สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ระบบการเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้าโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นางสาว สุธิดา อำนวยพาณิชย์
นางสาว อรวรรณ ชลวาณิชย์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43966
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

.b.....
.i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Regenerate system of grasses by tissue culture technique

Suthida Aumnuapanich

Orawan Chonvanich

Special project submitted in Partial fulfillment of the requirement

For the degree of Bachelor of Science

Departmant of Applied Biology Faculty of Science

King Mongkut's institute of Technology Ladkrabang

2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ระบบการเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้าโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
Regenerate system of grasses by tissue culture technique

โดย นางสาวสุธิดา อำนวยพาณิชย์ รหัสประจำตัว 41053081
นางสาวอรวรรณ ชลวาณิชย์ รหัสประจำตัว 41053087

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์) ประธานกรรมการ

(อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี) กรรมการ

(ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ระบบการเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้าโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
โดย	นางสาว สุธิดา อำนวยพาณิชย์ รหัสประจำตัว 41053081
	นางสาว อรวรรณ ชลวาณิชย์ รหัสประจำตัว 41053087
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

การเจริญเป็นแคลลัสของหญ้าแพรก โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในสูตรอาหาร MS และ LS ที่เติม 2 ,4-D 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ โพรลีน 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะที่เกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ (friable) จากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้บนอาหารสูตร LS ที่เติม ซีเอทิน 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม 2,4-D ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 สัปดาห์ จะชักนำแคลลัสให้เป็นเอ็มบริโอจินิค และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ ในสูตรอาหาร LS ที่เติมซีเอทินเพื่อชักนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสให้เป็นต้น เมื่อต้นหญ้ามีรากที่สมบูรณ์แล้ว นำมาศึกษาการเจริญในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ โดยนำไปปลูกลงดิน พบว่าสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุดคือ MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพรลีน1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่ชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นเอ็มบริโอจีนิคดีที่สุดคือ LS ที่เติม เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มี 2,4-D และเติมซีเอทินปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าต้นหญ้าสามารถอยู่รอดในสภาวะธรรมชาติได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title	Regenerate system of grasses by tissue culture technique
Name	Suthida Amnuaypanich 41053081
	Orawan Chonvanich 41053087
Project Advisor	Assist. Prof. Anurug Poeaim
Department	Applied Biology
Academic Year	2001

Abstract

Callus regeneration from seed-derived callus culture of *Cynodon spp.* was test on MS and LS medium. Both medium contained 3 and 5 mg/l 2,4-D 100 mg/l casein hydrolysate and 500 and 1,000 mg/l L-proline. Explants of all genotypes produced callus by the end of 4 weeks dark incubation peroid at 25 to 28°C. Which callus showed friable callus when subcultured onto fresh LS medium supplemented with 0.5, 1.0 and 1.5 mg/l zeatin and 0 mg/l 2,4-D at 25 to 28 °C with 16 hours photoperiod, callus became embryogenic within 2 to 8 weeks of incubation and subculturing at 4 weeks intervals. Some plantlets were regenerated from each callus transfer to soil. Conclusion MS supplemented 5 mg/l 2,4-D , 100 mg/l casein hydrolysate and 1,000 mg/l L-proline showed highest callus and LS supplemented with 1.5 mg/l zeatin and 0 mg/l 2,4-D showed highest purple spot. Plantlets from tissue culture can growth on soil in natural condition.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบของพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ในการค้นคว้าวิจัย การทำงาน ความเอาใจใส่ดูแลในการทำโครงงาน และตรวจทานการเขียนโครงงานฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ และ อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี ที่ให้คำแนะนำ และตรวจทานโครงงานฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งบุคคลากรให้ห้องธุรการ และทางภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่อนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สถานที่การทำงานจนทำให้สามารถดำเนินโครงงานจนเสร็จสมบูรณ์ได้

นางสาวสุธิดา อำนวยพาณิชย์
นางสาวอรวรรณ ชลวาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	27
ภาคผนวก	28
เอกสารอ้างอิง	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร MS	22
รูปที่ 2	กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร LS	22
รูปที่ 3	แสดงการพัฒนาองแคลลัสจากเมล็ดไปเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส	23
รูปที่ 4	แสดงจุดสีม่วงที่เกิดบนแคลลัส	25
รูปที่ 5	แสดงการเกิดราก และลำต้นที่เกิดจากแคลลัสที่เป็นจุดสีม่วง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ตารางแสดงความแตกต่างของพืช 3 ตระกูล	4
ตารางที่ 2	ระดับความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารสูตร MS	19
ตารางที่ 3	ระดับความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารสูตร LS	19
ตารางที่ 4	ขนาดของแคลลัสที่การเจริญเติบโตในอาหารสูตร MS	21
ตารางที่ 5	ขนาดของแคลลัสที่การเจริญเติบโตในอาหารสูตร LS	21
ตารางที่ 6	จำนวนแคลลัสที่เกิดตุ่มสีม่วงในอาหารสูตร LS ที่ระดับความเข้มข้นของซีอะตินต่างกัน	24
ตารางที่7	แสดงจำนวนต้นหญ้าที่มีการเจริญเติบโตได้ในสภาวะธรรมชาติ	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

หญ้าเป็นวัชชพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งมีทั้งประโยชน์ และโทษ โดยมีโทษคือ หญ้าสามารถแย่งอาหารจากพืชที่อยู่ใกล้เคียง ทำให้พืชขาดอาหารอาจเจริญเติบโตช้า หรือตายได้ และทำให้เกิดความรก ส่วนประโยชน์คือ ช่วยในการปกคลุมหน้าดิน ป้องกันการพังทลายของดินอันเกิดจากการพัดพาของลม หรือการไหลบ่าของน้ำ เพิ่มความสวยงามของพื้นสนาม อีกทั้งลดการกระแทกเมื่อเกิดอุบัติเหตุ จึงมีความสนใจในการศึกษาหญ้าแพรกสายพันธุ์ *Cynodon dactylon* เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะต่างๆ มีความทนทานต่อการเกิดโรคสูง และมีการค้นพบว่าสามารถเกิดลูกผสมได้หลายชนิด โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ครั้งละจำนวนมาก และระยะเวลาที่ใช้สั้นกว่าในการเพาะเลี้ยงในสภาวะธรรมชาติ ผลการวิจัยที่ได้สามารถเป็นพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูงต่อไป เช่น การถ่ายยีนที่ต้องการเข้าไปในหญ้า เป็นพื้นฐานในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหญ้าแพรกสายพันธุ์ *Cynodon dactylon* และศึกษาการอยู่รอดได้เมื่อนำต้นหญ้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในสภาวะธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดหญ้าให้เป็นแคลลัส
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เป็นต้น
3. เพื่อศึกษาการอยู่รอดของต้นหญ้าในสภาวะธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

<u>การจำแนกพืชตระกูลหญ้า</u> (สายยันต์,2531)

พืชตระกูลหญ้าเป็นพืชในตระกูล Gramineae ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับพืชตระกูล Juncaceae และตระกูล Cyperaceae โดยพืชตระกูลหญ้าสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 วงศ์ย่อย ได้แก่

1. Festucoideae
2. Panicoideae
3. Eragrotoideae
4. Bambusoideae
5. Oryzoideae
6. Arundinoideae

6 วงศ์ย่อยแบ่งได้เป็น 28 tribes

Agrostideae	Bambuseae	Maydeae	Phareae
Andropogoneae	Chlorideae	Nardeae	Parianeae
Anomochloreae	Eragroteae	Olyreae	Sporoboleae
Aristideae	Festuceae	Oryzeae	Stipeae
Arundinelleae	Hordeae	Paniceae	Streptochaeteae
Arundineae	Leptureae	Pappophoreae	Thysanolaeneae
Aveneae	Lygeae	Phalarideae	Zoyiseae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างของพืชทั้ง 3 ตระกูล

ลักษณะ	Gramineae	Cyperaceae	Juncaceae
ลำต้น	กลมหรือแบน	สามเหลี่ยม	กลม
ปล้อง	มีปล้อง	ไม่มีปล้อง	ไม่มีปล้อง
ภายในปล้อง	ส่วนมากกลวง	ตัน	ตัน
ใบ	2 แถว	3 แถว	3 แถว
กาบใบ	แยกจากลำต้นได้	แยกไม่ได้	แยกไม่ได้
ผล	Caryopsis	Achene	Capsule
จำนวนเมล็ด	1 เมล็ด	1 เมล็ด	มีมากกว่า 1เมล็ด
เอ็มบริโอ	อยู่ด้านข้าง endosperm	อยู่กลาง endosperm	-

หญ้าแพรก : Bermuda Grass

ชื่อสามัญ : Tifgreen Bermudagrass

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cynadon dactylon*

หญ้าแพรกเป็นหญ้าสนามกลุ่มใหญ่สกุลหนึ่งอยู่ในตระกูลย่อย Festucoideae ซึ่งถือว่าเป็นสกุลสำคัญสำหรับหญ้าสนามเขตร้อน มีคุณสมบัติดี มีการเจริญเติบโตเหมาะสมกับสภาพดินฟ้าอากาศของประเทศไทย (สิน,2535)

ลักษณะทั่วไปของหญ้าแพรก (สำเริง และ เอกชัย,2535)

1. ลำต้นจะค่อนข้างแบนและจะตั้งตรงหรือโค้งจากฐานของลำต้นมีทั้งลำต้นใต้ดิน และลำต้นบนดินซึ่งจะแตกแขนงออกมาแล้วมีรากที่ข้อ
2. ใบ ค่อนข้างบางปลายเรียวแหลม ขอบใบมีขนเล็กๆ ใบจะมีสีเขียวเข้ม ใบค่อนข้างหยาบ
3. ดอก และ ช่อดอกจะเป็นสามเหลี่ยม มีดอกย่อยอยู่ 4-5 แขนง
4. ต้องการแสงแดดอย่างเต็มที่ในการเจริญเติบโต
5. ทนต่อการเหยียบย่ำดี อาศัยเพียงน้ำค้างก็สามารถเจริญเติบโต และฟื้นตัวได้เร็ว
6. มีความทนทานต่อโรค และแมลงได้ดี

การจำแนกหญ้าแพรกตามหลักพฤษศาสตร์ (สิน,2535)

หญ้าแพรกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. หญ้าแพรกพันธุ์พื้นเมือง หญ้ากลุ่มนี้ใช้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมใหม่ๆ และทำสนามหญ้ามาตั้งแต่ดั้งเดิม หญ้าแพรกพันธุ์พื้นเมือง มีทั้งหมด 4 ชนิด

1.1 Common Bermuda หรือ Common Couch (*Cynodon dactylon* (L) pers.) หรือที่เรียกกันว่าหญ้าแพรก โดยทั่วไปมีคุณสมบัติดีทั้งสี ผิวสัมผัส ความแน่นของสนามหญ้ามีความแข็งแรงและปรับตัวเข้าสภาพแวดล้อมได้ดี ใบกว้าง 1.5-4 มิลลิเมตร ยาว 2-5 มิลลิเมตร

1.2 Bradley Bermuda (*Cynodon bradleyi* Stent.) มีผิวสัมผัสที่ละเอียด เขียวทึบ ใช้ปลูกทำสนามกอล์ฟได้

1.3 African Bermuda (*Cynodon transvaalensis* Burtt Davy) มีลักษณะอ่อนนุ่ม และเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์หญ้าแพรกลูกผสมอีกมาก โดยใช้ผสมกับหญ้าแพรกธรรมดา

1.4 Magennis Bermuda (*Cynodon magennisii* Hurcombe) มีผิวสัมผัสที่ละเอียดมาก ใบมีสีเขียวสดเรียวเล็กคล้ายเส้นด้าย หญ้าแพรกชนิดนี้เป็นลูกผสมระหว่างหญ้าแพรก *C. dactylon* กับ *C. transvaalensis*

2. หญ้าแพรกพันธุ์ลูกผสม เป็นพันธุ์หญ้าที่ผสมมาจากหญ้าพื้นเมืองดั้งเดิมทั้ง 4 ชนิด ดังที่กล่าวมาแล้วเป็นส่วนมาก หญ้าแพรกลูกผสมจะมีความแข็งแรงทนทานดีกว่าหญ้าแพรกพื้นเมือง และมีผิวสัมผัสที่ละเอียด ใบอ่อนนุ่มและเขียวสด พันธุ์ที่นำออกเผยแพร่และปลูกกันทั่วไปมีดังนี้

2.1 เบย์ชอร์ (Bayshore) เป็นลูกผสมระหว่างหญ้าแพรกธรรมดากับหญ้าแพรกอาฟริกัน มีชื่อเดิมว่า Gene tift เป็นหญ้าที่ทนต่อการเหยียบย่ำและความหนาวเย็น ผิวสัมผัสปานกลาง ใบเขียวเข้ม ลำต้นเป็นแบบเลื้อย มีการขยายพันธุ์โดยใช้ลำต้นปลูก เพราะไม่มีเมล็ดจำหน่าย

2.2 เบเวอรินา สปอร์ต เวย์ (Beverina sport way) เป็นลูกผสมจากพ่อแม่เดียวกันกับเบย์ชอร์ มีความแข็งแรงทนทานต่อการเหยียบย่ำ ฟื้นตัวเร็ว ใบมีสีเขียวปานกลางเป็นหญ้าสนามที่หนาแน่น ต้องการปุ๋ยมาก

2.3 เอเวอร์เกลด (Everglade) กำเนิดที่เดียวกันกับเบย์ชอร์ ลักษณะลำต้นเลื้อยตามดิน ผิวสัมผัสละเอียด มีสีเขียวเหมือนกับหญ้าแพรกธรรมดา แต่อ่อนนุ่มมากกว่า และได้จัดไว้เป็นพวกเบย์ชอร์ด้วย

2.4 มิดเวย์ (Midway) เป็นลูกผสมระหว่างหญ้าแพรกธรรมดากับหญ้าแพรกอาฟริกา เพื่อที่จะให้ได้ลูกผสมชนิดนี้ที่ทนต่อความหนาว แต่เป็นหมันจึงสามารถขยายพันธุ์ได้เฉพาะใช้ลำต้นปลูกเท่านั้น ผิวสัมผัสใบปานกลาง

2.5 โรยัล เคป (Royal Cape) ใบละเอียด สีเขียวเข้ม ลำต้นแข็งแรง เจริญเติบโตเร็ว และมีความทนต่อดินเกลือมาก ปรกติมีเมล็ดน้อยจึงมักปลูกโดยใช้ลำต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 แซนตา แอนนา (Santa Ana) เป็นหญ้าที่มีสีน้ำเงินปนเขียว มีความทนทานต่อควันหรือหมอกพิษ ทนต่อการเหยียบย่ำและทนต่ออากาศหนาวได้ดี ใบขนาดปานกลาง

2.7 ซันเทิฟ(Sunturf) เป็นผลจากการปรับปรุงพันธุ์หญ้า *C. magennisii* ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างหญ้าแพรกธรรมดากับหญ้าแพรกอาฟริกัน

2.8 ทิฟกรีน (Tif green) เป็นลูกผสมระหว่างหญ้าแพรกธรรมดากับหญ้าแพรกอาฟริกัน เป็นหญ้าที่มีคุณสมบัติดีกว่าหญ้าแพรกชนิดอื่นมากๆ มีสีเขียวเข้ม ใบละเอียดอ่อนนุ่ม มีความต้านทานโรคหลายชนิดได้ดี เจริญเติบโตเร็วและทนทานต่อการเหยียบย่ำได้ดีพอประมาณ

2.9 ทิฟดว๊อฟ (Tif dwarf) เป็นหญ้าลูกผสมที่ผ่าเหล่าออกมาจากหญ้าทิฟกรีน แตกต่างตรงเจริญเติบโตช้าและต้องการปุ๋ยน้อยกว่า ลำต้น ใบ ข้อ ช่อดอกสั้นและเล็กกว่า ผิวสัมผัสของใบละเอียด ทนหนาวได้ดี การขยายพันธุ์ใช้ได้แต่ลำต้นเท่านั้น เนื่องจากเป็นหมัน ไม่มีเมล็ด

2.10 ทิฟไฟน์ (Tif fine) เป็นลูกผสมของหญ้าแพรกธรรมดากับหญ้าแพรกอาฟริกัน ใบเขียวอ่อนละเอียดนุ่มไม่ระคายผิวหนัง เป็นหมัน จะขยายหรือปลูกโดยใช้เมล็ดเท่านั้น

2.11 ทิฟลอน (Tif lon) สามารถทนทานต่อการเหยียบย่ำและความแห้งแล้งได้ดีที่สุด

2.12 อูกันดา (Uganda) ลักษณะลำต้นเป็นแบบเลื้อย ใบสีเขียวอ่อน ผิวสัมผัสละเอียดมาก การเจริญเติบโตช้า ในฤดูร้อนใบที่เป็นสีเขียวอ่อนจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมม่วงแดง

<u>อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u>

อาหารที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารต่างๆ เช่น สูตร MS, LS, White, Heller, ER, B5, N_6 เป็นต้น และเมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่าจะมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

1. สารอนินทรีย์ (inorganic salt) ได้แก่ แร่ธาตุอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก (macronutrients หรือ major elements) ได้แก่ คาร์บอน (C) , ไฮโดรเจน (H) , ออกซิเจน (O) , ไนโตรเจน (N) , ฟอสฟอรัส (P) , โปแตสเซียม (K) , แคลเซียม (Ca) , แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหลานี้พืชต้องการในปริมาณมากและขาดไม่ได้โดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณ 25-60 มิลลิโมล หรือมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 แร่ธาตุอาหารรอง (micronutrients หรือ trace elements) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้เช่นกัน ได้แก่ เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมล โคบอล (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล ทองแดง (Cu)ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล สรุปโดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. สารอินทรีย์ (organic salt) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของ คาร์บอน (C) , ไฮโดรเจน (H) , ออกซิเจน (O) แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

2.1 คาร์โบไฮเดรต ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนในการให้พลังงาน ปกติจะใช้น้ำตาล 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเตรียมอาหาร 1 ลิตร น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ได้แก่

2.1.1 กลูโคส (Glucose) สูตรทางเคมีคือ $C_6H_{12}O_6$

2.1.2 ฟรุกโทส (Fructose) สูตรทาสูตรทางเคมีคือ $C_6H_{12}O_6$

2.1.3 ซอบิทอล (Sobitol) สูตรทางเคมีคือ $C_6H_{12}O_6$

2.1.4 แมนนิทอล (Manitol) สูตรทางเคมีคือ $C_6H_{12}O_6$

2.1.5 ซูโคส (Sucose) สูตรทางเคมีคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$

2.1.6 มอลโทส (Moltose) สูตรทางเคมีคือ $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$

2.2 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีความสำคัญ มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

2.2.1 ไทเอมีน ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) หรือเรียกว่าวิตามิน B_1 สูตรทางเคมี $C_{12}H_{17}CIN_4OS.HCl$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.2 อินโนซิทอล (Inositol) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ ปกติจะใช้ในรูปของไมโอ-อินโนซิทอล (Myo-inositol) ใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-50000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.3 ไนเอซิน (Niazin)หรือกรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) หรือเรียกว่าวิตามิน B_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย C_6H_5NO ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.4 ไพริดอกซีน ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)หรือเรียกว่าวิตรมิน B_6 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_{11}NO_3.HCl$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.5 ไบโอติน (Biotin) หรือเรียกว่าวิตามิน H สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6 กรดแพนโททีนิก (Pantothenic acid) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{16}H_{17}NO_5$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.7 กรดแอสคอบิก (Ascorbic acid) หรือเรียกว่าวิตามิน C สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_8O_6$ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8 กรดฟอลิค (Foric acid) หรือเรียกว่าวิตามิน H สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{19}H_{19}N_7O_6$

2.2.9 แคลเซียม แพนโททีเนต (Calcium pantothenate)) หรือเรียกว่าวิตรมิน B_5 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_9H_{17}NO_5$

2.2.10 ไซโนโคบาลามิน (Cyanocobalamine)) หรือเรียกว่าวิตามิน B_6 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{63}H_{90}CoN_{14}O_{14}P$

2.2.11โคลีนคลอไรด์ (Choline choride) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{17}H_{20}N_4O_6$

2.3 กรดอะมิโน (Amino acid) ซึ่งมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ไกลซีน (Glycine) ใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อะลานีน (Alanine) อาจีนีน (Arginine) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปาราจีน (Asparagine)ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสปาติก (Aspartic acid)ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีสทีน (Cystein)ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน (Glutamine) กรดกลูตามิก (Glutamic)ใช้ประมาณ 8 มิลลิโมล ลิวซีน (Leucine) เมทไทโอนีน (Methionine) ฟีนิลอะลานีน (Phemylalanine)ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน (Ploline)ใช้ประมาณ 100-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซอลีน (Serine) ทริปโตเฟน (Trytophan) และ ไทโรซีน (Tyrosine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทั่วไปประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปของ L มากกว่าในรูปของ D

2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulator) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นได้ ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ ฮอรีโมนพืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มต่างๆดังนี้

2.4.1ออกซิน(Auxin) ปกติจะพบในรูปของกรดอินโดลอะเซติค (indole-3-acetic acid : IAA) ส่วนสารไอเอเอผลิตจาก ทริปโตเฟน หรืออินโดล ในใบที่กำลังงอก ใบอ่อน และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาให้มีการงอก สารไอเอเอจะมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง ไปยังราก และบางที่อาจมีส่วนที่เกี่ยงข้องกับท่อน้ำและมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ออกซินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.4.1.1พวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น กรดอินโดลอะเซติค (indole-3-acetic acid) หรือ 3-Indoleacetic acid หรือเรียกย่อๆว่า IAA สามารถละลายในอะซิโตนและอีเทอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.2 พวกที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่

2.4.1.2.1 ∝- napthalene acetic acid 1-napthalene หรือเรียกย่อๆ ว่า NAA สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์

2.4.1.2.2 2,4-Dichorophenoxyacetic acid หรือเรียกย่อๆว่า 2,4-D สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์

2.4.1.2.3 2,4,5-Trichorophenoxyacetic acidหรือเรียกย่อๆว่2,4,5-T สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์

2.4.1.2.4 3-Indolebutyric acid หรือเรียกย่อๆ ว่า IBAสามารถละ-ลายได้ในแอลกอฮอล์ อะซิโตนและอีเทอร์

2.4.1.2.5 2-napthoxyacetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า NOA สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ อะซิโตน และกรดอะซิติค

2.4.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin) เป็นอนุพันธุ์ของอะดีนิน ซึ่งพบได้หลายชนิดในสิ่งมีชีวิต ไซโตไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดินีน โดยจะเกิดในบริเวณปลายราก และเอ็มบริโอที่กำลังเจริญเติบโต มีผลต่อพืช คือ สามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขณะที่มีออกซินผสมอยู่ด้วย และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในพืชที่กำลังเป็นโรคปุ่มปม สารพวกนี้ที่ใช้กันมากได้แก่

2.4.2.1 6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน หรือ ไคเนติน สามารถละลายในเมทานอล และเอทานอล

2.4.2.2 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน หรือ BA หรือ BAP สามารถละลายในเมทานอล และเอทานอล

2.4.2.3 2-ไอโซเพนทินิล อะมิโนเพียวรีน หรือ 2ip

2.4.2.4 ซีเอทิน (Zeatin) เป็นสารที่เกิดในธรรมชาติ

2.4.3 จิบเบอร์เรลลิน (Gibberellins) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อย ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอเรลลิก หรือ GA_3 สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญเกิดขึ้น กรดจิบเบอเรลลิกสามารถเคลื่อนย้ายผ่านท่อน้ำและท่ออาหารสามารถละลายในเมทานอล เอทานอล และอะซิโตน

2.5 สารอื่นๆ เช่น สารอินทรีย์อื่นๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ น้ำมันฝรั่ง กล้วย น้ำข้าวโพด สารสกัดจากมอลต์ และอื่นๆ เป็นต้น บทบาทของสารเหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตยังไม่ทราบแน่ชัด ผงถ่านเมื่อเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อพืชจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกจากเซลล์ เช่นพวกฟีโนลิกต่างๆ จะทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่ได้รับอันตรายต่อสารดังกล่าว และสามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตได้เร็ว ข้อเสียคือ มีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่สามารถดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตมาใช้ได้อย่างเต็มที่ ซึ่งมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ

2.6 วุ้น ทำหน้าที่ช่วยยึดเกาะของเนื้อเยื่อต่างๆ ในการเตรียมอาหารสามารถเตรียมเป็นอาหารแข็ง และอาหารกึ่งแข็งได้ สำหรับวุ้นทั่วๆ ไปใช้ประมาณ 0.8-1 เปอร์เซ็นต์

<u>เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อ</u>

การนำชิ้นส่วนใดๆของพืชมาเลี้ยงในอาหารจะเกิดเนื้อเยื่อขึ้นหลายแบบจากเนื้อเยื่อปกติของพืชที่เป็น Organized tissue เช่น ราก ลำต้น ใบ หรืออวัยวะอื่นๆ สามารถถูกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น unorganized tissue เช่น แคลลัส ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีฮอร์โมนต่างๆ เป็นสารกระตุ้น การเกิดชนิดของเนื้อเยื่ออาจแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามความต้องการสารกระตุ้น คือ

1. กลุ่มต้องการออกซิน
2. กลุ่มต้องการไซโตไคนิน
3. กลุ่มต้องการออกซินและไซโตไคนิน
4. กลุ่มต้องการสารสกัดธรรมชาติ

<u>แคลลัส</u> (ศิวพงศ์,2541)

เป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดยั้ง ความต้องการฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัสของพืชขึ้นกับแหล่งหรือชนิดของเนื้อเยื่อบางอย่าง หรือพืชบางชนิด เมื่อชิ้นเนื้อเยื่อได้รับอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะกลายเป็นเนื้อเยื่อเจริญ

โดยลักษณะของแคลลัส จะเป็นดังนี้

1. คล้ายคลึงกับเซลล์พาเรนไคมา ซึ่งไม่มีสีในพืชทั่วไป
2. มีรูปร่างหลายแบบ ถ้ายังมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วจะมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเล็ก และถ้าการแบ่งเซลล์ลดลง เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและค่อนข้างยาว ถ้าเซลล์หยุดแบ่งตัวจะยืดขยายออกทำให้เซลล์ยาวขึ้น โดยการดูดน้ำเข้าเซลล์
3. มีผนังเซลล์บาง
4. มีการไหลเวียนในไซโตพลาสซึม
5. ไม่ค่อยมีทางติดต่อระหว่างเซลล์ที่เรียกว่า พลาสโมเดสมาทา (Plasmodesmata)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแคลลัสที่เกิดขึ้นอาจจะเจริญเป็นแคลลัสไปเรื่อยๆ หรืออาจจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่างๆ ในภายหลัง แคลลัสที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะต่างกัน 2 แบบ

1. ไฟรเอเบิล แคลลัส (Friable callus) เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์หลวมๆ มักจะไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ สามารถแยกออกจากกันได้ง่ายเมื่อมีออกซินในความเข้มข้นสูง หรือมีความเข้มข้นของไซโทไคนินต่ำลง และยังสามารถนำไปทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

2. เดนส์ หรือคอมแพคต์ (Dense or Compact callus) เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์แน่นมักจะเจริญต่อไปเป็นอวัยวะได้

พืชที่เกิดจากแคลลัสมักจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยการเฉพาะเมื่อเลี้ยงแคลลัสไปนานๆ และการเปลี่ยนแปลงเป็นการถาวร และเป็นลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปยังรุ่นลูกได้ ลักษณะนี้อาจเป็นทางกายภาพ และสัณฐาน เช่น

1. อาจเกิดสายพันธุ์กลายที่ไม่ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เรียกว่า habituation
2. มีความอ่อนแอหรือต้องการสารเคมีบางอย่าง
3. การเติบโตเปลี่ยนไป และมีองค์ประกอบภายในเซลล์ผิดไป เช่นมีเม็ดสีเปลี่ยนไป

หลังจากเลี้ยงแคลลัสในอาหารไปสักระยะหนึ่งจำเป็นต้องแบ่งย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) เพราะว่าอาหารจะถูกใช้หมดไป นอกจากนี้เซลล์จะขับถ่ายสารออกมาและเป็นพิษต่อเซลล์เอง แคลลัสจะหยุดการเจริญเติบโต ในการเปลี่ยนอาหารใหม่ควรกระทำทุกๆ 4-6 สัปดาห์ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวอาจเปลี่ยนบ่อยกว่านี้ เช่น ทุกๆ 1-2 สัปดาห์ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งต้องการการย้ายประมาณ ทุกๆ 3 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในระยะ deceleration phase

เอ็มบริโอจีนีซิส การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารที่เหมาะสมจะให้เนื้อเยื่อที่เป็นแคลลัส และบางส่วนจะพัฒนามีรูปร่างคล้ายๆ เอ็มบริโอ คือ ส่วนที่กลายเป็นรากและยอด เช่น แคลลัสของแครอท หรือข้าวโพดที่กลายเป็นต้นพืชปกติได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม กระบวนการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดเนื้อเยื่อที่เหมือนเอ็มบริโอนี้จึงเรียกว่า เอ็มบริโอจีนีซิส เนื่องจากเนื้อเยื่อที่ให้เอ็มบริโอนี้เป็นเนื้อเยื่อของเซลล์ร่างกาย ดังนั้นจึงเรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ เนื้อเยื่อที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้นี้เรียกว่า เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส ส่วนที่ไม่สามารถเกิดเป็นต้น เรียกว่า นอน-เอ็มบริโอจีนิค

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอสามารถแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

1. เป็นขั้นตอนเริ่มต้นเกิดจากไซโกตแบ่งเป็น 2 เซลล์ (Proembryo) เซลล์ที่มีขนาดเล็กจะอยู่ด้านบน เรียกว่า apical cell ส่วนเซลล์ขนาดใหญ่อยู่ด่านล่าง เรียกว่า basil cell มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า globular shaped embryo

2. กลุ่มเซลล์ globular shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ heart shaped embryo

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กลุ่มเซลล์ heart shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ torpedo-shaped embryo

4. กลุ่มเซลล์ torpedo-shaped embryo จะมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอซึ่งในขั้นตอนนี้กลุ่มเซลล์สามารถจะเจริญเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยเนื้อเยื่อด้านบนของเอ็มบริโอจะเจริญไปเห็นยอด และเนื้อเยื่อด้านล่างของเอ็มบริโอคือส่วนที่สัมผัสกับอาหารจะเจริญไปเป็นราก

<u>การพัฒนาการของเนื้อเยื่อ</u> (ศิวพงศ์,2541)

จากการเพาะเลี้ยงอวัยวะบางส่วนของพืชที่สามารถเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ใหม่ได้ เนื่องจากว่าภายในเซลล์พืชแต่ละเซลล์ที่ประกอบกันขึ้นเป็นอวัยวะนั้นบรรจุสารพันธุกรรม ซึ่งมียีนควบคุมลักษณะต่างๆ ของพืชครบถ้วนจึงสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม การที่เซลล์พืชซึ่งพัฒนาการไปแล้วสามารถเปลี่ยนย้อนกลับมาเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเจริญใหม่นั้น ก็ต้องผ่านกระบวนการหลายประการ เพื่อให้เซลล์มีสภาพพร้อมที่จะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้เสมือนกับว่ามันยังเป็นเซลล์ที่กำลังเจริญอยู่ การที่เซลล์ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปแล้ว (differentiated cell) เปลี่ยนย้อนกลับไปเป็นเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (non-differentiated cell) เรียกกระบวนการในการเปลี่ยนย้อนกลับนี้ว่า dedifferentiation หลังจากนั้นแล้วเซลล์เหล่านี้จะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นอาจจะเป็นแคลลัส หรืออาจจะเกิดเป็นจุดกำเนิด ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงเจริญเป็นอวัยวะใหม่เลยก็ได้ การเปลี่ยนแปลงของชิ้นพืชนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายประการ ได้แก่ สภาพของพืชแม่พันธุ์ที่แยกเอาพืชต้นเล็กๆ มาเพาะเลี้ยง ตำแหน่งของพืชต้นเล็กๆ ฤดูการที่นำชิ้นพืชมาเพาะเลี้ยง สภาพของฮอร์โมน และสารอาหารสะสมในชิ้นพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ส่วนผสม และสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง

<u>กระบวนการพัฒนาการพื้นฐาน</u> มี 4 ขั้น ตามลำดับ ดังนี้

1. การกำหนด หรือ ดีเทอร์มิเนชั่น (Determination)

เป็นกระบวนการกำหนดว่าเซลล์ หรือส่วนใดของเอ็มบริโอจะเจริญไปในทิศทางใดโดยเฉพาะ ดังจะเห็นได้จากไซโกตซึ่งมีเซลล์เดียว และเมื่อมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นมากลุ่มหนึ่งเซลล์บริเวณด้านบนจะเจริญเป็นเอพิคอลเซลล์ (apical cell) และกลายเป็นยอดไปในที่สุด ส่วนเซลล์บริเวณด้านล่างจะเจริญไปเป็นราก การกำหนดว่าบริเวณใดจะเจริญไปเป็นอย่างไร ในแนวทางใดนั้นมีปัจจัยหลายอย่างเป็นตัวกำหนด ดังต่อไปนี้

1. ยีนภายในเซลล์ ซึ่งยีนเป็นสารพันธุกรรมเป็นตัวกำหนดลักษณะเช่น การผลิตคลอโรพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ กับเซลล์ที่อยู่ใกล้กัน เซลล์บริเวณใกล้เคียงกันจะมีการเชื่อมโยงกัน และติดต่อสัมพันธ์กัน

3. สภาพแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ ช่วงเวลาที่ได้รับแสง มีผลต่อการออกดอก เป็นต้น อุณหภูมิ 1-4 องศาเซลเซียส จะเปลี่ยนตาใบให้กลายเป็นตาดอกในกะหล่ำปลี ดังนั้นอุณหภูมิต่ำจึงทำให้กะหล่ำปลีออกดอก

2. การเปลี่ยนแปลง หรือ ดิฟเฟอเรนทิเอชั่น (Differentiation)

การมีบทบาทหน้าที่ใหม่ๆ ขึ้นมาของเซลล์ ซึ่งจะเกิดขึ้นควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่มองเห็นได้ ดิฟเฟอเรนทิเอชั่น จึงมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง ตัวอย่างเช่น เซลล์ผิวใบ ซึ่งมีผนังเซลล์เป็นเซลลูโลส เปลี่ยนแปลงไปมีผนังเซลล์หนาขึ้น เป็นต้น เซลล์ภายในใบหรือเนื้อใบ มีการเปลี่ยนแปลงเกิดคลอโรพลาสต์ขึ้นมา จึงกลายเป็นเซลล์ผนังบางมีคลอโรพลาสต์จำนวนมาก

เมื่อเกิดดีเทอร์มิเนชั่นแล้วจะตามด้วยดิฟเฟอเรนทิเอชั่น การเปลี่ยนแปลงของเซลล์จำนวนหนึ่งไปด้วยกัน เรียกว่า transformation เช่น เซลล์กลุ่มหนึ่งกลายไปเป็นเนื้อเยื่อ และจากเนื้อเยื่อจะกลายเป็นอวัยวะ

3. การเจริญ (Growth)

การเพิ่มขนาดของสิ่งมีชีวิตซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนย้อนกลับได้ จะเกิดขึ้นโดยการแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดของเซลล์ จึงทำให้มีจำนวนเซลล์มากขึ้น และเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นจึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีขนาดใหญ่ขึ้น สูงขึ้น และมีน้ำหนักมากขึ้น การที่เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นนี้เริ่มแรกเกิดขึ้นโดยการดูดน้ำจำนวนมากเข้าเซลล์ หลังจากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ทั้งทางด้านเคมี ส่วนประกอบของเซลล์ และโครงสร้างของเซลล์

4. การเปลี่ยนรูปร่าง หรือ มอร์โฟเจเนซีส (Morphogenesis)

เป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของสิ่งมีชีวิตอย่างต่อเนื่อง จนพัฒนาเป็นลักษณะสุดท้ายที่ปรากฏออกมา เช่น การเปลี่ยนรูปร่างจนเกิดเป็นใบ เป็นลำต้น หรือเป็นราก เริ่มต้นเซลล์จะมีการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง และมีการยืดขยายขนาด มีการเปลี่ยนแปลงไปเรื่อยๆ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ผลสุดท้ายจะออกมาเป็นอวัยวะ ซึ่งมีรูปร่างที่แตกต่างกันซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u> ได้มีการศึกษาในหญ้า พบว่าได้มีรายงานมากมายดังนี้

ในปี 1984 B. J. Ahn และคณะ ได้มีการศึกษาการเจริญเติบโตของพืชโดยผ่านโซมาติคเอ็มบริโอจีนิค ของหญ้าสายพันธุ์ Bermuda โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 จะมีขนาดของแคลลัสที่ใหญ่กว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิดจะมีการเติม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D และ 20 หรือ 60 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D และ 60 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส จะเกิดเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส 16 แคลลัสจาก แคลลัสที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่ 19 แคลลัส และมีความยาวไม่เกิน0.5 เซนติเมตร ส่วนพวกที่ไม่เกิดเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจะความยาวมากกว่า 1.5 เซนติเมตร เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่เกิดจากโซมาติคเอ็มบริโอ จะทำการเพาะเลี้ยง 80 สัปดาห์ และมีการย้ายอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ ต้นเล็กๆ ที่เจริญมาจากเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส จะทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่มีฮอร์โมน และเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่นำไปปลูกในดิน ทำการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้แน่ใจว่าต้นหญ้าที่เกิดขึ้นมีการเจริญเติบโตมาจาก เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ในปี 1988 Artunduaga และคณะ ได้ทำการศึกษาจีโนไทป์ และ 2,4-D ที่มีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้า *Bothrichloa ischaemum* 2 สายพันธุ์คือ A-8793 และ A-8911C และ *Cynodon dactylon* (L.) Pers 3สายพันธุ์คือ A-10987b A-12164 และ Brazos เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 0,1,3 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโตจะมีความยาวน้อยกว่า 9 มิลลิเมตร เมื่อทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เนื้อเยื่อจะมีการเจริญไปเป็นแคลลัส เมื่อเปลี่ยนอาหารใหม่และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาประมาณ 8 สัปดาห์ จะเกิดเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส และเมื่อเติม 3 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ในอาหารสูตร แมกซิมั่ม อี จะทำให้แคลลัสทั้ง 2 สายพันธุ์ของ *C. dactylon* คือ A-10987b และ A-12164 เกิดสีน้ำเงินขึ้น ส่วนแคลลัสที่ถูกสร้างจากสายพันธุ์ Brazos จะเกิดในอาหารแมกซิมั่ม อี ที่มีปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D

ในปี 1995 Jeffrey D. Griffin และ Margaret S. Dibble ได้ศึกษาการเจริญเป็นยอดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดของ Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) ที่เพาะเลี้ยงบนบนอาหารสูตร MS พื้นฐานโดยที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 10 ไมโครโมลาร์ 2,4-D 60 ไม-โครโมลาร์ หรือ พิโครแรม 30 ไมโครโมลาร์ ไดแคมบา เติมลงไปปริมาณ 0.4-4 เปอร์เซ็นต์ อาหารที่เติม 30 ไมโครโมลาร์ ไดแคมบา และเติม 10 ไมโครโมลาร์ BA จะมีการชักนำให้เกิดเป็นราก 20 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแคลลัสที่ใช้ทดสอบ เมื่อใช้ปริมาณของสารควบคุมการเจริญสูง คือ 60 หรือ 90ไมโครโมลาร์ ไค-แคมบา และ 20 ไมโครโมลาร์ BA ทำให้อัตราการเจริญไปเป็นยอดเพิ่มเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของชาวอเมริกันจำนวน 12 คน เกี่ยวกับผลการตอบสนองของการเจริญที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารที่เฉพาะเจาะจง พบว่าอัตรการเจริญจะอยู่ในช่วง 4-40 เปอร์เซ็นต์

ในปี 2000 Ashok Chaudhury และคณะ ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ยังเจริญไม่เต็มที่ของหญ้า เบอร์มิวดาลูกผสมทิฟกรีน (ผสมระหว่าง *Cynodon dactylon* และ *Cynodon transvalensis*) กับ เบอร์มิวดาธรรมดา (*Cynodon dactylon)* โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4 –D และ ชิ้นส่วนที่ไม่สามารถเจริญเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส ซึ่งจะเกาะกันอยู่หลวมๆ เมื่อเติม 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร BAลงในอาหาร จะชักนำให้เกิด แคลลัสที่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีโอกาสเจริญไปเป็นต้นได้สูง ทำให้อัตราการเจริญเป็นต้นของ เบอร์มิวดาลูกผสมทิฟกรีน และ เบอร์มิวดาปรกติ เป็น 79.5 เปอร์เซ็นต์ และ 83.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในปี 2000 Denis Lauzer และคณะ ได้ศึกษาระบบ micropropagation ที่ใช้การเจริญไปเป็นต้นโดยผ่านโซมาติคเอ็มบริโอจีนิค มาจากแคลลัสที่ยังเจริญไม่เต็มที่ ซึ่งระบบนี้ใช้ในการผลิต *Phragmites australis* (CAV) Trin ของ wetland จะใช้การบำบัดน้ำเสีย เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่เกิดจากแคลลัสที่ยังเจริญไม่เต็มที่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4 –D จะทำให้อัตราการเกิดเป็นเอ็มบริโอจีนิค เพิ่มขึ้นเป็น 28.4 เปอร์เซนต์ เมื่อทำการย้ายโซมาติคเอ็มบริโอจีนิค ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารชักนำให้เป็นต้น ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจะเกิดเป็นต้นเล็กๆ และเมื่อเติมไมโอ-อิโนซิทอลลงในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เป็นต้นจะทำให้จำนวนของต้นมีมากที่สุด แต่อัตราการเกิดจะลดลงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารนานกว่า 3 เดือน ต้นเล็กๆ ที่เกิดขึ้นสามารถปรับตัวและเจริญได้ตามปกติ แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างทางโครงสร้างเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่เจริญมาจากเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. เมล็ดหญ้าแพรกสายพันธุ์ *Cynodon dactylon*
2. สารเคมี
   - 2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS ,LS
   - 2.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอร็อกซ์ , สารเปียกใบ
   - 2.3 ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-D, ซีอะติน
   - 2.4 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
   - 2.5 ซีโฟซาน
   - 2.6 ยาฆ่าเชื้อรา
3. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ
   - 3.1 บีกเกอร์
   - 3.2 ขวดรูปชมพู่
   - 3.3 ปิเปตต์
   - 3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   - 3.5 จานแก้ว
   - 3.6 แท่งแก้วคน
   - 3.7 กระบอกตวง
   - 3.8 มีดผ่าตัด
   - 3.9 ปากคีบ
   - 3.10 อะลูมิเนียมฟลอย
   - 3.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์
   - 3.12 เครื่องเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.13 ไมโครเวฟ

3.14 ตู้ปลอดเชื้อ

3.15 ตู้บ่มเชื้อ

3.16 สเปคโตรไมโตรมิเตอร์

3.17 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ

3.18 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรองแบคทีเรีย

3.19 ตู้อบความร้อน

3.20 ไมโครปิเปตต์และทิป ขนาดต่างๆ

3.21 หม้อนึ่งความดัน

3.22 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

3.23 กล้องสเตอริโอ

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเกิดชักนำให้เป็นแคลลัส

ขั้นตอนการฟอกเมล็ดหญ้า

1. นำเมล็ดหญ้าที่มีเปลือกหุ้มมาใส่ในโกร่ง บดให้เมล็ดภายในหลุดออกมา ใช้ปากคีบ คีบเมล็ดที่หลุดออกมาวางในจานแก้ว

2. นำเมล็ดหญ้าที่ได้ ใส่ในตัวกรองที่เป็นโลหะล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ นาน 1 นาที เขย่าตลอดเวลา

3. นำตัวกรองพร้อมเมล็ดมาแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 30 เปอร์เซนต์ เติมสารเปียกใบ 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลานาน 10 นาที

4. ยกตัวกรองพร้อมเมล็ดมาล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อที่เติมซีโฟซาน ล้าง 3 ครั้งๆ ละ 5-10 นาที

5. ยกตัวกรองพร้อมเมล็ดมาวางบนจานแก้วที่มีทิชชู่ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งให้แห้ง

6. นำเมล็ดหญ้าที่ผ่านการฟอกแล้ววางลงบนอาหารที่เตรียมไว้ โดยทำสูตรอาหาร (ตารางที่ 1 และ 2) สูตรละ 3 ซ้ำ ปิดให้สนิทด้วย พาราฟิล์ม

7. นำจานเพาะเลี้ยงที่ลงเมล็ดหญ้าไปไว้ในมือที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส

8. ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 30 วัน

9. ทำการวัดขนาดของแคลลัสโดยมีวิธีการดังนี้

9.1 ใช้เวอร์เนียวัดความกว้าง และความยาวของแคลลัสของทุกสูตรอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43966

9.2 นำความกว้างคูณกับความยาว จะได้พื้นที่ของแคลลัส

9.3 นำค่าที่ได้ของแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย จะได้ค่าประมาณของพื้นที่ของแคลลัส

9.4 เปรียบเทียบพื้นที่ของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดเป็นแคลลัส

<u>การทดลองที่ 2</u> การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสไปเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

1. นำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่ไม่มี 2,4-D และเติมซีเอทินที่ระดับความเข้มข้น0.5, 1.0 และ1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำสูตรอาหารสูตรละ 3 ซ้ำ
2. นำไปอยู่ในที่มีอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส วางในที่มีแสงสว่างประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์ นาน 2-6 สัปดาห์
3. ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 วัน บนสูตรอาหารเดิม
4. ทำการชักนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสไปเป็นต้นโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร LS ที่เติมซีเอทิน
5. ศึกษาการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสโดยการดูการเกิดจุดสีม่วงบนเอ็มบริโอจีนิค แคลลัส บนอาหารแต่ละสูตร ทำการเปรียบเทียบการเกิดจุดสีม่วงบนอาหารแต่ละสูตรเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสไปเป็นเอ็มบริโอจีนิค

<u>การทดลองที่ 3</u> การหาอัตราการอยู่รอดของต้นหญ้าในสภาวะธรรมชาติ

ขั้นตอนหารนำต้นหญ้ามาปลูกในสภาวะธรรมชาติ

1. นำต้นหญ้าที่สมบูรณ์จากการชักนำให้เป็นต้นในการทดลองที่ 2 มาแช่ในยาฆ่าราความเข้มข้น 20-30 กรัมต่อลิตร นาน 15-20 นาที
2. ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
3. นำต้นหญ้ามาปลูกลงในกระถางที่มีดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
4. นำกระถางไปวางในที่มีแสง อุณหภูมิห้อง มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก
5. อาหารในช่วงแรกใช้เป็นอาหารเหลวที่ไม่เติมน้ำตาล และวุ้น ซึ่งจะให้ประมาณ 2 วัน เพื่อให้ต้นหญ้าค่อยๆ ปรับสภาพในการเจริญเติบโต จากนั้นใช้น้ำสะอาดรดต้นหญ้าตามปรกติ
6. ดูการเจริญเติบโต โดยดูจากหลังการนำมาเพาะเลี้ยงในดินแล้วต้นหญ้าสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ระดับความเข้มข้นของสารอาหารที่มีในอาหารสูตร MS

สูตรอาหาร	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เคซีนไฮโดรไลเสท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
MS 3.0.0	3	0	0
MS 3.1.5	3	100	500
MS 3.1.1	3	100	1000
MS 5.0.0	5	0	0
MS 5.1.5	5	100	500
MS 5.1.1	5	100	1000

ตารางที่ 3 ระดับความเข้มข้นของสารอาหารที่มีในอาหารสูตร LS

สูตรอาหาร	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เคซีนไฮโดรไลเสท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
LS 3.0.0	3	0	0
LS 3.1.5	3	100	500
LS 3.1.1	3	100	1000
LS 5.0.0	5	0	0
LS 5.1.5	5	100	500
LS 5.1.1	5	100	1000

หมายเหตุ อักษรตัวที่ 1 หมายถึง ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)
อักษรตัวที่ 2 หมายถึง ความเข้มข้นของ เคซีนไฮโดรไลเสท (มิลลิกรัมต่อลิตร)
อักษรตัวที่ 3 หมายถึง ความเข้มข้นของ โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส

การทดลองนี้จะทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยการวัดขนาดของแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตโดยจะทำการแบ่งระยะการวัดออกเป็น 3 ระยะ คือ 30 45 และ 60 วัน และนำผลที่ได้ในแต่ละสูตรมาเทียบกันเพื่อหาสูตรที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นแคลลัส ดังตารางที่ 4 และ 5 ผลที่ได้พบว่าช่วง 45 วันแรก อาหารสูตรMS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว(MS 5.0.0) แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีมาก และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพรลีน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS 5.1.1) และสูตรที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว(MS 5.0.0) พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบจากกราฟ (รูปที่ 1) แล้วพบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหาร MS 5.1.1 มีอัตราสูงกว่า MS 5.0.0 ดังนั้นอาหารสูตร MS 5.1.1จึงเป็นสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดีที่สุดของอาหารสูตรนี้ ส่วนในอาหารสูตร LS ในช่วง 45 วันแรก อาหารสูตรที่แคลลัสเจริญเติบโตได้ดี คือสูตรที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (LS 5.0.0) และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป อาหารLS สูตรที่เติม เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพรลีน 500มิลลิกรัมต่อลิตร (LS 3.1.5) และ สูตรที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ โพรลีน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (LS 3.1.1) มีการเจริญเติบโตของแคลลัสใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบจากกราฟ (รูปที่ 2) แล้วพบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหาร LS 3.1.1 มีอัตราสูงกว่า LS 3.1.5 ดังนั้นอาหารสูตร LS 3.1.1 จึงเป็นสูตรอาหารที่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดีที่สุดของอาหารสูตรนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงขนาดของแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตในอาหารสูตร MS

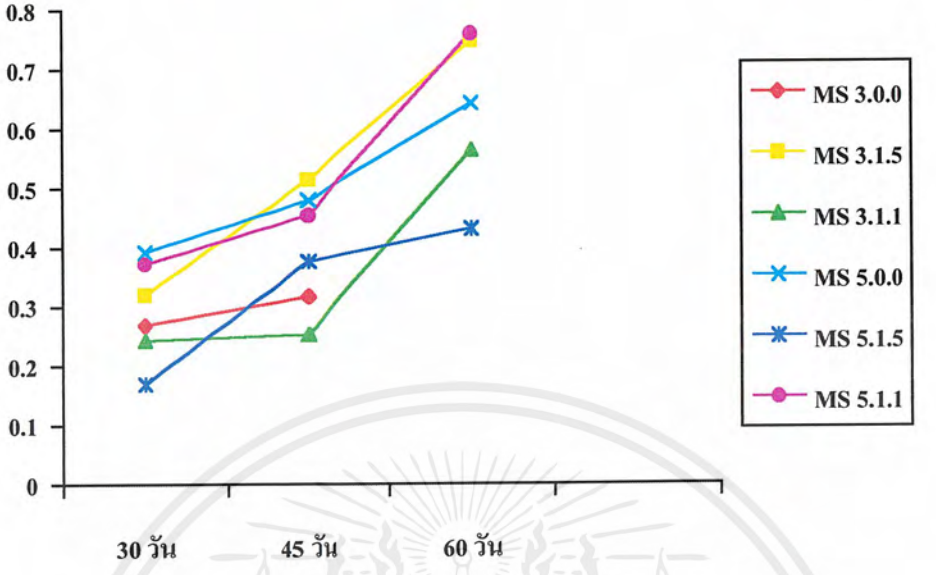
สูตรอาหาร	ขนาดของแคลลัส 30 วัน (ซม^2.)	ขนาดของแคลลัส 45 วัน (ซม^2.)	ขนาดของแคลลัส 60 วัน (ซม^2.)
MS 3 .0.0	0.2682	0.3163	Error
MS 3.1.5	0.3192	0.5129	0.747
MS 3.1.1	0.2427	0.2523	0.5624
MS 5 .0.0	0.3914	0.4787	0.6415
MS 5.1.5	0.1693	0.3753	0.4304
MS 5.1.1	0.3714	0.4527	0.7590

ตารางที่ 5 แสดงขนาดของแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตในอาหารสูตร LS

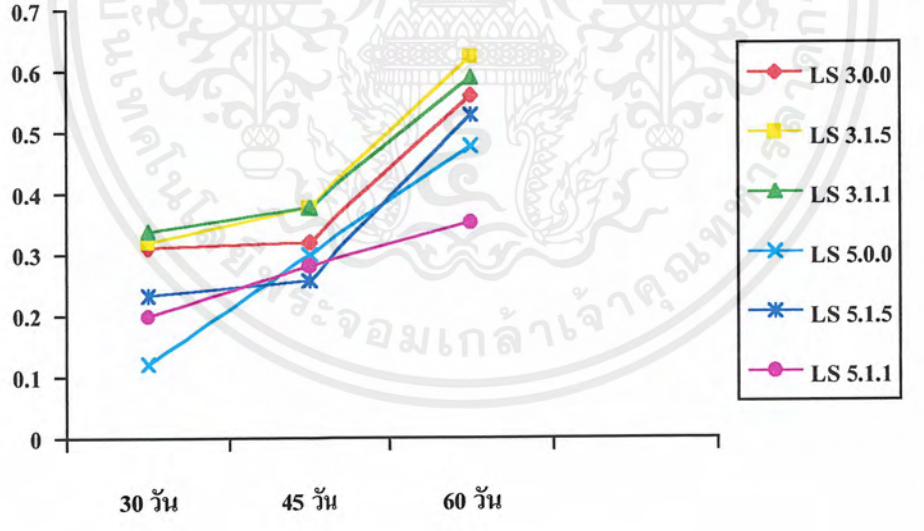
สูตรอาหาร	ขนาดของแคลลัส 30วัน (ซม^2.)	ขนาดของแคลลัส 45 วัน (ซม^2.)	ขนาดของแคลลัส 60 วัน (ซม^2.)
LS 3.0.0	0.3110	0.3200	0.5598
LS 3.1.5	0.3193	0.3767	0.6226
LS 3.1.1	0.3376	0.3765	0.5892
LS 5.0.0	0.1210	0.2996	0.4773
LS 5.1.5	0.2327	0.2570	0.5284
LS 5.1.1	0.1986	0.2816	0.3524

เมื่อนำมาเทียบเป็นกราฟการเจริญเติบโตจะเห็นค่าความแตกต่างอย่างระหว่างอาหารสูตร MS และ LS ดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



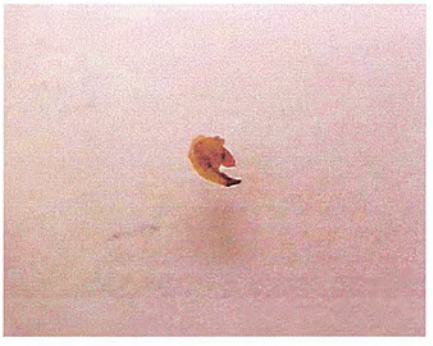
<u>รูปที่ 1</u> กราฟแสดงผลการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร MS



<u>รูปที่ 2</u> กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร LS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพ ก



ภาพ ข

ภาพ ค

ภาพ ง

รูปที่ 3 แสดงการพัฒนาของแคลลัสจากเมล็ดไปเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพรลีน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก แสดงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ข แสดงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

ค แสดงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน

ง แสดงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักให้นำแคลลัสเกิดเป็นเอ็มบริโอจีนิค

ผลจากการศึกษาในอาหารสูตร LS ที่เติม เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติม 2,4-D (LS 0.1.5) ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส โดยจะมีการเติมซีเอทินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสเกิดจุดสีม่วงโดยจะใช้แคลลัสที่มีอายุประมาณ 30 วัน ลักษณะแคลลัสที่เกิดจุดสีม่วง(รูปที่ 4) และผลการเกิดจุดสีม่วงในแต่ละสูตรจะแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 14 วันบนอาหาร LS 0.1.5 ที่มี ซีเอทิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรแคลลัสจะเกิดจุดสีม่วงมากที่สุดโดยคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่มีปริมาณ ซีเอทิน 1.0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเจริญเติบโตเป็น 33.33 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน และทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เป็นเอ็มบริโอจีนิคบนอาหาร LS สูตรเดิมเป็นระยะเวลาอีกประมาณ 10-15 วัน แคลลัสที่มีจุดสีม่วงจะสามารถเกิดรากและลำต้นได้ (รูปที่ 4)

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีม่วงบนอาหารสูตร LS ที่เติม เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติม 2,4-D ที่เติมซีเอทินในปริมาณที่ต่างกัน

ซีเอทิน จำนวนซ้ำ	0.5 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1.0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1.5 (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ซ้ำที่ 1	2	1	4
ซ้ำที่ 2	2	2	2

หมายเหตุ ในแต่ละซ้ำ เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส 6 แคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4 แสดงการเกิดจุดสีม่วงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติม 2,4-D และเติมซีเอทิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน

รูปที่ 5 แสดงการเกิดราก และลำต้นที่เกิดจากแคลลัสที่เป็นจุดสีม่วงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม เคซีนไฮโดรเลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติม 2,4-D และเติมซีเอทิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20-30วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 การหาอัตราการอยู่รอดของต้นหญ้าในสภาวะธรรมชาติ

ผลจากการศึกษาอัตราการอยู่รอดของต้นหญ้าที่เจริญมาจากเมล็ดที่ผ่านกระบวนการเกิดเอ็มบริโอจีนีซิสโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยจะนำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่เติม เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมซีเอทิน 0.5 1.0 หรือ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 20-30 วัน ก็จะเกิดการชักนำไปเป็นต้น เมื่อต้นหญ้ามีรากที่สมบูรณ์จึงนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะธรรมชาติโดยจะกำหนดในแต่ละกระถางมีจำนวนต้นหญ้าอยู่กระถางละ3 ต้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้ ดังตารางที่ 6 คือในกระถางที่ 1 3 5 และ 6 จะมีอัตราการเจริญเติบโตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ คือสามารถอยู่รอดได้ทุกต้น แต่ในกระถางที่ 2 และ4 จะอัตราการรอดประมาณ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และมีบางต้นที่ตายเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อรา

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนต้นหญ้าที่สามารถเจริญได้ในสภาวะธรรมชาติ

กระถางที่	จำนวนต้นที่อยู่รอดได้นาน 3 วัน	จำนวนต้นที่อยู่รอดได้นาน 7 วัน	จำนวนต้นที่อยู่รอดได้นาน14 วัน	จำนวนต้นที่อยู่รอดได้นาน 21 วัน
1	3	3	3	3
2	3	3	2	2
3	3	3	3	3
4	3	3	2	2
5	3	3	3	3
6	3	3	3	3

หมายเหตุ ในแต่ละกระถางเพาะเลี้ยงต้นหญ้า 3 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเกิดเป็นแคลลัส

จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าบนสูตรอาหารทั้ง 2 ชนิดคือ MS และ LS โดยจะในระยะเวลา 60 วัน สามารถสรุปได้ว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ โพรลีน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร(MS 5.1.1) และ อาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ โพรลีน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร(LS 3.1.1) เป็นสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสไปเป็นเอ็มบริโอจีนิค แคลลัส

ผลจากการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสไปเป็นเอ็มบริโอแคลลัส คืออาหารสูตร LS ที่เติม เคซีนไฮโดรไลเสท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มี 2,4-D(LS 0.1.5) และเติมซีเอทีน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วันจะเกิดจุดม่วง และสามารถพัฒนาไปเป็นต้นหญ้าได้โดยใช้เวลาประมาณ 10-20 วัน

การทดลองที่ 3 การหาอัตราการอยู่รอดของต้นหญ้าในสภาวะธรรมชาติ

ผลจากการทดลองพบว่า หญ้าแพรกสายพันธุ์ *Cynodon dactylon* ที่เกิดจากเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสสามารถเจริญได้ในสภาวะปกติเหมือนกับหญ้าที่อยู่ในธรรมชาติ ดังนั้นเราสามารถที่จะทำการขยายพันธุ์หญ้าโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากการเจริญเติบโตของหญ้าทั้ง 2 สภาวะไม่มีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อนุรักษ์,2544)

สารอาหาร	สูตรอาหาร MS (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สูตรอาหาร LS (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	165	165
KNO_3	190	190
$MgSO_4.7H_2O$	37	37
KH_2PO_4	17	17
$CaCl_2.2H_2O$	44	44
H_3BO_3	3.1 (1/2 ลิตร)	3.1 (1/2 ลิตร)
KI	0.415 (1/2 ลิตร)	0.415 (1/2 ลิตร)
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.125 (1/2 ลิตร)	0.125 (1/2 ลิตร)
$CoCl_2.6H_2O$	0.0125 (1/2 ลิตร)	0.0125 (1/2 ลิตร)
$MnSO_4.4H_2O$	2.23	2.23
$ZnSO_4.7H_2O$	0.86	0.86
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025	0.0025
Na_2 EDTA	3.73	3.73
$FeSO_4.7H_2O$	2.78	2.78
Inositol	5 (1/2 ลิตร)	20
Nicotinic acid	0.025 (1/2 ลิตร)	-
Pyridoxine HCL	0.025 (1/2 ลิตร)	-
Thiamine HCL	0.005 (1/2 ลิตร)	0.08
Glycine	0.1 (1/2 ลิตร)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ปรีดี เอกะวิภาต. 2519. การจัดการสนามหญ้า. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 164 หน้า.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี 218 หน้า.

สมบุญ เตชะกิญญาวัฒน์. 2536. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 149 หน้า.

สายยัณห์ ทัดศรี. 2531. พืชอาหารสัตว์และหลักการทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์. ภาควิชาไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 257 หน้า.

สิน พันธุ์พินิจ. 2535. การจัดการสนามหญ้า, สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช 87 หน้า.

สำเริง คำทอง และ เอกชัย พฤกษ์อำไพ. 2535. สนามหญ้า. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม 184 หน้า.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2544. หลักเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 140 หน้า.

Ashok C. and Rongda Qu. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass:Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant, Tissue and Organ Culture. 60 :113-119.

B. J. Ahn, F. H. Huang and J. W. King. 1984. Plant regeneration through somatic embryogenesis in common bermudagrass tissue culture. 1107-1109.

Denis L., Sylvain D. and Gilles V. 2000. Invitro propagation of reed grass by somatic embryogenesis. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 60:229-234.

Ivan R.A., Charles M. T. and Becky L. J. 1988. Effect of auxinconcentration on induction on growth of Embryogenic callus from young inflorescence explants of old world bluestem (*Bothriochloa* spp.) and bermuda (*Cynodon* spp.) grasses. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 12:13-19.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jeffrey D. Griffin and Margaret S. Dibble. 1995. High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures Of Kenucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Plant Cell Reports. 14:721-724.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้