รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้าง somatic embryogenesis ของลิลลี่

Somatic embryo induction of *Lilium formolongo*

นางสาวกัญจนา แซ่เตียว

นางงามนิจ ชื่นบุญงาม

นางสาวปวีณา ไตรเพิ่ม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2559

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้าง somatic embryogenesis ของลิลลี่

Somatic embryo induction of *Lilium formolongo*

นางสาวกัญจนา แซ่เตียว

นางงามนิจ ชื่นบุญงาม

นางสาวปวีณา ไตรเพิ่ม

RCH
ก382ก
2559

.b 12869582
.i

สชพมู 148553
สเขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี 31 มี.ค. 2560

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2559

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การสร้าง somatic embryogenesis ของลิลลี่

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2558-2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน....296000...บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย.....2....ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2559.....

ชื่อ-สกุล

หัวหน้าโครงการ นางสาวกัญจนา แซ่เตียว

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางงามนิจ ชื่นบุญงาม

นางสาวปวีณา ไตรเพิ่ม

บทคัดย่อ

การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบ และการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการโดยเฉพาะ α-Naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BA) และ NH_4NO_3 ในการศึกษานี้แบ่งเป็น 3 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NAA และ BA สำหรับการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ขนาด 0.5 เซนติเมตรบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติม NAA เข้มข้น0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 15 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 8 ชิ้น พบว่าใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาไปเป็น friable callus ได้ดีที่สุด โดยแคลลัสมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.93 เซนติเมตร และจำนวนยอดเฉลี่ย 1.08 ยอดต่อชิ้น ส่วนที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75,และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่สามารถทำให้ชิ้นส่วนพัฒนาไปเป็นยอดหรือแคลลัสได้ และตายในที่สุด โดยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการลดปริมาณ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่ โดยทำการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอดมากที่สุด 3.85 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มากที่สุดเฉลี่ย 3.10 ต้นต่อชิ้นส่วน การทดลองที่ 3 นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 อายุ 10 สัปดาห์ มาศึกษาผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มีต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 0.5 และ1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้แคลลัสขนาด 0.5 กรัมต่อขวด จัดสิ่งทดลองแบบ 2x6 factorial in complete randomized design (factorial in CRD) ทำ 12 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าผลของสถานะของอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุด 1.40 กรัม มีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด 0.56 เซนติเมตร และมีจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด 12.46 ยอดต่อชิ้นส่วน โดยมีระยะการพัฒนาเป็นยอดและรากที่เชื่อมต่อกัน ซึ่งเป็นทรีตเมนต์ที่เหมาะสมที่สุด และเมื่อเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 7.67 ยอดต่อชิ้นส่วน

คำสำคัญ : เอ็มบริโอ โซมาติกเอ็มบริโอ สารควบคุมการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลิลลี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Somatic embryo induction of *Lilium formolongo*

Researcher: **Miss Kanjana Saetiew**[1],

Mrs. Ngamnij Chuenboonngarm[2], **Miss Paweena Traiperm**[2]

[1]**Department: Plant Production Technology Faculty: Agricultural Technology, King Mongkut's Institute Technology Ladkrabang**

[2]**Department of Plant science Faculty of Science**

ABSTRACT

Induction of somatic embryo generation from leaf explants and the development of callus to somatic embryo contains several relevant factors such as α-Naphthaleneacetic acid (NAA), 6-Benzylaminopurine (BA), and NH_4NO_3. In this study was divided into three experiments. Experimental 1 the appropriate concentrations of NAA and BA for somatic embryo where somatic embryo induction from leaf of *Lilium formolongo* was studied. The leaf explants (size 0.5 cm) were cultured on Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplemented with 0, 0.5, 1 mg/l NAA combination with 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/l BA and cultured in the dark condition for ten weeks. The experimental design was completely randomized design CRD consisted of fifteen treatments three replications and eight pieces in a replication. The leaf explant cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 0.25 mg/l BA developed to creamy-white friable callus and callus size was 0.93 cm and 1.08 shoots per explant. Explants cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA developed 1.25 shoots. On MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1 mg/l BA the explants developed 0.83 cm compact callus and 0.41 shoot. The explants cultured on MS medium without growth regulators and explant cultured on MS medium with 0, 0.25, 0.75 and 1 mg/l BA did not develop to callus and explant turned brown and died. These results suggested that the differences were statistically significant. In experiment 2, the leaf explants were cultured on MS modified with 0, 5, 10, 15 and 20 mg/l NH_4NO_3 combination with 1 mg/l NAA and 0.25, 1 mg/l BA. They were cultured for ten weeks. The leaf explant (size 0.5 cm) were cultured on MS modified with 0, 20 mg/l NH_4NO_3 supplemented with 1 mg/l NAA and 0.25 mg/l BA was survivor equivalent rate at 65 percent and explants on MS modified with 10 mg/l NH_4NO_3 supplemented 1 mg/l NAA and 0.25 mg/l BA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

was callus size of 0.65 cm. The leaf explants on MS modified with 5 mg/l NH_4NO_3 supplemented with 1 mg/l NAA combied with 0.25 mg/l BA was highest shoots rate at 60 percent. It was found on modified MS with 15 mg/l NH_4NO_3 supplemented 1 mg/l NAA and 1 mg/l BA was amount of 3.85 shoots, and explants developed somatic embryogenesis on MS modified 5 mg/l NH_4NO_3 supplemented with 1 mg/l NAA and 1mg/l BA was amount 3.10 shoots. These results suggested that the differences were statistically significant. In experiment 3 callus obtained from experiment 1 cultured on MS medium supplemented with 0, 0.5, 1 mg/l NAA with 0, 0.25 and 1 mg/l BA. They were cultured in dark condition for five weeks. It was found that MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 0.25 mg/l BA showed that callus growth was 1.40g with embryogenic callus size 0.56 cm and the amount somatic embryogenesis was 12.46 shoots. Callus in liquid MS supplemented with 1 mg/l NAA combined with 0.25 mg/l BA showed that weight of callus was 0.35g. But embryogenic callus size was smaller than that of callus cultured in liquid MS supplemented with 1 mg/l NAA combined with 0.5 mg/l BA which was 0.35 cm. When callus were cultured in liquid MS supplemented with 0.5 mg/l NAA combined with 1 mg/l BA produced amounts of 7.67 somatic embryo. It was also found that callus were cultured on MS liquid medium gave somatic embryo less than solid culture medium.

Keyword : Embryo, Somatic embryo, Plant growth regulator, Tissue cultured, Lily

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2558-2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	3
ขอบเขตของงาน	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	54
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	58
บรรณานุกรม	**59**
ภาคผนวก	**63**
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย	**64**
ประวัติผู้เขียน	**66**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	การเตรียมส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์	19
4.1	ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการรอดชีวิตของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	23
4.2	ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อขนาดของแคลลัสในการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	26
4.3	ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนยอดที่ชักนำผ่านแคลลัสในการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	28
4.4	ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออัตราการรอดชีวิตของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	37
4.5	ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อขนาดแคลลัสของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	38
4.6	ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออัตราการเกิดยอดของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	39
4.7	ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนยอดของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	40
4.8	ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่	41
4.9	ผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวต่อน้ำหนักการเจริญเติบโตของแคลลัส	46
4.10	ผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวต่อขนาดของแคลลัส	48
4.11	ผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวต่อจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	24
4.2	การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์	27
4.3	การเกิดยอดของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์	29
4.4	การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	31
4.5	การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์	32
4.6	การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 7 สัปดาห์	34
4.7	การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์	35
4.8	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์	36
4.9	การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง T1-T6 และในอาหารเหลว T7-T12 สูตรต่างๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	43
4.10	การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง T1-T6 และในอาหารเหลว T7-T12 สูตรต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	44
4.11	การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง T1-T6 และในอาหารเหลว T7-T12 สูตรต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์	51
4.12	แสดงระยะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอและการเกิดพัฒนาไปเป็นต้นในอาหารแข็ง	52
4.13	แสดงระยะการเกิดรูปร่างเซลล์เดี่ยว (single cell) จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันไม้ดอกมีความสำคัญและเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกจำหน่ายกันอย่างแพร่หลายในหลายพื้นที่ของโลก ลิลลี่เป็นไม้หัวที่มีดอกขนาดใหญ่ สวยงาม บางชนิดมีกลิ่นหอม และเป็นดอกไม้ที่มีราคาแพงมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นไม้ตัดดอกอันดับที่สี่ของโลก มีมูลค่า 205.43 ล้านล้านบาท ราคาต่อก้าน 18.4 บาท และพบว่าลิลลี่มีการเพาะปลูกมากที่สุดในประเทศจีน และแถบเอเชีย พื้นที่ 2,831.250 ไร่ (International statistics flowers and plants 2014, AIPH 2014, โสระยา. 2559) ในประเทศญี่ปุ่นมีพื้นที่ปลูกดอกลิลลี่เพื่อเป็นไม้ตัดดอกมากเป็นอันดับสามของไม้ตัดดอกทั้งหมด (กระทรวงเกษตร ประมง และป่าไม้ญี่ปุ่น. 2557) สามารถทำรายได้ให้เกษตรกรและผู้ผลิตเป็นจำนวนมากสามารถทำเป็นอาชีพหลักและอาชีพเสริมได้ ซึ่งได้รับความสนใจจากเกษตรกรจำนวนมากที่จะปลูกเป็นอาชีพ ไม้ดอกยังมีความสำคัญในด้านความสวยงาม และเป็นแหล่งวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตน้ำหอม เครื่องสำอาง ยารักษาโรค ก่อให้เกิดอุตสาหกรรมการท่องเที่ยว ประเทศไทยจึงได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมาปลูกเพื่อผลิตเป็นไม้ตัดดอกและเป็นการค้าต้น ซึ่งเป็นไม้ดอกที่มีความต้องการของตลาดสูง จึงทำให้เกษตรกรมีความสนใจที่จะผลิตลิลลี่เป็นจำนวนมาก

ลิลลี่เป็นไม้ดอกประเภทหัว มีดอกขนาดใหญ่ และสวยงาม บางชนิดมีกลิ่นหอมมากนับว่าเป็นดอกไม้ที่มีราคาแพง ใช้เป็นทั้งไม้ตัดดอกและไม้กระถาง (โครงการหลวง. 2535) เป็นที่ต้องการของตลาดเสมอ ไม้ดอกจึงมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นจนเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย (สุปราณี. 2540) แต่หัวพันธุ์ที่นำเข้ามามีราคาแพงและปลูกได้ในบางพื้นที่ของประเทศที่มีอากาศค่อนข้างเย็น วิธีขยายพันธุ์คือการปักชำโดยใช้กลีบหัวหรือส่วนขยายพันธุ์พิเศษคือ bulbil (หัวย่อย) แต่ต้นพันธุ์ที่ได้มีจำนวนน้อยและใช้เวลานานกว่าจะได้ผลผลิตที่ดี (กรมวิชาการเกษตร. 2546) จึงได้มีวิธีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและต้นที่ปลอดโรค ให้ได้เป็นจำนวนมากสามารถผลิตดอกได้เองภายในประเทศ (อรดี. 2534) ดังนั้นการผลิตหัวพันธุ์ลิลลี่โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณหัวพันธุ์และผลิตหัวพันธุ์ให้ได้คุณภาพใช้ภายในประเทศมีผลทำให้การนำเข้าหัวพันธุ์ลิลลี่จากต่างประเทศในอนาคตลดลง(กรมวิชาการเกษตร. 2546) การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลิลลี่สามารถใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชได้ เช่น หัว ลำต้น ใบ ดอกอ่อน อับละอองเกสร แต่ส่วนมากเป็นการชักนำให้เกิดต้นโดยตรง และมีบางชนิดใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นส่วนดังกล่าวมาพัฒนาให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ (Nhut *et al.* 2006) ซึ่งโซมาติกเอ็มบริโอพร้อมจะพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

จากการปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะใช้เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาการพัฒนาให้เกิดต้นพืชผ่านระบบโซมาติกเอ็มบริโอจึงเป็นพื้นฐานสำคัญที่จะทำให้การคัดเลือกต้นในระบบการถ่ายยีนง่ายขึ้น (Luo *et al.*1999) สำหรับลิลลี่ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อนำออกปลูกมีรายงานว่าต้นที่เกิดมาจากการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นที่เกิดจากออร์แกโนเจเนซิส (Nhut *et al.* 2006) การพัฒนาของเนื้อเยื่อนั้นมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้หลายแบบ โดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ทั้งในเรื่องของพันธุ์ อายุพืช ชิ้นส่วนเริ่มต้น อาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งส่วนใหญ่การพัฒนามีทั้งชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่โดยตรง (direct organogenesis) และการชักนำผ่านแคลลัส (callus) ซึ่งแคลลัสดังกล่าวจะถูกชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนิค แคลลัส และชักนำให้เกิดต้นต่อไป การวิจัยนี้เป็นการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นจากชิ้นส่วนใบ โดยเลี้ยงในสูตรอาหารและสถานะของอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอของลิลลี่ รวมทั้งศึกษาการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์เพื่อเป็นพื้นฐานในการนำมาปรับปรุงพันธุ์ลิลลี่โดยเทคนิคอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยใช้ความเข้มข้นของ NAA และ BA สำหรับการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการลดปริมาณ NH_4NO_3 ในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของสถานะของอาหารต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่

1.2.4 เพื่อศึกษาการพัฒนาการทางกายวิภาคของโซมาติกเอ็มบริโอ

1.3 ขอบเขตของงาน

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NAA และ BA สำหรับการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และศึกษาผลของการลดปริมาณ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่ และศึกษาผลของสถานะของอาหารต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และศึกษาลักษณะทางกายวิภาคการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่ โดยผ่านวิธีการศึกษาทาง histology

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NAA และ BA ที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอของลิลลี่ทราบถึงผลของปริมาณ NH_4NO_3 ลักษณะของแคลลัสที่มีต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของลิลลี่ทราบถึงผลของสถานะของอาหารต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอของลิลลี่

1.4.2 ทราบถึงการพัฒนาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของลิลลี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลิลลี่เป็นดอกไม้เมืองหนาวมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนและตอนเหนือของญี่ปุ่นเป็นไม้ที่มีดอกสวยงามมากจนได้รับสมญานามว่าเป็นดอกไม้ของเจ้าหญิง ลิลลี่พันธุ์ที่มีสีขาวบริสุทธิ์ เป็นดอกไม้ที่มีความหมายในเทศกาลอีสเตอร์ ช่วงเดือนเมษายน เราจึงเรียกลิลลี่ในกลุ่มนี้ว่า อีสเตอร์ลิลลี่ หรือ ทรัมเปตลิลลี่ ลิลลี่เป็นไม้ดอกประเภทหัว มีหลายสายพันธุ์และมีดอกหลากสี บางชนิดมีกลิ่นหอมจึงเป็นที่นิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก (กรมวิชาการเกษตร. 2546) เป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญเนื่องจากมีดอกขนาดใหญ่ สวยงามน่าดึงดูด และมีอายุการปักแจกันที่นาน (EL-Naggar *et al.* 2012)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lilium* sp.

วงศ์ Liliaceae

ชื่อสามัญ Lily, Easter lily

ลิลลี่ (*Lilium* sp.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นไม้ดอกที่มีหัวสะสมอาหารอยู่ใต้ดิน หัวของลิลลี่คือส่วนลำต้นที่อัดตัวกันแน่นประกอบด้วยฐานของหัวลักษณะเป็นแผ่นแบนๆ ด้านบนเป็นกลีบเรียงซ้อนกันเป็นชั้นคล้ายกลีบกระเทียม ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหาร ด้านล่างของฐานจะมีรากงอกออกมา ประกอบด้วยส่วนของ basal plate เป็นส่วนของลำต้นหรือส่วนฐานของหัว มีลักษณะเป็นแผ่นแบนและด้านบนเป็นที่กำเนิดของกลีบสะสมอาหาร (scale) เปลี่ยนแปลงมาจากใบเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ คล้ายกลีบกระเทียมแต่บางกว่า กลีบนี้เป็นส่วนสะสมอาหารสำหรับการเจริญเติบโตเหนือดินและด้านล่างของ basal plate จะเป็นที่เกิดรากด้วย หัวลิลลี่ไม่มีเยื่อบางๆ ห่อหุ้มเหมือนกลีบกระเทียม หัวของลิลลี่จะเจริญเติบโตและเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปีจะสร้างจุดเจริญใหม่ภายในหัว เมื่อหัวพัฒนาเต็มที่และได้ผ่านช่วงฤดูหนาวจะเกิดการทำลายการฟักตัวของหัว ยอดใหญ่จะเจริญเติบโตเป็นลำต้นเหนือดิน และส่วนยอดจะสร้างช่อดอก ซึ่งดอกจะมีกลีบดอก 6 กลีบแยกออกจากกันมีเกสรตัวผู้ชูขึ้นอยู่ใจกลางดอก ลิลลี่มีหลากหลายสี มีทั้งสีขาว ชมพู ส้ม แดงม่วง และมีสองสีในดอกเดียวกัน นอกจากนี้บางพันธุ์ยังมีจุดประบนกลีบดอกอีกด้วย ซึ่งได้รับความนิยมมาก ลิลลี่เป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมไม้ตัดดอกลำดับต้นๆ ของโลก และมีมากกว่า 8,000 สายพันธุ์ (Zhou *et al.* 2008) ลิลลี่จึงได้มีการปลูกเพื่อผลิตหัวพันธุ์และเป็นไม้ตัดดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ชนิดและพันธุ์ของลิลลี่โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

2.2.1 กลุ่มลูกผสม ลองจิฟลอรัม (Longiflorum hybrid) ลิลลี่ปากแตร ดอกมี 6 กลีบโคนกลีบดอกเชื่อมติดกัน แยกกันเฉพาะปลายกลีบ มีลักษณะคล้ายปากแตรปกติจะออกดอกในช่วงเดือนพฤษภาคม ซึ่งอยู่ในช่วงเทศกาลอีสเตอร์ จึงเรียกว่า อีสเตอร์ลิลลี่ ลิลลี่ประเภทนี้ดอกอ่อนจะตั้งขึ้นแต่เมื่อดอกอายุมากจะนอนขนานกับพื้น แต่เดิมมีสีขาวเพียงชนิดเดียว มีกลิ่นหอม แต่ในปัจจุบันมีสีเหลือง ชมพู ม่วง ซึ่งไม่มีกลิ่นหอม พันธุ์ที่นำมาปลูกในไทย ได้แก่ ฮาร์ซันฮิโนโมโต้ พิงค์โกล เด้นทรัมเป็ด เยนโลว์

2.2.2 ลูกผสมเอเชีย (Asiatic hybrid) กลีบดอก 6 กลีบ แยกออกจากกัน ช่อดอกตั้งไม่คว่ำหน้าเหมือนชนิดอื่น มีจุดประเล็กน้อยที่กลีบดอกหรือไม่มี สีของดอกมีหลายสี ได้แก่ ขาว ครีม เหลือง ส้ม ชมพู แดง ลิลลี่ประเภทนี้ไม่มีกลิ่นหอม พันธุ์ที่นำมาปลูกได้แก่ คอนเนกติกัน คิงออร์คิด บิวตี้ และ มองต์บลังก์

2.2.3 ลูกผสมออเรียลทอล (Oriental Japanese hybrid) ดอกมี 6 กลีบแยกออกจากกัน ดอกออกในแนวนอนขนานกับพื้นดิน ลักษณะเด่นชัดคือ กลีบดอกด้านในมีลักษณะคล้ายหนวดยื่นออกมาจำนวนมาก ดอกมีหลายสี เช่น ขาว ชมพู แดง ทุกพันธุ์มีกลิ่นหอมรุนแรง (สุปราณี. 2540)

ส่วนลิลลี่ที่ใช้ในงานทดลองนี้คือ *Lilium formolongo* จัดอยู่ในกลุ่มของลูกผสม ลองจิฟลอรัม (Longiflorum hybrid) หรือลิลลี่ปากแตร

2.3 การขยายพันธุ์

2.3.1 การเพาะเมล็ด เมื่อฝักแตกจะเห็นเมล็ดสีดำอยู่ประมาณ 200-500 เมล็ดต่อฝัก สามารถนำเมล็ดไปเพาะใน ขุยมะพร้าว : ทราย : ขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:1:1 เมล็ดจะงอกได้ภายใน 2-3 สัปดาห์

2.3.2 การแยกหัว (bulb division) การแยกหัวย่อยที่เกิดใต้ดิน (underground bullet) และการปักชำกลีบหัว (bulb scale) ซึ่งเรียกว่า scaling สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้ เมื่อนำออกปลูกก็จะได้ต้นเหมือนเดิม อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจเกิดปัญหาเรื่องโรคไวรัสได้

2.3.3 หัวย่อย (bulbil) เป็นหัวย่อยที่เกิดตรงซอกใบของลิลลี่ โดยเฉพาะพวก asiatic hybrids

2.3.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการขยายพันธุ์จากชิ้นส่วนพืชขนาดเล็ก แล้วทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนเดิมเป็นปริมาณมาก และปลอดเชื้อโรคในเวลาอันรวดเร็ว ส่วนต่างๆ ที่สามารถนำมาขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ ได้แก่ ปลายยอด (shoot tip) กลีบ (bulb scale) ก้านละอองเกสร (filament) อับละอองเกสร (pollen) ชิ้นส่วนของลำต้น (stem section) และชิ้นส่วนใบ (leaf section) (ณรงค์. 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึงการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ เช่น ข้อ ตา ปลายยอด ราก เนื้อเยื่อพาเรงไคมา (parenchyma) หรือ ในระดับเซลล์ หรือ โพรโทพลาสต์ของพืช ในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ชิ้นส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นส่วนใดก็ตามสามารถเจริญเติบโตขึ้นได้ในอาหารสังเคราะห์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม และมีการใช้ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง ความรู้ทางเทคนิควิธีการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลายเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) ในอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) ซึ่งประกอบด้วย เกลือ แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสง (อรดี . 2539; อารีย์. 2541) และโพรโทพลาสต์ (protoplast) ตลอดจนการทำลูกผสมของโพรโทพลาสต์ระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลกัน (ศิวพงศ์. 2546) มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้นซึ่งประกอบไปด้วยเกลือแร่ ธาตุอาหารต่างๆ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) เนื้อเยื่อจะถูกเก็บไว้ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส ได้รับแสงประมาณ 1000-2000 ลักซ์ ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้โดยตรง หรือเจริญเป็นแคลลัส หรือ เอมบริออยด์ (embryoid) และหลังจากนั้นพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป (รงรอง. 2542)

2.5 หลักการและประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

หลักการที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ตัดเอาชิ้นส่วนที่สะอาด นำมาเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เมื่อเซลล์พืชหรือส่วนต่างๆ ได้รับแร่ธาตุ ไวตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาล จากอาหาร ที่ใช้เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส หรือเกิดเป็นคัพภะที่เรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ หรือเอมบริออยด์ เมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้นๆ แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายก็จะได้ต้นที่เหมือนกันทุกประการ (อรดี. 2539)

2.5.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.5.1.1 การขยายสายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมาก (clonal propagation) การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีนี้ทำให้ได้ตรงตามพันธุ์ และจำนวนมากๆ ในเวลาอันสั้น เป็นวิธีที่นิยมใช้ในเชิงการค้า

2.5.1.2 การปรับปรุงพันธุ์พืช (crop improvement) การนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นขึ้นกับวัตถุประสงค์ของผู้ปฏิบัติ ว่าต้องการในด้านใดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.3 การผลิตพืชที่ปราศจากโรคที่ติดมากับพันธุ์พืช โดยเฉพาะโรคไวรัส (virus free plant) การที่จะผลิตต้นพืชให้ปราศจากเชื้อไวรัสนั้นทำได้โดยการตัดส่วน meristem ที่มีขนาดเล็กประมาณ 0.01-0.05 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงและชักนำให้เกิดต้น ซึ่งเชื่อว่าจะได้ต้นที่ปราศจากเชื้อไวรัส และใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศได้ต่อไป

2.5.1.4 การผลิตยาและสารเคมีที่เป็นประโยชน์จากพืช โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อสารเหล่านี้เช่นสารสี สารอัลคาลอยด์ จากยาสมุนไพร สารหอมระเหย เป็นต้น ซึ่งวิธีการนี้จะให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการรอเก็บผลผลิตจากต้นแล้วนำมาสกัด ทั้งยังประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย จึงต้องใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น

2.5.1.5 การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

2.5.1.6 การเก็บรักษาพันธุ์พืช (germplasm preservation) สาเหตุสำคัญอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือจากการทำของมนุษย์เอง นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในสภาพหลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (water stress) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งเช่นสภาพปกติ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ เก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ (รังสฤษฎ์. 2540)

2.6 ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโต (hormones and growth regulators)

ฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในต้นพืช (plant hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติ การเจริญเติบโตตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และ secondary metabolism เป็นผลมาจากฮอร์โมน เหล่านี้ทั้งสิ้น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่จำเป็นเสมอไปโดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงแคลลัส อย่างไรก็ตามโดยปกติจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและ/หรือการกำเนิดอวัยวะ และมีเนื้อเยื่อไม่กี่ชนิดที่สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ประเภทออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญที่สุด พืชบางชนิดสร้างสารเหล่านี้อยู่แล้ว แต่ควรเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อช่วยให้การเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีขึ้น บางครั้งอาจต้องใช้จิบเบอเรลลิน หรือ เอทิลีนเพื่อพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (รงรอง. 2542) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากธรรมชาติหรือสารที่สังเคราะห์ขึ้นมา (ศิวพงศ์. 2546) ในการทดลองนี้มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิด อยู่ในกลุ่มของ ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ได้แก่

2.6.1 ออกซิน (auxin) เช่น NAA (α-naphthalene acetic acid) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สังเคราะห์ขึ้นมา มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มขนาดของเซลล์ เซลล์มีการยืดตัวและเกิดรากได้ดี (คำนูญ. 2542) มักใช้กับไซโทไคนินเพื่อช่วยในการแบ่งเซลล์ ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส การสร้างราก แต่การเจริญของรากจะถูกยับยั้งถ้ามีออกซินในปริมาณที่สูง

2.6.2 ไซโทไคนิน (cytokinin) เช่น BAP หรือ BA (6-benzyl amino purine หรือ N^6-benhzyl adinine) มีหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์โดยเฉพาะถ้าใช้ร่วมกับออกซิน ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงขึ้นจะช่วยในการสร้างราก แต่ยับยั้งการเจริญของรากส่งเสริมการสร้างยอดโดยลดผลจากการที่ตายอดข่มตาข้าง มีบทบาทในการเปลี่ยนสภาพเซลล์เป็นอวัยวะได้และชักนำให้เกิดเป็นต้น (สุเม. 2536)

2.7 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรงไคมาแต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus แคลลัสที่ได้จะมีรูปร่าง สี แตกต่างออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและอาหารที่เลี้ยง การเจริญของแคลลัสในอาหารแข็งเห็นได้จากการที่มีก้อนโตขึ้น (รังสฤษฏ์. 2540)

2.7.1 การพัฒนาของแคลลัส การพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือ รากของแคลลัส อาจจะผ่านขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส หรือ เอ็มบริโอเจเนซิส ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ เช่น ถ้าหากเกาะตัวเป็นกลุ่ม การพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส ถ้าเป็นเซลล์เดี่ยว การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จะผ่านขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสคล้ายกับเอ็มบริโอ จึงเรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ

2.7.2 การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอทำได้โดยการชักนำให้เซลล์พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัส หรือเซลล์แขวนลอยมาก่อน จากนั้นทำการเปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เกิดการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอจากเซลล์เดี่ยวหรือแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอย สูตรอาหารที่นิยมนำมาใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสหรือกระตุ้นให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอส่วนมากใช้อาหารสูตร MS และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน จะมีผลโดยตรงต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชักนำให้เกิดแคลลัส ได้แก่ การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตแบบผสมระหว่างออกซินและไซโทไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสม (วราภรณ์. 2557) ซึ่งสอดคล้องกับ Novak and Petru (2003) มีการขยายพันธุ์ลิลลี่ลูกผสม โดยศึกษาผลของสูตรอาหาร Linsmaier and Skoog (1965) (LS) ร่วมกับ NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบจำนวนมาก และการเพาะเลี้ยงรังไข่ได้ผลสำเร็จ

2.7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

2.7.3.1 ขนาดและรูปร่าง (size and shape) ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กกว่านี้แล้วจะไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัส

2.7.3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วๆ ไปแล้ว ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซินมากกว่าไซโตไคนิน) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ (ออกซินน้อยกว่าไซโตไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล (ออกซินเท่ากับไซโตไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ นั้นพบว่าออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิด พืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

2.7.3.3 ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากจะต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่วๆ ไป ของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน แอสปาติน อาร์จินิน พิวรีน และไพริมิดิน สารพวกเคซิน ไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

2.7.3.4 แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และ/หรือ แซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์

2.7.3.5 ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย (เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

2.7.3.6 สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าใน อาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (รังสฤษดิ์. 2540)

2.7.4 ประโยชน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.4.1 การขยายพันธุ์ (micropropagation) โดยชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก

2.7.4.2 การผลิตโพรโทพลาส (protoplasts) แคลลัสเหมาะอย่างยิ่งในการนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้วและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

2.7.4.3 การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม (secondary metabolites) ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมได้

2.7.4.4 ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploids) โดยใช้สารโคลซิซินชักนำ

2.7.4.5 การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน (tolerant and resistant plants) เช่น ทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อนและหนาว หรือต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

2.7.4.6 การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (cryopreservation) (รังสฤษดิ์. 2540)

2.7.5 การพัฒนาของพืชในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การพัฒนาไปเป็นต้นพืชจะผ่านการพัฒนาอยู่ 2 วิถีทางคือ

2.7.5.1 ออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) คือ การพัฒนาเป็นอวัยวะการเกิดยอดจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชส่วนใดส่วนหนึ่ง หรือจากส่วนแคลลัส ที่ยอดเกิดขึ้นมีทิศทางในการเจริญเติบโตในทิศทางเดียว หลังการเกิดยอดแล้ว จะเกิดรากเพื่อเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

2.7.5.1.1 ทางตรง (direct organogenesis) เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใดก็ตามบนอาหารสามารถเกิดอวัยวะของพืช โดยไม่เกิดแคลลัสมาก่อน

2.7.5.1.2 ทางอ้อม (indirect organogenesis) การชักนำให้เกิดยอดโดยเกิดแคลลัสก่อนส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงมักเป็นส่วนที่มีการเจริญเติบโต หรือมีการแบ่งตัวที่รวดเร็ว เช่น shoot tip (สุเม. 2536)

2.7.5.2 เอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) คือ การพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจากไซโกตแต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเกิดเอ็มบริโอได้จากเซลล์เดี่ยวๆ ซึ่งมีคุณสมบัติโททิโพเทนซี (totipotency) ออกมาอย่างสมบูรณ์เต็มที่จึงเกิดเป็นเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์เดี่ยวอาจเรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) การเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส มีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่างๆ คือจากเซลล์เดี่ยว เพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มเซลล์ เปลี่ยนเป็นรูปร่างกลม (globular shape) หัวใจ (heart shape) ตอร์ปิโด (torpedo shape) และต้นกล้า(seedling) ตามลำดับ

2.7.5.2.1 การเจริญเป็นเอ็มบริโอโดยตรง เรียกว่า direct embryogenesis จากโซมาติกเซลล์เจริญเป็นเอ็มบริโอโดยตรงไม่ผ่านแคลลัส เช่น จากนิวเซลลัสของมะนาวแล้วเจริญเป็นเอ็มบริโอ

2.7.5.2.2 การเจริญเป็นเอ็มบริโอโดยอ้อม เรียกว่า indirect embryogenesis จากเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงจะเจริญเป็นแคลลัสก่อน แล้วต่อจากนั้นจึงพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแคลลัสนำไปแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้วจึงกลายเป็นเอ็มบริโอ เช่น การเพาะเลี้ยงใบกาแฟเป็นแคลลัสแล้วพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ (ศิวพงศ์. 2546)

2.8 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) กับการเจริญเติบโตของพืช

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) เป็นธาตุอาหารที่รากพืชสามารถดูดไปใช้ได้ซึ่งอยู่ในกลุ่มธาตุอาหารไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมากจึงจะเพียงพอต่อการเจริญเติบโตตามปกติ ไนโตรเจนรูปที่เป็นประโยชน์ซึ่งพืชดูดไปใช้ได้ มีอยู่ 3 อย่างคือ ไนเตรทไอออน (NO^-_3) แอมโมเนียม (NH^+_4) และ ยูเรีย [$CO(NH_2)_2$] โสภา (2015) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเอื้องพร้าว โดยการดัดแปลงอาหารสูตร MS โดยการลดไนโตรเจนลง 20 เท่าและเพิ่มฟอสฟอรัสขึ้น 5 เท่า เติม BA 0.5 มิลลิลิตร พบว่าให้น้ำหนักสดมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในขณะที่การเติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้ต้นกล้ามีความยาวราก และมีจำนวนใบมากที่สุด ส่วน พันทิภา (2555) รายงานว่าได้ศึกษาผลของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ BA ต่อการเจริญเติบโตและออกดอกของออนซิเดียมแคระในหลอดทดลอง โดยเลี้ยงต้นกล้วยไม้บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยการปรับลดไนโตรเจน ในรูป NH_4NO_3 ลง 20 เท่า และ เพิ่มฟอสฟอรัส ในรูป KH_2PO_4 ขึ้น 5 เท่า และเติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองรวม 6 สูตร พบว่าสูตรที่เติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดต้นใหม่จำนวนมาก แต่ต้นใหม่มีขนาดเล็กและไม่มีราก ส่วนในอาหารที่เพิ่มฟอสฟอรัส 5 เท่า และลดไนโตรเจน 20 เท่า และเติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเกิดต้นมากที่สุด แต่ถ้าไม่เติม BA จะส่งผลไม่ชัดเจน

2.9 การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การพัฒนาของเอ็มบริโอที่ได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัสเริ่มจากเซลล์บางเซลล์ในก้อนของแคลลัสที่มีความตื่นตัวมากกว่าเซลล์อื่นๆ เซลล์ดังกล่าวนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้เป็นกลุ่ม และปูดยื่นออกมามีลักษณะคล้ายระยะ globular-shaped ต่อมาก็พัฒนาเป็นระยะ heart-shaped และ torpedo-shaped การพัฒนาของเอ็มบริโอจากเซลล์ผิว (epidermis cell) ของพืชจะพบได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และลำต้นที่ยังอ่อนอยู่ แต่เซลล์ผิวที่นิยมนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ จะใช้จากส่วนของใบ เพราะใบมีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีพื้นที่ผิวมาก มีเซลล์ผิวทั้งด้านบน (upper epidermis) และด้านล่าง (lower epidermis) จากการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเลี้ยงแผ่นใบ พบว่านอกจาก เซลล์ชั้นผิวแล้ว เซลล์ชั้นอื่นๆ คือ palisade cell และ spongy cell ก็สามารถที่จะชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้เหมือนกันการพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell culture) เซลล์เดี่ยวอาจได้มาจากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอ็มไซม์ (pectinase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

enzyme) หรือได้จากการแยกเซลล์จากแคลลัส การเพาะเลี้ยงทำในอาหารเหลว จึงเรียกวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบนี้ว่าการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การพัฒนาของเอ็มบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยวๆ แบ่งตัวออกเป็น 2, 4 เซลล์ และทวีคูณไปเรื่อยๆ จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ ต่อมาพัฒนาเป็นก้อนกลมๆ (globular-shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped และ torpedo-shaped ในที่สุด (อภิชาติ. 2544)

2.9.1 ข้อแตกต่างระหว่าง organogenesis และ embryogenesis มีดังนี้คือ

2.9.1.1 การเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก (shoot-root connection) ในการเกิดออร์แกนโนเจเนซิสนั้น การเกิดยอดและรากจะเป็นอิสระต่อกัน คือการเกิดยอดและรากอาจจะไม่ติดต่อกันก็ได้ รากอาจจะเกิดจากบริเวณหนึ่ง ส่วนยอดจะเกิดอีกบริเวณหนึ่ง แม้บนแคลลัสก้อนเดียวกัน แต่ในบางครั้งอาจจะพบว่า เนื้อเยื่อที่เกิดยอดและรากอยู่ใกล้กันอาจจะเจริญติดกันได้ หรือเนื้อเยื่อส่วนยอดด้านโคน อาจจะสามารถเกิดรากขึ้นมาจนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ส่วนในเอ็มบริโอเจเนซิส ส่วนยอดและรากจะต้องติดต่อกัน เนื่องจากพัฒนามาจากเซลล์ ๆ เดียวกัน

2.9.1.2 polarity การเกิดยอดหรือรากในแคลลัสนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกหรือสิ่งที่จะมากระตุ้นให้เกิดเป็น meristematic cell และ meristematic cell เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากก็ได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่า polarity ของออร์แกนโนเจเนซิส เสียไป หรือ ไม่มี polarity ส่วนใน เอ็มบริโอเจเนซิสนั้นจะมี polarity ซึ่งเป็นแบบ bipolar เนื่อง จากการพัฒนาจากเซลล์ ๆ เดียวเป็นกลุ่มเซลล์ขึ้น ด้านหนึ่งของกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดเจริญขึ้นไปบนอากาศ อีกด้านหนึ่งพัฒนาเป็นราก เจริญลงสู่แนวดิ่ง เหมือนต้นพืชที่เจริญทั่วๆ ไป

2.9.1.3 การเชื่อมต่อระหว่างท่อน้ำท่ออาหาร (vascular bundle connection) ท่อ น้ำท่ออาหารของยอดและรากในขบวนการออร์แกนโนเจเนซิสอาจจะต่อหรือไม่ต่อกันก็ ได้ แต่โดยทั่วๆ ไป มักจะต่อถึงกัน โดยจะต่อผ่านเนื้อเยื่อเดิม แต่ในขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ท่อน้ำและท่ออาหารของยอดและรากจะเชื่อมต่อกัน (อภิชาติ. 2544)

2.10 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ

2.10.1 โซมาติกเอ็มบริโอไม่มีสภาวะการพักตัว

2.10.2 สามารถผลิตต้นอ่อนได้เป็นจำนวนมาก

2.10.3 ได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ

2.10.4 ประหยัดพื้นที่ สามารถผลิตได้ทั้งปี ลดแรงงาน

2.10.5 ช่วยในการขยายพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี

2.10.6 โซมาติกเอ็มบริโอปลอดจากโรคและไวรัส

2.10.7 ย่นระยะเวลาในการปรับปรงพันธุ์

2.10.8 แก้ปัญหาการไม่งอกของเมล็ดพืชบางชนิด

2.10.9 ประหยัดพื้นที่ สามารถผลิตได้ทั้งปี ลดแรงงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 รายงานผลการวิจัยของการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกี่ยวข้อง

Novak and Petru. (2003) ได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์ลิลลี่ลูกผสมโดยศึกษาผลของ NAA และ BAP ต่อการงอกของหัวลิลลี่จากขนาดของชิ้นส่วนลิลลี่ลูกผสมตะวันออกเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารสูตร (Linsmeaierang and Skoog. 1965)(LS) ร่วมกับ NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสจำนวนมากต่อ 1 ชิ้นส่วน ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงใบ และการเพาะเลี้ยงรังไข่เกิดผลสำเร็จอย่างยิ่ง เนื่องจากการแตกตาของลิลลี่ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อมีการประสพความสำเร็จเป็นอย่างดีจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งของการขยายพันธุ์พืช ต่อมา Lingfei *et al.* (2009) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของใบลิลลี่พันธุ์ *Lilium davidii* var. unicolour ซึ่งได้นำมาเลี้ยงบนอาหาร (Nitsh and Nitsh. 1969) (NN) ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ NAA จากการทดลองพบว่า ยอดสามารถเจริญขึ้นมาได้จากการเกิดแคลลัส ส่วนมากจะเกิดจากการตัดขวางของเส้นกลางใบและส่วนโคนของใบ อาหารสูตรที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมากสุด พบว่าเกิดแคลลัส 93.9 เปอร์เซ็นต์และเกิดยอดจากใบได้มากที่สุด 3.83 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชคืออาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกยอดสามารถเจริญได้ดีบนอาหารสูตร ½ MS (ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้เลี้ยงยาสูบทำให้เจริญได้เร็ว) ร่วมกับฮอร์โมน IBA 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน และสามารถนำออกปลูกได้ปริมาณมากถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Kanchanapoom *et al.* (2011) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของลิลลี่ longiflorum มาตัดให้มีขนาด 1 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีการเกิดยอดมากที่สุด 4.1 ยอดต่อชิ้น หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน Bachetta *et al.* (2003) กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้มีการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นโดยเริ่มจากหลายส่วน เช่น ดอก ต้น ใบ และกลีบหัว ซึ่ง Sage D.O., *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของหัว (bulb) ของ Narcissus พันธุ์ Golden Harvest และ St. Kevarne พบว่า พันธุ์ Golden Harvest ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.11 และ 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากก้านช่อดอก (scape) มากที่สุดต่อมา Loretta (2003) จึงทำการเพาะเลี้ยงลิลลี่ 4 สายพันธุ์จากชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต cytokinin (TDZ หรือ BA) และ auxin (NAA หรือ IBA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า พันธุ์ในกลุ่ม Asiatic Pollyanna และพันธุ์ Oriental hybrid สามารถเกิดยอดในอาหารที่มี TDZ ปริมาณสูง ส่วน Longiflorum 'Snow Queen' มีการพัฒนาเป็นแคลลัส โดย Nhut *et al.* (2001) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของหัวลิลลี่ ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาก่อน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA 1.10 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร ตัดตาดอกให้มีขนาด 3-4 มิลลิเมตร เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่าเกิดตายอด 41 ยอดต่อชิ้นส่วน ยอดที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความแข็งแรงมากที่สุด อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก คือ อาหาร ½ MS ที่เติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อทำการย้ายต้นพืชไปปลูกในสภาพโรงเรือน ต้นพืชสามารถเกิดรากได้ภายใน 2 เดือน และเจริญเติบโตเป็นต้นได้ปกติ ต่อมา Nhut *et al.* (2006) ได้ทดสอบการเกิดและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเพื่อให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส โดยเริ่มจากการนำ pseudo-bulblets ของลิลลี่ มาชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วนำแคลลัสที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารเหลวและอาหารแข็งในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเลี้ยงแคลลัสบนอาหารเหลวจะทำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสได้ ซึ่งพบว่าที่ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสมากที่สุด ในขณะที่อาหารแข็งนั้นทำให้แคลลัสพัฒนาได้ดี มีน้ำหนักเฉลี่ยที่มากและโตเร็ว แต่ไม่มีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส และเมื่อนำต้นที่ได้จากการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสที่ได้มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ มาเพาะเลี้ยงในโรงเรือนพบว่าสามารถปรับตัวได้ดีเมื่อนำออกปลูก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ผ่านการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส ทำให้สามารถขยายพันธุ์ลิลลี่ได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพมาก ต่อมาผู้วิจัยได้สนใจศึกษาการลดปริมาณไนโตรเจนในรูปไนเตรท NH_4NO_3 เพื่อต้องการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ จึงได้ศึกษารายงานของ Kostenyak *et al* (1999) กล่าวว่าพืชที่ได้รับธาตุอาหารในปริมาณต่ำ จะส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. พืชทดลองได้แก่ ลิลลี่พันธุ์ *formolongo*

2. อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง แท่งแก้วคนสาร หม้อนึ่งฆ่าเชื้อมีดผ่าตัด ขวดแก้ว กระบอกน้ำกลั่น ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์จานแก้ว กรวย ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ฟรอยด์ ถุงพลาสติก ยางรัด มีดผ่าตัด ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช ขวดย้อมสี

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ตู้ปลอดเชื้อสำหรับตัดชิ้นส่วนพืช เครื่องเขย่า (shaker)

4. อุปกรณ์ในการบันทึกภาพ กล้องถ่ายภาพ

5. อุปกรณ์อื่นๆ ตู้เย็น ไม้บรรทัด สมุดบันทึกผลการทดลอง ปากกา ดินสอ ยางลบ ผ้าขาวบ

6. อุปกรณ์ในการตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ

7. กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo-microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

8. ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส

9. สารเคมีในการในการตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ

10. แผ่นให้ความร้อน

11. กระดาษผิวมันสำหรับพับเป็นกระทง ขนาด 1.5x1.5x1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

12. แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

13. เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome) พร้อมใบมีด

14. สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)(MS) (ภาคผนวก ก)

15. สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA (Napthalene acetic acid) และไซโตไคนิน ได้แก่ BA (6-benzyl adenine)

16. สารเคมีในการในการตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลิลลี่ โดยนำเมล็ดผ่านน้ำไหล 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และ sodium hypochloride 1 เปอร์เซ็นต์ (คลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 5 นาที นำเมล็ดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS จนกระทั่งได้ต้นในสภาพปลอดเชื้อ

นำใบที่ได้จากต้นที่เพาะเมล็ดมาตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโทไคนินได้แก่ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโทไคนิน เช่น BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลทุก 1 สัปดาห์ โดยบันทึกอัตราการรอดชีวิต ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส ขนาดแคลลัส จำนวนการเกิดยอด วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำ 15 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 8 ชิ้น ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS (control)
ทรีตเมนต์ที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 5 อาหารแข็งสูตร MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 6 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 7 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 8 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 9 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 10 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 11 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 12 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 13 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 14 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ที่ 15 อาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การทดลองที่ 2 ผลของ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี

นำใบอ่อนจากต้นที่มีอายุ 3 สัปดาห์จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS มาตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตรนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยการปรับลดไนโตรเจนในรูปของ NH_4NO_3 ลงปริมาณความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส โดยทำการย้ายชิ้นส่วนลงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลทุก 1 สัปดาห์

เมื่อเลี้ยงครบ 10 สัปดาห์แล้ว นำไปเลี้ยงในที่มีแสง เพื่อสังเกตการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ให้แสงจากหลอดไฟ cool white วันละ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส จนครบ 12 สัปดาห์ โดยบันทึกอัตราการรอดชีวิต ขนาดของแคลลัส อัตราการเกิดยอด จำนวนการเกิดยอด จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำ 10 ทรีตเมนต์ๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น ดังนี้

ทรีตเมนต์ 1 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 2 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 3 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 4 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 5 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

+NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด friable callus จากการทดลองที่ 1)

ทรีตเมนต์ 6 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 7 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 8 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 9 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 10 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

+NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด compact callus จากการทดลองที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148553

การทดลองที่ 3 ผลของสถานะของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 ที่มีลักษณะเป็น friable callus ที่มีอายุ 10 สัปดาห์ จากอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.25, 0.5, 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเลี้ยงในแข็งและอาหารเหลวใหม่ โดยใช้แคลลัสขนาด 0.5 กรัมต่อขวด โดยในอาหารเหลวใช้ Erlenmeyer Flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และเลี้ยงบนอาหารแข็งให้แสงจากหลอดไฟ cool white วันละ 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส จนครบ 5 สัปดาห์ โดยบันทึกน้ำหนักของแคลลัส ขนาดของแคลลัส และจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ จัดสิ่งทดลองแบบ 2x6 factorial in complete randomized design (factorial in CRD) ทำ 12 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น โดยแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัย A คือ a_1 อาหารแข็ง

a_2 อาหารเหลว

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

b_1 ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

b_2 ความเข้มข้นของ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

b_3 ความเข้มข้นของ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

b_4 ความเข้มข้นของ NAA1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

b_5 ความเข้มข้นของ NAA1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

b_6 ความเข้มข้นของ NAA1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนท์ที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS (control)

ทรีตเมนต์ที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS+ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 5 อาหารแข็งสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 6 อาหารแข็งสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนท์ที่ 7 อาหารเหลวสูตร MS (control)

ทรีตเมนต์ที่ 8 อาหารเหลวสูตร MS+ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 9 อาหารเหลวสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 10 อาหารเหลวสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 11 อาหารเหลวสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 12 อาหารเหลวสูตร MS+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

สังเกตระยะการพัฒนาต่างๆ เช่น รูปร่างกลม รูปร่างหัวใจ รูปร่างตอร์ปิโด และต้นอ่อนโดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวาง และตามยาวของอวัยวะดังกล่าว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ของ Johansen (1940)

3.3.1 วิธีการเตรียมสาร

3.3.1.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixation) ได้แก่ Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

3.3.1.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ จากระดับที่ 1 ไปจนถึงระดับที่ 5 โดยในแต่ละระดับใช้เวลาในการแช่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

ส่วนผสม	ปริมาตรในแต่ละระดับ				
	1	2	3	4	5
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	50	30	15	0	0
95 % Ethyl alcohol (%)	40	50	50	45	0
Tertary butyl alcohol(TBA)(มิลลิลิตร)	10	20	35	55	75
100% Ethyl alcohol (มิลลิลิตร)	0	0	0	0	25
Total alcohol	50	70	85	95	100
รวมปริมาตร (มิลลิลิตร)	100	100	100	100	100

3.3.1.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ paraplast

3.3.1.4 พาราฟินเหลว

3.3.1.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดกับแผ่นสไลด์ (Haupt'sadhesive)

การเตรียม Haupt's adhesive (Sass.1958) ประกอบด้วยส่วนผสม

เจลาติน (galatin)	1	กรัม
ผลึกฟีนอล(phenol crystal)	2	กรัม
กลีเซอรีน	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียมโดยการละลายเจลาตินในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส แล้วเติมผลึกฟีนอลและกลีเซอรีนลงไปคนให้เข้ากันแล้วกรองใส่ขวดที่มีฝาปิด เมื่อใช้ให้หยดน้ำยา 1-2 หยดลงบนแผ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สไลด์ที่สะอาดใช้พู่กันทาน้ำยาให้ทั่วแผ่นสไลด์และใช้น้ำยานี้คู่กับฟอร์มาลิน 3 เปอร์เซ็นต์

3.3.1.6 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี (safranin) ($C_{20}H_{19}N_4Cl$) มีสภาพเป็นด่าง ละลายน้ำได้ 5.45 เปอร์เซ็นต์ มีคุณสมบัติย้อมติดส่วนของเนื้อเยื่อที่มีลิกนิน (lignin) คิวติน (cutin) และซูเบอริน (suberin) ประกอบด้วยส่วนผสมของ

สีซาฟรานิน	1	กรัม
เอธิลีนไกลคอล (ethylene glycol)	50	กรัม
เอธิลแอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซ็นต์	25	มิลลิลิตร
โซเดียมอะซีเตต(sodium acetate)	1	กรัม
ฟอร์มาลิน (formalin)	2	มิลลิลิตร

3.3.1.7 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี (fast green) ($C_{37}H_{34}O_{10}N_2Na_2S_3$) มีสภาพเป็นกรด ละลายน้ำได้ 16.04 เปอร์เซ็นต์ มีคุณสมบัติย้อมติดส่วนผนังที่มีเซลลูโลส (cellulose) เพคติน(pectin) และไซโตพลาสซึม(cytoplasm) ประกอบด้วยส่วนผสมของ

สีฟาส์ทกรีน	1	กรัม
เอธิลีนไกลคอล (ethylene glycol)	60	มิลลิลิตร
โคลฟ่ออย	60	มิลลิลิตร
เอธิลแอลกอฮอร์ 100 เปอร์เซ็นต์	60	มิลลิลิตร

3.3.1.8 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

3.3.1.9 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์

3.3.2 วิธีการการเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืช

3.3.2.1 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ มาแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดแก้วไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปสู่ขั้นตอนต่อไป

3.3.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึงระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำยาที่เป็นส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 เมื่อถึงขั้นตอนนี้แล้วเนื้อเยื่อเหล่านั้นก็พร้อมที่จะรับการซึมซับพาราฟิน (infiltration)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่เติมพาราฟินในหลอดแล้ว จึงนำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง หรือมากกว่า เพื่อให้พาราฟินแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช

3.3.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ เก็บแท่งเนื้อเยื่อไว้ในที่เย็น

3.3.2.5 เมื่อต้องการตัดเนื้อเยื่อนำแท่งพาราฟินที่เตรียมไว้ มาตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า จัดให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง นำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำแท่งไม้ไปบรรจุอยู่ในช่องของเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ตัดเนื้อเยื่อตามความยาวหรือตามขวางตามความเหมาะสม ให้หนา 13-15 ไมครอน เนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดจะอยู่ในลักษณะของแถบเนื้อเยื่อ (paraffin ribbon)

3.3.2.6 นำเนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ด้วยน้ำยายึดพืช วางแผ่นกระจกสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบเนื้อเยื่อแห้ง และติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์

3.3.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วนำไปย้อมสี

3.3.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นปิดกระจกสไลด์ โดยใช้ Canada balsam ยึด

3.3.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิทนำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพเนื้อเยื่อ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิเคราะห์ อัตราการรอดชีวิต ขนาดแคลลัส อัตราการเกิดยอด จำนวนการเกิดยอด จำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

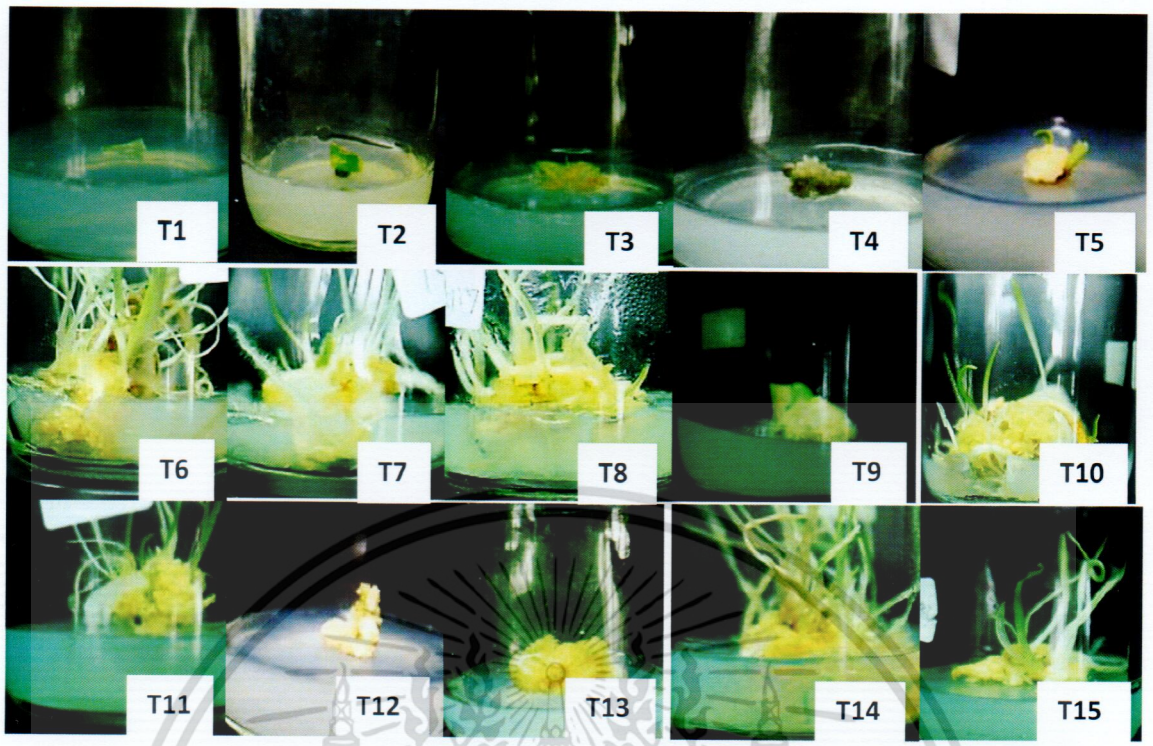
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

4.1.1 อัตราการรอดชีวิต

การศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ สังเกตได้ว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่น 0.25, 0.5, 0.75 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2-4 ใบลิลลี่เริ่มขยายขนาดขึ้นมีลักษณะหงิกงอ และยังไม่มีการเกิดแคลลัสในทุกๆ ทรีตเมนต์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปเรื่อยๆ พบว่าบางทรีตเมนต์ชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลงตามลำดับ โดยในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียว ส่งผลให้ชิ้นส่วนตายโดยใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 4.1 T1) มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อทำการพิจารณาทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติม NAA ร่วมกัน และเมื่อชิ้นส่วนมีอายุครบ 10 สัปดาห์ ชิ้นส่วนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดเฉลี่ยคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาว่าบน อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 83 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีอัตราการรอดชีวิตลดลง เฉลี่ย 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารในสูตรต่างๆ ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่าก็พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

(T1) ชิ้นส่วนใบที่ตายบนอาหารสูตร MS (control)

(T2) ชิ้นส่วนเริ่มมีการขยายขนาดบนอาหารแข็งสูตร MS + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T3) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T4) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T5) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T6) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T7) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T8) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T9) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T10) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T11) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T12) ส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T13) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

(T14) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

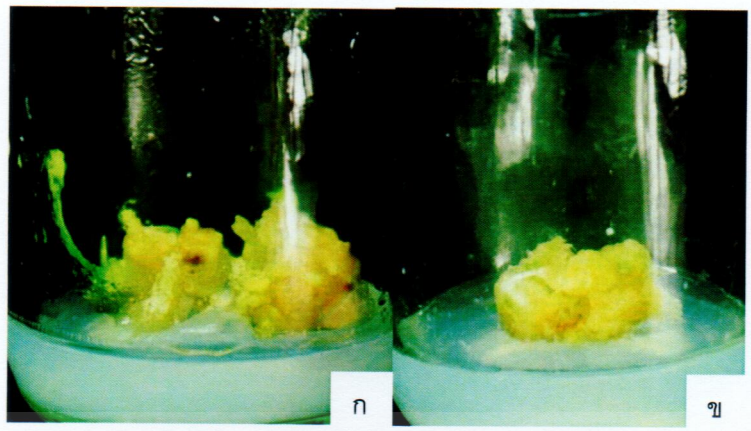
(T15) ชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ขนาดแคลลัส

พบว่าในสัปดาห์ที่ 0-4 ยังไม่มีการเกิดแคลลัสในทุกทรีตเมนต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 6 พบว่า ชิ้นส่วนใบมีการขยายขนาดและมีการเกิดแคลลัสในลักษณะที่ต่างกัน โดยพบว่า มีการเกิดแคลลัส 2 ลักษณะคือ ลักษณะที่เกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) และลักษณะที่เกาะกันแน่น (compact callus) โดยพบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัสแบบ friable callus (ภาพที่ 4.2ก) ซึ่งพบว่า มีขนาดเฉลี่ย 0.13 เซนติเมตร และพบว่าชิ้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการเกิด compact callus (ภาพที่ 4.2ข) มีขนาดเฉลี่ยมากที่สุด 0.39 เซนติเมตร แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนชิ้นส่วนบนอาหารสูตรอื่นๆ พบว่า มีการเกิดทั้ง friable callus และ compact callus ที่ต่างกันออกไปตามความเข้มข้นต่างๆ (ภาพที่ 4.1) แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่ออายุครบ 10 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบมีการเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้นทั้ง 2 ลักษณะ โดยลักษณะที่เป็น friable callus มีขนาดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด 0.93 เซนติเมตร และมีการเกิดยอด 1.08 ยอดต่อชิ้นส่วน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะที่เป็น compact callus มีขนาดแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 0.83 เซนติเมตร แต่มีการเกิดยอดเพียง 0.41 ยอดต่อชิ้นส่วน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อพิจารณาขนาดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เนื่องจากมีขนาดแคลลัสที่เล็กกว่า มีขนาด 0.63 เซนติเมตร(ตารางที่ 4.2) มีการเกิดยอดเพียง 0.04 ยอดต่อชิ้นส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

(ก) ชิ้นส่วนใบมีการเกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็น friable callus บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ข) ชิ้นส่วนใบมีการเกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact callus บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.2 จำนวนการเกิดยอด

พบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 0-4 ยังไม่มีการเกิดยอดในทุกทรีตเมนต์ แต่เมื่อชิ้นส่วนใบมีอายุ 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบที่พัฒนาไปเป็นแคลลัสมีการเจริญเติบโตต่อเนื่อง เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติพบว่า บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอด 0.38 ยอดต่อชิ้นส่วนมากที่สุด และรองลงมาพบว่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอด 0.37 ยอดต่อชิ้นส่วน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอด 0.33 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่ออายุครบ 10 สัปดาห์พบว่า แคลลัสที่มีลักษณะที่เป็น friable callus มีการเกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 1.25 ยอดต่อชิ้นส่วน (ภาพที่ 4.3) บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาพบว่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอด 1.08 ยอดต่อชิ้นส่วน และบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอด 0.70 ยอดต่อชิ้นส่วน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ในอาหารสูตรอื่นมีการเกิดยอดที่แตกต่างกันไป เมื่อทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติกับชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการเกิดยอดเฉลี่ย 0.41 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อจำนวนยอดที่ชักนำผ่านแคลลัสในการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในสัปดาห์ที่ 6-10

ความเข้มข้น (mg/l)		ชนิดแคลลัส	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน(ยอด)(±SE)[1/]		
			อายุ (สัปดาห์)		
NAA	BA		6	8	10
MS (control)		-	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	0.25	-	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	0.50	-	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	0.75	-	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	1	-	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.5	0	friable callus	0.38±0.86a	0.62±0.92a	0.70±1.05ab
0.5	0.25	friable callus	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.5	0.5	friable callus	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.5	0.75	compact callus	0.04±0.11c	0.04±0.11c	0.04±0.11c
0.5	1	compact callus	0.00±0.00c	0.37±0.73abc	0.37±0.73bc
1	0	friable callus	0.04±0.11c	0.04±0.11c	0.04±0.11c
1	0.25	friable callus	0.37±0.50a	0.49±0.75abc	1.08±1.52a
1	0.5	friable callus	0.33±0.71b	0.58±1.00ab	1.25±1.17a
1	0.75	friable callus	0.12±0.35bc	0.12±0.35bc	0.12±0.35bc
1	1	compact callus	0.08±0.23bc	0.20±0.50abc	0.41±0.75bc
F-test			**	**	**
CV (%)			7.92	15.02	16.24

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 การเกิดยอดของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

4.2.1 อัตราการรอดชีวิต

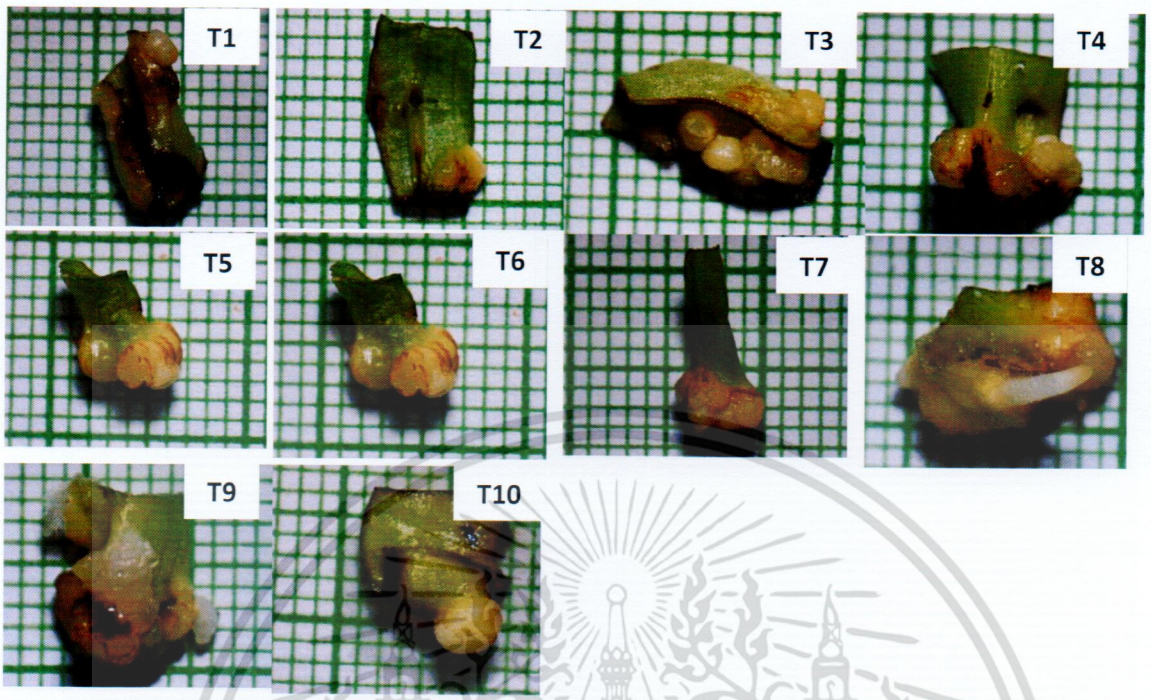
จากการศึกษาผลของ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่ สังเกตได้ว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ทุกความเข้มข้น เมื่อนำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนใบมีการเปลี่ยนแปลงขยายขนาด แต่เมื่อเริ่มเข้าสัปดาห์ที่ 3 พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเข้าสัปดาห์ที่ 4 พบว่าชิ้นส่วนใบมีอัตราการรอดชีวิตลดลง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 10 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด 65 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (control) ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อทำการพิจารณาทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากบางชิ้นส่วนไม่มีการพัฒนาและตาย (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การเจริญเติบโตของแคลลัส

เมื่อชิ้นส่วนมีอายุได้ 3 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนมีการเกิดตุ่มเล็กๆ บนอาหารทุกทรีตเมนต์ โดยมีลักษณะเป็นก้อนกลมปูดออกมาจากชิ้นส่วนใบ มีลักษณะคล้ายพัฒนาไปเป็นยอดหรือ ราก โดยเรียกการเจริญเติบโตแบบนี้ว่า direct organogenesis โดยมีการเกิดยอดหรือรากก่อน ถ้าหากชิ้นส่วนพัฒนาไปเป็นรากจะสังเกตเห็นได้ว่าจะมีขนรากเกิดขึ้นมาพร้อมกัน (ภาพที่ 4.4 T8) และบางชิ้นส่วนก็มีลักษณะการเกิดเป็นแคลลัสขึ้นมาก่อน แบบ compact callus และมีการพัฒนาแบบการเกิดโดยอ้อมเรียกว่า indirect somatic embryogenesis โดยพบว่ามีการเกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีขนาดเฉลี่ย 0.08 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.4 T3) เมื่อชิ้นส่วนมีอายุได้ 5 สัปดาห์พบว่า บนอาหาร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุด เฉลี่ย 0.27 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.5 T3) และเมื่อชิ้นส่วนมีอายุได้ 7 สัปดาห์พบว่ามีขนาดใหญ่ที่สุดและมีการพัฒนาไปเป็นยอดด้วย (ภาพที่ 4.6 T3) เมื่อทำการเลี้ยงชิ้นส่วนไปจนครบ 10 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนมีการพัฒนาเห็นได้ชัดเจนขึ้น โดยพบว่า ชิ้นส่วนบนอาหารมีการพัฒนาไปเป็นยอด (ภาพที่ 4.7 T1) และพัฒนาไปเป็นรากและมีการเกิดแคลลัสพร้อมกับการเกิดยอดและราก (ภาพที่ 4.7 T10) โดยเมื่อพิจารณาทางสถิติในสัปดาห์ที่ 10 พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต เพราะชิ้นส่วนมีการเกิดแคลลัสเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 4.7 T6, ตารางที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การเจริญเติบโตของแคลลัสบนชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

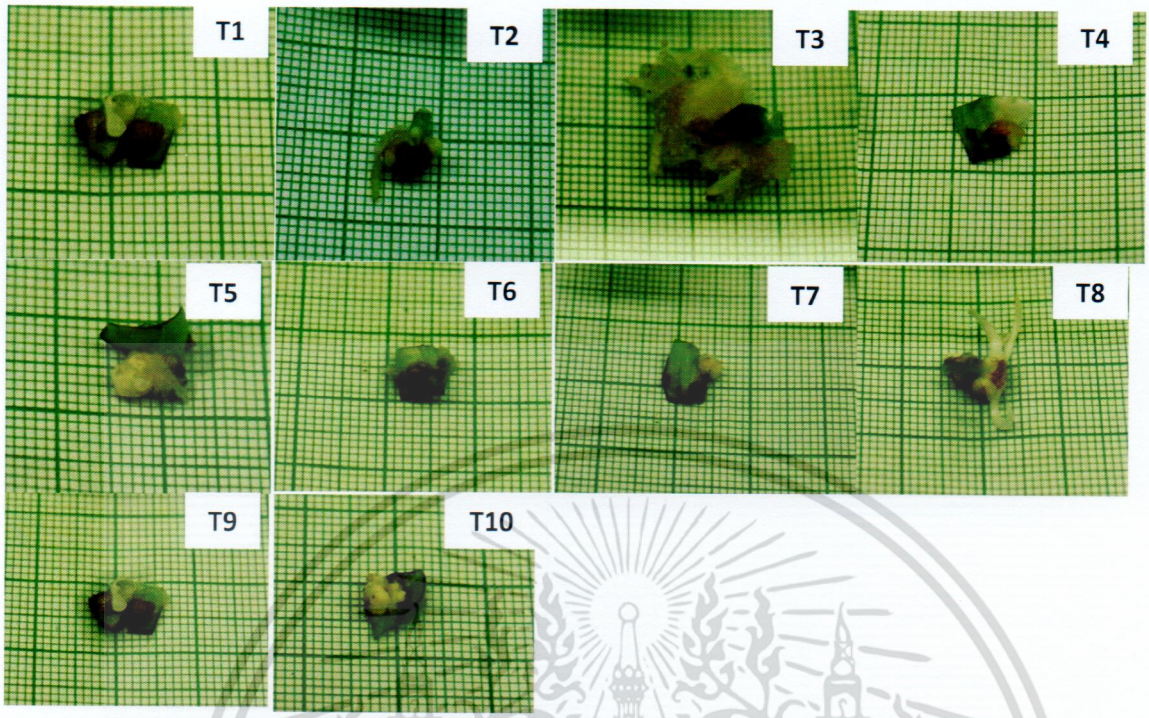
ทรีตเมนต์ 1 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 2 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 3 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 4 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 5 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

} + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด friable callus จากการทดลองที่ 1)

ทรีตเมนต์ 6 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 7 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 8 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 9 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 10 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

} + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด compact callus จากการทดลองที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเจริญเติบโตของแคลลัสบนชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ทรีตเมนต์ 1 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 2 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 3 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 4 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 5 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด friable callus จากการทดลองที่ 1)

ทรีตเมนต์ 6 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 7 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 8 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 9 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 10 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

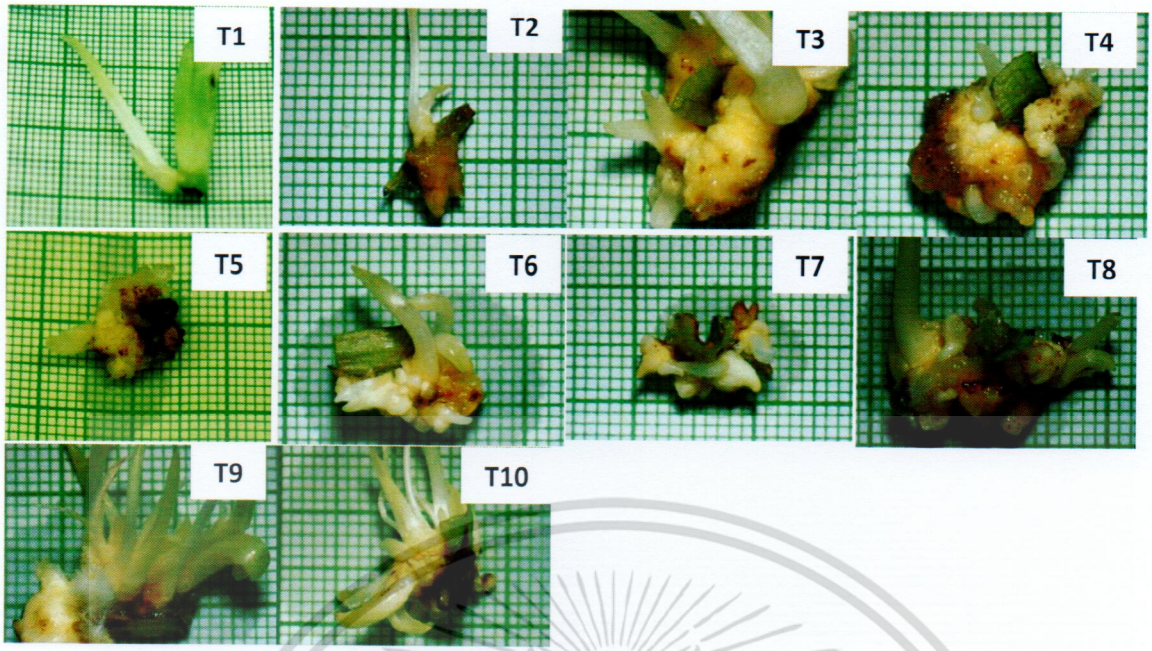
+ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด compact callus จากการทดลองที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 อัตราการเกิดยอดและจำนวนการเกิดยอด

เมื่อพิจารณาอัตราการเกิดยอดพบว่า ในสัปดาห์ที่ 3-10 ทุกชิ้นส่วนมีอัตราการเกิดยอดเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 5 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึงมากที่สุดเฉลี่ย 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6) เมื่อมาพิจารณาอัตราและจำนวนการเกิดยอดพบว่า ชิ้นส่วนที่มีอัตราการเกิดยอดที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มในการเกิดยอดได้ แต่การพัฒนาไปเป็นยอดในทุกทรีตเมนต์มีเกิดยอดเพียงเล็กน้อย โดยมีลักษณะเป็นยอดขึ้นมาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอดมากที่สุด 3.85 ยอดต่อชิ้นส่วนเรื่อย ๆ (ภาพที่ 4.7 T9) โดยเมื่อพิจารณาทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ กับชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอดรองลงมาเฉลี่ย 3.05 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 4.7) โดยมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ (ภาพที่ 4.7 T4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 การเกิดแคลลัสและยอดของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 7 สัปดาห์

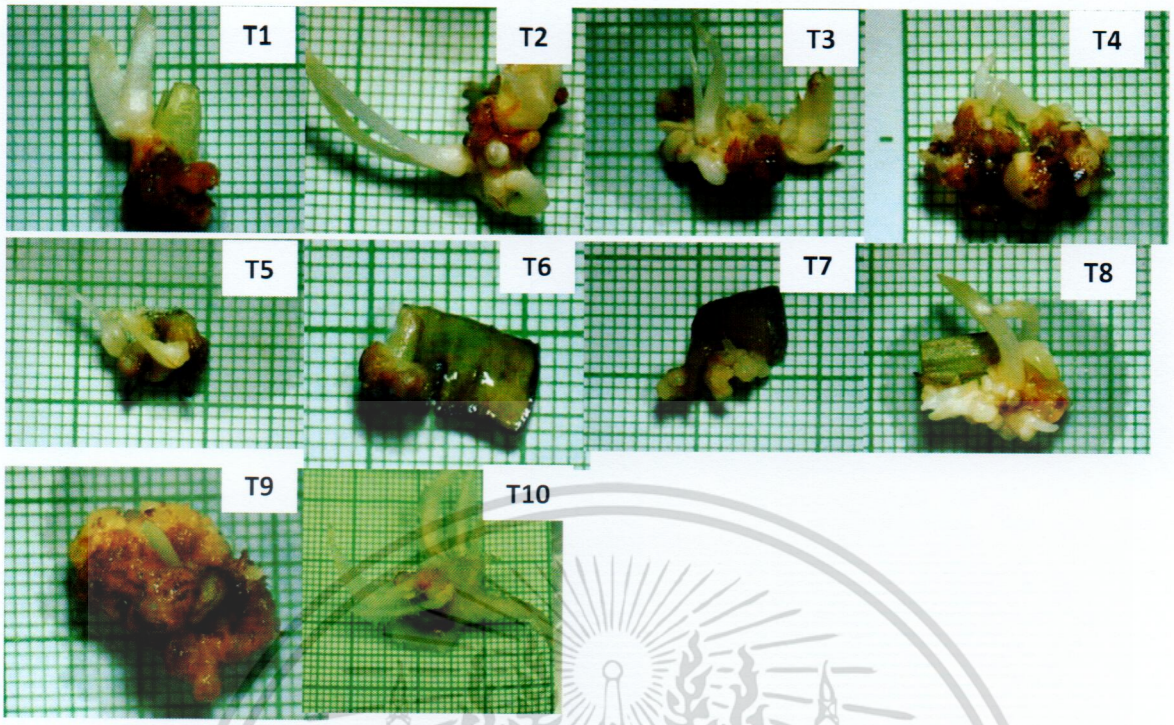
ทรีตเมนต์ 1 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 2 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 3 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 4 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 5 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

} + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด friable callus จากการทดลองที่ 1)

ทรีตเมนต์ 6 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 7 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 8 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 9 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 10 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

} + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด compact callus จากการทดลองที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 การเกิดแคลลัสและยอดของชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

ทรีตเมนต์ 1 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 2 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 3 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 4 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 5 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

} + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด friable callus จากการทดลองที่ 1)

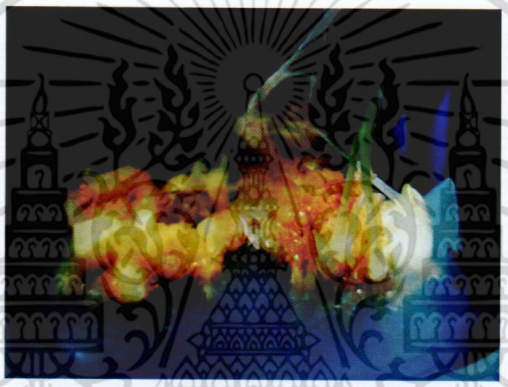
ทรีตเมนต์ 6 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 7 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 8 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 9 MS ดัดแปลง NH_4NO_3 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีตเมนต์ 10 (control) MS ดัดแปลง NH_4NO_3 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

} + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกจากสูตรอาหารที่ทำให้เกิด compact callus จากการทดลองที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

พบว่าบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด 3.10 ต้นต่อชิ้นส่วน โดยเกิดหลังจากนำมาเลี้ยงไว้ในที่มีแสง นอกจากนี้ยังพบว่า มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ อาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอด 2.30 ต้นต่อชิ้นส่วน รองลงมาอีกตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) เมื่อพิจารณาลักษณะการเกิดยอดและรากแล้ว พบว่ามีการเชื่อมต่อระหว่างยอดและรากโดยเป็นโซมาติกเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออัตราการรอดชีวิตของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในสัปดาห์ที่ 3-10

ความเข้มข้น			อัตราการรอดชีวิต (%)(±SE)[1/]							
NH_4NO_3 (mg/l)	NAA (mg/l)	BA (mg/l)	อายุ (สัปดาห์)							
			3	4	5	6	7	8	9	10
0	1	0.25	100.00±0.00	100.00±0.00a	95.00±10.00a	90.00±11.55a	90.00±11.55a	85.00±10.00a	65.00±19.15a	65.00±19.15a
5	1	0.25	100.00±0.00	90.00±11.54a	90.00±11.55a	90.00±10.00a	70.00±20.00ab	70.00±20.00ab	60.00±32.60ab	60.00±25.17a
10	1	0.25	100.00±0.00	95.00±10.00a	85.00±19.15a	75.00±30.00a	75.00±30.00ab	60.00±28.28abc	55.00±30.00ab	55.00±30.00ab
15	1	0.25	100.00±0.00	90.00±11.54a	90.00±11.55a	90.00±11.55a	75.00±37.86ab	60.00±36.51abc	60.00±36.51ab	60.00±36.51a
20 (control)	1	0.25	95.00±10.00	85.00±19.15a	85.00±10.00a	85.00±10.00a	65.00±19.15ab	65.00±19.15ab	65.00±19.14a	65.00±19.15a
0	1	1	100.00±0.00	85.00±10.00a	85.00±10.00a	40.00±32.66bc	25.00±19.15de	20.00±16.33de	20.00±16.33bc	20.00±16.32bc
5	1	1	100.00±0.00	95.00± 10.00a	90.00±20.00a	85.00±19.15a	45.00±19.15bcd	45.00±19.15bcd	45.00±19.15abc	45.00±19.15abc
10	1	1	90.00±20.00	85.00±19.14a	85.00±19.15a	85.00±19.15a	30.00±20.00cde	30.00±20.00cde	30.00±30.00abc	30.00±20.00abc
15	1	1	95.00±10.00	80.00±16.33a	75.00±19.15a	65.00±19.15ab	60.00±16.33cde	60.00±16.33abc	55.00±25.17ab	55.00±25.17ab
20 (control)	1	1	95.00±10.00	50.00±11.54b	25.00±10.00b	15.00±10.00c	10.00±11.55e	10.00±11.55a	10.00±11.55c	10.00±11.55c
F-test			ns	**	**	**	**	**	*	*
CV (%)			0.38	0.75	1.49	8.54	8.92	8.53	9.05	8.79

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.5 ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อขนาดแคลลัสของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในสัปดาห์ที่ 3-10

ความเข้มข้น			ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)(±SE)[1/]							
			อายุ (สัปดาห์)							
NH_4NO_3(mg.l)	NAA(mg/l)	BA(mg/l)	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1	0.25	0.00±0.00	0.03±0.02	0.04±0.00	0.06±0.02b	0.06±0.02	0.06±0.04	0.04±0.06b	0.09±0.07
5	1	0.25	0.06±0.11	0.09±0.11	0.12±0.13	0.27±0.36ab	0.29±0.39	0.38±0.34	0.30±0.42b	0.35±0.50
10	1	0.25	0.08±0.03	0.11±0.02	0.27±0.13	0.47±0.16a	0.48±0.18	0.52±0.19	0.66±0.14a	0.65±0.25
15	1	0.25	0.02±0.03	0.09±0.11	0.09±0.12	0.15±0.17b	0.15±0.19	0.17±0.23	0.19±0.26b	0.24±0.31
20 (control)	1	0.25	0.04±0.03	0.16±0.11	0.22±0.11	0.26±0.10ab	0.26±0.14	0.28±0.15	0.31±0.22b	0.33±0.25
0	1	1	0.00±0.00	0.02±0.02	0.02±0.02	0.05±0.04b	0.05±0.04	0.05±0.06	0.08±0.11b	0.06±0.06
5	1	1	0.00±0.00	0.09±0.07	0.13±0.10	0.18±0.13b	0.17±0.11	0.17±0.13	0.19±0.14b	0.21±0.16
10	1	1	0.03±0.05	0.11±0.13	0.15±0.20	0.17±0.19b	0.18±0.20	0.20±0.24	0.23±0.29b	0.30±0.40
15	1	1	0.02±0.01	0.05±0.02	0.06±0.03	0.18±0.11b	0.18±0.11	0.20±0.11	0.20±0.11b	0.24±0.12
20 (control)	1	1	0.00±0.00	0.04±0.05	0.07±0.08	0.07±0.08b	0.08±0.09	0.10±0.11	0.11±0.12b	0.16±0.18
F-test			ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns
CV(%)			1.95	3.81	5.60	6.73	7.24	7.25	8.36	12.22

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.6 ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออัตราการเกิดยอดของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในสัปดาห์ที่ 3-10

ความเข้มข้น			อัตราการเกิดยอด (%)(±SE)[1/]							
			อายุ (สัปดาห์)							
NH_4NO_3(mg/l)	NAA(mg/l)	BA(mg/l)	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1	0.2	5.00±10.00	25.00±10.00a	45.00±37.86a	45.00±25.17a	45.00±25.17abc	45.00±25.17ab	45.00±25.17ab	45.00±25.17ab
5	1	0.25	0.50±10.00	10.00±11.55abc	30.00±11.54ab	50.00±25.82a	65.00±34.16a	60.00±32.66a	60.00±32.66a	60.00±32.66a
10	1	0.25	0.00±0.00	0.00±0.00c	10.00±11.54bc	25.00±37.86ab	45.00±41.23abc	50.00±34.64a	50.00±34.64a	50.00±34.64a
15	1	0.25	0.00±0.00	0.00±0.00c	0.00±0.00c	5.00±10.00b	20.00±28.28bc	20.00±28.28abc	25.00±25.17abc	25.00±25.17abc
20 (control)	1	0.25	5.00±10.00	15.00±19.17abc	40.00±16.32a	50.00±25.82a	55.00±30.00ab	60.00±23.09a	60.00±23.09a	60.00±23.09a
0	1	1	0.00±0.00	5.00±10.00bc	5.00±10.00bc	5.00±10.00b	5.00±10.00c	5.00±10.00c	5.00±10.00c	5.00±10.00c
5.	1	1	0.00±0.00	5.00±10.00bc	40.00±16.32a	45.00±10.00a	40.00±16.33abc	45.00±19.15ab	45.00±19.15ab	45.00±19.15ab
10	1	1	5.00±10.00	5.00±10.00bc	25.00±25.17abc	30.00±20.00ab	25.00±25.17abc	30.00±20.00abc	30.00±20.00abc	30.00±25.81abc
15	1	1	0.00±0.00	20.00±16.33ab	45.00±19.15a	45.00±19.15a	55.00±25.17ab	55.00±25.17a	55.00±25.17a	55.00±25.17a
20 (control)	1	1	0.00±0.00	0.00±0.00c	0.00±0.00c	10.00±11.56b	0.50±10.00c	10.00±11.55bc	10.00±11.55bc	10.00±11.55bc
F-test			ns	*	**	*	*	*	*	*
CV(%)			7.51	12.32	9.18	11.14	12.60	11.08	10.06	11.44

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.7 ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนยอดของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในสัปดาห์ที่ 3-10

ความเข้มข้น			จำนวนการเกิดยอด (ยอด/ชิ้นส่วน) (±SE)[1/]							
			อายุ (สัปดาห์)							
NH_4NO_3(mg/l)	NAA(mg/l)	BA(mg/l)	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1	0.25	0.05±0.10	0.50±0.50	0.80±0.80bc	0.90±0.76abcd	1.10±0.74abc	1.20±0.80bc	1.25±0.90bcd	1.75±1.24abc
5	1	0.25	0.05±0.10	0.10±0.11	0.40±0.10bcd	0.80±0.54bcd	1.10±0.66abc	1.30±0.94bc	1.35±1.04bcd	1.55±1.04bc
10	1	0.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.11cd	0.49±0.40dc	0.70±0.70bc	1.20±0.85bc	1.25±0.89bcd	1.40±1.04bc
15	1	0.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00d	0.05±0.10d	0.35±0.47c	0.65±0.85c	0.70±0.81dc	0.85±0.87c
20 (control)	1	0.25	0.10±0.20	0.20±0.28	0.90±0.66b	1.50±1.00ab	1.90±1.32ab	2.55±1.45ab	2.75±1.48ab	3.05±1.60ab
0	1	1	0.00±0.00	0.01±0.02	0.05±0.10cd	0.10±0.20d	0.15±0.30c	0.15±0.30c	0.15±0.30d	0.20±0.40c
5	1	1	0.00±0.00	0.05±0.01	0.20±0.55bcd	1.45±0.62abc	1.20±0.59abc	1.65±0.78abc	1.90±0.80abc	1.90±0.82abc
10	1	1	0.10±0.20	0.20±0.23	0.65±0.91bcd	0.95±1.24abcd	1.00±1.35abc	1.25±1.47bcd	1.35±1.56bcd	1.45±1.67bc
15	1	1	0.00±0.00	0.20±0.16	1.95±0.55a	1.95±0.55a	2.30±0.74a	3.00±1.04a	3.10±0.87a	3.85±1.23a
20 (control)	1	1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00d	0.10±0.11d	0.20±0.40c	0.60±0.70c	0.80±0.92cd	0.90±1.05c
F-test			ns	ns	**	**	**	**	**	*
CV(%)			4.44	7.94	13.78	16.77	19.30	20.79	20.68	21.71

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น95%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.8 ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในสัปดาห์ที่ 9-12

ความเข้มข้น			จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ(ต่อชิ้นส่วน) (±SE)[1/] อายุ (สัปดาห์)			
NH_4NO_3(mg/l)	NAA(mg/l)	BA(mg/l)	9	10	11	12
0	1	0.25	0.75±0.41ab	1.25±0.62ab	1.75±1.00ab	2.25±1.05abc
5	1	0.25	1.20±0.86a	2.15±1.81a	2.70±1.61a	3.10±1.60a
10	1	0.25	0.75±0.19ab	1.25±0.19ab	1.65±0.72ab	2.30±0.95abc
15	1	0.25	0.30±0.26bc	0.60±0.43bc	0.95±0.64bc	1.35±0.91bcd
20(control)	1	0.25	0.35±0.10bc	1.10±0.38abc	1.75±0.44ab	2.50±0.87ab
0	1	1	0.00±0.00c	0.05±0.10c	0.10±0.20c	0.10±0.20d
5	1	1	0.20±0.16c	0.95±0.62bc	1.10±0.77bc	1.85±1.28abc
10	1	1	0.05±0.10c	0.30±0.60bc	0.50±1.00bc	0.75±1.50dc
15	1	1	0.15±0.19c	0.45±0.34bc	0.55±0.44bc	0.90±0.66bcd
20(control)	1	1	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00d
F-test			**	**	**	**
CV(%)			10.29	18.54	18.18	21.16

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

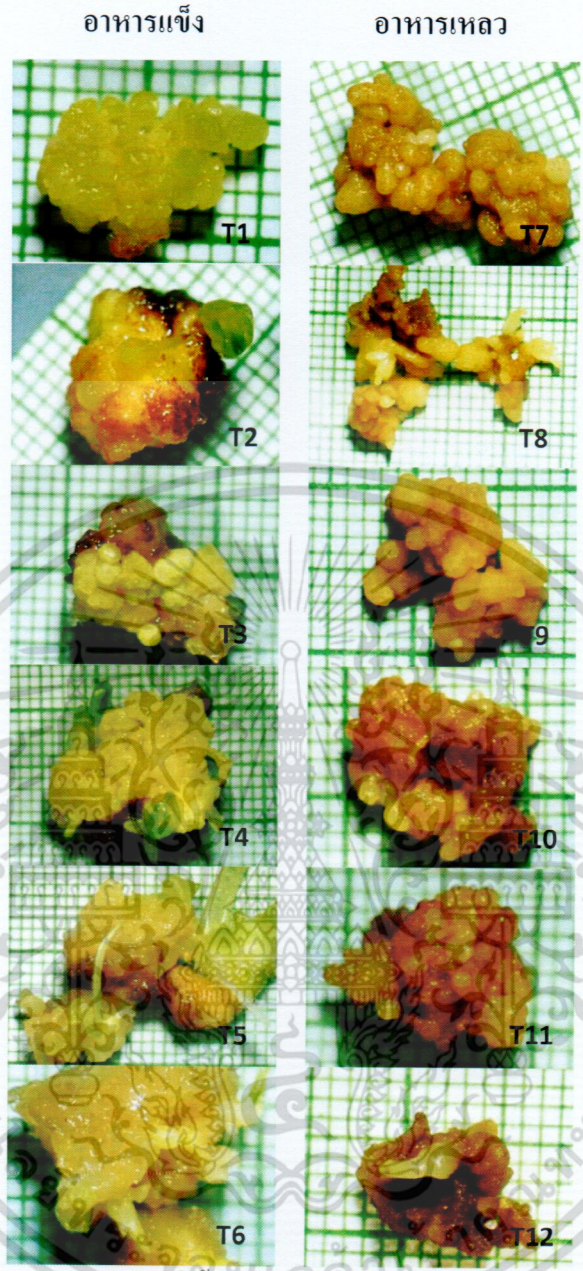
4.3 การทดลองที่ 3 ผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการนำแคลลัสอายุ 10 สัปดาห์ ที่ได้จากการทดลองที่ 1 น้ำหนัก 0.5 กรัมต่อชิ้น มาเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 1 มีลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวโดยชิ้นส่วนแคลลัสมีการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในทุกทรีตเมนต์ทั้ง บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว โดยเริ่มเกิดจากลักษณะรูปร่างกลม และบางทรีตเมนต์ก็มีการเกิดยอดเพียงเล็กน้อยและมีสีที่แตกต่างกันโดยบนอาหารแข็งแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีสีเหลือง ส่วนในอาหารเหลวชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลและมีการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บนชิ้นส่วนมีสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 4.9)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนได้ 3 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นพร้อมกับมีการเกิดต้นอ่อนที่มีลักษณะยอดและรากเกิดพร้อมกัน และแคลลัสก็มีระยะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเกิดขึ้นพร้อมกัน ส่วนในอาหารเหลว พบว่า แคลลัสมีการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 4.10)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัส ครบ 5 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสบนอาหารแข็งมีการเกิดต้นอ่อนจำนวนหลายต้น และในอาหารเหลวก็พบว่า มีการเกิดต้นอ่อนเช่นกัน(ภาพที่ 4.11) เมื่อหลังจบการทดลองนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ต้นอ่อนมีการพัฒนาโดยสมบูรณ์ จากนั้นจึงนำไปศึกษาต่อภายใต้กล้องสเตอริโอ และการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคพบว่าต้นอ่อนมีการเชื่อมต่อระหว่างยอดและรากโดยสมบูรณ์ (ภาพที่ 4.12) และการศึกษาระยะการเกิดรูปร่างเซลล์เดี่ยว (single cell) ในอาหารเหลว (ภาพที่ 4.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง T1-T6 และอาหารเหลว T7-T12 ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

T1 และ T7 ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร MS (control)

T2 และ T8 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

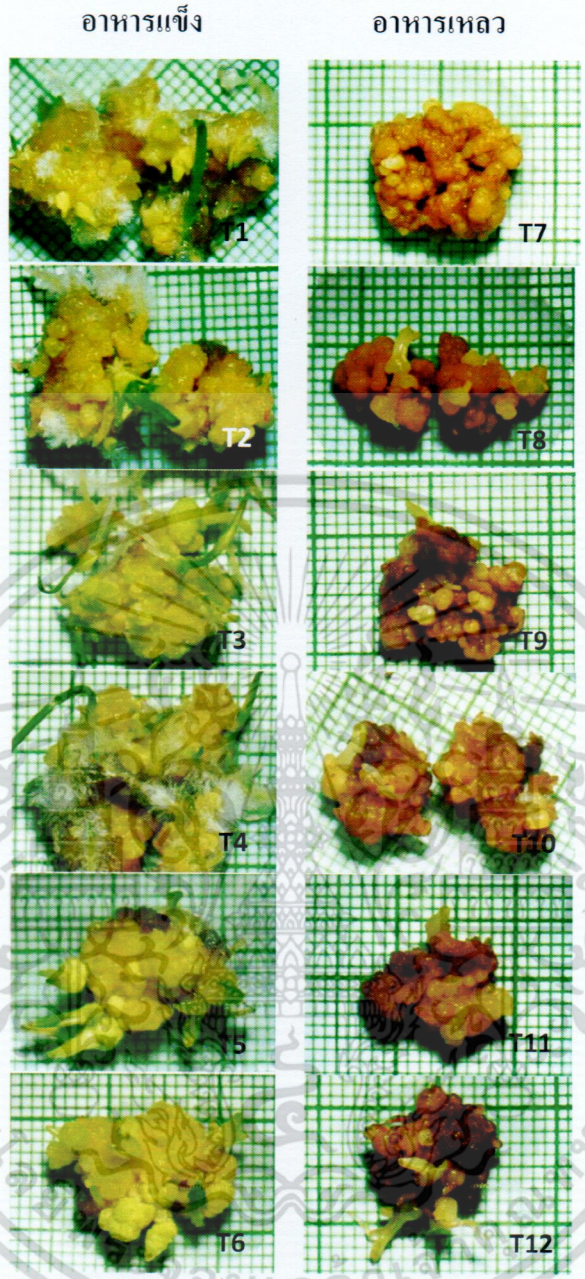
T3 และ T9 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

T4 และ T10 ความเข้มข้นของ MSที่ เติม NAA1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

T5 และ T11 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

T6 และ T12 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง T1-T6 และอาหารเหลว T7-T12 ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

T1 และ T7 ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร MS (control)

T2 และ T8 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

T3 และ T9 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

T4 และ T10 ความเข้มข้นของ MSที่ เติม NAA1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

T5 และ T11 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

T6 และ T12 ความเข้มข้นของ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1 น้ำหนักของแคลลัส

เปรียบเทียบการเลี้ยงในระหว่างอาหารแข็งและอาหารเหลวพบว่า สถานะของอาหารมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ทุกสัปดาห์ของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าน้ำหนักในอาหารแข็งมีน้ำหนักมากที่สุดเฉลี่ย 0.88 กรัม ส่วนในอาหารเหลวมีน้ำหนักรองลงมาคือ 0.21 กรัม

น้ำหนักของแคลลัสเริ่มเพิ่มมากขึ้นจากสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลอง โดยมีน้ำหนักมากขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละสัปดาห์ พบว่า ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักของแคลลัส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.9) โดยน้ำหนักในสัปดาห์ที่ 5 บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด 0.88 กรัม ส่วนบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรองลงมาเฉลี่ย 0.67 กรัม

และเมื่อพิจารณาผลของสูตรอาหารและสถานะของอาหารพบว่า น้ำหนักของแคลลัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง โดยพบว่า น้ำหนักแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักมากที่สุดเฉลี่ย 1.40 กรัม และในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักน้อยกว่าเฉลี่ย 0.35 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวต่อน้ำหนักการเจริญเติบโตของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 1-5

การทดลอง			น้ำหนักของแคลลัส(กรัม) อายุ (สัปดาห์)				
สถานะอาหาร			1	2	3	4	5
แข็ง			0.19±0.04a	0.41±0.13a	0.49±0.22a	0.69±0.37a	0.88±0.48a
เหลว			0.06±0.04b	0.08±0.03b	0.11±0.05b	0.16±0.09b	0.21±0.12b
F-test			**	**	**	**	**
NAA	BA						
MS (control)			0.11±0.08b	0.20±0.12a	0.26±0.16ab	0.35±0.24ab	0.39±0.28b
0.5	0		0.11±0.07b	0.24±0.18a	0.28±0.18ab	0.37±0.20ab	0.43±0.20b
1	0		0.14±0.02ab	0.21±0.14a	0.19±0.17b	0.29±0.22b	0.36±0.28b
1	0.25		0.16±0.09a	0.28±0.24a	0.40±0.35a	0.65±0.56a	0.88±0.78a
1	0.50		0.12±0.08b	0.23±0.21a	0.34±0.28ab	0.49±0.39ab	0.67±0.53ab
1	0.75		0.13±0.10b	0.29±0.27a	0.32±0.35ab	0.44±0.54ab	0.53±0.58ab
F-test			**	**	**	**	**
สูตรอาหาร		สถานะอาหาร					
MS(control)			0.18±0.03bc	0.30±0.07c	0.38±0.12bc	0.54±0.18bc	0.61±0.23bc
0.5	0		0.16±0.06c	0.38±0.14bc	0.40±0.19bc	0.48±0.24bcd	0.56±0.18bc
1	0		0.16±0.01c	0.34±0.21bc	0.29±0.19cd	0.43±0.25bcd	0.56±0.31bc
1	0.25	แข็ง	0.24±0.06a	0.47±0.18ab	0.67±0.29a	1.05±0.55a	1.40±0.83a
1	0.50		0.19±0.02abc	0.41±0.13abc	0.58±0.11ab	0.86±0.17ab	1.14±0.11a
1	0.75		0.23±0.02ab	0.55±0.08a	0.60±0.26ab	0.84±0.48ab	1.00±0.39ab
MS (control)			0.04±0.04c	0.10±0.02d	0.13±0.04cd	0.16±0.04dc	0.17±0.05c
0.5	0		0.05±0.03e	0.10±0.02d	0.16±0.05cd	0.26±0.09de	0.30±0.12c
1	0		0.14±0.02cd	0.09±0.01d	0.09±0.02d	0.14±0.04cd	0.17±0.06c
1	0.25	เหลว	0.09±0.04de	0.08±0.01d	0.13±0.05cd	0.29±0.11cd	0.35±0.11c
1	0.50		0.05±0.02e	0.06±0.01d	0.10±0.01d	0.15±0.01cd	0.19±0.01c
1	0.75		0.04±0.01e	0.04±0.01d	0.03±0.01d	0.03±0.01d	0.05±0.02c
F-test			**	**	**	**	**
CV%			1.54	3.14	5.36	7.92	8.73

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ขนาดของแคลลัส

เปรียบเทียบการเลี้ยงในระหว่างสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่า สถานะของอาหารมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ทุกสัปดาห์ของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าในอาหารแข็งมีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุดเฉลี่ย 0.42 เซนติเมตร ส่วนในอาหารเหลว มีขนาดแคลลัสรองลงมา คือ 0.26 เซนติเมตร

ชิ้นส่วนเริ่มเกิดแคลลัสขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลอง โดยมีลักษณะเป็นรูปร่างกลมและมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ พบว่า ค่าเฉลี่ยของขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) โดยพบว่าชิ้นส่วนในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสใหญ่ที่สุด 0.43 เซนติเมตร ส่วนบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดรองลงมาเฉลี่ย 0.41 เซนติเมตร

และเมื่อพิจารณาผลของสูตรอาหารและสถานะของอาหารพบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง โดยพบว่าบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสใหญ่ที่สุดเฉลี่ย 0.56 เซนติเมตร ส่วนในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 0.48 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวต่อขนาดของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 1-5

การทดลอง			ขนาดของแคลลัส (เซนติเมตร)(±SE)[1/]				
			อายุ (สัปดาห์)				
สถานะอาหาร			1	2	3	4	5
แข็ง			0.10±0.11a	0.28±0.09a	0.30±0.11a	0.37±0.12a	0.42±0.14a
เหลว			0.11±0.04a	0.19±0.06b	0.21±0.07b	0.24±0.07b	0.26±0.09b
F-test			**	**	**	**	**
NAA	BA						
MS (control)			0.08±0.04bc	0.18±0.06c	0.18±0.06c	0.23±0.07c	0.27±0.11bc
0.5	0		0.11±0.04b	0.22±0.04bc	0.21±0.03bc	0.26±0.04bc	0.32±0.09abc
1	0		0.04±0.06c	0.19±0.08c	0.21±0.10bc	0.25±0.12c	0.24±0.16c
1	0.25		0.06±0.07bc	0.27±0.13ab	0.32±0.13a	0.38±0.15a	0.43±0.16a
1	0.50		0.16±0.06a	0.24±0.04abc	0.28±0.08ab	0.36±0.08a	0.41±0.10ab
1	0.75		0.19±0.10a	0.29±0.10a	0.31±0.11a	0.35±0.15ab	0.39±0.16ab
F-test			**	**	**	**	**
สูตรอาหาร		สถานะอาหาร					
MS(control)			0.07±0.05cd	0.21±0.06b	0.21±0.06cd	0.27±0.06cd	0.36±0.08abcd
0.5	0		0.09±0.04c	0.21±0.04b	0.19±0.01cd	0.27±0.02cd	0.38±0.05abcd
1	0		0.00±0.00d	0.23±0.03b	0.27±0.06bcd	0.31±0.10bcd	0.28±0.21bcd
1	0.25	แข็ง	0.00±0.00d	0.38±0.04a	0.43±0.07a	0.51±0.06a	0.56±0.07a
1	0.50		0.20±0.02b	0.25±0.06b	0.30±0.11bc	0.41±0.01abc	0.46±0.12abc
1	0.75		0.27±0.03a	0.37±0.04a	0.38±0.09ab	0.45±0.14ab	0.48±0.17ab
MS (control)			0.10±0.03c	0.16±0.05b	0.16±0.05d	0.18±0.04d	0.18±0.05d
0.5	0		0.13±0.04c	0.23±0.04b	0.23±0.04d	0.25±0.06d	0.26±0.08dc
1	0		0.08±0.06c	0.15±0.00b	0.16±0.11d	0.19±0.11d	0.19±0.11d
1	0.25	เหลว	0.11±0.05c	0.16±0.05b	0.21±0.01cd	0.25±0.03d	0.29±0.06bcd
1	0.50		0.13±0.07c	0.23±0.02b	0.27±0.05bcd	0.31±0.04bcd	0.35±0.05bcd
1	0.75		0.10±0.04c	0.20±0.02b	0.23±0.07cd	0.26±0.09cd	0.30±0.10bcd
F-test			**	**	**	**	**
CV%			1.94	1.93	2.64	2.94	4.04

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 จำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ

พบว่า จำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ในทุกสัปดาห์มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยเริ่มจากสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลอง โดยพบว่าจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.11)

เปรียบเทียบการเลี้ยงในระหว่างสถานะอาหารแข็งและอาหารเหลวพบว่า สถานะของอาหารมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลองโดยพบว่า จำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารแข็ง มีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด 7.94 ต้น ส่วนในอาหารเหลว มีจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอรองลงมา 3.88 ต้น

โดยพบว่า ชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เฉลี่ยมากที่สุด 8.43 ต้น ส่วนบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอรองลงมาเฉลี่ย 8.27 ต้น

และเมื่อพิจารณาผลของสูตรอาหารและสถานะของอาหารพบว่า จำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง โดยพบว่า บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยมากที่สุด 12.46 ต้น และในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ น้อยกว่าเฉลี่ย 7.67 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

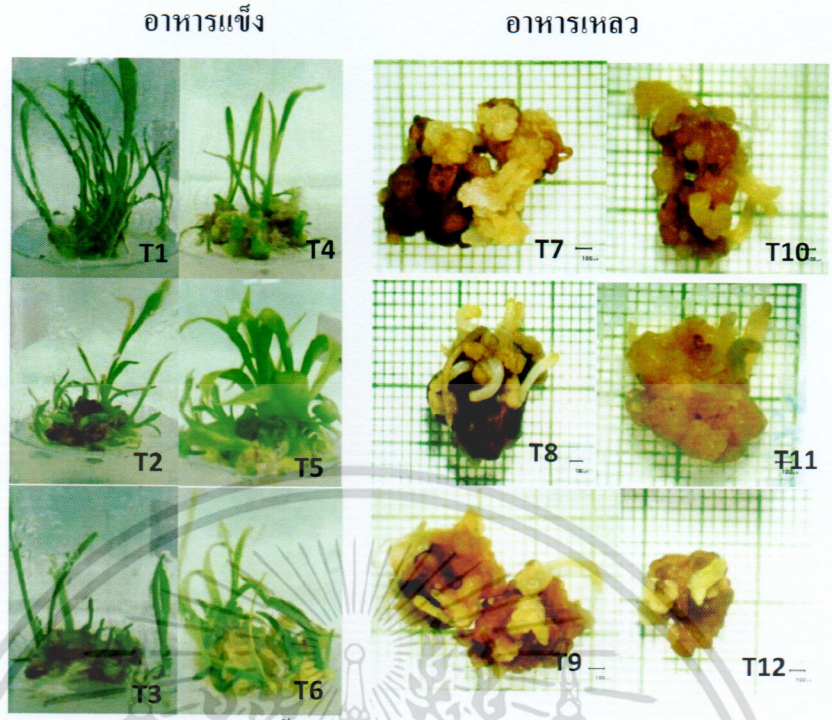
ตารางที่ 4.11 ผลของสถานะของอาหารแข็งและอาหารเหลวต่อจำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ ในสัปดาห์ที่ 1-5

การทดลอง			จำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอ(±SE)[1/]				
			อายุ (สัปดาห์)				
สถานะอาหาร			1	2	3	4	5
แข็ง			3.64±1.15a	5.73±2.24a	6.27±2.98a	7.04±3.49a	7.94±4.13a
เหลว			1.73±0.93b	2.54±1.44b	2.99±1.75b	3.37±1.94b	3.88±2.43b
F-test			**	**	**	**	**
NAA	BA						
MS (control)			2.86±2.13a	4.70±3.73ab	5.13±4.25abc	5.63±4.70ab	6.07±5.07ab
0.5	0		3.06±1.30a	5.97±1.65a	6.80±1.85a	7.33±2.46a	8.27±2.52a
1	0		2.40±1.18a	3.83±2.43b	3.47±2.86bc	3.73±3.02b	3.77±3.05b
1	0.25		2.73±2.10a	4.20±3.36b	5.67±3.94ab	6.87±4.71a	8.43±6.02a
1	0.50		2.56±0.61a	3.07±0.41b	3.70±0.70bc	4.33±0.91ab	5.03±1.49ab
1	0.75		2.50±1.12a	3.07±1.06b	3.00±1.06c	3.37±1.33b	3.90±1.62b
F-test			**	**	**	**	**
สูตรอาหาร		สถานะอาหาร					
MS(control)			4.53±1.70ab	7.73±2.66a	8.60±3.01a	9.40±3.54a	10.13±3.80ab
0.5	0		3.93±0.94abc	7.13±0.50ab	7.73±0.64ab	8.47±1.27ab	8.87±1.45abc
1	0		2.93±0.31bcde	5.53±1.80abc	4.53±3.67bcd	4.80±3.90bc	4.86±3.98bcde
1	0.25	แข็ง	4.60±0.70a	7.00±2.11ab	8.80±3.01a	10.33±4.30a	12.46±6.31a
1	0.50		2.40±0.87cdefg	3.00±0.60def	4.26 ±0.46cd	5.13±0.23bc	6.33±0.50bcde
1	0.75		3.47±0.58abcd	4.00±0.35cde	3.66±1.20cd	4.13±1.62bc	5.00±1.71abcde
MS (control)			1.20±0.40fg	1.67±0.23ef	1.67±0.23d	1.87±0.31c	2.00±0.20e
0.5	0		2.20±1.04defg	4.80±1.56bcd	5.86±2.34abc	6.20±3.10abc	7.67±3.56abcd
1	0		1.87±1.60defg	2.13±1.70ef	2.40±1.91cd	2.66±2.05c	2.67±2.05de
1	0.25	เหลว	0.87±0.31g	1.40±0.53f	2.53±0.42cd	3.40±0.92c	4.40±1.39cde
1	0.50		2.73±0.31cdef	3.13±0.23cdef	3.13±0.23cd	3.53±0.31c	3.73±0.50cde
1	0.75		1.53±0.12efg	2.13±0.31ef	2.33±0.11cd	2.60±0.20c	2.80±0.20de
F-test			**	**	**	**	**
CV%			12.47	12.67	17.74	19.39	20.35

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง T1-T6 และอาหารเหลว T7-T12 ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

T1 แคลลัสที่มีการเกิดยอดและรากบนอาหารแข็งสูตรอาหารแข็งสูตร MS (controls)

T2 แคลลัสที่มีการเกิดยอดและรากบนอาหารแข็งสูตรอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

T3 แคลลัสที่มีการเกิดยอดและรากบนอาหารแข็งสูตรอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

T4 แคลลัสที่มีการเกิดยอดและรากบนอาหารแข็งสูตรอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

T5 แคลลัสที่มีการเกิดยอดบนอาหารแข็งสูตรอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

T6 แคลลัสที่มีการเกิดยอดบนอาหารแข็งสูตรอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

T7 โซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS (control)

T8 โซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

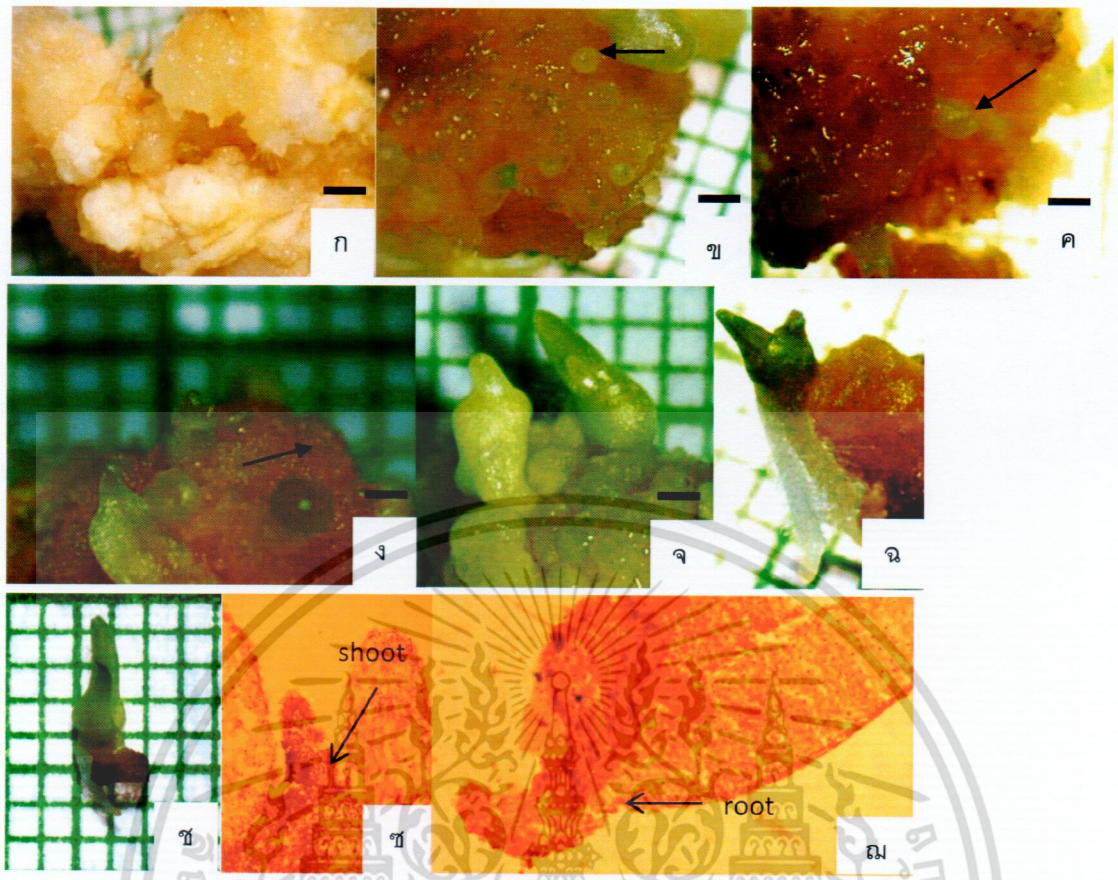
T9 โซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

T10 โซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

T11 แคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

T12 แคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

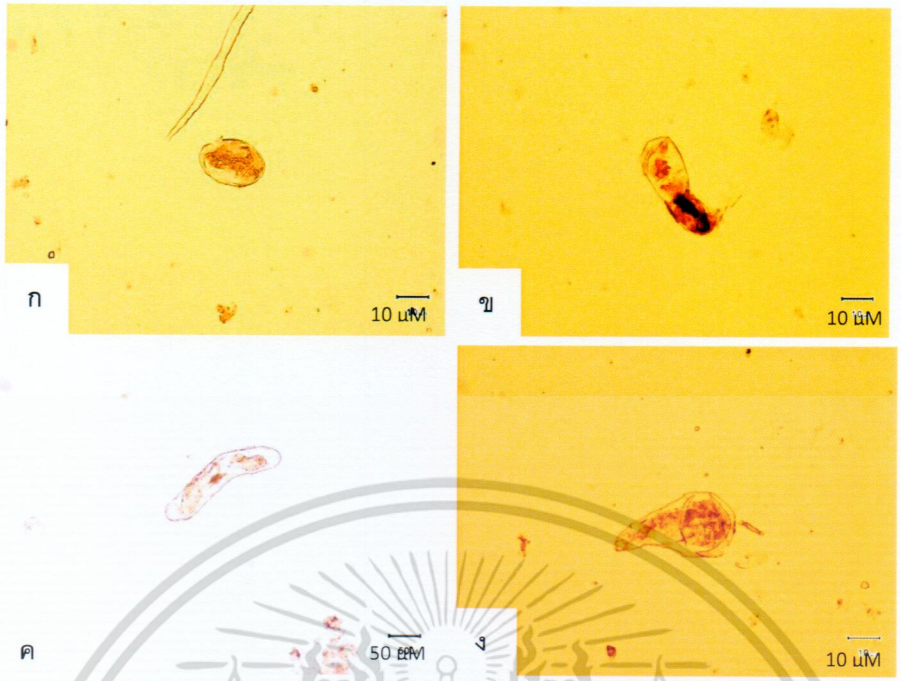
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 ระยะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอและการเกิดพัฒนาไปเป็นต้นในอาหารแข็งโดยส่องภายใต้กล้อง stereo-microscope (bar = 1 mm)

(ก) Non-embryogenic callus (ข) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสรูปร่างกลม (globular structure) (ลูกศรชี้) (ค) รูปร่างคล้ายหัวใจ (heart shape) (ง) ระยะเกิดใบอ่อน (cotyledon stage) (จ) ต้นอ่อนที่มียอดและราก (shoot and full radicle) (ฉ) โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) (ช) ต้นอ่อน (seedling) (ซ) ปลายยอดของโซมาติกเอ็มบริโอ (ฌ) ปลายรากของโซมาติกเอ็มบริโอ แสดงลักษณะทางกายวิภาคการเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อตัดตามยาวที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 รูปภาพแสดงการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว

ก. เซลล์ระยะรูปร่างกลม (single cell)

ข. เซลล์ระยะรูปร่างหัวใจ (heart stage)

ค. เซลล์ระยะรูปร่างตอร์ปิโด (torpedo stage)

ง. ต้นกล้า (plantlet)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การทดลองที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของลิลลี่พันธุ์ *Lilium formolongo* โดยการนำชิ้นส่วนใบลิลลี่ในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโทไคนิน เช่น NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโทไคนิน เช่น BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่น 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยงในสภาพที่มืดชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เลี้ยงในอาหารทุกสูตรที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการสร้างแคลลัสได้ เพราะในสภาพมืดและสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ LingFei *et al.* (2009) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนใบของลิลลี่พันธุ์ *Lilium davidii* var. unicolor ซึ่งได้เลี้ยงบนอาหารสูตร NN (Nitsch and Nitsch, 1969) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ NAA ในสภาพมืด 15 วัน จึงพบว่ามีการเกิดแคลลัส จะเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น ถ้ามีปริมาณไซโทไคนินต่อออกซินต่ำ มักจะเจริญเป็นรากหรือแคลลัส (ศิวพงศ์ .2546) จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้พบว่าชิ้นส่วนใบที่ได้รับ BA เพียงอย่างเดียว ทำให้ชิ้นส่วนไม่มีการพัฒนา เนื่องจาก BA เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินจะสามารถกระตุ้นให้เซลล์พืชทำงานได้ดีเมื่ออยู่ร่วมกับออกซินในปริมาณที่เหมาะสม เพราะออกซินและไซโทไคนินมีบทบาทร่วมกันในการควบคุมการแบ่งเซลล์ (วันทนี. 2542) เมื่อใช้ BA อย่างเดียวทำให้ชิ้นส่วนใบของลิลลี่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากจึงทำให้ชิ้นส่วนตาย ต่อมาเมื่อดูความสัมพันธ์ของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เมื่อทำงานร่วมกันพบว่าออกซินและไซโทไคนินสามารถทำให้พืชมีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อแล้วพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เมื่อพืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดแล้วเซลล์จะมีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงการพัฒนาหรือกำเนิดการพัฒนาอื่นๆ ทั้งนี้ขึ้นกับสัดส่วนของออกซินและไซโทไคนินที่ได้รับ ถ้าได้รับออกซินมากกว่าไซโทไคนิน มักเกิดเป็นรากแต่ถ้าได้รับสัดส่วนที่มีค่าออกซินน้อยกว่าไซโทไคนิน มักเกิดเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล ออกซินเท่ากับไซโทไคนิน จะสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป จะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วนและระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่นำมาใช้ (รังสฤษฎ์. 2540) ส่วนในชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เลี้ยงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุกสูตรที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจะพบว่าตายทั้งหมด โดยในการทดลองพบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด 0.93 เซนติเมตร และมีจำนวนการเกิดยอดมากที่สุด 1.25 ยอด เนื่องจากสัดส่วนของออกซินและไซโทไคนินระดับที่สมดุลกันทำให้เกิดแคลลัสและยอดได้ ซึ่ง El- Naggar (2012) ได้ทำการเพาะเลี้ยงกลีบย่อยของลิลลี่สายพันธุ์ "Prato" โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนการเกิดยอดมากที่สุด 6 ยอด และได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของลิลลี่สายพันธุ์ "*Prato*" พบว่า NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 50.25 เปอร์เซ็นต์ และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 64.67 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bakhshaie (2010) ได้ทำการเพาะเลี้ยงราก และกลีบหัวย่อยของลิลลี่สายพันธุ์ "*Ledebourii*" เพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากการชักนำแคลลัส โดยพบว่าชิ้นส่วนรากที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.54 ไมโครโมลล์ ร่วมกับ BA 0.44ไมโครโมลล์ พบว่าชิ้นส่วนมีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด 3.84 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน และการเพาะเลี้ยงกลีบหัวย่อยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนมีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 3.69 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน

5.2 การทดลองที่ 2 ผลของ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการศึกษาผลของ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่ สังเกตได้ว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด 65 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการเกิดแคลลัสน้อยที่สุด เนื่องจากการขาด NH_4NO_3 ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นในการเจริญเติบโตที่พืชต้องการในปริมาณมากมีผลให้การดูดซึมธาตุอาหารลดลงจึงส่งผลต่อชิ้นส่วนไม่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสหรือเกิดการพักตัวของเอ็มบริโอ Kedra and Bach. (2005) แต่ยังมีการเกิดยอดจากชิ้นส่วนเนื่องจากได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีออกซินสูงไซโตไคนินต่ำ จึงพัฒนาไปเป็นยอดหรือราก ซึ่งรังสฤษฎ์ (2540) กล่าวว่า ธาตุอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พืชมีความต้องการอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ต้องพิจารณาถึงบทบาทของธาตุอาหารบางชนิดที่มีสัดส่วนช่วยให้เกิดคัพภะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดีขึ้น เช่น ควรลดปริมาณของธาตุไนโตรเจน (N) ให้ต่ำกว่าระดับปกติ จะสามารถชักนำให้เกิดคัพภะหรือโซมาติกเอ็มบริโอได้ โดยพบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงสามารถพัฒนาจนเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 2.25 ต้นต่อชิ้นส่วน ส่วนชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด เนื่องจากชิ้นส่วนใบแก่ หรืออ่อนเกินไป จึงส่งผลให้ชิ้นส่วนตายมีอัตราการรอดชีวิตน้อยลง เมื่อพิจารณาการเกิดแคลลัสพบว่า ชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัสมากที่สุด 0.65 เซนติเมตร เนื่องจากการลดปริมาณไนโตรเจนมีผลทำให้ชิ้นส่วนมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสอีกทั้งยังได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณที่พอเหมาะจึงทำให้ชิ้นส่วนพัฒนาไปเป็นยอด 1.40 ยอด และมีการพัฒนาเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอพร้อมกัน 2.30 ต้น รังสฤษฎ์ (2540) กล่าวว่าในการลดระดับไนโตรเจนให้ต่ำกว่าระดับปกติจะสามารถชักนำให้เกิดคัพพะหรือโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีขึ้น เมื่อศึกษาจำนวนการเกิดยอดพบว่าชิ้นส่วนบนอาหาร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัส 0.24 เซนติเมตร และมีการเจริญเติบโตเป็นยอดมากที่สุด 3.85 ยอดต่อชิ้นส่วน เนื่องจากชิ้นส่วนได้รับธาตุอาหารที่พอเหมาะจึงสามารถพัฒนาเป็นยอดมากที่สุด เมื่อพิจารณาต่อพบว่าชิ้นส่วนบนอาหาร MS ดัดแปลง NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด 3.10 ต้นต่อชิ้นส่วน

5.3 การทดลองที่ 3 ผลของสถานะของอาหารต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการศึกษาผลของสถานะของอาหารต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอของลิลลี่(*Lilium formolongo*) โดยการนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 0.5, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ชิ้นส่วนแคลลัสขนาด 0.5 กรัม ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่มีลักษณะเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ในทุกทรีตเมนต์ ศิวพงษ์ . (2546) กล่าวว่ามีการเกิดเป็นต้นโดยอ้อมเรียกว่า indirect embryogenesis โดยการเกิดแคลลัสดังกล่าวจะถูกชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพัฒนาต่อไปเป็นต้น หรือจากแคลลัสนำไปแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆและจึงกลายเป็นเอ็มบริโอ โดยบนอาหารแข็งมีการพัฒนาเป็นระยะต่างๆ โดยเริ่มเกิดเป็นเซลล์ที่มี รูปร่างกลม(globular shape) รูปร่างคล้ายหัวใจ (heart shape) รูปร่างตอร์ปิโด (torpedo shape) จนพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนโดยสมบูรณ์ และในอาหารเหลวพบว่า แคลลัสมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดเซลล์รูปร่างกลม และพัฒนาไปเป็นยอด โดยมีรูปร่างที่แตกต่างจากบนอาหารแข็ง เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนไปเรื่อยๆ ก็พบว่า ทั้งหมดมีการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนโดยสมบูรณ์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ EL-Naggar *et al.* (2012) ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของลิลลี่พันธุ์ Lilium "Prato"บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 64.67 เปอร์เซ็นต์ Lojic *et al.* (2015) ได้รายงานการวิจัยว่าอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตและสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้แต่ในทางกลับกันโซมาติกเอ็มบริโอก็สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีไซโตไคนินและออกซิน แต่สารควบคุมการเจริญเติบโตก็ไม่ได้เป็นแค่ปัจจัยเดียวที่ทำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ รวมไปถึงแสง ซึ่งเป็นปัจจัยภายนอก อุณหภูมิ และปัจจัยภายในของพืชเอง เช่น ธาตุอาหารภายในพืช Nhut *et al.* (2006) ได้นำ friable callus ของลิลลี่ *Lilium* longiflorum มาเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารเหลวมีการเกิดเป็นโซมาติกเอ้มบริโอได้ดี ส่วนบนอาหารแข็งรายงานว่าไม่มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่ง บุญยืน กิจวิจารณ์ (2547) กล่าวว่า การเลี้ยงในอาหารเหลว การแบ่งเซลล์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกลุ่มเซลล์ proembryonic จะหลุดออกจากกลุ่มใหญ่ทำให้เกิดได้ทั้งเซลล์เดี่ยวๆ และการเจริญเติบโตของแคลลัส ซึ่งผลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ ที่พบว่า บนอาหารแข็งมีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอดีกว่าในอาหารเหลว เนื่องจากข้อแตกต่างของชนิดพืช สายพันธุ์พืชที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง และความสามารถในการตอบสนองของแคลลัส ต่อสถานะของอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมไปถึงอายุของชิ้นส่วน Bakhshaie *et al.* (2010) ได้ทำการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากกลีบย่อยของลิลลี่พันธุ์ *Lilium* ledebourii พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสมากที่สุด 65.55 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 3.22 ต้น และมีน้ำหนักสดมากที่สุด 1.86 กรัม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองพบว่า แคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พอเหมาะ พบว่ามี น้ำหนัก ขนาด และจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของลิลลี่พันธุ์ *Lilium formolongo* ในชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีขนาดของ friable callus ใหญ่ที่สุด โดยมีขนาด 0.93 เซนติเมตร เนื่องจากแคลลัสที่ได้จากการทดลองนี้สามารถเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอต่อไป

จากการศึกษาผลของ NH_4NO_3 ต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในลิลลี่ ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงพบว่ามีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยการลด NH_4NO_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มากที่สุดเฉลี่ย 3.10 ต้นต่อชิ้นส่วน

จากการศึกษาผลของสถานะของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติมโตประเภทออกซินและไซโตไคนินส่งผลให้น้ำหนัก ขนาด และจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด 12.46 ต้นส่วนในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีน้ำหนัก ขนาด และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอน้อยกว่าเฉลี่ย 7.67 ต้น โดยเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กระทรวงเกษตร ประมง และป่าไม้ญี่ปุ่น. 2557. สำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ ณ กรุงโตเกียว www.ditp.go.th./cutflower2014.doxc

กรมวิชาการเกษตร. 2546. **เอกสารเรื่องวิชาการเรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน.** สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

โครงการหลวง. 2535. **พรรณไม้โครงการหลวง.**อมรินทร์พริ้นติ้ง. กรุงเทพฯ

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.**สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ

ฉรงค์ โฉมเฉลา. 2534. **เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ.** กรุงเทพฯ. สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย

ปราณี วนิชชานนท์. 2540. **ไม้ตัดดอก.**สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร. นนทบุรี.

อรดี สหวัชรินทร์. 2534. **เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ.**สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.กระทรวงเกษตร ประมง และป่าไม้ญี่ปุ่น. 2557. สำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ ณ กรุงโตเกียว www.ditp.go.th./cutflower2014.doxc

ปรัชพรรณ หนูจีน. 2550. **ปัจจัยที่มีผลการเจริญและการออกดอกของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร.** วิทยานิพนธ์ของการออกดอกของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร. สาขาวิชาพืชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พันทิพา ลิ้มสงวน, สิริจันทร์ พิทักษ์ตุ้ม, ศุภธิดา อับดุลลากาซิม และเสริมสิริ จันทร์เปรม.2555. **ผลของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ BA ต่อการเจริญเติบโต และการออกดอกของออนซิเดียมแคระในหลอดทดลอง.** รายงานการประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 9 วันที่ 6-7ธันวาคม 2555 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน หน้า 2198-2205.

รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2542. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน.** พิมพ์ครั้งที่ 8. สำนักพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน. นครปฐม.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**:หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

วราภรณ์ ภูตะลูน. 2557. **เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร:จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ทางเภสัชศาสตร์.**คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.**คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

สุปราณี วนิชชานนท์. 2540. **ไม้ตัดดอก.**สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร. นนทบุรี.

สุเม อรัญนารถ. 2536. **เอกสารประกอบการสอน การเพาะเลี้ยงเยื่อเพื่อการเกษตร.** ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

โสภา ชูเพ็ง. 2558. **ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญเติบโตของเอื้องพร้าวในหลอดทดลอง.** วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่2 ฉบับที่2. หน้า 32-35

โสรยา ร่วมรังษี. 2559. **เอกสารโครงการฝึกอบรมทักษะอาชีพการผลิตไม้ดอกและไม้หัวเป็นธุรกิจ.** ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. **เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ.**สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

อภิชาติ ชิดบุรี. 2544. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์.**สถาบันวิจัยและฝึกอบรมอาชีพเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

Bacchetta, L., Remotti P.c., Bernardini, C., and Saccardo, F., 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explant and stem nodes of *Lilium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture.74. 37-44.

Baknshaie. M., Babalar. M., Mirmasoumi. M., and Khalight. A., 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ladebourii* (Baker) Boiss., an endangered species. Plant Cell Tissue Organ Culture. 102:229-235

sage, D.O., Lyn. J., and Hammett. N., 2000. Somatic embryogenesis in Narcissus Pseudo narcissus CVS. Golden Harvest and ST. Keverne. Plant Science.150. 209-216

EL-Naggar. H., Osman.A.,and Sewaedan E., 2012. In vitro propagation and organogenesis of *Lilium 'Prato'* Affrican journal of Biotechnology.,11(82).14771-14776.

Godo,T., Kobayashi, K., Tagami, T., Matsui, K., and Kida, T., 1998. *In vitro* propagation utilizing suspension cultures of meristematic nodular cell clumps and chromosome stability of *Lilium* x *formolongi* hort. Scientia Horticulturae. 72. 193-202.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company., New York and london, N.Y.

Kanchanapoom. K., Ponpiboob.T.,Kanchanapoom. K., and Wirakiat. W., 2011. Regeneration of (*Lilium longiflorum* 'Easter lily') by callus derived from leaf explants cultured in vitro.ScienceAsia. 37. 373-376.

Karalija. E., Trbojevic. S., and Paric. A., 2010. Somatic embryogenesis and in vitro plantlet regeneration *Llilium martagon* L. var. cattaniae Vis. Biologica nyssana.1(1-2):57-60

Kostenyak, I., Oh, B.J and So. I.S. 1999. Induction of early flowering Cymbidium neveo-marginatum Mak in vitro. Plant Cell Reports 19.1-5.

Kedra. M and Bach.A. 2005. Morphogenesis of *Lilium martagon* L. Explant in callus cultured *In vitro*. ScienceAsia. 37,373-376.

LingFei, X., Feng-Wang, M., and Dong L.2009. Plant regeneration from *In vitro* cultured leaves of Lanzhou lily *(Lilium davidii* var. unicolour) Scientia Horticulturae. 119.131-138.

Loretta, B., Patrizio, R.C., Claudia, B. and Francesco, S. 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. Plant Cell Tisssue and Organ Culture. 74, 37-44.

Luo, J.P., Jia, J., Gu, Y., and Liu,J., 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of Asstagalus adsurgens Pall. Plant Science. 143, 93-99

Lojic. M., Vinterhalter. B., Subotic. A., and Vinterhalter. D., 2015. Differences in regenerative capacity of Oriental lily (*Lillium* sp.) cultivars. Botanica Serbica. 39 (2): 159-167.

Murashige, T and Skoog, F.1962. " A revised medium for rapid growth and bioassay with to bacco tissue culture." Physiologia Plantarum 15:473-497.

NiiMi. Y., Onozawa. T., *In vitro* bulblet formation from leaf segment of lilies, especially *Llium rubellum* Baker. Scientia Horticulturae. 11: 379-389.

Nitsch J. and Nitsch C. 1969. Haloid plants from pollen grains. Science., 163: 85-87

Nhut, D. T., V. L. Bui, T. Michio and V. T. Tran. 2001. Shoot induction and plant regeneration from of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolour). Scientia Horticulturae. 119. 458-461.

Nhut, D.T., Hanh, N.T., Tuan, P.Q., Nguyet, L.T., N.T., Chinh, N.C., Nguyen, N.H., and Vinh, D.N., 2006. Liquid culture as a positive condition to induced and enchange quality and quantity of somatic embryogrnesis of *Lilium longiflorum.* Scientia Horticulturae.110, 93-97.

Novak, F.J., and Petru, E. A. 2003. Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. Scientia Horticulturae.57 (2). 125-142.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sass. J.E. 1958. Botanical Microtechnique. Iowa. The Iowa state University Press.

Varshney, A., Dhawan, V., and Srivastava. P.S., 2000. A protocol for *In vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily thought liquid stationary culture. *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant. 36. 383-391.

Zhou, S., Ramanna M.S., Visser, R.G.F. and Tuyl, J.M., 2008. Analysis of the meiosis in the F1 hrbrids of *Longiflorum* x Asiatic (LA) of lilies (*Lilium*) using genomic in hybridization. Journal Genetic. Genomics 35.687-695.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
$Mn_2SO_4 \cdot 4H_2O$	22.30
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.60
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CuSO_4 \cdot 6H_2O$	0.025
Myo-inositol	100.00
Nicotinic . acid	0.50
Pyridoxine . HCl	0.50
Thiamine . HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
pH	5.5-5.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลข A118-59-048

แหล่งทุน: ทุนอุดหนุนทั่วไป

ชื่อโครงการ การสร้าง somatic embryogenesis ของลิลลี่ (Lilium formolongo)

ชื่อหัวหน้าโ นส กัญจนา แซ่เตียว

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้าง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	อกเบี้ยรั	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
							ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์	
	งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ (ตามแผน)		158,000.00				24,000.00	-	12,500.00	121,500.00			158,000.00
26 ม.ค. 59	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 85%)		134,300.00										
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 15%)		23,700.00										
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 3)												
												-	-
													-
													-
													-
	งบประมาณคงเหลือ		158,000.00										
	รายละเอียดค่าใช้จ่าย												
ครั้งที่ 1													
12 ก.พ. 59	ค่าจ้างผู้ช่วยนักวิจัย			24,000.00			24,000.00						24,000.00
12 ก.พ. 59	ค่าเสียม			189.00						189.00			189.00
23 ก.พ. 59	ค่าเดินทาง			2,300.00					2,300.00				2,300.00
30 พ.ค. 59	ค่าดินและวัสดุปลูก			925.00			-	-	-	925.00	-		925.00
30 พ.ค. 59	แกส			360.00						360.00			360.00
1 ก.ค. 59	ค่าเดินทาง			1,700.00					1,700.00				1,700.00

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเ A118-59-048

แหล่งทุน: ทุนอุดหนุนทั่วไป

ชื่อโครงการ การสร้าง somatic embryogenesis ของลิลลี่ (Lilium formolongo)

ชื่อหัวหน้าโ นส กัญจนา แซ่เตียว

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้าง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	อกเบี้ยรั	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
25 ก.ค. 59	ค่าเดินทาง			7,700.00					7,700.00				7,700.00
23 มี.ค. 59	ค่าสารเคมี บิล คริสตัล เลขที่ 1286			20,500.00						20,500.00			20,500.00
30 มี.ค. 59	อุปกรณ์แลป			16,125.00						16,125.00			16,125.00
30 ส.ค. 59	ค่าสารเคมี			14,820.00						14,820.00			14,820.00
27 ก.ย. 59	น้ำกลั่น			3,210.00						3,210.00			3,210.00
27 ก.ย. 59	อุปกรณ์ช่าง			711.00						711.00			711.00
1 มิ.ย. 59	ค่าฟิวเตอร์			35,000.00						35,000.00			35,000.00
27 สค 59	ค่าสารเคมี			20,550.00						20,550.00			20,550.00
27 สค 59	ค่าแกส			360.00						360.00			360.00
30 สค 59	ค่าสารเคมี			9,240.00						9,240.00			9,240.00
4 มค 60	ค่าแกส			360.00						360.00			360.00
	รวมครั้งที่ 1		134,300.00	158,050.00		-	24,000.00	-	11,700.00	122,350.00	-	-	158,050.00

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ ..... วันที่ .....

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ นางสาวกัญจนา แซ่เตียว

Miss Kanjana Saetiew

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1012 02369 45 0

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เขตลาดกระบัง จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10520

โทรศัพท์ 7373000 ต่อ 6016, 02-3264318 โทรสาร 02-3264318

Email-Address kskanjan@kmitl.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. ที่จบ 2535 : วท.บ. (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ปี พ.ศ. ที่จบ 2539 : วท.ม. (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ปี พ.ศ. ที่จบ 2548 : ปร.ด.(เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

plant tissue culture andplant transformation

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

โครงการวิจัย การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของบัวหลวง

โครงการวิจัย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมาเพื่อความเหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการวิจัย การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

โครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

กัญจนา แซ่เตียว และ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2540. การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปทุมมา บทคัดย่อการประชุมวิชาการ ไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 3 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กรุงเทพ. หน้า 29-41.

กัญจนา แซ่เตียว และ สุเม อรัญนารถ. 2542. การศึกษาชนิดของสารสกัดและชิ้นส่วนต่างๆที่เหมาะสมในการทำแบบแผนไอโซไซม์ของบัวหลวง งานประชุมวิชาการ 30ปีเกษตรเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ. หน้า 337-342.

สุเม อรัญนารถ จงวัฒนาพุ่มหิรัญ และกัญจนา แซ่เตียว. 2548. การพัฒนาวัสดุปลูกจากวัสดุเหลือใช้ของปาล์มน้ำมัน การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 5 ณ โรงแรมเวลคัมจอมเทียน บีช พัทยา ชลบุรี หน้า 205.

นภาวรรณ ผลมณี กัญจนา แซ่เตียว และ สุเม อรัญนารถ 2549.ผลของ IAA และ 2iP ต่อการเพิ่มปริมาณบัวประดับพันธุ์ไดเร็คเตอร์จีทีมัวร์วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37(6)(พิเศษ):793-796.

กัญจนา แซ่เตียว รักชนก โคโต สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์ สนธิชัย จันทร์เปรม และเสริมศิริ จันทร์เปรม 2549. การทดสอบสารปฏิชีวนะของ Stylosantheshamataและกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการถ่ายยีน วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37 (2):137-144.

กัญจนา แซ่เตียว วราพร วีรพลากร ชิดชนก สุวรรณเกษชนาทิต และสุเม อรัญนารถ 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดอกโป๊ยเซียน วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 25:1(79-86)

สุเม อรัญนารถ นภาวรรณ ผลมณีวีรา คล้ายพุก และกัญจนา แซ่เตียว 2550. การขยายพันธุ์อุบลชาติ (Nymphaeaspp.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ The proceeding of IWGS Annual Symposium 2007 “Potential development of lotus and waterlily as economic plants” หน้า 1-6

กัญจนา แซ่เตียว และสุเมอรัญนารถ 2551. การถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้อโกรแบคทีเรียม การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุเม อรัญนารถ กัญจนา แซ่เตียว และวีรา คล้ายพุก 2551. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณอุบลชาติพันธุ์โจอี้โทโมคิค การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

สุเม อรัญนารถ กัญจนา แซ่เตียว ประเสริฐ แป๊ะสกุล 2552. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของบัวหลวงโดยใช้สารออรีซาลินวารสารเกษตรพระจอมเกล้า 27: 1 (42-53)

สาโรจน์ รุจิสรรค์สกุล วิลาสินี ลีทวีทรัพย์ กัญจนา แซ่เตียว และ งามนิจ ชื่นบุญงาม 2553. การถ่ายยีนเข้าสู่ต้นเข้าพรรษาทางเงิน (Globbasubstrigosa) โดยใช้ Agrobacterium tumefaciens. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย2 (ฉบับพิเศษ): 155-162.

Saetiew, K., and Arunyanart, S. 2001. Isozyme Analysis of Tissue Cultured Lotus (NelumbonuciferaGaertn.) Proceeding of Tissue culture and biotechnology in New Zealand.The Grand Chateau, Mount Ruapehu, New Zealand.

Saetiew, K., Sirinarumitr, T., Chanprame, S., Chatchawankanphanich, O., and Chanprame, S. 2005. The transfer of structural protein VP1 of foot and mouth disease virus to Stylosantheshamata.Conference of the Australian Branch of the international association for plant tissue culture and biotechnology.Ecology center of the botanic gardens and park. Western Australia.

Saetiew, K., Arunyanart, S. and Thongsukdee, K. 2010. Morphology and development of pollen in lotus (NelumbonuciferaGaerth.Cv. "Buntharik". Proceedings The 1st International Conference on Lotus and Waterlily 2010 and The 8th Conference on Research and Development of Lotus and Waterlily as Economic Plants 2010. Kasetsart University Chalemphrakiat SakonNakhon Province Campus, Thailand.

Saetiew, K., Sang-in, V., and Arunyanart, S. 2011. The effect of BA and NAA on multiplication of Butterwort (Pinguicula gigantean) in vitro .Journal of Agricultural Technology. Vol. 7(5):1349-1354.

Nitikonvarakul, D., Arunyanart, S., and Saetiew, K.. 2012. Effect of basic medium and plant growth regulators on in vitro multiplication of Phaius tankuvillae (Banks ex L' Brutelle) Blume. Journal of Agricultural Technology. Vol. 8(5): 1761-1768.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Buathong, R., Saetiew, K., Phansiri, S., Parinthawong, N., and Arunyanart, S. 2013. Tissue culture and transformation of the antisense DFR gene into lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) through particle bombardment. Scientia Horticulturae. 161: 216-222.

Saetiew, K., Leethaweesup, W., Parinthawong, N., and Arunyanart, S. 2014. Transformation of antisense dihydroflavonal 4-reductase (DFR) into secred lotus 'Buntharik' using Agrobacterium-mediated gene transfer. Acta Hort. 1025: 99-106.

Saetiew, K. and Umamanit, T. 2015. Micropropagation of Lilium formolongo via leaf explants. Journal of Agricultural Technology. Vol. 11(4): 855-862.

Kido, M., Morikawa, A., Saetiew, K., and Hoshi, Y. 2016. A cytogenetic study of three Japanese cultivars of Momordica charantia L.. Cytologia 81(1): 7-12

Saetiew, K., Ano P., Parinthawong, N. and Arunyanart, S. 2017. Transformation of antisense chalcone synthase (CHS) gene into lotus (Nelumbo nucifera Gaerth.) by particle bombardment. The open biotechnology journal. 11: 1-8.

Chaipanya, C., Saetiew, K., Arunyanart, S. and Parinthawong, N. 2017. Isolation and expression analysis of the Flavanone 3-Hydroxylase genes in lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.), waterlily (Nymphaea sp.) and transient silencing in waterlily. Chiang Mai J. Sci. 2016; 44(2) : 427-437.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

คนที่ 1

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง งามนิจ ชื่นบุญงาม

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Ngarmnij Chuenboonngarm

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1008-00228-21-2

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงาน ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์: 02-201-5232 โทรสาร: 02-354-7172

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E-mail: ngarmnij.chu@mahidol.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. ที่จบ 2529 : วท.บ. สาขาเคมีชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

ปี พ.ศ. ที่จบ 2534 : วท.ม. สาขาชีววิทยาสภาวะแวดล้อม
มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี จังหวัดกรุงเทพฯ

ปี พ.ศ. ที่จบ 2549 วท.ด. สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จังหวัดกรุงเทพฯ

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง สรีรวิทยาของพืช

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: -

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. โครงการ การศึกษาการเพิ่มปริมาณและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของต้นเข้าพรรษาทางเงิน (Globba substrigosa King. ex Baker) ดอกดิน (Kaempferia rotunda L.) และชมพูกาหลง (Scaphochlamysbiloba (Ridl.) Holtt.)ในหลอดทดลอง แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

2. โครงการ ความหลากหลายทางชีวภาพและการอนุรักษ์พันธุ์พืชใกล้สูญพันธ์ พืชเฉพาะถิ่น พืชอาหาร พืชสมุนไพร และพืชที่มีศักยภาพเป็นไม้ดอกไม้ประดับในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนสุดา สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

งานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่และการนำเสนอผลงาน

Pornsawan Visoottiviseth, Tepwitoon Thongsri, Veerapat Thonganan, Pornvipa Nartmenee and Ngarmnij Chuenboonngarm. Botanical exploration for hyperaccumulating plants in a gold mine. 9th International Phytotechnology Society Conference. 11-14 September 2012. Hasselt University, Belgium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sasikarn Prasongsom ,Kanchit Thammasiri, Ngarmnij Chuenboonngarm, and Wilai Noonpakdee. Micropropagation of Rhynchostylis gigantea (Lindl.) Ridl. (Amethyst-purple) through protocorm-like bodies. The international symposium on orchids and ornamental plants. 9-12 January 2012. Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Chusana Rungjindamai ,Kanchit Thammasiri, Ngarmnij Chuenboonngarm, and Thaya Jenjittikul. Micropropagation of Hedychium coronarium J. Konig. The international symposium on orchids and ornamental plants. 9-12 January 2012. Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Itsarapong Khaenthong, Kanchit Thammasiri, Ngarmnij Chuenboonngarm, and Wilai Noonpakdee. Micropropagation of variegated-leaf DendrobiumBurana Jade. The 37th Congress on Science and Technology of Thailand. 10-12 October 2011. Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok, Thailand.

Suthinutt Soonthornkalump, Ngarmnij Chuenboonngarm, Puangpaka Soontornchainaksaeng, Thaya Jenjittikul, and Kanchit Thammasiri. Effect of Colchicine Incubation Time on Tetraploid Induction of Kaempferia rotunda L. The international symposium on orchids and ornamental plants. 9-12 January 2012. Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand.

สาโรจน์ รุจิสรรค์สกุล, วิลาสินี ลีทวีทรัพย์, กัญจนา แซ่เตียว, งามนิจ ชื่นบุญงาม. การถ่ายยีนเข้าสู่ต้นเข้าพรรษาทางเงินโดยใช้ Agrobacterium tumefaciens. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 2553; 2 (ฉบับพิเศษ):155-162.

Chuenboonngarm N, Juntawong N, Engkagul A, Arirob W, Peyachoknakul S. Changing in TSS, TA and sugar contents, and sucrose synthase activity in ethephon treated 'Pattavia' pineapple fruit. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 2007; 41 (2): 205-212.

Chuenboonngarm N, Charoonsote S, Bhamarapravati S. Effect of BA and 2iP on shoot proliferation and somaclonal variation of Gardenia jasminoides Ellis in vitro culture.ScienceAsia 2001; 27 (3): 137-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งามนิจ ชื่นบุญงาม, สุวัชรา ลีลามณีพงศ์. ผลของ 6-Benzyladenine ต่อการเจริญของปลายยอดและตาข้างจากดาหลาพันธุ์สีชมพู. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 2543; 16 (2): 84-90.

คนที่ 2

1. ชื่อ นางสาวปวีณา ไตรเพิ่ม

Miss PaweenaTraiperm

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1405 00138 05 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงาน ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี จังหวัดกรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10400

โทรศัพท์ 02-2015232 โทรสาร 02-3547172

Email-Address paweena2411@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. ที่จบ 2543 วท.บ. (ชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปี พ.ศ. ที่จบ 2545 วท.ม. (พฤกษศาสตร์)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี พ.ศ. ที่จบ 2550 วท.ด. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

plant anatomy and taxonomy

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

โครงการวิจัย อนุกรมวิธานของพืชวงศ์หญ้าเผ่า Oryzeaeในประเทศไทย

โครงการวิจัย การชี้แจงชนิดที่ไม่รู้จัก การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบและเรณูของพืชวงศ์ผักบุ้ง สกุล ArgyreiaLour.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Traiperm P, & Staples G*. A new combination in Argyreia (Convolvulaceae). Adansonia (in press).

Staples G*, Traiperm P, Sugau JB &Pornpongrungrueng P. Ipomoea cambodiensis (Convolvulaceae) recharacterised with notes on its distribution and ecology. Adansonia (in press).(IF

Sumanon P &Traiperm P*.An Investigation of Lemma Micromorphology in Thai Oryzeae (Poaceae).ScienceAsia (in press).

Traiperm P*, Boonkerd T, Chantaranothai P & Simpson DA.Eremochloarenvoizei, a new species of Poaceae from Thailand.Kew Bulletin 2012; 67: 397-400.

Traiperm P*, Boonkerd T, Chantaranothai P & Simpson DA. Notes on the genus Ischaemum(Poaceae). Kew Bulletin 2012; 67: 75–79.

Traiperm P., Boonkerd T., Chantaranothai P. & Simpson D.A. (2011) Vegetative anatomy of subtribeIschaeminae: Andropogoneae (Poaceae) in Thailand. Tropical Natural History 11(1): 39-54.

Traiperm P., Boonkerd T., Chantaranothai P. & Simpson D.A. (2010) The genus Hemarthria (Poaceae) in Thailand. Thai journal of Botany 2(2): 133-147.

Staples G. &Traiperm P. (2010) Argyreia, pp. 337-371. In T. Santisuk and K. Larsen, eds. Flora of Thailand.Vol. 10 (3).The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok.

Traiperm P., Boonkerd T., Chantaranothai P. & Simpson D.A. (2010) A new species of Mnesithea(Poaceae) from Thailand. Kew Bulletin 65 (2): 341-343.

Staples G. &Traiperm P. (2008) New species, new combinations, and new records in Convolvulaceae for the Flora of Thailand. Thai Forest Bulletin 36: 86-108.

Traiperm P., Boonkerd T., Chantaranothai P. and Simpson D.A. (2008) Systematics of the subtribesIschaeminae and Rottboelliinae (Poaceae) in Thailand. Proceedings of the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Second Symposium of the Botany in Thailand March 2008, p. 55-65, 26-28, KhonKaen, Thailand.

Traiperm P., Boonkerd T., Chantaranothai P. & Simpson D.A. (2007) IschaemumhubbardiiBor (Poaceae), a New Record for Thailand. The Natural History Journal of Chulalongkorn University 7 (1): 67-70.

Khunwasi C., Na Songkhla B., Traiperm P. & Staples G. (2005) Four new combinations in ArgyreiaLour. (Convolvulaceae). Thai Forest Bulletin 33: 42-43.

Staples G., Na Songkhla B., Khunwasi C. &Traiperm P. (2005) Annotated checklist of Thai Convolvulaceae. Thai Forest Bulletin 33: 171-184.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วารสาร
เกษตรพระจอมเกล้า
KING MONGKUT'S AGRICULTURAL JOURNAL

พฤศจิกายน 2558
ปีที่ 33 ฉบับพิเศษ 1

ISSN 0857-0108

November 2015
SPECIAL ISSUE NUMBER 1

การประชุมวิชาการ
พืชสวนแห่งชาติ
ครั้งที่ 14
14th National Horticultural Congress 2015

พืชสวนไทย ไร้พรมแดน

18-20 พฤศจิกายน 2558

ณ สวนหงษ์ พัทยา

จัดประชุมโดย
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ร่วมกับ กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ลิขสิทธิ์เป็นของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในการแสวงหาผลประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบข้อความนี้ออก และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญบทความวิจัย

งานวิจัย	หน้า
ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology)	1
○ **อิทธิพลของ BA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของฟักข้าว** ไซนีย๊ะ สะมาลา พลวัต ภัทรกุลพิสุทธิ สมปอง เตชะโต และสุรีรัตน์ เย็นช้อน	3
○ **ศึกษาผลของปริมาณอาหารเหลว และสภาพเลี้ยงที่มีต่อการแตกยอดว่านแสงอาทิตย์ในสภาพปลอดเชื้อ** อิศร์ สุปินราช สุมิตรา สุปินราช และณัฐยา เทพสาร	10
○ **การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแอปเปิ้ลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค SRAP** ปัทมา ศรีน้ำเงิน และ Titnarong Heng	18
○ **การขยายพันธุ์หน้าวัวลูกผสมด้วยระบบเพาะเลี้ยงจมชั่วคราว** ประภาพร ฉันทานุมัติ อรทัย ธนัญชัย ยุพิน กลินเกษมพงษ์ และสุเมธ ฮ่องเภา	24
○ **การชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสของลิลลี่ในสภาพปลอดเชื้อ** พิศวรรณ เพ็ชรยิ่ง งามนิจ ชื่นบุญงาม ปรีณา ไตรเพิ่ม และกัญจนา แซ่เตียว	28
○ **ผลของความเข้มข้น IAA จากน้ำหมัก *Methylobacterium radiotolerans* กลุ่มแยก ED5-9 ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสเชียงดา** เพียงพิมพ์ ชิดบุรี ศิริพรรณ สารินทร์ และอภิชาติ ชิดบุรี	37
○ **ผลของความเข้มข้น IAA จากน้ำหมักร่วมกับสภาพเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเจริญและพัฒนาเชียงดาในสภาพปลอดเชื้อ** อภิชาติ ชิดบุรี พิทักษ์ พุทวรชัย และศิริพรรณ สรินทร์	42
○ **การศึกษาการปลดปล่อยเรณูมะละกอจากดอกชนิด elongatae ภายใต้สภาวะธรรมชาติ** ภานุวรรณ บัวทองจันทร์ เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์ และปาริชาติ เบิร์นส	47
○ **การเพิ่มชุดโครโมโซมของดาวเรืองอเมริกันและดาวเรืองฝรั่งเศสโดยใช้สารละลายโคลชิซิน** มรกต บุรณสุขบรรณ รสมนต์ จีนแส รุ่งฟ้า จีนแส นงลักษณ์ คงศิริ และราตรี บุญเรืองรอด	54
○ **การส่งถ่ายยีน *DFR* (dihydroflavonol 4-reductase) เข้าสู่ปทุมมากระถางด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*** วารุต อยู่คง รัฐพร จันทร์เดช และ ณิชมน ธรรมรักษ์	62
○ **การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกเพศอินทผลัมไทย (แม่โจ้36)** นพรัตน์ อินถา กวี สุจิปุลิ ปิยรัชฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ และพีระศักดิ์ ฉายประสาท	68
○ **การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นในสภาพปลอดเชื้อของข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia Kunth.*)** ปพิชญา ขวานทอง เยาวพา จิระเกียรติกุล และภาณุมาศ ฤทธิไชย	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสของลิลลี่ในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro callus and shoot induction of *Lilium formolongo* Hort.

พิศวรรณ เพ็ชร์ยิ่ง[1] งามนิจ ชื่นบุญงาม[2] ปวีณา ไตรเพิ่ม[2] กัญจนา แซ่เตียว[1]
Phitsawan Phetying[1] Ngarmnij Chuenboonngarm[2] Paweena Traiperm[2] Kanjana Saetiew[1]

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ขนาด 0.5 เซนติเมตรบนอาหารสูตร Murashige and Skoog(1962,MS) ที่เติม α-Napthalene acetic acid (NAA) เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-Benzylaminopurine (BA) เข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) จำนวน 15 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 8 ชิ้น พบว่าใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาไปเป็น friable callus ได้ดีที่สุด โดย callus มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.93 เซนติเมตร และจำนวนยอดเฉลี่ย 1.08 ยอดต่อชิ้น และ บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดมากที่สุด 1.25 ยอดต่อชิ้น ส่วนชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเกิด Compact callus ขนาดเฉลี่ยมากที่สุด 0.83 เซนติเมตรและมีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.41 ยอดต่อชิ้น ส่วนที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่สามารถทำให้ชิ้นส่วนพัฒนาไปเป็นยอดหรือแคลลัสได้ และตายในที่สุด โดยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : เอมบริโอ สารควบคุมการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลิลลี่

Abstract

Callus induction of *Lilium formolongo* was studied. The leaf explants (size 0.5 cm) were cultured on Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplemented with 0, 0.5, 1 mg/l α-Napthalene acetic acid (NAA) combination with 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/l 6- Benzylaminopurine (BA) and cultured in the dark condition for ten weeks. The experiment design was CRD (Completely randomized design) consist of fifteen treatments three replication and eight pieces in a replication. The leaf explant cultured on MS medium supplement with 1 mg l^{-1} NAA and 0.25 mg l^{-1} BA developed to creamy-white friable callus and callus size was 0.93 cm and shoot was amount 1.08 shoots. Explants cultured on MS medium supplement with 1 mg l^{-1} NAA and 0.5 mg l^{-1} BA developed 1.25 shoot. On MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} NAA and 1 mg l^{-1} BA the explants developed to compact callus size was 0.83 cm and 0.41 shoot . The explants cultured on MS medium without growth regulators and explant cultured on MS medium with 0, 0.25, 0.75, 1 mg l^{-1} BA found that do not develop in to callus and explant turned brown and died. These results suggest that the difference were statistically significant.

Keywords : Embryo, Plant growth regulator, Tissue cultured, Lily

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
[2] ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ลิลลี่ (*Lilium formolongo* Hort.) เป็นดอกไม้เมืองหนาว มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนและตอนเหนือของประเทศญี่ปุ่น เป็นไม้ดอกที่มีความสวยงามมาก มีหลายสายพันธุ์และมีดอกหลากสี บางชนิดมีกลิ่นหอม นิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางอย่างแพร่หลายทั่วโลก จึงได้รับสมญานามว่า ดอกไม้ของเจ้าหญิง ลิลลี่ในกลุ่มถูกเรียกนี้ว่า อีสเตอร์ลิลลี่ หรือ ทรัมเปตลิลลี่ (*Lilium* sp.) (กรมวิชาการเกษตร , 2546) ลิลลี่(*L. formolongo*) เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่มีการพัฒนามาจาก *L. longiflorum* มีดอกสีขาวและเป็นพันธุ์การค้า (Nguyen *et al.*, 2008) ลิลลี่เป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมไม้ตัดดอกประเภทหัวที่มีความสำคัญอันดับสามของโลก(Robinson and Firozabady, 1998)และมีมากกว่า 8000 สายพันธุ์ (Zhou *et al.*, 2008) ลิลลี่จึงได้รับการปลูกมานานเพื่อผลิตหัวพันธุ์และเป็นไม้ตัดดอก (Godo *et al.*, 1998) ในการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลิลลี่นั้น พบว่าสามารถใช้อวัยวะต่าง ๆ เช่น หัว ใบ ลำต้น ดอกอ่อน อับละอองเกสร นอกจากนี้มีการนำรังไข่ของ *L. longiflorum* ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นพืช (Ramsay *et al.*, 2003) ผลจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้ส่วนมากเป็นการเกิดต้นโดยตรงจากชิ้นพืชแต่มีการพบว่าชิ้นส่วนพืชบางชนิดสามารถเกิดแคลลัส (Callus) เช่น ใบของลิลลี่ *L. formolongo* ซึ่งเกิดยอดได้ภายหลังการเกิด callus (Saetiew and Umamanit., 2015) บางกรณีแคลลัสมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนโดยผ่านการเกิด somatic embryogenesis (Nhut *et al.*, 2006) การเกิด somatic embryogenesis นี้ แคลลัสจะถูกชักนำให้เกิดเป็น embryogenic callus ก่อนที่จะพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ (embryoid) ก่อนจะเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปและแนวโน้มการปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาการพัฒนาให้เกิดต้นพืชผ่านระบบ somatic embryo จึงเป็นพื้นฐานสำคัญ ที่จะทำให้การคัดเลือกต้นในระบบถ่ายยีนง่ายขึ้น (Luo., 1994) สำหรับลิลลี่ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อนำออกปลูกนั้นมีรายงานว่าต้นที่เกิดจาก embryogenesis เจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นที่เกิดจาก organogenesis (Nhut *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้น

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลิลลี่นำฝักมาล้างให้สะอาดโดยใช้น้ำยาล้างจาน (detergent) จากนั้นมาผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำฝักมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และตามด้วย คลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์
(Sodiumhypochloride 20%) ที่มี Tween 20 1-2 หยด นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

การชักนำให้เกิดต้นและแคลลัส

นำฝักลิลลี่ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาผ่าเอาเมล็ดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962, MS) จนกระทั่งได้ต้นในสภาพปลอดเชื้อในเวลา 1 เดือน โดยใช้ใบอ่อนจากต้นที่มีอายุ 3 สัปดาห์จากนั้นนำใบในสภาพปลอดเชื้อมาตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 ซม. เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโตไคนิน ได้แก่ NAA (α-Napthalene acetic acid) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโทไคนิน เช่น BA (6-Benzylaminopurine) ที่ระดับความ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design 15 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 8 ชิ้น เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยทำการย้ายชิ้นส่วนลงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลทุก 2 สัปดาห์ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธีการ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่ พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงใบลิลลี่บนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไปเลี้ยงในที่มืดนั้น ในสัปดาห์ที่ 2-4 ใบเริ่มขยายขนาดใหญ่ขึ้นแต่ยังไม่เกิดแคลลัสในทุก ๆ ทรีตเมนต์ ในสัปดาห์ที่ 6 พบว่าใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ขยาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดและเกิดแคลลัสในลักษณะที่เกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 0.39±0.95 เซนติเมตร (Fig. 1c, Table 2) สำหรับใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดแคลลัสและรากพร้อมกัน (Fig. 1d) โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) และมีจำนวนมากขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 0.11±0.10 เซนติเมตร ในระยะเวลาดังกล่าวนี้มียอดเกิดขึ้นด้วย โดยมียอดเฉลี่ย 0.33±0.71 ยอด นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าชิ้นพืชเกิดยอดและแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.25, 0.75, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Fig1e,1f) การเลี้ยงในสภาพที่มืด มีส่วนช่วยให้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรมีการสร้างแคลลัสได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ LingFei *et al.* (2009) ที่ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนใบของลิลลี่พันธุ์ *Lilium davidii* var. unicolor ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร NN ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ NAA ในสภาพมืด 15 วัน จึงเกิดแคลลัสขึ้น สารควบคุมการเจริญเติบโตทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นพืชที่เป็นปกติ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นผลมาจากฮอร์โมนทั้งสิ้น (รังสฤษดิ์, 2541) หลังการเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ชุดควบคุม) และ MS ที่เติม BA เข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงอาการตาย โดยใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Fig 1a, Table 1) เนื่องจากชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับหรือได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซินหรือไซโตไคนินในความเข้มข้นที่พอเหมาะตามความเหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อพืช จึงทำให้ไม่เกิดการสร้างแคลลัสและชิ้นส่วนตายได้ (สมพร, 2552) ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดแคลลัส ทั้ง friable callus และ complex callus โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากที่สุด 0.61±0.58 เซนติเมตร (Fig .2a,2b) จากการศึกษาพบว่าชิ้นพืชเกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดเฉลี่ย 0.62±0.48 เซนติเมตร มีการเกิดยอดโดยเฉลี่ยมาก 0.49±0.75 ยอด (Fig. 2c,Table3) ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงกลีบหัวย่อยและชิ้นส่วนใบของลิลลี่พันธุ์ *Lilium* "Prato" ในสภาพปลอดเชื้อว่า การใช้ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้น ส่งเสริมและพัฒนาการเกิดยอดได้มากถึง 96.67 เปอร์เซ็นต์ และ 64.97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (El-Naggar *et al.*, 2012) ในการศึกษานี้พบว่าชิ้นส่วนพืชสามารถเกิดแคลลัสพร้อมกับยอดและรากได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ในทุกความเข้มข้น (Fig. 2d) และเมื่อเลี้ยงต่อจนครบ 10 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการขยายขนาดโดยมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและจำนวนยอดมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2, 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Kanchanaporn and Ponpiboon, 2011) ที่ได้ชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และต่อมาแคลลัสมีการพัฒนาเป็นแบบออร์แกโนเจเนซิสไปเป็นยอดจากชิ้นส่วนใบของลิลลี่ *L. longiflorum* ได้ถึง 12 ยอด โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 5.3 ไมโครโมลลาร์ Nhut *et al.* (2006) ได้นำ pseudo-bulblets ของลิลลี่มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส เพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส พบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตรที่เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิด somatic embryogenesis มากที่สุด ในขณะที่อาหารแข็งนั้นทำให้แคลลัสพัฒนาได้ดี แต่ไม่มี somatic embryogenesis ดังนั้นในการสร้าง somatic embryogenesis จะต้องนำเลี้ยงในอาหารอาหารเหลวที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

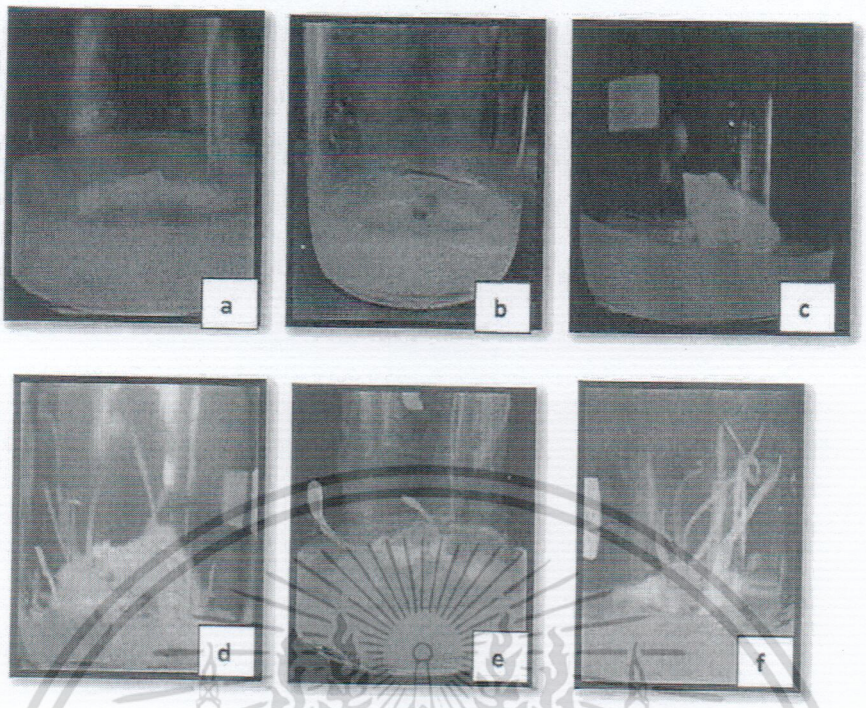


Fig.1. Callus induction of *Lilium formolongo*. Plant regeneration from leaf explants on medium in 6 weeks. (a) explant turned brown and died on MS medium (controls). (b) leaf expanded on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA. (c) leaf explant and friable callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 0.75 mg/l BA. (d) compact callus, shoots and roots cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA. (e) friable callus and shoots cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 0.25 mg/l BA. (f) friable callus, shoots and roots cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1 mg/l BA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

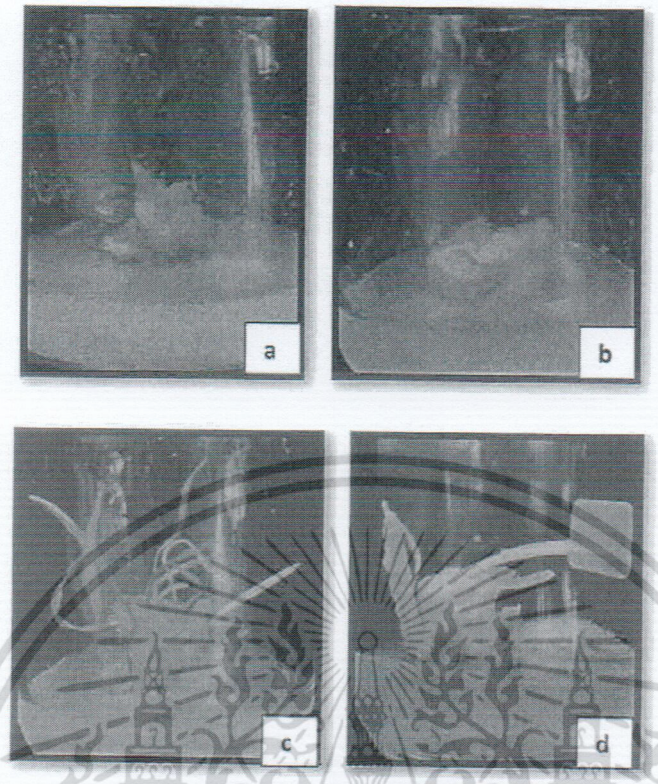


Fig.2. Plant regeneration from leaf explants on medium in 8 weeks. (a) leaf expanded and friable callus on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 0.75 mg/l BA. (b) compact callus on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l BA. (c) friable callus and shoots on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA. (d) compact callus, shoots and roots on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1 mg/l BA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 Effect of NAA and BA concentration for explant servivals of lily cultured 2-10 weeks.

Concentration (mg/l)		Survivals (%)				
		weeks				
NAA	BA	2	4	6	8	10
MS (control)		100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	00.00±0.00e	00.00±0.00e
0	0.25	100.00±0.00a	71.00±0.47b	00.00±0.00d	00.00±0.00e	00.00±0.00e
0	0.50	100.00±0.00a	66.00±0.44b	00.00±0.00d	00.00±0.00e	00.00±0.00e
0	0.75	100.00±0.00a	74.00±0.47b	00.00±0.00d	00.00±0.00e	00.00±0.00e
0	1	100.00±0.00a	62.00±0.50b	00.00±0.00d	00.00±0.00e	00.00±0.00e
0.5	0	100.00±0.00a	100.00±0.00a	62.00±0.50c	62.00±0.50cd	62.00±0.50cd
0.5	0.25	100.00±0.00a	79.00±0.42b	62.00±0.50c	62.00±0.50cd	62.00±0.50cd
0.5	0.5	100.00±0.00a	100.00±0.00a	70.00±0.47bc	50.00±00.53d	50.00±0.53d
0.5	0.75	100.00±0.00a	100.00±0.00a	66.00±0.46c	66.00±0.46bcd	66.00±0.46bcd
0.5	1	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	58.00±0.50cd	58.00±0.50cd
1	0	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	66.00±0.46bcd	66.00±0.46bcd
1	0.25	100.00±0.00a	100.00±0.00a	83.00±0.38b	70.00±-.38ab	83.00±0.39ab
1	0.5	100.00±0.00a	70.00±0.44b	70.00±0.44bc	70.00±0.44bc	70.00±0.44bc
1	0.75	100.00±0.00a	100.00±0.00a	58.00±0.52c	58.00±0.51cd	58.00±0.52cd
1	1	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
F-test		ns	**	**	**	**
CV (%)		0	8.20	11.34	15.35	17.63

Different letters within a column indicate significant difference at α=0.05 by Duncant's Multiple Range Test.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2 Effect of NAA and BA concentration for explant callus size of lily cultured 6-10 weeks

Concentration (mg/l)		Callus size (centimeter)(±SE)[1/]		
		Weeks		
NAA	BA	6	8	10
MS (control)		0.00±0.00d	0.00±0.00f	0.00±0.00e
0	0.25	0.00±0.00d	0.00±0.00f	0.00±0.00e
0	0.50	0.00±0.00d	0.00±0.00f	0.00±0.00e
0	0.75	0.00±0.00d	0.00±0.00f	0.00±0.00e
0	1	0.00±0.00d	0.00±0.00f	0.00±0.00e
0.5	0	0.00±0.00d	0.07±0.07ef	0.28±0.26d
0.5	0.25	0.23±0.45ab	0.40±0.62bc	0.59±0.84b
0.5	0.5	0.02±0.05cd	0.14±0.25de	0.24±0.43d
0.5	0.75	0.22±0.48a	0.47±0.64b	0.63±0.84b
0.5	1	0.27±0.35a	0.44±0.48b	0.58±0.61b
1	0	0.09±0.12cd	0.22±0.28d	0.38±0.45c
1	0.25	0.13±0.10bc	0.62±0.42a	0.93±0.60a
1	0.5	0.11±0.10cd	0.40±0.36bc	0.57±0.48b
1	0.75	0.11±0.10cd	0.32±0.31c	0.52±0.49b
1	1	0.39±0.95a	0.61±0.58a	0.83±0.79a
F-test		**	**	**
CV (%)		4.48	3.31	1.27

Differrent letters within a column indicate significant difference at α=0.05 by Duncant's Multiple Range Test.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3 Effect of NAA and BA concentration for explant shoots of lily cultured 6-10 weeks

Concentration (mg/l)		Shoot of number(shoots)(±SE)[1/]		
		Weeks		
NAA	BA	6	8	10
MS (control)		0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	0.25	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	0.50	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	0.75	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0	1	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.5	0	0.38±0.86a	0.62±0.92a	0.70±1.05ab
0.5	0.25	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.5	0.5	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.5	0.75	0.04±0.11c	0.04±0.11c	0.04±0.11c
0.5	1	0.00±0.00c	0.37±0.73abc	0.37±0.73bc
1	0	0.04±0.11c	0.04±0.11c	0.04±0.11c
1	0.25	0.37±0.50a	0.49±0.75abc	1.08±1.52a
1	0.5	0.33±0.71b	0.58±1.00ab	1.25±1.17a
1	0.75	0.12±0.35bc	0.12±0.35bc	0.12±0.35bc
1	1	0.08±0.23bc	0.20±0.50abc	0.41±0.75bc
F-test		**	**	**
CV (%)		7.92	15.02	16.24

Differrent letters within a column indicate significant difference at α=0.05 by Duncant's Multiple Range Test.

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของลิลลี่พันธุ์ *Lilium formolongo* โดยการนำชิ้นส่วนใบลิลลี่ขนาด 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0, 0.5,1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เช่น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 มิลลิกรัมต่อ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบเริ่มต้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ ในชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีขนาดของ Friable callus ใหญ่ที่สุด โดยมีขนาด 0.93 เซนติเมตร และในชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีขนาดของ Compact callus ขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีขนาด 0.83 เซนติเมตร และมีการเกิดยอดมากที่สุด 1.25 ยอด ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2546. เอกสารวิชาการเรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 น.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล.2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. พิมพ์ครั้งที่ 2 . สำนักพิมพ์โพร์เพช. กรุงเทพฯ. 127น.

EL-Naggar .H. 2012. *In vitro* propagation and organogenesis of *Lilium* "Prato'. African Journal of Biotechnology. 82, 1477-14776.

Godo. T., Kobayashi, K., Tagami, T., Matsui, K., Kida, T., 1998. In vitro propagation utilizing suspension cultures of Meristematic nodular cell clumps amd chromosome stability of Lilium x formolongi hort. Scientia Horticulturae. 72, 193-202

Kanchanapom,K. and Ponpiboon,T. 2011. Regeneration of Lily (*Lilium longiflorum* "Easter lily") by callus Derived from leaf explants cultured in vitro. ScienceAsia.37, 373-376.

LingFei, X., Feng-Wang, M., Dong L.2009. Plant regeneration from in vitro cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolour) Scientia Horticulturae. 119, 131-138.

Luo, J.P., Jia, J., Gu, Y., Liu,J., 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of Asstagalusadsurgens Pall. Plant Science. 143, 93-99

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15:473-497

Nguyen. T.P.T., Nguyen, T.T., and Nguyen, Q.T. 2008. Developing an agrobactenium-mediated transformation system for *Lilium formolongo* using thin layer of bulb scales. Journal of Science and Development. 123-128

Nhut, D.T., Hanh, N.T., Tuan, P.Q., Nguyet, L.T., Tram, N.T., Chinh, N.C., Nguyen, N.H., Vinh, D.N., 2006. Liquid culture as a positive condition to induce and enchance quality and quantity of somatic embryogenesis of *lilium longiflorum*. Scientia Horticulturae.110, 93-97

Ramsay. J.L., Galiz, D.S., and Lee, C.L. 2003. Basal medium and sucrose concentration influence regeneration of easter lily in overy culture. Horticultural Science. 38(3):404-406

Robinson, K.E.P., Firozabady, E., 1993. Transformation of floriculture crops. Scientia Horticulturae. 55, 83-99

Saetiew, K., and Umamanit, T., 2015. Micropropagation of Lilium formolongo vai leaf explanta. Journal of Agricultul Technology. 11(4):855-862.

Zhou, S., Ramanna M.S., Visser, R.G.F., Tuyl, J.M., 2008. Analysis of the meiosis in the P1 hrbrids of *Longiflorum* x Asiatic (LA) of lilies (*Lilium*) using genomic in hybridization. Journal of Genetic and Genomics 35, 687-695.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้