนอกซีแอซิดิกแอซิด (2 , 4-D) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดเป็นแคลลัสก่อน แล้วจึงเจริญเป็นยอดจำนวนมาก ต่อมาเมื่อย้ายยอดเหล่านั้นลงในแร่ธาตุอาหารสูตรของ MS ก็ชักนำให้เกิดรากได้

ในปีค.ศ. 1986 Jude และ Chandler ได้เพาะเลี้ยงส่วนข้อยาว 0.5 เซนติเมตร และส่วนปล้องยาว 1.0 เซนติเมตรของต้นกล้า Swinge citrumelo (*C. paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) ในอาหารสูตรของ MT ที่มีผงวุ้นและระดับควมารินต่างๆ ซึ่งระดับควมารินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ส่วนข้อและปล้องที่ยาว 0.5 เซนติเมตร เกิดยอดและราก คือ 90.0-150 ไมโครโมลาร์ โดยทั้งนี้ ควมารินยังมีผลทำให้พืชที่พัฒนามาจากการเพาะเมล็ดเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า ในปีเดียวกันนี้ Moore ได้เพาะเลี้ยงส่วนข้อของเอพิคอตที่ยาว 2.0 เซนติเมตรของส้มเปรี้ยว (*C. aurantium* L.) ,

Carrizo citrange [*C. sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] และ Cleopatra mandarin (*C. reshni* Hort. ex Tanaka) ในอาหารสูตรของ MT ที่มี BA และ NAA ในระดับต่างๆ โดยอาหารที่มี BA 22.0 ไมโครโมลาร์ และ/หรือไม่มี NAA 5.4 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิดยอด แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน ก็พบว่า NAA เป็นตัวยับยั้งการสร้างยอด ต่อมาในปีค.ศ. 1988 Hidaka และ Kajiura ได้นำคัพพะของเมล็ดส้ม Washington navel [*C. sinensis* (L.) Osbeck] , Yoko (*C. yuko* Hort. ex Tanaka) และ Ponkan (*C. reticulata* Blanco.) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรของ MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.16 โมลาร์ , สารสกัดจากมอลต์ 0.5 กรัมต่อลิตร และโคเคนดิน 50 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้น 1-3 เดือน เกิดแคลลัสที่ค่อนข้างขาวบริเวณส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยงของคัพพะ ทำการย้ายแคลลัสจากอาหารเก่าลงอาหารใหม่เป็นเวลานาน 2 ปี จากนั้นนำมาแยกเอาโปรโทพลาสต์และเพาะเลี้ยงในอาหารทดสอบต่างๆ โดยเอ็มบริอยด์เกิดขึ้นในอาหารที่มีซีติน 1.0 ไมโครโมลาร์ หรือไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นต้นพืชเล็กๆ ที่สมบูรณ์ภายหลังย้ายลงในอาหารแข็งสูตรของ MS ที่มี GA₃ 1.0 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 0.06 โมลาร์

ต่อมา Sim และคณะ (1989) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเริ่มต้นที่แตกต่างกันของต้นกล้า และต้นที่โตเต็มวัยของ *C. mitis* โดยเอพิคอตทิล , ใบ , ปลายยอด และส่วนข้อของต้นกล้า มีความพร้อมในการเกิดยอด ส่วนการเพาะเลี้ยงปลายยอด และลำต้นส่วนข้อของพืชที่โตเต็มวัยในอาหารสูตรของ MS ที่มี/หรือไม่มี BAP จะให้จำนวนยอดสูงถึง 66-100 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ ได้นำส่วนรากที่ติดกับต้นกล้า , รากที่ติดกับต้นกล้าที่ตัดยอดทิ้งและรากที่ตัดต้นกล้าทิ้งมาชักนำให้เกิดตายอด โดยจากการเพาะเลี้ยงส่วนรากที่ติดกับต้นกล้าในอาหารสูตรของ MS ที่มี BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดเป็นตาได้สูงที่สุด จากนั้นย้ายยอดลงในอาหารสูตรพื้นฐาน เพื่อชักนำให้เกิดราก จากนั้น Omura และ Hidaka (1992) ได้ทำการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดของส้มเขียวหวานพันธุ์ Asoshima และ Kiomi ในอาหารสูตรของ MS ที่มี GA₃ , BA และ NAA 5.0 , 1.0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากยอดเจริญสมบูรณ์แล้ว ย้ายยอดลงในอาหารสูตรของ MS ที่มี GA₃ , BA และ NAA 5.0-10.0, 0.5-1.0 และ 0.05-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก จากนั้นชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตรของ MS ที่มี NAA และ IBA 0.1 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถนำต้นออกปลูกในสภาพภายนอกได้ ต่อมาในปีค.ศ. 1993 Amin และ Akhtar ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโอในอาหารสูตรของ 1/2 MS ที่มี BA 1.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่วนข้อที่อยู่โคนต้นกล้าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดและให้ยอดจำนวน 30-50 ยอด ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 90 วัน (ตัดย้ายทุก 4 สัปดาห์) จากนั้นนำ

ยอดที่มีความยาวมากกว่า 1.0 เซนติเมตร ไปเลี้ยงในอาหารสูตรของ 1/2 MS ที่มี IAA และ IBA 0.1-0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด(85 เปอร์เซ็นต์) ในอาหารที่มี IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ต่อมา Grewal และคณะ (1994) ได้เพาะเมล็ด *C. depressa* , *C. reshini* และ *C. jamphiri* ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำส่วนต่างๆ ของต้นกล้าไปชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตรของ MS ที่มี NAA 10.0 และ BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากภายหลังการตัดย้าย แคลลัสลงในอาหารสูตรเดิม จากนั้นชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารสูตรของ 1/2 MS ที่มี IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในปีเดียวกันนี้ Singh และคณะได้เพาะเลี้ยงปลายยอดของ *C. reticulata* Blanco. cv. Khasi mandarin และ *C. limon* Burm.f. cv. Assam lemon (พืชโตเต็มที่อายุ 5-6 ปี) ในอาหารสูตรของ MS ที่มี BAP 1.0 , ไคเนติน 0.5 และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก และเมื่อนำยอดเดียวที่มีอายุ 7 สัปดาห์ (ยาวประมาณ 2.0 เซนติเมตร) มาเลี้ยงในอาหารสูตรของ MS ที่มี BAP 0.25 , NAA 0.5 และ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถชักนำให้เกิดรากได้

การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ เพื่อการขยายพันธุ์ส้มให้ได้ปริมาณมาก นิยมทำ 2 วิธี (เกรียงไกร ไทยอ่อน 2538) คือ

ก. การขยายพันธุ์ผ่านแคลลัส เริ่มจากนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จนออกเป็นต้นเล็กๆ จากนั้นนำต้นอ่อนมาตัดเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรเร่งแคลลัส หรืออาจใช้กิ่งอ่อนของต้นต่อสั้มที่ปลูกในโรงเรือนแทนเมล็ดก็ได้ นำมาฟอกฆ่าเชื้อก่อนเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเร่งแคลลัสเช่นเดียวกัน ภายใน 3 เดือน เมื่อเนื้อเยื่อด้านสั้มตรงบริเวณรอยตัดแบ่งเซลล์เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ เรียกว่า “แคลลัส” โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเดิมจนได้จำนวนที่เพียงพอต่อความต้องการ จึงนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเร่งยอด แคลลัสจะพัฒนาเป็นยอดอ่อนเล็กรวมกันเป็นกระจุก เลี้ยงจนยอดโตพอสมควรจึงตัดยอดเล็กๆ นั้นมาเลี้ยงในอาหารเร่งราก ภายใน 2 เดือน รากจะงอกเป็นต้นสั้มเล็กๆ พร้อมออกปลูกในโรงเรือนต่อไป

ข. การปักชำในหลอดแก้วโดยการตัดต้นต่อเล็กๆ มาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำตาข้างให้เจริญภายใน 1-2 เดือน ตาข้างจะเจริญแตกยอดยาวขึ้น นำยอดเหล่านั้นมาตัดเป็นข้อๆ เลี้ยงในอาหารต่อไปได้ไม่มีสิ้นสุด จนได้ปริมาณเพียงพอจึงนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเร่งราก แล้วนำไปเพาะชำในโรงเรือน วิธีนี้สามารถขยายพันธุ์สั้มได้รวดเร็วมาก เพียง 1 ข้อ เวลา 1 ปี ขยายพันธุ์ได้มากกว่า 50,000 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสเต็มปลอดโรค

สเต็มปลอดโรคคือ ต้นสเต็มหรือพันธุ์สเต็มที่ผลิตขึ้นโดยใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อและเทคนิคทางโรคพืช ทำให้สเต็มปราศจากเชื้อโรคอยู่ภายในเนื้อเยื่อของต้นสเต็มเช่น เชื้อไวรัส มายโคพลาสมา แบคทีเรีย และไวรอยด์ เมื่อนำไปปลูกต้นสเต็มเหล่านั้นจะสมบูรณ์แข็งแรงและเจริญเติบโตเร็ว มีการตอบสนองต่อปุ๋ยและสารเคมีทุกชนิดได้อย่างดีและถ้ามีการดูแลรักษาอย่างถูกต้องไม่ให้เป็นโรคอีกก็จะทำให้ต้นสเต็มปลอดโรคเหล่านั้นมีอายุยืนยาว ผลผลิตสูงอย่างสม่ำเสมอต่อไปอีกนานหลายสิบปี ดังเช่นหลายๆ ประเทศที่ปลูกสเต็มเป็นอุตสาหกรรม โดยการผลิตสเต็มปลอดโรคทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมปฏิบัติกัน (อุบล และคณะ 2538) คือ

2.4.1 การเพาะเมล็ด ต้นสเต็มที่ได้จากการเพาะเมล็ดถือได้ว่าปลอดโรคเพราะยังไม่มีรายงานยืนยันว่า เชื้อไวรัสชนิดใดสามารถถ่ายทอดไปกับเมล็ดได้ (McClean 1957 ; Garnsey และคณะ 1977) แต่การเพาะเมล็ดไม่เป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากทำให้ต้นสเต็มให้ผลผลิตช้า ทรงสูงชูดมมีหนามมาก และที่สำคัญผลผลิตค่อนข้างต่ำในระยะแรก และต้องใช้เวลานานกว่าจะพัฒนาไปเป็นแม่พันธุ์ที่ได้มาตรฐาน (Nauer และคณะ 1983)

2.4.2 การใช้ความร้อนควบคู่กับการต่อปลายยอด ความร้อนจะไปยับยั้งการเจริญและขยายพันธุ์ของเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรียภายในเนื้อเยื่อสเต็ม ปกติใช้ความร้อน 30 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง และ 40 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง นาน 3 เดือน นำเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดที่ผ่านความร้อนแล้ว มาตัดบางๆ 0.2 มิลลิเมตร และติดบนต้นตอซึ่งทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในสภาพที่ปลอดเชื้อ จนกระทั่งพัฒนาเป็นต้น แล้วนำไปตรวจสอบโรคอีกครั้ง จึงจะแน่ใจว่าต้นสเต็มที่ได้ปลอดโรคจริง วิธีนี้เป็นวิธีสากลที่นิยมแพร่หลายกันทุกประเทศทั่วโลก

การต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อเป็นการขยายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเชื่อมกันของชิ้นเนื้อเยื่อขนาดเล็ก โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของต้นกล้า หรือจากการขยายกิ่งพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อไปต่อบนต้นตอที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อต่อไป ทำให้ได้ต้นพืชที่ปลอดไวรัส โดยเฉพาะในไม้เนื้อแข็งหลายชนิดเช่น ส้ม แอปเปิ้ล และพืชสกุลพุ ซึ่งวิธีนี้มีความสำคัญมากสำหรับส้มเพราะสามารถใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นจากต้นที่โตเต็มวัยและหลีกเลี่ยงลักษณะเขาวัวของต้นกล้าที่ได้จากเนื้อเยื่อนิวเคลอัส แม้ว่าการต่อปลายยอดนี้เป็นเทคนิคที่ใหม่และยุ่งยาก แต่ก็ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้การต่อปลายยอดในสภาพ

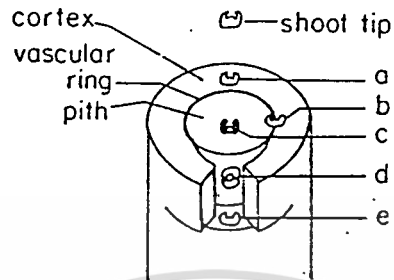
ปลอดเชื้อ มักแสดงอาการความไม่เข้ากันเกิดขึ้นได้ภายในวันหรือสัปดาห์ให้ ซึ่งในสภาพภายนอก
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มักใช้เวลานานกว่า โดยการต่อปลายยอดจะประสบความสำเร็จหรือล้มเหลวนั้นขึ้นอยู่กับ การตอบสนองที่สามารถเข้ากันได้ที่เกิดขึ้นระหว่างเนื้อเยื่อที่ทำการต่อกันได้มากน้อยเพียงใด (Jonard 1986) นอกจากนี้ แหล่งและขนาดของปลายยอดที่เหมาะสมยังมีผลทำให้การต่อปลายยอดมี เปอร์เซ็นต์สำเร็จมากขึ้นอีกด้วย (Navarro และคณะ 1976)

การต่อปลายยอดเริ่มทำโดย Doorenbos (1953) ได้ต่อกิ่งในต้นโอวี และเบญจมาศ (Holmes 1956) ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงของพืชทั้งสองนี้ ทำให้เทคนิคนี้ถูก นำมาใช้ในพืชพวกไม้เนื้อแข็ง โดยเฉพาะในไม้ผล พบว่าประสบความสำเร็จในต้นมะนาวฝรั่ง ต่อมาในปี 1972 Murashige และคณะได้นำเทคนิคการต่อปลายยอดมาทำกับส้มเป็นครั้งแรก โดย นำปลายยอดขนาด 2-3 เซนติเมตร ของพืชตระกูลส้มที่ติดเชื้อไวรัสมาต่อบนต้นตอของต้นกล้า Troyer citrange {*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.} และส้ม Trifoliate {*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.} ที่ปลอดโรค พบว่าพืชที่ต่อกันสำเร็จนั้นปลอดจากเชื้อ Exocortis Viroid และ Stubborn Spiroplasma ต่อมา Navarro และคณะ (1975) ได้ปรับปรุงเทคนิคนี้ โดยทำ การศึกษาสูตรอาหาร , รูปแบบการวางปลายยอดลงบนเอพิคอทิลที่ตัดยอดของต้นตอ , ความแตกต่างของต้นตอ, ความเข้มแสง , แหล่งและขนาดของปลายยอดที่ทำให้การต่อปลายยอด ประสบผลสำเร็จ พบว่า ยอดอ่อนที่เลี้ยงในเรือนเพาะชำ หรือตาข้างที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นแหล่งปลายยอดที่ดีที่สุด และการวางปลายยอดขนาดประมาณ 0.14-0.18 มิลลิเมตร ลงใน รอยกริดรูปตัวทีหัวกลับ ความยาวตามแนวตั้งและแนวนอนประมาณ 1.0 มิลลิเมตร (ภาพที่ 10) โดยให้ฐานของปลายยอดอยู่บริเวณคอเทกซ์ของต้นกล้าต้นตอส้ม Troyer citrange ที่เพาะเลี้ยงใน ที่มีคนาน 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นส้มที่ต่อปลายยอดเสร็จแล้วเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส เข้มข้นสูง 7.5 เปอร์เซ็นต์ วางในที่ที่มีความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำให้การต่อปลายยอดประสบความสำเร็จเพิ่มขึ้นจาก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ เปรียบเทียบกับเทคนิคเดิม นอกจากนี้ยังปลอดจากเชื้อ Tristeza Virus , Psorsis Virus , Stubborn Spiroplasma และ Exocortis Viroid (Roistacher และคณะ 1976)

จากนั้น Nauer และคณะ (1983) พบว่าการต่อปลายยอดของส้ม Willowleaf mandarin (*C. reticulata* Blanco) และ Temple tangor {*C. reticulata* x *C. sinensis* (L.) Osbeck} ที่ติดเชื้อ ไวรัสบนต้นตอส้ม Troyer citrange {*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.} ที่ ปลอดโรค ทำให้ต้นส้มทั้งสองปลอดจากเชื้อ Tristeza Virus , Exocortis Viroid และ Cachexia Viroid ต่อมา Su และ Chu (1984) ได้ทำการดัดแปลงเทคนิคการต่อปลายยอดของ Murashige และคณะ (1972) กับ Navarro และคณะ (1975) โดยวางปลายยอดลงในรอยกริดของต้นกล้าส้ม ต้นตอ อายุ 2 สัปดาห์ ที่กริดเป็นรูปสามเหลี่ยมมุมฉาก ขนาด 0.3-0.4 มิลลิเมตร (ภาพที่ 11) ห่วง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 10

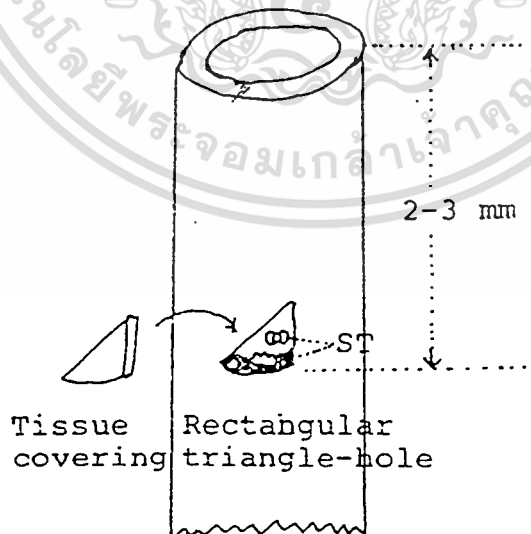


แสดงการวางปลายยอดในรอยกรีดรูปตัวที่หัวกลับบนต้นตอส้ม

- a. ปลายยอดวางที่คอเทกซ์ d. ปลายยอดวางในรอยกรีดที่แคมเปียม
b. ปลายยอดวางที่วงท่ออาหาร e. ปลายยอดวางในรอยกรีดที่คอเทกซ์
c. ปลายยอดวางที่พืธ

ที่มา : Navarro และคณะ (1975)

ภาพที่ 11



แสดงการวางปลายยอดในรอยกรีดรูปสามเหลี่ยมบนต้นตอส้ม

ที่มา : Su and Chu (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากปลายเอพิกอททิลประมาณ 2.0-3.0 มิลลิเมตร หลังจากนั้น ปิครอยกรีดด้วยเนื้อเยื่อเอพิเคอมิส ของต้นกล้าสัมต้นตอดันเดิม พบว่าการต่อปลายยอดประสบความสำเร็จมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และ เมื่อนำต้นเหล่านี้ไปต่อปลายยอดบนต้นกล้าสัมที่ปลูกในภาคสนามอีก 3 วงจร จะทำให้ปลอดจาก โรคไวรัสส้ม และ Likubin Organism ได้มากกว่า 500 ชนิด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 พันธุ์พืช

- เมล็ดส้มพันธุ์น้ำผึ้ง (*Citrus reticulata* Blanco.)
- เมล็ดส้มพันธุ์คาริโซ ชิเตรนจ์ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)

3.1.2 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- เครื่องซังสารเคมีไฟฟ้าแบบละเอียด รุ่น A-200s ของ Satorius
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น HM-7E ของ TOA Electronics
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-3D ของ Hirayama MFG. CORP.
- ตู้เชื้อเชื้อ (Laminar Air-Flow) รุ่น TL 2448 ของ Holten
- ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope)
- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้ว จานแก้ว ปิเปตต์ ขวดแก้ว หลอดทดลอง พร้อมฝาพลาสติก ขวดลีซา เป็นต้น
- มีดผ่าตัด ปากคีบ
- กระจก กระจกพลาสติก
- กล้องถ่ายรูป

3.1.3 สารเคมี

- Ammonium Nitrate (NH_4NO_3) ของ Fluka
- Potassium Nitrate (KNO_3) ของ MERCK
- Potassium Chloride (KCl) ของ AnalaR*
- Calcium Chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของ MERCK
- Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) ของ MERCK
- Boric Acid (H_3BO_3) ของ MERCK
- Manganese Sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ของ J.T. Baker
- Zinc Sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ของ MERCK
- Potassium Iodide (KI) ของ J.T. Baker
- Sodium Molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของ BHD laboratory reagents
- Copper Sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ของ MERCK
- Cobalt Chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของ MERCK
- Magnesium Sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของ J.T. Baker
- Disodium Ethelene Diamine Tetraacetate (Na_2 EDTA) ของ M&B laboratory chemicals
- Ferrous Sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของ MERCK
- i-Inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_9$) ของ Fluka
- Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) ของ Fluka
- Nicotinic Acid ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) ของ Fluka
- Pyridoxine.HCl ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$) ของ MERCK
- Thiamine.HCl ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS.HCl}$) ของ Fluka
- Casein-Hydrolysate ของ Fluka
- Benzyladenine , BA ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_9$) ของ Fluka
- Naphthylene acetic acid , NAA ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$) ของ Fluka
- Hydrochloric (HCl) ของ J.T. Baker
- Sodium Hydroxide (NaOH) ของ MERCK
- Sucrose ($\text{C}_6\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)
- Agar
- Clorox
- Tween-20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 - แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
 ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ศึกษาการออกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร

3.2.1.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้ง

เตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige&Skoog (MS , 1962) และสูตร MS ดัดแปลง (MS1) ตามภาคผนวก ก. โดยใส่ขูดเพาะเลี้ยงขูดละประมาณ 20 มิลลิกรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

3.2.1.2 การเตรียมคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้ง

- นำเมล็ดส้มมาล้างน้ำ ผึ่งลมให้แห้งแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อต้องการใช้ให้นำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 วินาที โดยทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
- ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมทวิน-20 ประมาณ 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- เทน้ำกลั่นทิ้ง

3.2.1.3 การถ่ายคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- นำเมล็ดวางบนจานแก้ว
- ใช้ปากคิบแกะเปลือก และเยื่อหุ้มเมล็ดออก แยกเมล็ดออกเป็นคัพภะได้ 2-4 คัพภะต่อเมล็ด
- นำแต่ละคัพภะปักลงในอาหารเพาะเลี้ยงให้ลึกลงไปพอที่จะคงตัวอยู่ได้ โดยทำการเพาะ 1 คัพภะต่อขวด
- นำขูดเพาะเลี้ยงไปไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์
- ตรวจสอบและบันทึกจำนวนคัพภะสัมพันธ์ที่งอกในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS และ MS1 โดยทำในระยะเวลาแต่ละสัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ใช้เฉพาะในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 ศึกษาการเจริญของต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร

นำขวดเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ที่เลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ออกมาเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง สังกะและบันทึกผลการเจริญของต้นกล้าสัม โดยวัดความสูงในแต่ละสัปดาห์

3.2.3 การขยายพันธุ์สัมพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2.3.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีน (BA) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ตาข้างอายุต่างๆ เกิดยอด

- นำต้นกล้าสัมที่มีอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ ออกจากขวดเพาะเลี้ยง
- ตัดส่วนรากทิ้ง และตัดส่วนของลำต้นที่เหลือออกเป็น 3 ส่วน ตามแนวขวาง ได้แก่ ส่วนยอด ส่วนลำต้น และส่วนโคนลำต้นซึ่งมีตาข้างอยู่
- นำส่วนโคนลงเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สังเกตและบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์ เป็นเวลา 90 วัน

3.2.3.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีน (BA) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ปล้องอายุต่างๆ เกิดยอด โดยปฏิบัติตามข้อ 3.2.3.1 ทุกประการ แต่เปลี่ยนชิ้นส่วนเริ่มต้นจากส่วนโคนเป็นส่วนลำต้น

3.2.3.3 การศึกษาระดับความเข้มข้นของแนฟทะดินแอซิดิกแอซิด (NAA) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ยอดอายุต่างๆ เกิดราก

นำส่วนยอดที่มีอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ ซึ่งได้จากการตัดแยกในข้อ 3.2.3.1 ลงเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตและบันทึกจำนวนยอดที่เกิดรากในแต่ละสัปดาห์ เป็นเวลา 90 วัน เมื่อต้นสัมแข็งแรงดี ก็ย้ายลงปลูกในดินต่อไป โดยล้างรากให้สะอาดก่อน

8.2.4 การต่อปลายยอดสั้มพันธุ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ

8.2.4.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงต้นที่ต่อปลายยอด

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ดัดแปลง (MS2) ตามภาคผนวก ก. โดยใส่ในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร หลอดละ 25 มิลลิลิตร ภายในหลอดมีกระดาษกรองเจาะรูตรงกลางเพื่อให้รากจุ่มอยู่ในอาหารและช่วยพยุงต้นไว้ นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำต่อไป

8.2.4.2 การเตรียมต้นตอสั้มพันธุ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์

นำเมล็ดสั้มมาปฏิบัติตามข้อ 3.2.1.2 และ 3.2.1.3 ทุกประการ โดยลงเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

8.2.4.3 การเตรียมปลายยอดสั้มพันธุ์น้ำผึ้ง

นำยอดอ่อนของสั้มพันธุ์น้ำผึ้งที่ได้จากการขยายพันธุ์จากการปฏิบัติตามข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 มาตัดใบออกให้เหลือแต่ปลายยอดและใบอ่อน

8.2.4.4 ขั้นตอนการต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 12)

- นำต้นกล้าสั้มพันธุ์คาร์ริโซที่ได้จากการปฏิบัติตามข้อ 3.2.4.2 มาตัดปลายยอดและใบเลี้ยงออก จนเหลือต้นตอยาวประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร และตัดปลายรากออกให้เหลือรากยาวประมาณ 3.0-4.0 เซนติเมตร

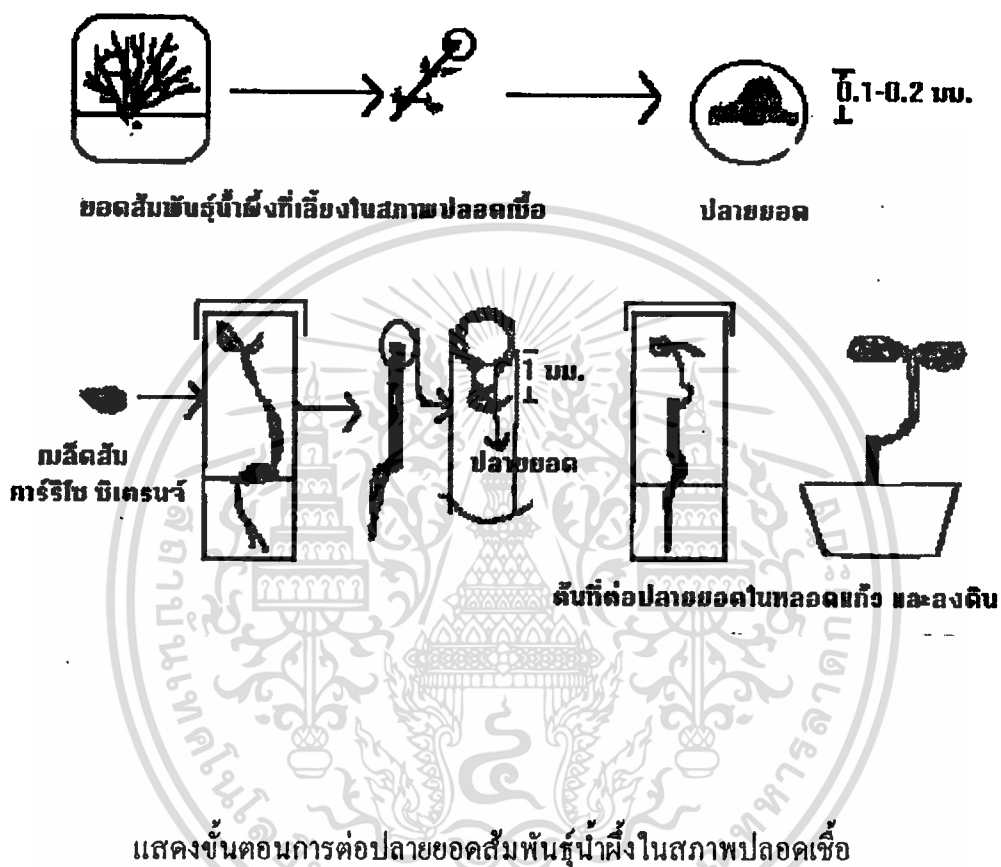
- ใช้ปลายมีดกรีดตรงปลายลำต้นที่ถูกตัดให้เป็นรูปตัวที่หัวกลับ รอยกรีดทั้งแนวตั้งและแนวนอนยาว 1.0 มิลลิเมตร โดยตั้งแต่ขั้นตอนนี้นำเอากล้องจุลทรรศน์สเตอริโอมาช่วยในการปฏิบัติงาน

- นำต้นตอที่กรีดเสร็จแล้ว มาวางในงานแก้วที่รองด้วยกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อเพื่อให้ความชื้น

- นำยอดอ่อนที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.4.3 มาตัดใบอ่อนทิ้ง เหลือส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและจุดเจริญที่จะเติบโตเป็นใบอยู่ 2-3 ใบ

- ตัดปลายยอดยาวประมาณ 0.1-0.2 มิลลิเมตร แล้วนำมาวางในรอยกรีดรูปตัวที่หัวกลับโดยให้ฐานอยู่บริเวณคอเทกซ์ของต้นตอ

ภาพที่ 12



3.2.4.5 การดูแลต้นที่ต่อปลายขอดในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นต่อที่ต่อปลายขอดแล้วไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.4.1 วางหลอดทดลองไว้ในที่มีเป็นเวลา 2-4 วัน จากนั้นนำออกมาวางในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-5 สัปดาห์ จนรอยต่อสมานกันและมีใบคล้อออกมา 2-3 ใบ เลี้ยงต่อไปอีก 2 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกจำนวนต้นที่ต่อปลายขอดสำเร็จ

3.2.4.6 การย้ายต้นที่ต่อปลายขอดสำเร็จลงปลูกในดิน

- นำต้นล้มที่ต่อปลายขอดสำเร็จ และแข็งแรงลงปลูกในกระถางที่มีดินปลูกที่หนึ่ง

น้ำเชื้อแล้ว รดด้วยเกลืออนินทรีย์สูตร MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ยกเว้นแต่มีหนังสือขออนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ในการนำไปใช้

- กลุ่มต้นล้มด้วยถุงพลาสติก วางในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์

- รดด้วยน้ำทุกวัน และรดด้วยเกลืออนินทรีย์สูตร MS สัปดาห์ละครั้ง จนกระทั่งต้นส้มเจริญเติบโตและแข็งแรงดี จึงหยุดรดด้วยเกลืออนินทรีย์สูตร MS
- สังเกตและบันทึกจำนวนต้นส้มที่มีชีวิตรอด

3.2.5 การเก็บรวบรวมผลการวิจัย และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ

- เก็บรวบรวมผลการวิจัยในรูปของตัวเลข การจดบันทึก และภาพถ่ายในแต่ละสัปดาห์
- นำข้อมูลตัวเลขที่วางแผนการวิจัยแบบ Completely Randomized Design (CRD) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติและตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Least Significant Difference Test (LSD) ในหัวข้อ 3.2.1 กับ 3.2.2 ส่วนในหัวข้อ 3.2.3 ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (Little และ Hills 1978)



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ Murashige & Skoog (MS) และสูตร MS ดัดแปลง (MS1) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า มีคัพภะบางส่วนเริ่มงอก โดยที่สังเกตเห็นรากสีขาวอวบงอกออกมาจากส่วนล่างของคัพภะ ซึ่งเดิมคัพภะที่อวบ มีสีขาวออกเหลือง เริ่มเหี่ยว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนจนถึงเขียวเข้ม และเมื่อวัดอัตราการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งในสัปดาห์แรก แสดงให้เห็นว่า คัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS มีอัตราการงอก 5 เปอร์เซ็นต์ โดยต่ำกว่าอัตราการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 ซึ่งเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์

ส่วนคัพภะที่ยังไม่งอกในสัปดาห์แรก จะเริ่มงอกเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 , 3 , 4 และ 5 ซึ่งคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS มีอัตราการงอก 15 , 15 , 20 และ 35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 มีอัตราการงอกคงที่ คือ 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากสัปดาห์ที่ 5 ไปแล้ว ไม่มีคัพภะงอกเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเห็นว่า อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 ให้อัตราการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งสูงกว่าสูตรของ MS ในทุกสัปดาห์ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 จึงมีความเหมาะสมต่อการทำให้คัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งงอกได้ดีกว่าสูตรของ MS ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 13

ตารางที่ 1
แสดงจำนวนการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร
ในสัปดาห์ต่างๆ

สูตรอาหาร	การงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้ง (เปอร์เซ็นต์) ในสัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5
MS	5b	15b	15b	20b	35b
MS1	20a	40a	40a	40a	40a

หมายเหตุ ใช้ LSD ตรวจสอบค่าเฉลี่ยการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้ง
ค่าเฉลี่ยการงอกของคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งที่กำกับตามแนวตั้งด้วยอักษรเดียวกัน แสดงว่า
ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

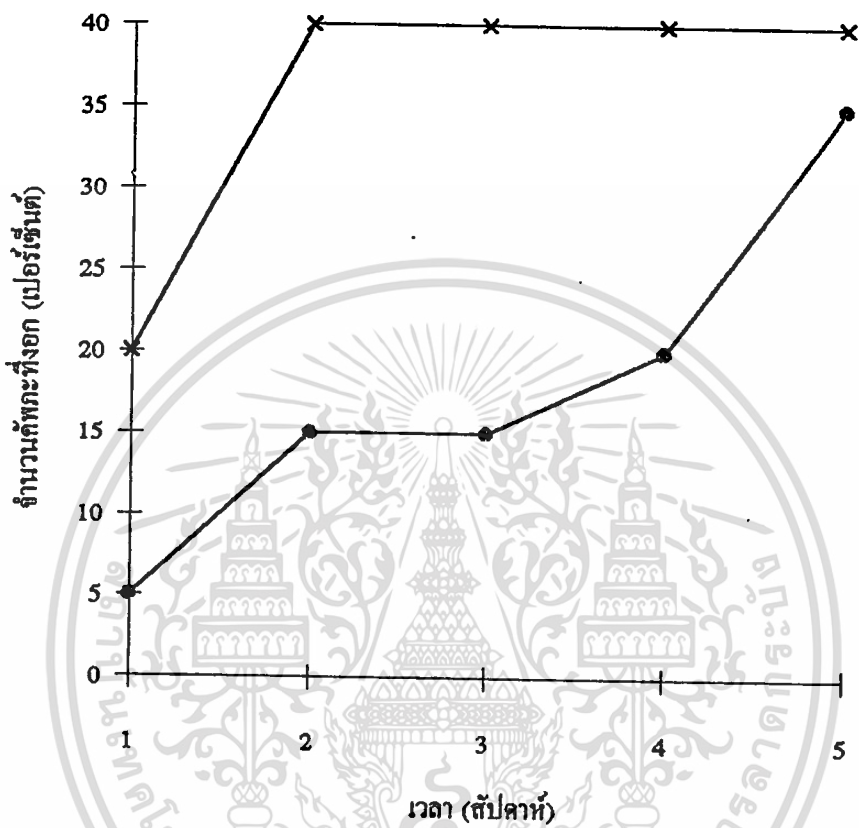
4.2 ผลการศึกษาการเจริญของต้นกล้าสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร

หลังจากคัพภะสัมพันธ์น้ำผึ้งงอกแล้ว (ภาพที่ 14) จะเกิดยอดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยความสูงเฉลี่ยของต้นกล้าสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS เท่ากับ 0.7 เซนติเมตร โดยสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 ซึ่งเท่ากับ 0.6 เซนติเมตร และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ในสัปดาห์ที่ 3 , 4 และ 5 พบว่า ส่วนของลำต้นยืดยาวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ พร้อมทั้งมีใบเพิ่มขึ้นด้วย ต้นสมบูรณ์ จะมีส่วนของใบและลำต้นสีเขียวเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นประมาณ 0.2 เซนติเมตร ขนาดใบกว้างประมาณ 1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร โดยต้นกล้าสัมพันธ์น้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ให้ความสูงเฉลี่ยเป็น 3.6 , 6.5 และ 8.0 เซนติเมตร ตามลำดับ และสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 ซึ่งเท่ากับ 2.4 , 3.4 และ 4.4 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบความสูงเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 3 , 4 และ 5 แสดงให้เห็นว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าสัมพันธ์น้ำผึ้งได้ดีกว่าสูตรของ MS1 ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

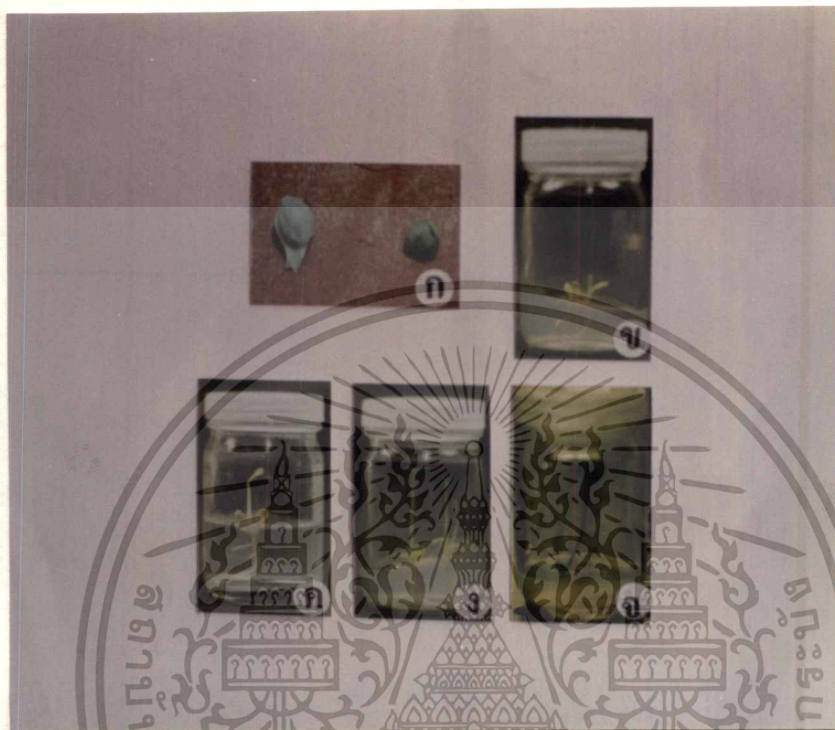
ภาพที่ 13



แสดงจำนวนการงอกของกั๊กกะที่งอกที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร
ในสัปดาห์ต่างๆ

- กั๊กกะที่งอกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS
- x— กั๊กกะที่งอกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS1

ภาพที่ 14



แสดงการเจริญเติบโตของคัพภะสัมพันธุ์น้ำผึ่งในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ก. เมล็ดสัมพันธุ์น้ำผึ่ง
- ข. ต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ่ง เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์
- ค. ต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ่ง เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์
- ง. ต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ่ง เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์
- จ. ต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ่ง เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์

ตารางที่ 2
แสดงการเจริญเติบโตของต้นกล้าสัมพัทธ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร
ในสัปดาห์ต่างๆ

สูตรอาหาร	ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้าสัมพัทธ์น้ำผึ้ง (เซ็นติเมตร) ในสัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5
MS	0.0a	0.7a	3.6a	6.5a	8.0a
MS1	0.0a	0.6a	2.4b	3.4b	4.4b

หมายเหตุ ใช้ LSD ตรวจสอบค่าความสูงเฉลี่ยของต้นกล้าสัมพัทธ์น้ำผึ้ง
ค่าความสูงเฉลี่ยของต้นกล้าสัมพัทธ์น้ำผึ้งที่กำกับตามแนวตั้งด้วยอักษรเดียวกัน
แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

4.3 ผลการขยายพันธุ์สัมพัทธ์น้ำผึ้งปลอดโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

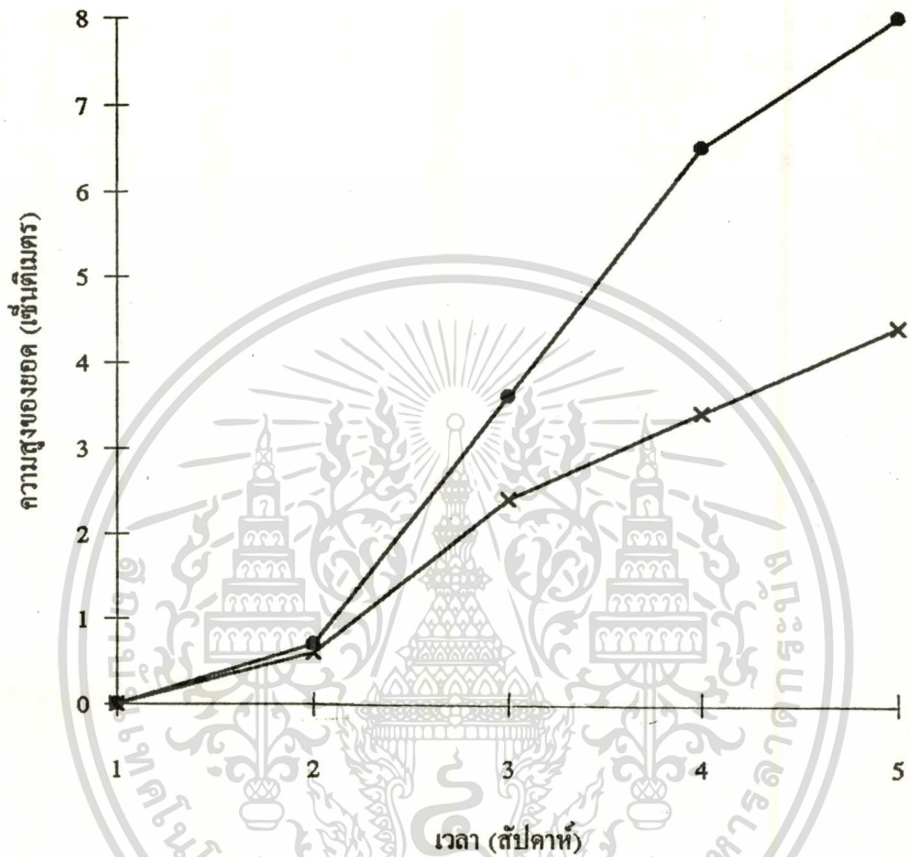
4.3.1 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีน (BA) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้
ตาข้างอายุต่างๆ เกิดยอด

เมื่อนำตาข้างของสัมพัทธ์น้ำผึ้งอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะ
เลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0
มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า ตาข้างอายุ 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 16) มีแนวโน้มให้จำนวน
ยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ
BA เพิ่มขึ้น โดยที่ BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 10.67 ยอด ส่วน
ตาข้างอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 17) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 23.33 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงใน
อาหารที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงใน
อาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น

เมื่อเพาะเลี้ยงตาข้างอายุ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 18) ในอาหารที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้
จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 16.33 ยอด และให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร
ที่มี BA เพิ่มขึ้น เว้นแต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 13.33 ยอด และ

ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 15



แสดงการเจริญเติบโตของต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร
ในสัปดาห์ต่างๆ

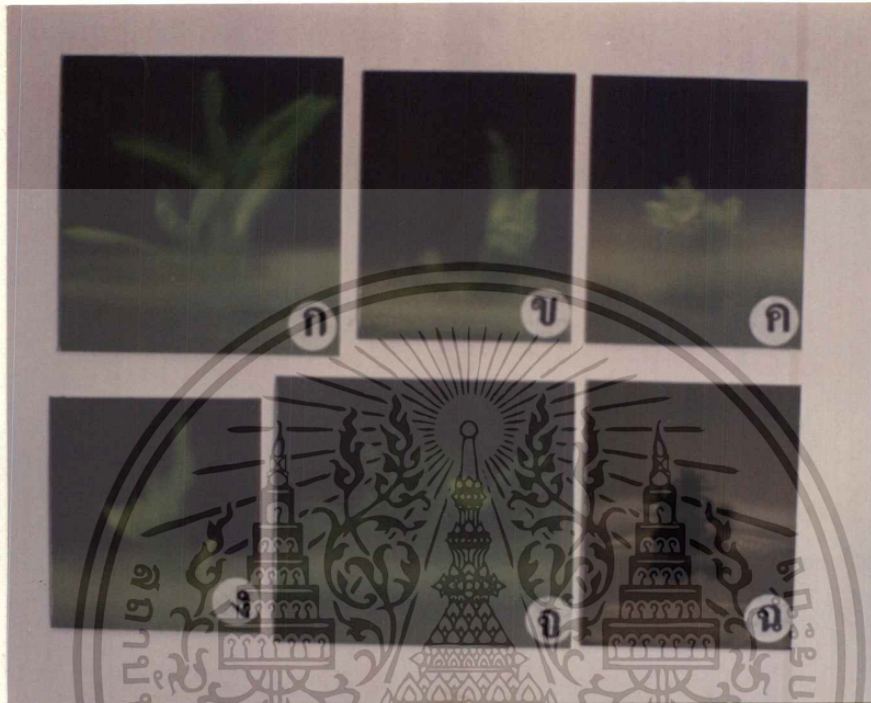
- ต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร MS
- x— ต้นกล้าสัมพันธุ์น้ำผึ้งที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร MS1

กับจำนวนยอคเฉลี่ยสูงสุด ส่วนตาข้างอายุ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 19) มีแนวโน้มให้จำนวนยอคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น โดยจำนวนยอคเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 16.00 ยอค เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ที่ระดับ BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอคเฉลี่ยลดลง และตาข้างอายุ 10 สัปดาห์ (ภาพที่ 20) ให้จำนวนยอคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 9.67 ยอค แต่ให้จำนวนยอคเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนยอคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเท่ากับ 8.33 ยอค โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอคเฉลี่ยสูงสุด

เมื่อเพาะเลี้ยงตาข้างอายุต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่ไม่มี BA ให้จำนวนยอคเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.00 ยอค โดยตาข้างอายุ 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาได้แก่ ตาข้างอายุ 6 , 8 , 2 และ 10 สัปดาห์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า อายุของตาข้างสัมพันธ์น้ำฟุ้งที่น้อยกว่า หรือมากกว่า 4 สัปดาห์ ต้องการระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น เพื่อชักนำให้ตาข้างเกิดเป็นยอคสูงสุด โดยการเพาะเลี้ยงตาข้างของสัมพันธ์น้ำฟุ้งที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอค คือเท่ากับ 23.33 ยอค และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงตาข้างอายุต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 21

ส่วนการเกิดแคลลัส พบว่ามีการเกิดแคลลัสขนาดเล็กที่ส่วนโคนและรอยตัดของชิ้นส่วน โดยในสูตรที่มี BA 0.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสสีเขียวเข้ม และในสูตรที่มี BA 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีสีเขียวอ่อนจนถึงเหลือง

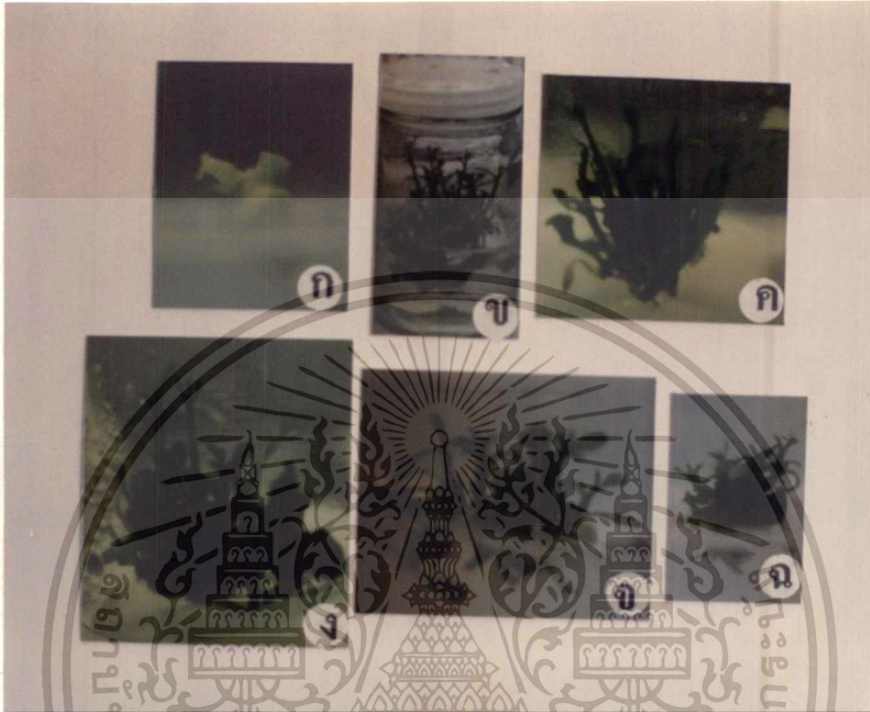
ภาพที่ 16



แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์น้ำผิ้อายุ 2 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

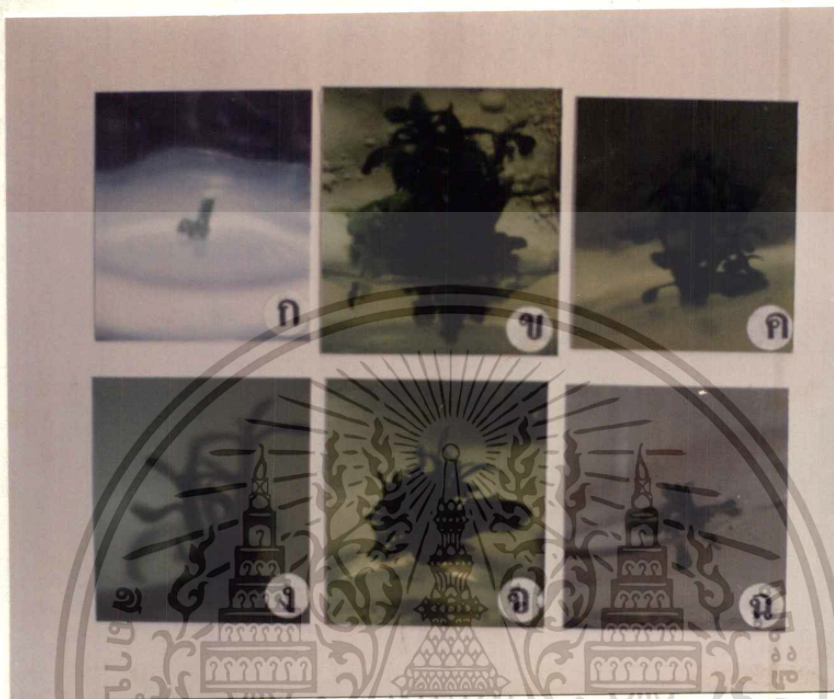
ภาพที่ 17



แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์กับน้ำผึ้งอายุ 4 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

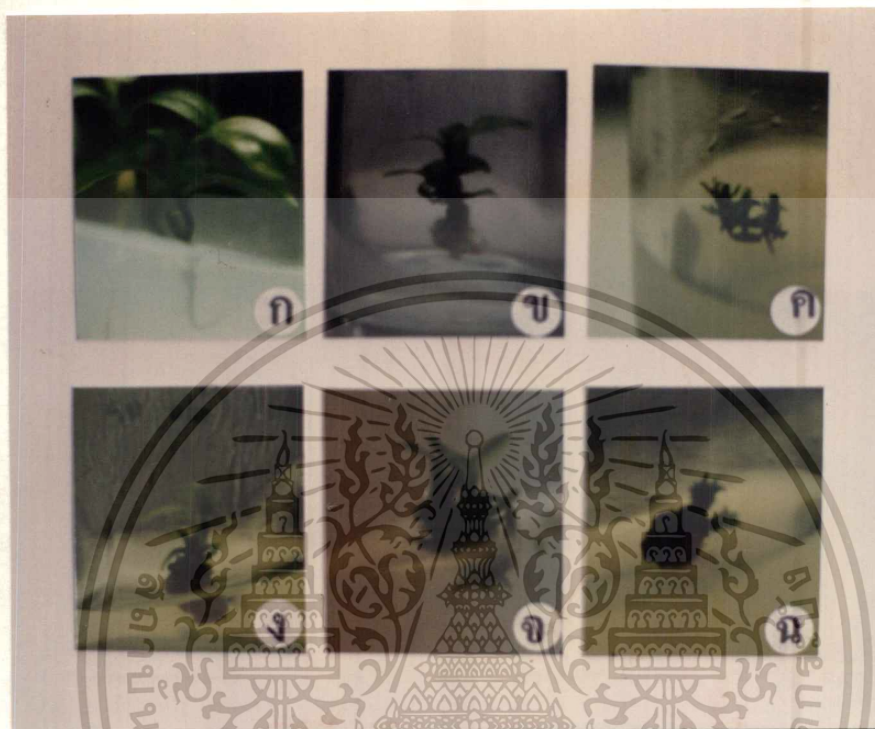
ภาพที่ 18



แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์กับน้ำเลี้ยงอายุ 6 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

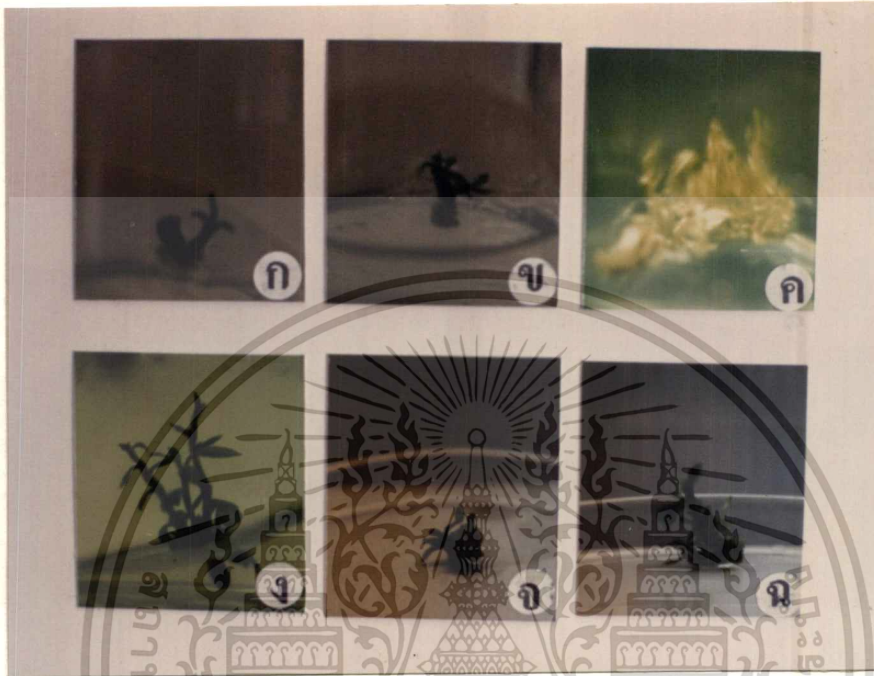
ภาพที่ 19



แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์น้ำเลี้ยงอายุ 8 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 20



แสดงการเพาะเลี้ยงตาข้างสัมพันธ์น้ำผึ้งอายุ 10 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3

แสดงจำนวนยอคเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตาข้างของสั้มพันธุ์น้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บนอาหาร
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ
เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

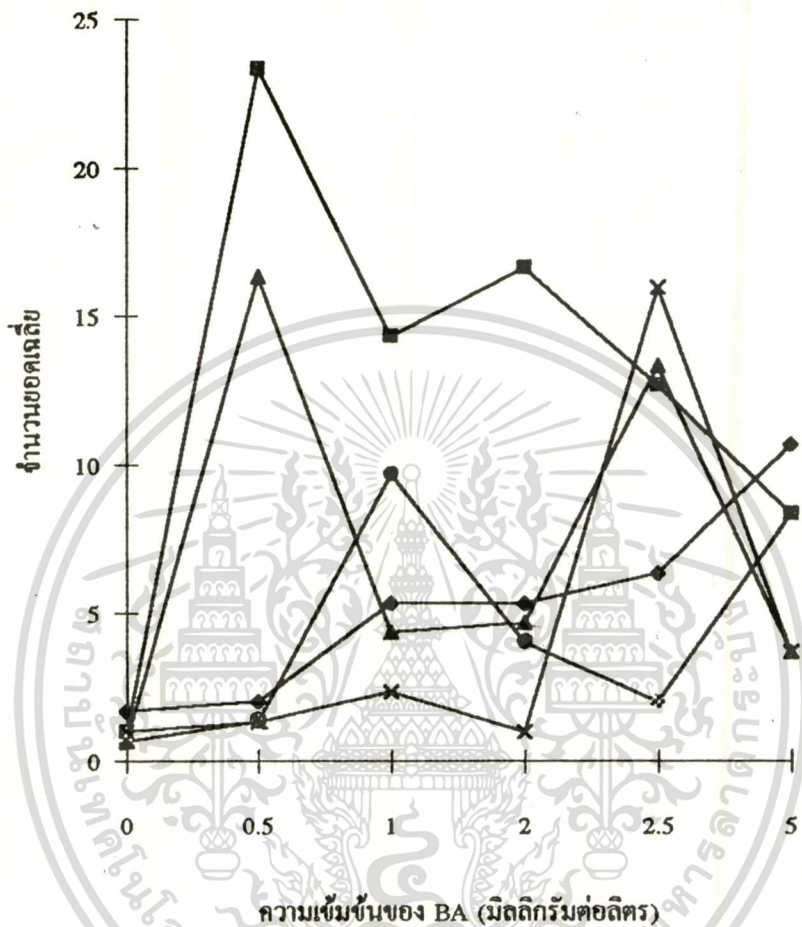
ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอคเฉลี่ยที่เกิดจากตาข้างอายุ (สัปดาห์)				
	2	4	6	8	10
0.0	1.67jkl	1.00kl	0.67l	1.00kl	0.67l
0.5	2.00jkl	23.33a	16.33bc	1.33jkl	1.33jkl
1.0	5.33ghi	14.33bcd	4.33hijk	2.33ijkl	9.67f
2.0	5.33ghi	16.67b	4.67hij	1.00kl	4.00hijkl
2.5	6.33gh	12.67de	13.33cde	16.00bc	2.00jkl
5.0	10.67ef	8.33fg	3.67hijkl	3.67hijkl	8.33fg

หมายเหตุ ใช้ DMRT ตรวจสอบจำนวนยอคเฉลี่ยจากตาข้างของสั้มพันธุ์น้ำผึ้ง
จำนวนยอคเฉลี่ยจากตาข้างของสั้มพันธุ์น้ำผึ้งที่กำกับด้วยอักษรเดียวกัน แสดงว่า
ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

4.3.2 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของเบนซิลอะดีนีน (BA) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้
ปล้องอายุต่างๆ เกิดยอด

เมื่อนำปล้องของสั้มพันธุ์น้ำผึ้งอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0
มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า ปล้องอายุ 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 22) มีแนวโน้มให้จำนวน
ยอคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ
BA เพิ่มขึ้น โดยที่ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 10.00 ยอด และ
จำนวนยอคเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงใน
อาหารที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับให้จำนวนยอคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอีก ส่วนปล้องอายุ 4 สัปดาห์
(ภาพที่ 23) ให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 22.00 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 0.5

ภาพที่ 21



แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตัวข้างของสัมันธุ์น้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บน
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ
เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

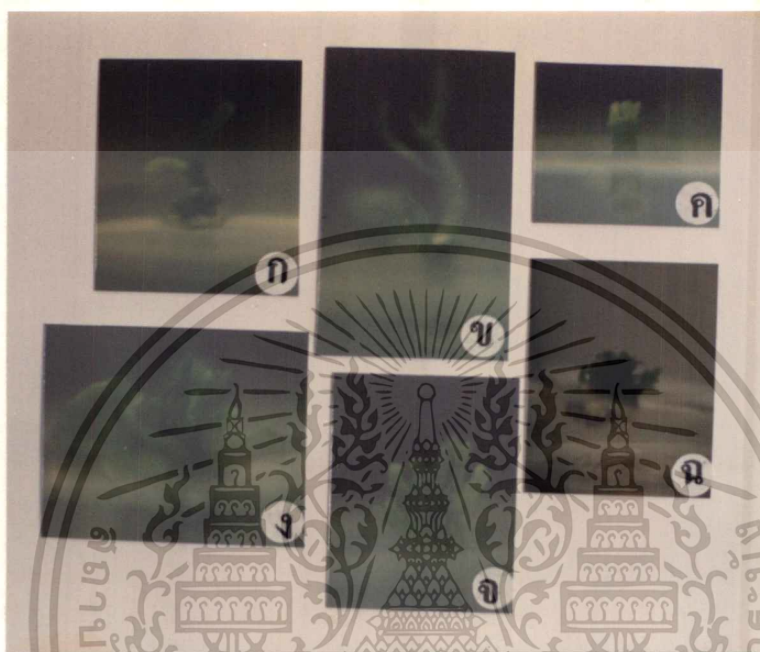
- ◆ แทนตัวข้างอายุ 2 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- แทนตัวข้างอายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- ▲ แทนตัวข้างอายุ 6 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- × แทนตัวข้างอายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- แทนตัวข้างอายุ 10 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ

มิลลิกรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มให้จำนวนยอคเฉลี่ยลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น

เมื่อเพาะเลี้ยงปล้องอายุ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 24) ในอาหารที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 13.33 ยอค และให้จำนวนยอคเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น ส่วนปล้องอายุ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 25) ให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 5.33 ยอค เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จำนวนยอคเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น และปล้องอายุ 10 สัปดาห์ (ภาพที่ 26) ให้จำนวนยอคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอคเฉลี่ย เท่ากับ 5.67 ยอค แต่ให้จำนวนยอคเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนยอคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 7.67 ยอค โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยเปรียบเทียบจำนวนยอคเฉลี่ยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อเพาะเลี้ยงปล้องอายุต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่ไม่มี BA ให้จำนวนยอคเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.00 ยอค โดยตาข้างอายุ 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอคเฉลี่ยสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ตาข้างอายุ 6 , 2 , 10 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า อายุของปล้องสัมพันธ์น้ำฟุ้งที่น้อยกว่า หรือมากกว่า 4 สัปดาห์ ต้องการระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น เพื่อชักนำให้ปล้องเกิดเป็นยอคสูงที่สุด โดยการเพาะเลี้ยงปล้องของสัมพันธ์น้ำฟุ้งที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอค คือเท่ากับ 20.00 ยอค และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงปล้องอายุต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 27 ส่วนการเกิดแคลลัสเหมือนกับการเพาะเลี้ยงข้อ

ภาพที่ 22

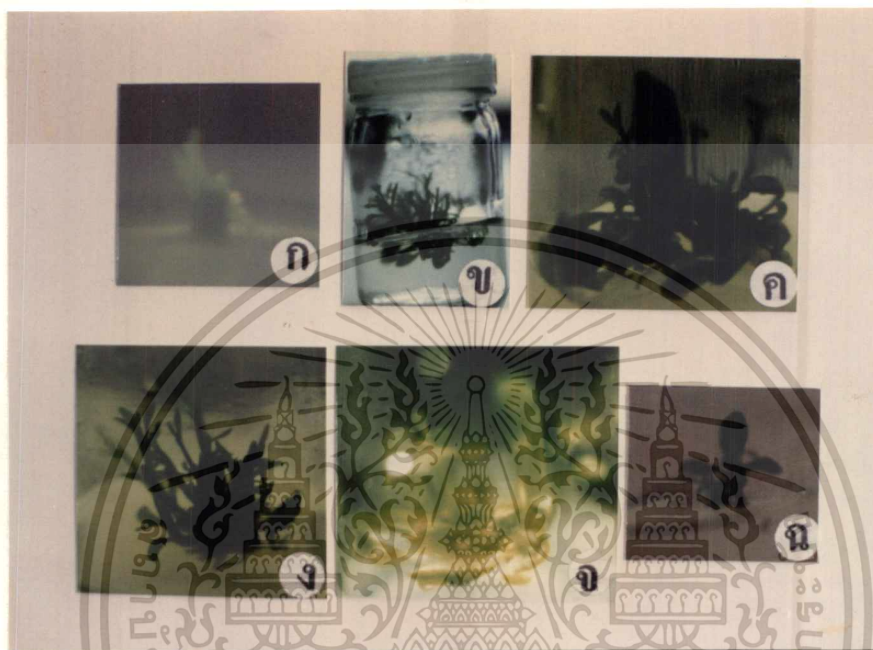


แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัมพันธ์น้ำฝ้ายอายุ 2 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร

MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

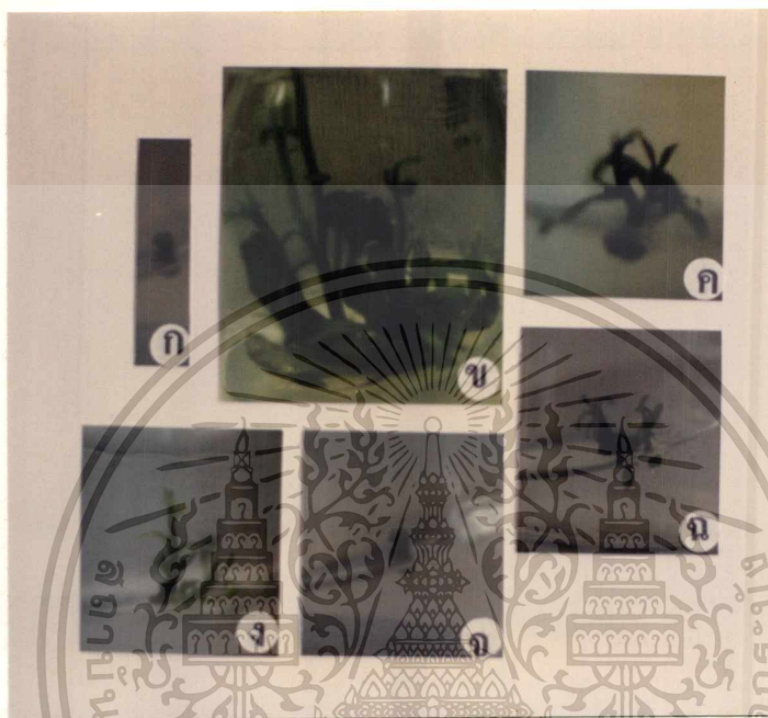
ภาพที่ 23



แสดงการเพาะเลี้ยงปลีอองส้มพันธุ์น้ำผึ้งอายุ 4 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ปลีอองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ปลีอองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ปลีอองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ปลีอองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ปลีอองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ปลีอองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

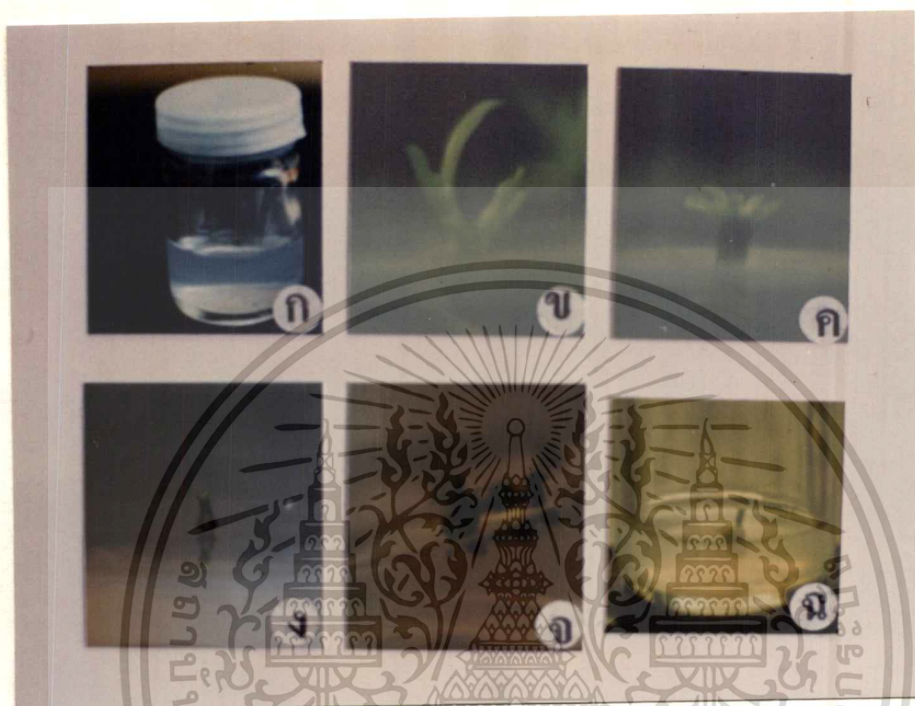
ภาพที่ 24



แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัณฐานผู้นำกิ่งอายุ 6 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 25

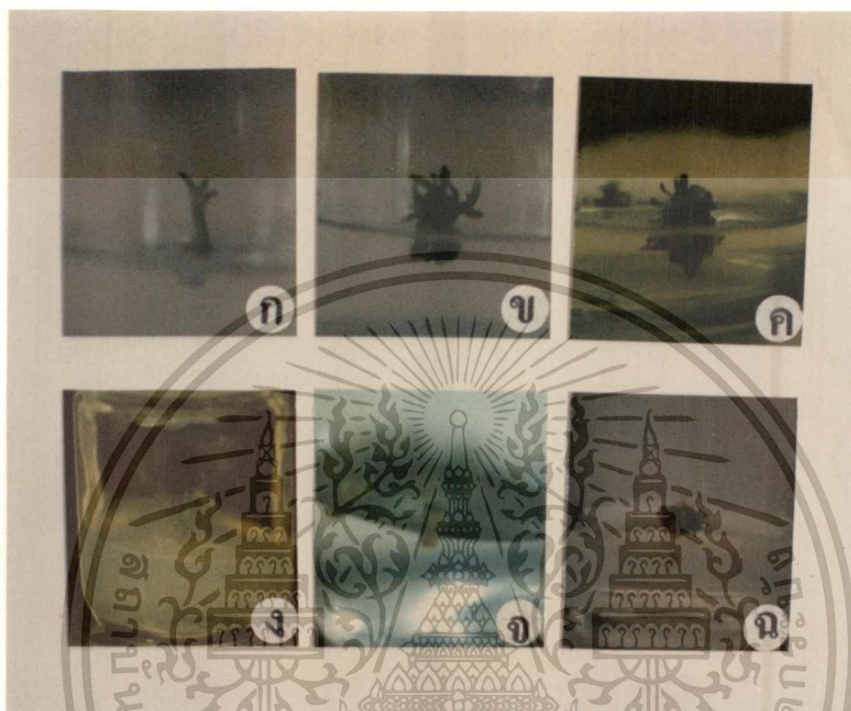


แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัณฐานพื้นฐานน้ำฟุ้งอายุ 8 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร

MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 26



แสดงการเพาะเลี้ยงปล้องสัณฐานพื้นฐานน้ำผึ้งอายุ 10 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

- ก. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4

แสดงจำนวนยอคเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงปล้องของสัณฐานน้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บนอาหาร
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ
เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอคเฉลี่ยที่เกิดจากปล้องอายุ (สัปดาห์)				
	2	4	6	8	10
0.0	1.00hi	0.33i	0.00i	0.00i	0.33i
0.5	4.00fghi	22.00a	13.33b	3.67fghi	1.33hi
1.0	3.67fghi	10.33bc	2.00hi	5.33efgh	5.67defgh
2.0	10.00bcd	9.67bcde	3.00ghi	1.00hi	1.67hi
2.5	6.67cdefg	5.33efgh	0.33i	2.00hi	1.33hi
5.0	8.67cde	4.00fghi	2.00hi	0.00i	7.67cdef

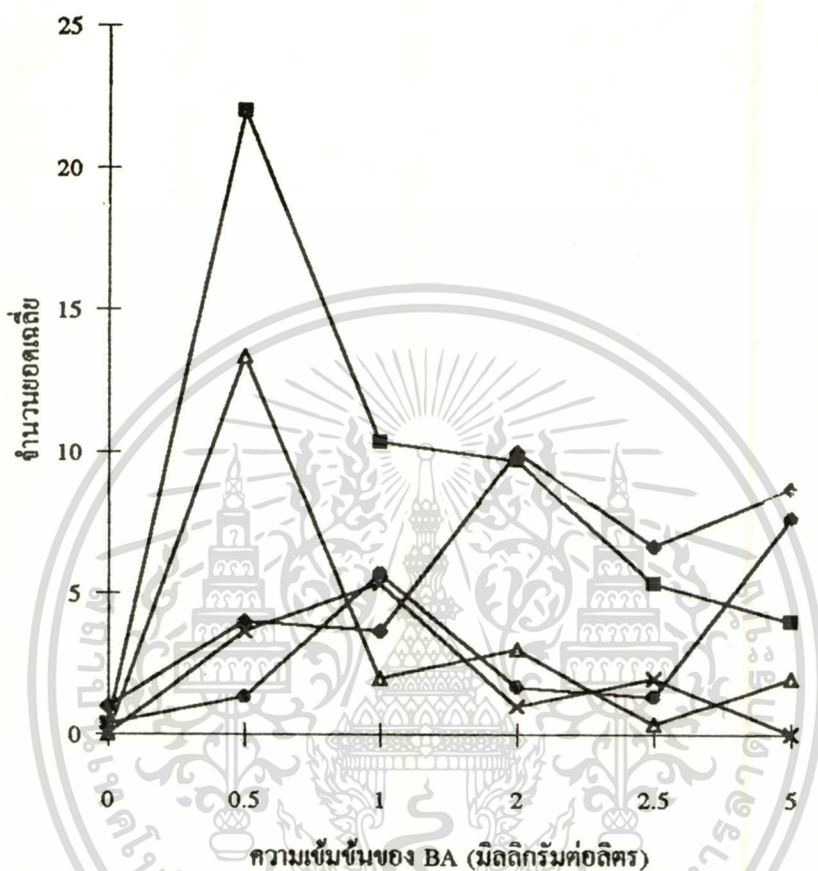
หมายเหตุ ใช้ DMRT ตรวจสอบจำนวนยอคเฉลี่ยจากปล้องของสัณฐานน้ำผึ้ง
จำนวนยอคเฉลี่ยจากปล้องของสัณฐานน้ำผึ้งที่กำกับด้วยอักษรเดียวกัน แสดงว่า
ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

**4.3.3 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของแนฟเทดินแอซิดิกแอซิด (NAA) ที่เหมาะสมต่อ
การชักนำให้ยอดอายุต่างๆ เกิดราก**

เมื่อนำยอดของสัณฐานน้ำผึ้งอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะ
เลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5
มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า ยอดอายุ 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 28) มีแนวโน้มให้จำนวน
รากเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ
NAA เพิ่มขึ้น โดยที่ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ย เท่ากับ 4.50 ราก และจำนวน
รากเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่
มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับให้จำนวนรากเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงที่สุด เท่ากับ 5.00 ราก ซึ่งไม่
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์โดยเปรียบเทียบกับจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 27



แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงปล้องของส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ
บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ
เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

- ◆— แทนปล้องอายุ 2 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- แทนปล้องอายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- ▲— แทนปล้องอายุ 6 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- ×— แทนปล้องอายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ
- แทนปล้องอายุ 10 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ต่างๆ

รากเฉลี่ยเมื่อเพาะเลี้ยงยอดในอาหารที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนยอดอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 29) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 9.50 ราก และให้จำนวนรากเฉลี่ยลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น

เมื่อเพาะเลี้ยงยอดอายุ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 30) ให้จำนวนรากเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น โดยยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 32.50 ราก และให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนยอดอายุ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 31) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 30.50 ราก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนรากเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น และยอดอายุ 10 สัปดาห์ (ภาพที่ 32) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 10.50 ราก และมีแนวโน้มให้จำนวนรากเฉลี่ยลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น

ส่วนใหญ่ การเพาะเลี้ยงยอดอายุต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่ไม่มี NAA และมี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยต่ำที่สุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยยอดอายุ 6 สัปดาห์ ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ คาข้างอายุ 8 , 10 , 4 และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ยอดสัปดาห์น้ำผึ่งที่มีอายุน้อยๆ มีแนวโน้มต้องการระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น เพื่อชักนำให้ยอดเกิดเป็นราก โดยการเพาะเลี้ยงยอดของสัปดาห์น้ำผึ่งที่มีอายุ 6 สัปดาห์ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก คือเท่ากับ 32.50 ราก และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงยอดอายุต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 33 ส่วนการเกิดแคลลัส พบว่าเกิดแคลลัสที่ส่วนโคนของชิ้นส่วนในทุกสิ่งทดลอง และต้นสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ในดินได้ (ภาพที่ 34)

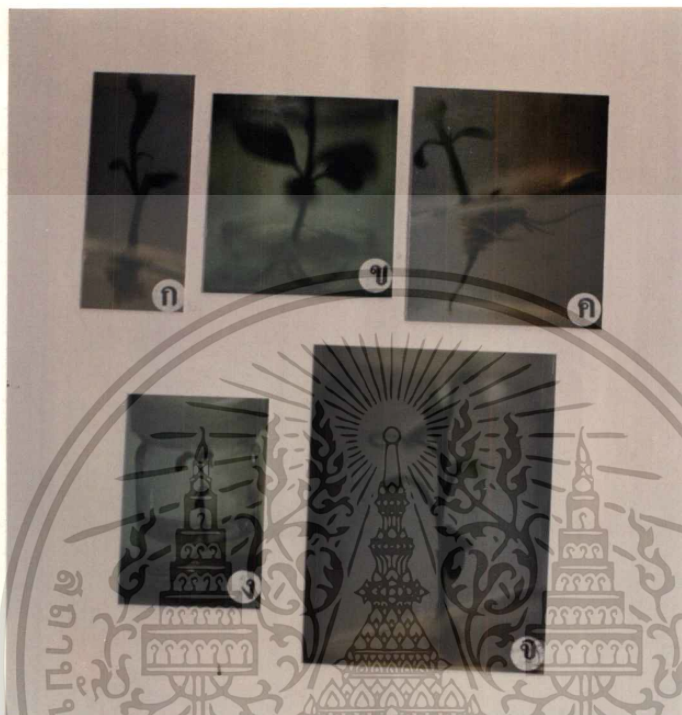
ภาพที่ 28



แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัมน้ำฝัองอายุ 2 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ

- ก. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

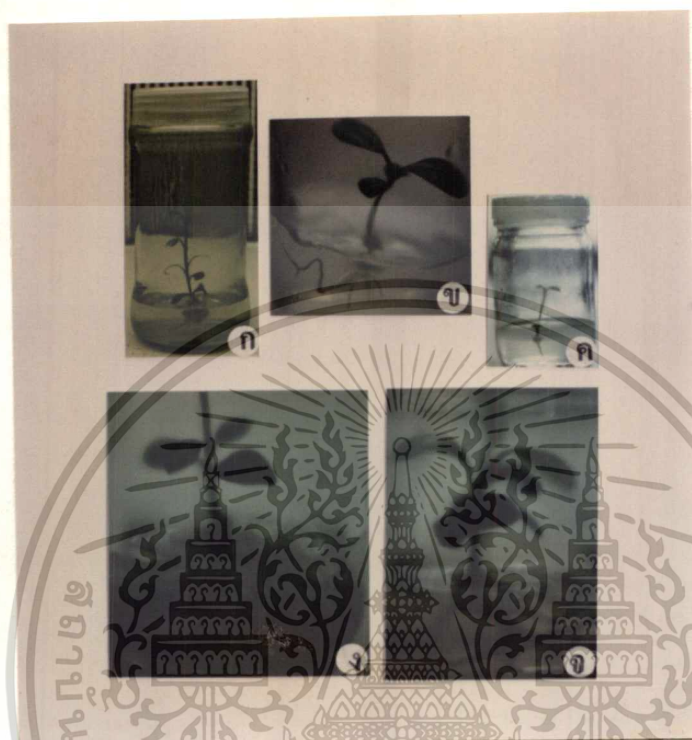
ภาพที่ 29



แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัมน้ำฝัองอายุ 4 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ

- ก. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

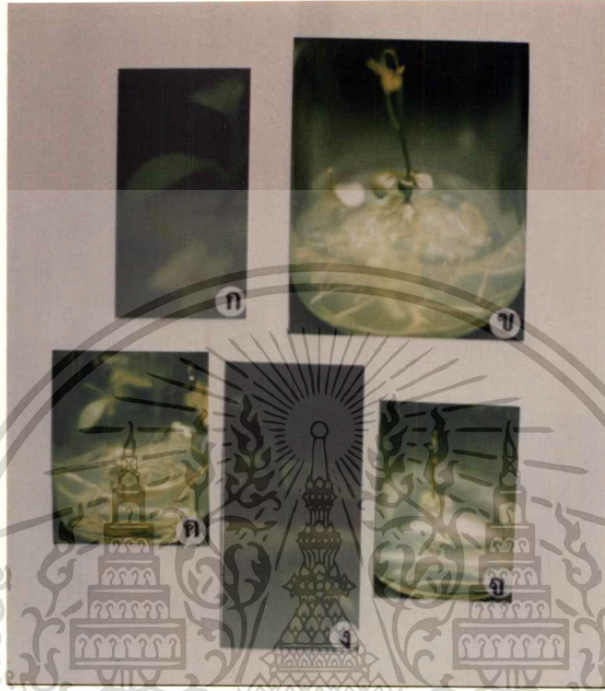
ภาพที่ 30



แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัมน้ำฝัองอายุ 6 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ

- ก. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 31



แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัมน้ำผิ้อายุ 8 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ

- ก. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 32



แสดงการเพาะเลี้ยงยอดสัมน้ำฝัองอายุ 10 สัปดาห์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ

- ก. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 5

แสดงจำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดของสั้มน้ำฝั้ที่มีอายุต่างๆ บนอาหาร
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ
เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

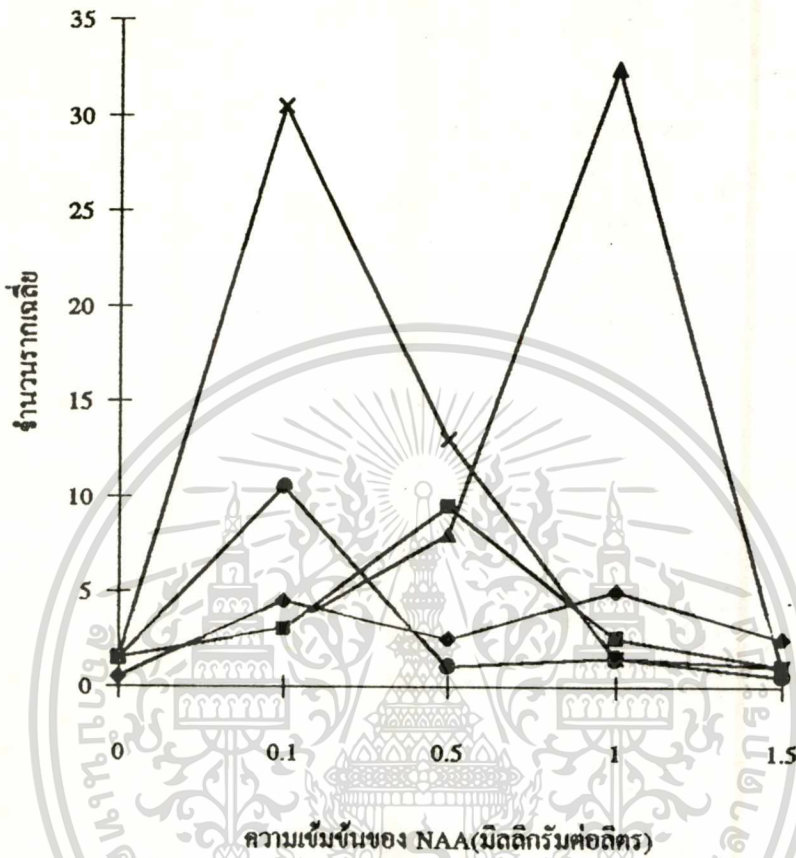
ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดจากยอดอายุ (สัปดาห์)				
	2	4	6	8	10
0.0	0.50e	1.50e	1.50e	1.50e	1.50e
0.1	4.50cde	3.00de	3.00de	30.50b	10.50bc
0.5	2.50de	9.50bcd	8.00bcde	13.00b	1.00e
1.0	5.00cde	2.50de	32.50a	1.50e	1.50e
1.5	2.50de	1.00e	1.00e	1.00e	0.50e

หมายเหตุ ใช้ DMRT ตรวจสอบจำนวนรากเฉลี่ยจากยอดของสั้มน้ำฝั้
จำนวนรากเฉลี่ยจากยอดของสั้มน้ำฝั้ที่กำกับด้วยอักษรเดียวกัน แสดงว่า
ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

4.4 ผลการต่อปลายยอดสั้มน้ำฝั้ในสภาพปลอดเชื้อ

จากการต่อปลายยอดสั้มน้ำฝั้บนต้นตอของสั้มน้ำฝั้คาร์ริโซ ชิเตรนจ์ที่มีอายุ 2 สัปดาห์
และนำไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อพบว่า สั้มน้ำฝั้ที่ต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อเป็นผลสำเร็จ
43.54 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 6) โดยต้นที่ต่อปลายยอดสำเร็จ จะมีใบอ่อนเจริญออกมาตรงบริเวณ
รอยกรีดรูปตัวทีหัวกลับทางด้านข้างของสั้มน้ำฝั้ หลังจากการต่อปลายยอดเป็นเวลาประมาณ 3-5
สัปดาห์ และมีใบ 2-3 ใบ ก็ย้ายลงดินปลูกในกระถาง (ภาพที่ 35) โดยต้นสั้มน้ำฝั้ 75 เปอร์เซนต์
สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้

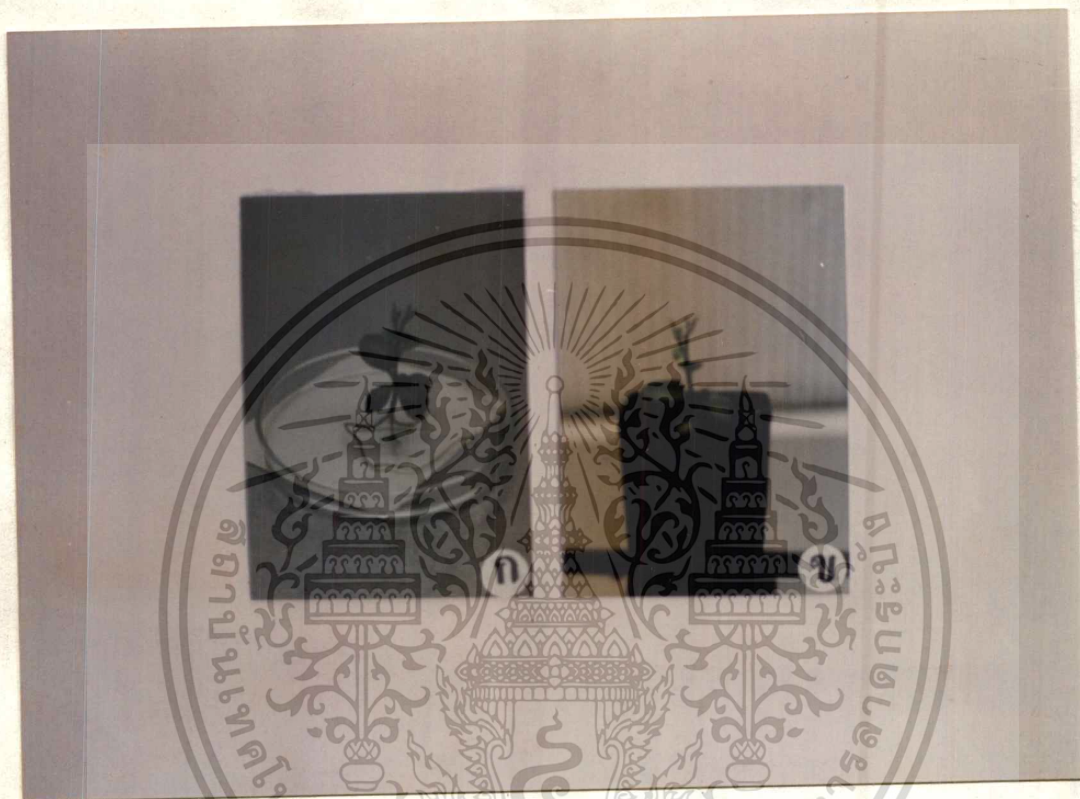
ภาพที่ 33



แสดงจำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดของสั้มพันธุ์น้ำผึ้งที่มีอายุต่างๆ บน
บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ
เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

- ◆— ยอดอายุ 2 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ต่างๆ
- ยอดอายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ต่างๆ
- ▲— ยอดอายุ 6 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ต่างๆ
- ×— ยอดอายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ต่างๆ
- ยอดอายุ 10 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ต่างๆ

ภาพที่ 34



แสดงต้นสัมพันธู์น้ำผึ้งที่ชักนำให้เกิดราก และย้ายปลูกลงดินในกระถาง

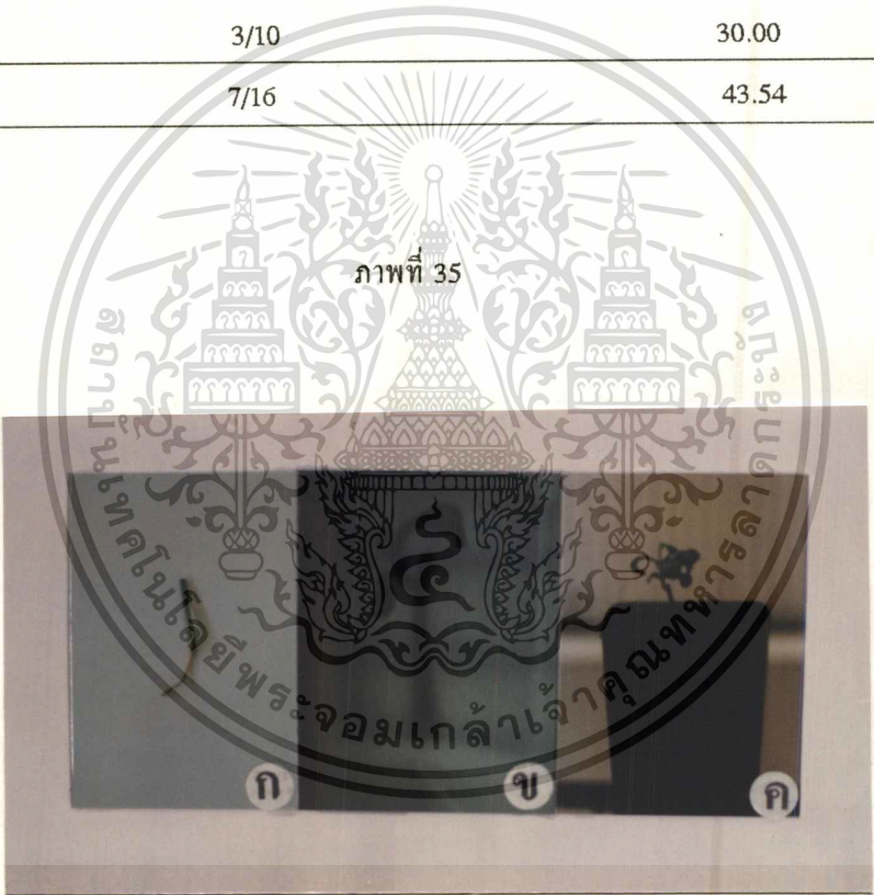
ก. ยอดสัมพันธู์น้ำผึ้งที่ชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์

ข. ต้นสัมพันธู์น้ำผึ้งที่ปลูกลงดิน

ตารางที่ 6

แสดงเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการต่อปลายยอดสัมพันธ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ

ครั้งที่	จำนวนต้นที่ต่อปลายยอดสำเร็จ/จำนวนต้นที่ทำ	เปอร์เซ็นต์การต่อปลายยอดสำเร็จ
1	4/10	40.00
2	2/3	66.67
3	6/16	37.50
4	3/10	30.00
เฉลี่ย	7/16	43.54



แสดงการต่อปลายยอดสัมพันธ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ

- ก. ต้นตอของต้นกล้าสัมพันธ์คาร์ริโซ ชิเตรนจ์
- ข. ปลายยอดสัมพันธ์น้ำผึ้งที่ต่อบนต้นตอสัมพันธ์คาร์ริโซได้สำเร็จ
- ค. ต้นสัมพันธ์ต่อปลายยอดสำเร็จแล้ว และย้ายปลูกลงดินในกระถาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรค โดยศึกษาการเจริญเติบโต และสภาพที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคให้ได้จำนวนมากและรวดเร็ว พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 เหมาะสมต่อการงอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้งได้ดีกว่าสูตรของ MS โดยให้อัตราการงอกของคัพภะ 40 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องมาจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 มีการลดปริมาณไนเตรท โพแทสเซียม และแอมโมเนียมลง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรของ MS ทำให้อัตราการงอกของคัพภะสูงขึ้น และเมื่อเลี้ยงต่อไป ต้นกล้าที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าส้มพันธุ์น้ำผึ้งได้ดีกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS1 ให้ความสูงเฉลี่ย 8.0 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในกุหลาบ (Hyndman และคณะ 1982) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีการลดปริมาณไนโตรเจนลงจนถึงไม่มีเลย สามารถกระตุ้นให้เกิดรากได้ดีกว่าสูตรของ MS ที่มีไนโตรเจนรวมปกติ อาจเนื่องมาจากกระตุ้นไนโตรเจนไอออนที่ต่ำมีผลต่อการกระตุ้นให้ IAA ที่มีอยู่ในพืชทำหน้าที่สร้างรากได้ (Trewavas 1983) และในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS มีปริมาณไนเตรท โพแทสเซียม และแอมโมเนียมพอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้คืออยู่แล้ว

ส่วนการใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นของส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่แตกต่างกัน คือ ตาข้าง และปล้อง ที่มีอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงตาข้างและปล้องที่มีอายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 23.33 และ 20.00 ยอด ตามลำดับ ซึ่ง BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินตัวหนึ่ง ที่ทำให้เกิดการพัฒนาของจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นในการเพาะเลี้ยงตาข้างของส้มในสภาพปลอดเชื้อ (Altman และ Goren 1974) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงตาข้างของแอปเปิ้ลในอาหารที่มี BA ยังผลให้เกิดการพัฒนาของยอดได้มากกว่า 1 ยอดอีกด้วย (Dutcher และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Powell 1972) และงานทดลองในปลับจีนยังพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอดได้ดี (Qi-quang 1986) ส่วนตาข้างและปล้องที่มีอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ ต้องการระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดต่ำกว่าที่ระดับอายุ 4 สัปดาห์ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากตาข้างและปล้องมีอายุน้อย และ/หรือมากเกินไป จึงยากต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

เมื่อนำยอดเดี่ยวๆ ที่มีอายุ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี NAA 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงยอดเดี่ยวๆ ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากจำนวนมาก โดยให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดที่ 32.50 ราก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในส้มของ Kitto และ Young (1981) ว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดเกิดเป็นรากได้สมบูรณ์ ส่วนยอดที่ระดับอายุน้อยต้องการระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น เพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากจำนวนมาก แต่ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดต่ำกว่าที่ระดับอายุมาก ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากยอดที่มีอายุน้อยนั้น ยากต่อการชักนำให้เกิดรากจำนวนมาก และเมื่อย้ายต้นส้มที่สมบูรณ์ แข็งแรงไปลงดินปลูกในกระถาง สามารถมีชีวิตรอดได้

ส่วนการต่อปลายยอดสัมพันธ์น้ำผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ โดยวางปลายยอดที่ได้จากการเพาะเมล็ด ซึ่งถือได้ว่าปลอดโรค (McClellan 1957 ; Garnsey และคณะ 1977) ลงในรอยกรีดรูปตัวที่หัวกลับบนต้นตอของต้นกล้าสัมพันธ์คาร์ริโซ ซีเตรนจ์ที่เพาะในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า 43.54 เปอร์เซ็นต์ สามารถต่อปลายยอดได้สำเร็จ และเมื่อยอดมีใบ 2-3 ใบ ย้ายลงดินปลูกในกระถางได้สำเร็จ ทั้งนี้ การต่อปลายยอดที่ประสบความสำเร็จได้นั้น เนื่องมาจากลำต้นของต้นกล้าที่เจริญในที่มืด มีลักษณะที่อวบหนา สีเขียว และสูงกว่าต้นกล้าที่เจริญในที่มีแสง โดยการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเอพิคอตทิล และความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นของต้นกล้าที่เจริญในที่มืดนั้น ยังสูงกว่าต้นกล้าที่เจริญในที่มีแสงอีกด้วย (Herman และ Hess 1963) นอกจากนี้ อายุของต้นกล้ายังมีผลต่อการต่อปลายยอดให้ประสบความสำเร็จได้ โดยพบว่า ต้นกล้าที่เพาะในที่มืด อายุ 2 สัปดาห์ มีความเหมาะสมต่อการต่อปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าอายุต่างๆ ซึ่งการต่อปลายยอดบนต้นกล้าอายุมากกว่า 2 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าส่วนของปลายยอดแห้ง มีสีน้ำตาล และตายในที่สุด ทั้งนี้ อาจเกิดจากมีความชื้นไม่เพียงพอ ส่วนต้นกล้าอายุน้อยกว่า 2 สัปดาห์ พบว่าปลายยอดไม่มีการเปลี่ยนแปลงและถูกฝังอยู่ในแคลลัสที่สร้างขึ้นมากเกินไปจากเนื้อเยื่อของต้นตอ และการตัดยอดที่เกิดจากตาข้างของต้นกล้าทั้งนั้นมีความจำเป็น เนื่องจากมีผลทำให้การเจริญเติบโตของปลายยอดที่นำมาต่อปลายยอดลดลง การต่อปลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยอดที่ประสบผลสำเร็จจะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของปลายยอดเพิ่มขึ้น แต่ส่วนของพืชที่ปลอดไวรัสจะลดลง (Navarro และคณะ 1975)

จากงานวิจัยนี้สามารถขยายพันธุ์สัมพันธุ์น้ำผึ้งปลอดโรคได้ แต่ต้นสัมอาจกลับไปติดเชื้อโรคอีกได้ ถ้ามีการดูแลรักษาไม่ดีหรือไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงควรใช้พันธุ์ปลอดโรคในสวนใหม่ โดยห่างไกลจากสวนเก่า ควบคุมแมลงพาหะ ถ้าตรวจพบสัมที่ปลูกเป็นโรคควรรีบกำจัดเสีย และอย่านำต้นสัมที่เป็นโรคเข้าไปในสวนเป็นอันตราย นอกจากนี้ ควรพยายามหาความรู้อยู่เสมอ เพื่อจะได้ข้อมูลที่ถูกต้อง



บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. สถิติการเพาะปลูกไม้ผลไม้ยืนต้น ปีการเพาะปลูก 2531/32 เล่ม 2.

กรุงเทพฯ. : ฝ่ายวิเคราะห์ข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กองแผนและโครงการพิเศษ กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ , 2533.

เกรียงไกร ไทยอ่อน. “กรมวิชาการฯ ทำสำเร็จเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นคอสมอสพันธุ์ต่างประเทศ” เคลวินส์ , 6 มกราคม 2538 , หน้า 11.

จารุวรรณ จาติเสถียร. “การเลี้ยงเนื้อเยื่อสัมพันธ์กับงานโรคพืช.” วารสารกสิกร. ปีที่ 68 , ฉบับที่ 6 (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2538) : 524-528.

ไชยา อุ้ยสูงเนิน. การปลูกส้มเขียวหวาน. กรุงเทพฯ. : เรื่องแสงการพิมพ์ , 2531.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. ฮอว์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. กรุงเทพฯ. : สหมิตรออฟเซต , 2537.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ. : โอเคียนสโตร์ , 2536.

เปรมปรี ฌ สงขลา. ทำสวนส้มอย่างมืออาชีพ. กรุงเทพฯ. : ฝ่ายข้อมูลวารสารเคหะเกษตร , 2532.

ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ. : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2524.

ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. การปลูกส้ม. กรุงเทพฯ. : โครงการหนังสือคู่มือการประกอบอาชีพสำหรับประชาชน , 2528.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ. : ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2536.

สัญญาชัย ตันตยาภรณ์ และคนอื่นๆ. “การผลิตพันธุ์ส้มปลอดโรค.” รายงานผลงานวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ , 2538.

อุบล คือประโคน และคนอื่นๆ. “ศึกษาเชื้อรา *Phytophthora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มจากแหล่งปลูกส้มต่างๆ.” รายงานผลงานวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ , 2532.

อุบล คือประโคน , ไมตรี พรหมมินทร์ และ ชนวัฒน์ กำแหงฤทธิ์รงค์. “แนวทางฟื้นฟูการทำสวนส้ม.” เอกสารเผยแพร่ในงานนิทรรศการทางวิชาการเรื่องส้ม จัดโดยบริษัทไบเออร์ไทย จำกัด ณ โรงแรมรามาร์คเด็นท์ , 7 กันยายน 2538.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Altman , A. and R. Goren. "Promotion of Callus Formation by Absciscic Acid in Citrus Bud Cultures." Plant Physiol. , no.47 (1971) PP.844-846.
- Altman , A. and R. Goren. "Growth and Domancy Cycles in *Citrus* Bud Cultures and Their Hormonal Control." Physiol. Plant. , no.30 (1974) PP.240-245.
- Amin , M. N. and S. Akhtar. "Regeneration of Plants from Seedling Explants of Pomelo [*Citrus grandilis* (L.) Osb.]." Plant Tissue Culture. , no.3 (1993) PP.71-79.
- Annie , S. , A. Mouras and A. Lutz. "Plant Regeneration from Citrus Root Meristems." J. Hort. Sci. , no.57 (1982) PP.227-231.
- Aubert , B. "Report on Citriculture in Thailand." Report Submitted by UNDP-FAO to the Government of Thailand. , 1989.
- Barlass , M. and K. G. M. Skene. "In Vitro Plantlet Formation from *Citrus* Species and Hybrids." Sci. Hort. , no.17 (1982) PP.333-341.
- Barlass , M. and K. G. M. Skene. Citrus (Citrus Species) : Biotechnology In Agriculture and Forestry , no. 1. New York : Springer , 1986.
- Bhojwani , S. S. and M. K. Razdan. Production of Pathogen-Free Plants : Developments in Crops Science (5) Plant Tissue Culture. Netherlands : Elisevier Science , 1983.
- Bitter , W. P. and others. Investigation on Establishing Virus-Free Citrus Plants through Tissue Culture : Proc. 5th Conf. Intern. Org. Citrus Virol. Gainesville Univ. : FL Press , 1972.
- Calavan , E. C. , C. N. Roistacher and E. M. Nauer. "Thermotherapy of Citrus for Inactivation of Certain Viruses." Plant Dis. Rep. , no.36 (1972) PP.976-980.
- Chaturvedi , H. C. and G. C. Mitra. "Clonal Propagation of Citrus from Somatic Callus Cultures." HortSci. , no.9 (1974) PP.118-120.
- Chen , Z. and others. Citrus : Handbook of Plant Cell Culture no. 6. USA : Mc Graw-Hill , 1990.
- Costa , A. S. "Present Status of the Tristeza Disease of Citrus in South America." FAO Plant Protection Bulletin. , no.4 (1956) PP.97-105.
- Dickson , R. C. , R. A. Flock and M. Johnson. "Insect Transmission of Citrus Quick Decline Virus." J. Econ. Ent. , no.44 (1951) PP.172-176.
- Doorenbos , J. "Rejuvenation of *Hedera helix* in Graft Combination." , no.115 (1953).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dutcher , R. D. and L. E. Powell. "Culture of Apple Shoots from Buds *in vitro*." I. Amer. Soc. Hort. Sci. , no.97 (1972) PP.511-514.
- Fawcett , H. S. and J. M. Wallace. "Evidence of the Virus Nature of Citrus Quick Decline." Citrograph. , no.32 (1946) PP.50.
- Garner , R. J. Methods of Grafting : The Grafters' Handbook. London : Faber and Faber , 1979.
- Garnsey , S. M. , D. Gonsalver. and D. E. Purcifull. "Mechanical Transmission of Citrus Tristeza Virus." Phytopathology. , no.67 (1977) PP.965-968.
- Giladi , I. , A. Altman. and R. Goren. "Differential Effects of Sucrose , Absciscic Acid and Benzyladenine on Shoot Growth and Callus Formation in the Abscission Zone of Excised Citrus Buds." Plant Physiol. , no.59 (1977) PP.1161-1164.
- Grewal , H. S. , A. S. Dhatt. and S. S. Gasal. "Plantlet Regeneration from Callus Cultures in Citrus." Plant Tissue Culture. , no.4 (1994) PP.9-16.
- Herman , D. E. and C. E. Hess. "The Effect of Etiolation upon the Rooting of Cuttings." Proc. Intern. Plant. Prop. Soc. , no.13 (1963) PP.42-62.
- Hidaka , T. and I. Kajiura. "Plantlet Differentiation from Callus Protoplasts Induced from Citrus Embryo." Scientia Horticulturae. , no.34 (1988) PP.85-92.
- Holmes , F. O. "Elimination of Spemivirus from the Nightingale Chrysanthemum." Phytopathol. , no.46 (1956) PP.599-600.
- Hyndman , S. E. , P. M. Hasegawa. and R. A. Bressan. "Stimulation of Root Initiation from Cultured Rose Shoots Through the Use of Reduced Concentrations of Mineral Salts." HortScience. , no.17 (1982) PP.82-83.
- Ieki , H. and I. Y. Shun. Inactivation of Citrus Tristeza Virus (CTV) wiht Heat Treatment: Heat Tolerance and Inactivation of CTV on Rootstock-Scion Combination. Proc. 8th Conf. Intern. Org. Citrus Virol. Gainesville Univ. : FL Press , 1980.
- Jonard , R. Micrografting and its Application to Tree Improvment : Biotechnology in Agriculture and Forestry. no. 1. New York : Springer , 1986.
- Jude , W. G. and J. L. Chandler. "In Vitro Multiplication of Swingle Citrumelo Rootstock with Coumarin." HortSci. , no.21 (1986) PP.518-520.

- Morel , G. and C. Martin. "Guerison de Dahlias Attenints d'une Maladie a Virus." CR.Heb. Seances. Acad. Sci. no.235 (1952) PP.1325-1325.
- Murashige , T. "Plant Propagation through Tissue Cultures." Ann. Rev. Plant Physiol. no.25 (1974) PP.135-166.
- Murashige , T. and F. Skoog. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture." Physiol. Pla. no.15 (1962) PP.473-497.
- Murashige , T. and others. "A Technique of Shoot Apex Grafting and Its Utilization Towards Recovering Virus-Free Citrus Clones." HortSci. no.7 (1972) PP.118-119.
- Nauer , E. M. and others. "In Vitro Shoot-Tip Grafting to Eliminate Citrus Viruses and Virus-Like Pathogens Produces Uniform Budlines." HortSci. no.18 (1983) PP.308-309.
- Navarro , L. , C. N. Roistacher and T. Murashige. "Improvement of Shoot-Tip Grafting In Vitro for Virus-Free Citrus." J. Amer. Soc. Hort. Sci. no.100 (1975) PP.471-479.
- Navarro , L. , C. N. Roistacher and T. Murashige. Effect of Size and Source of Shoot-Tips on Psorsis-A and Excortis Content of Navel Orange Plants Obtained by Shoot-Tip Grafting In Vitro : In Proc. 7th Conf. Intern. Org. Citrus Virol. California : Riverside Univ. , 1976.
- Novak , F. J. Plant Tissue Culture Techniques for Mutation Breeding : A Training Manual. Austria : n.p. , 1990.
- Nyland , G. and A. C. Goheen. "Heat Therapy of Virus Disease of Perennial Plants." Ann. Rev. Phytopath. no.7 (1969) PP.331-334.
- Omura , M. and T. Hidaka. "Shoot Tip Culture of Citrus no.1 : Culture Conditions." Bulletin of the Fruit Tree Research Station. no.22 (1992) PP.23-36.
- Pierik , R. L. M. Production of Disease-Free Plant : In Vitro Culture of Higher Plants. Netherlands : Martinus Nijhoff , 1987.
- Qi-quang , Y. and others. "Effect of Cytokinin, IBA and Rooting Regime on Chinese Chestnut Cultured In Vitro." HortScience. no.21 (1986) PP.133-134.
- Roberta , H. S. Plant Tissue Culture Technique and Experiments. California : Academic Press , 1992.
- Roistacher , C. N. , L. Navarro and T. Murashige. Recovery of Citrus Selections Free of Several Viruses , Excortis Viroid and Spiroplasma citri by Shoot-Tip Grafting In Vitro :

- Schwarz , R. E. , L. C. Knorr and P. Maitree. "Greening-Cause of a Recent Decline of Citrus in Thailand : UNDP-FAO THA 68/526 Report." Plant Protection Service Bulletin. no.20 (1973) PP.18.
- Sim , G. E. ,C. J. Goh and C. S. Loh. "Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco-Multiple Bud Formation from Shoot and Root Explants in the Presence of 6-Benzylaminopurine." Plant Sci. no.59 (1989) PP.203-210.
- Singh , S. and others. "In Vitro Propagation of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus limon* Burm. f." HortSci. no.29 (1994) PP.214-216.
- Skoog , F. and C. O. Miller. "Chemical regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured *in Vitro*. Sym. Soc. Exp. Bio. no.11 (1957) PP.118-131.
- Su , H. J. and J. Y. Chu. "Modified Technique of Citrus Shoot-Tip Grafting and Rapid Propagation Method to Obtain Citrus Budwoods Free of Citrus Viruses and Libukin Organism." Proc. Int. Soc. Citriculture. no.1 (1984) PP.332-334.
- Trewavas , A. J. Nitrate as a Plant Hormone : Biotechnology in Agriculture and Forestry. no. 17. Berlin : Springer-Verlag , 1983.
- Wang , P. J. and A. Charles. Micropropagation through Meristem Culture : Biotechnology in Agriculture and Forestry 17 High-Tech and Micropropagation I. Germany : Springer , 1991.
- White , P. R. "Multiplication of the Viruses of Tobacco and *Aucuba* Mosaics in Growing Excised Tomato Root Tips. Phytopathology. no.24 (1934) PP.1003-1011.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS , MS1 และ MS2 (Murashige และ Skoog 1962 ; Navarro 1975)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้(มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	MS1	MS2
NH_4NO_3	1,650.00	-	1,650.00
KNO_3	1,900.00	-	1,900.00
KCl	-	29.80	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00	88.80	440.00
KH_2PO_4	170.00	81.60	170.00
H_3BO_3	6.20	0.04	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.90	2.00	6.90
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.14	0.04	6.14
KI	0.83	0.04	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	-	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	440.00	48.00	440.00
Na_2EDTA	37.25	-	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	2.00	27.85
i-Inositol	100.00	-	100.00
Glycine	2.00	-	-
Nicotinic acid	0.50	1.00	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้(มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	MS1	MS2
Pyridoxine.HCl	0.50	0.20	1.00
Thiamine.HCl	0.10	0.20	0.20
Casein Hydrolysate	-	500.00	-
Sucrose	3,000.00	4,000.00	3,000.00
Agar	1,000.00	1,000.00	-
pH	5.70	5.70	5.7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เลือกสูตรอาหารที่ใช้
2. ทำการจัดแบ่งกลุ่มอาหารเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม
3. คัดเอาสารละลายจากสารละลายเข้มข้นต่างๆ มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรในแต่ละสารละลายเข้มข้นตามที่ได้คำนวณไว้ เช่น ต้องการเตรียมสารละลาย NH_4NO_3 1650 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารละลายเข้มข้น NH_4NO_3 100 เท่า
คือ สารละลาย NH_4NO_3 1650 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตร
สารละลายเข้มข้น NH_4NO_3 100 เท่า เท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร
ดังนั้น มี NH_4NO_3 165 กรัม ในสารละลาย 1000 มิลลิลิตร
ถ้าต้องการ NH_4NO_3 1.65 กรัม ใช้สารละลาย $(1000 \times 1.65)/165 = 10$ มิลลิลิตร
 $\therefore$ คัดสารละลายเข้มข้น NH_4NO_3 10 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
4. เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งก็คือน้ำตาลซูโครส
5. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่นๆ ตามความต้องการของผู้วิจัย
6. ปรับปริมาตรให้ครบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม
7. ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง อยู่ในช่วง 5.7-5.8 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและโพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์เป็นบัฟเฟอร์
8. เติมน้ำ (ในกรณีที่เตรียมอาหารแข็ง)
9. ellowอาหารเพื่อหลอมวุ้น โดยใช้เตาควบคุมความร้อนหรือเตาแก๊ส หรือเตาไมโครเวฟก็ได้
10. เทอาหารลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยง เช่น ขวด หลอดทดลอง หรือขวดรูปชมพู่
11. นำอาหารที่เทลงขวดเรียบร้อยแล้ว ไปเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลาประมาณ 15-20 นาที อาหารที่นึ่งแล้วเมื่อทิ้งไว้ให้เย็น ก็สามารถนำไปใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวรัฐครรช เอี่ยมไพบูลย์ เกิดวันที่ 14 พฤศจิกายน 2514 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาวិทยาสตรบัณฑิต สาขาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2536 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2537 จนถึงปีการศึกษา 2540



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้