สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้า

นายศรัณย์ สุขวัฒน์
นางสาวสุวิชา ฮั้งตระกูล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....67287
วัน,เดือน,ปี.....22 พ.ย. 2548
.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study on the Optimization of Tissue Culture in Grasses.

Mr. Sarun Sukhawat

Miss Suwicha Hungtrakul

A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้า

นักศึกษา นายศรัณย์ สุขวัฒน์ รหัสประจำตัว 45050242

นางสาวสุวิชา ฮั้งตระกูล รหัสประจำตัว 45050257

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้า
นักศึกษา	นายศรัณย์ สุขวัฒน์
	นางสาวสุวิชา ฮั้งตระกูล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของหญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) เมล็ดของหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) และเมล็ดของหญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum TD 58*) เพื่อให้พัฒนาเป็นแคลลัสบนอาหารสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดยหญ้าไนล์และ หญ้ารูซี่ สามารถชักนำให้เกิด compact callus ได้ 48 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในหญ้ากินนีสีม่วงไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็น compact callus ได้

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าไนล์ หญ้ารูซี่ และหญ้ากินนีสีม่วง บนอาหารสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสของหญ้าไนล์ และหญ้ารูซี่ สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ใกล้เคียงกัน หลังจากเพาะเลี้ยง 20 วัน และแคลลัสของหญ้าไนล์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด เท่ากับ 4.2 ยอดต่อแคลลัส ที่ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ส่วนการชักนำแคลลัสของหญ้ากินนีสีม่วงจะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A Study on the Optimization of Tissue Culture in Grasses.
Name	Mr. Sarun Sukhawat
	Miss Suwicha Hungtrakul
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Acadamic Year	2005
Special Project Advisor	Asst.Prof. Dr. Anurug Poeaim
	and Asst.Prof. Dr. Supattar Poeaim

Abstract

Study callus induction and plant regeneration media for three species of forage grasses ; node of *Acroceras macrum*, seed of *Brachiaria ruziziensis*, and *Panicum maximum TD 58*. The callus induction media contained solid LS medium supplemented with 2,4-D at different concentrate ; 0.5 1 3 and 5 mg/l to stimulate callus formation. The results shows that explant of these three species of forage grasses which culture on 1 mg/l 2,4-D can develop to be callus formation higher than other media. The frequency of compact callus formation in *Acroceras macrum* is 48%, in *Brachiaria ruziziensis* is 40%, and in *Panicum maximum TD 58* can not induced to be compact callus.

The plant regeneratation media contained solid LS medium supplemented with BA at different concentrate ; 1 2 3 and 4 mg/l. After culture for 20 days, the number of plantlets regenerated that induced from *Acroceras macrum* and *Brachiaria ruziziensis* compact callus are well in all media, but not in *Panicum maximum TD58* fiable callus. After culture for 30 days, compact callus of *Acroceras macrum* give the highest number of multiple shoots at 4.2 shoots/callus on BA 1 mg/l.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และโครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากขาดซึ่งความกรุณาจาก ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ อบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้าทุกด้านทั้งด้านจริยธรรม ด้านการทำงาน รวมถึงความมีเมตตากรุณาที่มีให้กับข้าพเจ้าในการทำงานและการดำรงชีวิต

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อคุมสอบโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งคำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า เป็นผลให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงงานพิเศษนี้ ตลอดทั้งเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เป็นอย่างดีเสมอมาทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างราบรื่นและมีประสิทธิภาพ

ขอขอบคุณ กรมปศุสัตว์ (Department of Livestock Development) ซึ่งเป็นหน่วยงานภายใต้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้คำปรึกษา และอนุเคราะห์หญ้าสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่ให้คำแนะนำในการทำงานที่มีคุณค่าและมีประโยชน์อย่างมาก ตลอดทั้งกำลังใจที่มอบให้ด้วยดีตลอดมา รวมถึงสถาบันอันทรงเกียรติแห่งนี้ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลา 4 ปี

ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์ที่พึงจะได้รับจากโครงงานพิเศษฉบับนี้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายศรัณย์ สุขวัฒน์

นางสาวสุวิชา ฮั้งตระกูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....V
สารบัญรูป.....VI
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....3
1.3 ขอบเขตของของโครงงานพิเศษ.....3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....27
เอกสารอ้างอิง.....39
ภาคผนวก.....41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำส่วนข้อและเมล็ดของหญ้าให้พัฒนาเป็นแคลลัส.....26
2. อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 เพื่อชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นใหม่..... 26
3. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการเกิด compact callus จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์ บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 45 วัน.....28
4. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเกิด compact callus จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้ารูซี่บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน.....31
5. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้ากินนีสีม่วงบนอาหาร LS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน.....33
6. จำนวนยอดต่อแคลลัสจากการชักนำแคลลัสของหญ้าไนล์ ให้พัฒนาเป็นต้น บนอาหาร LS ที่ BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 30 วัน.....34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1. กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยแคลลัสของหญ้าไนล์ บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 40 50 60 70 80 และ 90 วัน.....28
2. แสดงการพัฒนาของส่วนข้อของหญ้าไนล์ ไปเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน.....29
2. แสดงลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้น จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์ บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน.....30
4. กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสของหญ้ารูซี่ บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 40 50 60 และ 70 วัน.....31
5. แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ ที่เจริญไปเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2 ,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 20 30 50 และ 60 วัน.....32
6. ลักษณะแคลลัส ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้ากินนีสีม่วง บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน.....33
7 แสดงลักษณะแคลลัสของหญ้าไนล์ หลังจากย้ายไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน.....35
8. แสดงลักษณะแคลลัสของหญ้ารูซี่ หลังจากย้ายไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน.....35
9. การพัฒนาของแคลลัสของหญ้าไนล์ หลังจากย้ายลงอาหารชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ระยะเวลาต่างๆ.....36
10. ลักษณะต้นใหม่ที่พัฒนามาจากแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตรชักนำให้เกิดต้นใหม่ เป็นระยะเวลา 30 วัน.....37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

อาชีพการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โคเนื้อและโคนมนั้นกำลังเป็นที่นิยมและได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นจำนวนมาก ดังนั้น การพัฒนาการเลี้ยงสัตว์จึงจำเป็นต้องทำควบคู่ไปกับการเลือกชนิดและการพัฒนาสายพันธุ์พืชอาหารสัตว์ ให้มีผลผลิตต่อพื้นที่และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในทางเศรษฐกิจ ยิ่งไปกว่านั้น ปัจจุบัน ทางภาครัฐบาลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้ส่งเสริมให้เกษตรหันมาเลี้ยงโคเนื้อและโคนม และได้รับความสนใจจากเกษตรเป็นจำนวนมาก จึงทำให้การเลี้ยงโคนมและโคเนื้อนั้นขยายตัวอย่างรวดเร็วในทุกภาคของประเทศไทย ทำให้จำนวนของพืชอาหารสัตว์นั้นไม่เพียงพอกับความต้องการของสัตว์

ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากจำนวนพื้นที่เพาะปลูกพืชอาหารสัตว์มีปริมาณไม่เพียงพอและไม่เหมาะสม รวมทั้งขาดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่และสามารถที่จะทนทานและให้ผลผลิตได้ในฤดูแล้ง ซึ่งเป็นช่วงที่ขาดแคลนอาหารสัตว์ได้ ส่วนใหญ่แล้ว อาชีพเลี้ยงสัตว์ พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งสภาพภูมิประเทศค่อนข้างแห้งแล้งและประสบกับปัญหาดินเค็ม แนวทางที่จะแก้ไขสถานการณ์นี้ คือ จะทำอย่างไรเพื่อที่จะปรับปรุงพันธุ์พืชอาหารสัตว์ให้มีคุณภาพดี และสามารถใช้เลี้ยงโค กระบือได้ตลอดทั้งปี ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาเทคนิควิธีการปรับปรุงและขยายพันธุ์หญ้าอาหารสัตว์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงและเพิ่มผลผลิตให้กับหญ้าอาหารสัตว์ ดังเช่น

ธนภักษ์ (2545) รายงานว่า สามารถชักนำเมล็ดของหญ้าอะตราตัม (*Paspalum atratum*) ให้เกิดเป็นยอดจำนวนมากได้โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร Murashige & Skoog (MS) medium ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ N-acetylaspartate (NAA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดิริฎา (2545) ได้ทดลองนำหญ้ารูซี่ *(Brachiaria ruziziensis* Germain and Everard) มาชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถที่จะชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดีที่สุด คือ จำนวนยอดเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 7.49 ยอด

อนุรักษ์ (2544) ศึกษาการเจริญเป็นแคลลัสของหญ้าแพรก โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS และ LS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท (casein hydrolyzate) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพรลีน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้ไปยังอาหารสูตร LS ที่เติมซีเอทิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่เติม 2,4-D เพื่อชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (Embryogenic callus) และชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่ในสูตรอาหาร LS ที่เติมซีเอทิน เมื่อนำไปปลูกลงดิน พบว่า ต้นหญ้าสามารถอยู่รอดในสภาวะธรรมชาติได้

Lajonchere และคณะ (1993) ทดลองนำชิ้นส่วนของยอดอ่อนของหญ้าพันธุ์ *P. maximum* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อนและ 2,4-D โดยทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พบว่า สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ คือ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4–D ปริมาณ 2-7 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4–D 2 – 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรพัฒนาแคลลัสเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติมไคเนติน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Yuexia Wang และคณะ (2002) ศึกษาสูตรอาหารชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ ในหญ้า bentgrasses 3 สายพันธุ์และหญ้า annual bluegrass 1 สายพันธุ์ พบว่า อาหาร MS ที่เติมเคซีนไฮโดรไลเสท 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 3,6-dichloro-anisic acid 6.63 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6-benzyladenine (BA) 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้า annual bluegrass มีอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่สูงกว่า bentgrasses สายพันธุ์อื่นๆ และพบว่า อาหาร MSA2D ที่เติม 2,4–D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร myo-inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสปาราจีน (asparagines)150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหญ้า creeping bentgrass แต่ไม่มีผลในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหญ้า colonial bentgrass, velvet bentgrass และหญ้า annual bluegrass

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nayak และคณะ (1996) ทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าสายพันธุ์ lemongrass (*Cymbopogen flexuous* (Nees.) Wates) ในอาหารเหลวสูตร MS และ N_6 ที่มีส่วนประกอบของฮอร์โมนต่างกัน พบว่า เมื่อเติมฮอร์โมน 2,4–D แอลฟา-แนฟทาลีนอะซิติคแอซิด (α-naptalene acetic acid) หรือ ไคเนติน (kinetin) อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียวจะไม่สามารถกระตุ้นการเกิดแคลลัสได้ แต่ผสม 2,4–D และไคเนตินในอาหาร พบว่า เริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้นและสังเกตเห็นการเจริญเติบโต หลังทำการทดลองครบ 30 วัน ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหาร MS จะสามารถเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหาร N_6 ที่มีปริมาณฮอร์โมนเท่ากันทุกประการ โดยอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เจริญเติบโตดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4–D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-แนฟทาลีนอะซิติคแอซิด 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Ashok และ Rongda (2000) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4–D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 3 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารชักนำแคลลัสให้ข้อปล้องของหญ้าเบอ์มิวดาเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และแคลลัสจะเริ่มพัฒนาขึ้นในสัปดาห์แรก หลังจาก 4 สัปดาห์ ขนาดของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4–D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4–D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 3 เท่า

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำจากเมล็ด และส่วนข้อของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ด และส่วนข้อของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส รวมทั้งศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จะเป็นส่วนหนึ่งที่มีแหล่งข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส และการพัฒนาแคลลัสให้เป็นต้นใหม่ของหญ้า

1.4.2 ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าในอนาคต

1.4.3 การวิจัยนี้จะช่วยสนับสนุนการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืชและช่วยสานต่องานทางด้านพันธุวิศวกรรมให้ครบวงจร สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการเรียน การสอน สำหรับนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

ในโลกนี้มีพืชที่จัดอยู่ในวงศ์หญ้า (Gramineae หรือ Poaceae) ประมาณ 10,000 ชนิด (species) หรือประมาณ 651-785 สกุล (genera) ขึ้นกระจัดกระจายกันทั่วไปเกือบทุกสภาพภูมิอากาศ ซึ่งแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันทั้งด้านขนาด รูปร่าง และรูปแบบการเจริญเติบโต พืชเหล่านี้อาจเจริญเติบโตรวมกันเป็นพื้นที่กว้างใหญ่ จัดว่าเป็นทุ่งหญ้าธรรมชาติ เช่น ทุ่งหญ้าสะวันน่า (savanna) ทุ่งหญ้าแพรรี่ (prairies) และทุ่งหญ้าสะเตปป์ (steppes) มนุษย์ได้นำพืชในวงศ์นี้มาปลูกเป็นทุ่งหญ้าเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์เปลี่ยนอาหารหยาบเหล่านี้เป็นเนื้อ นม และเนย ตลอดจนขนสัตว์เพื่อใช้เป็นเครื่องนุ่งห่ม (สายัณห์, 2531)

2.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของหญ้าอาหารสัตว์ (สายัณห์, 2531)

Class	:	Angiospermae
Subclass	:	Monocotyledoneae
Order	:	Graminales
Famiry	:	Poaceae (Gramineae)

โดยพืชตระกูลหญ้าสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 วงศ์ย่อย (Sub species) ได้แก่

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

6 วงศ์ย่อยแบ่งได้เป็น 28 ชนิด ดังนี้

Agrostideae	Bambuseae	Maydeae	Phareae
Andropogoneae	Chlorideae	Nardeae	Parianeae
Anomochloreae	Eragroteae	Olyreae	Sporoboleae
Aristideae	Festuceae	Oryzeae	Stipeae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Arundinelleae	Hordeae	Paniceae	Streptochaeteae
Arundineae	Leptureae	Pappophoreae	Thysanolaeneae
Aveneae	Lygeae	Phalarideae	Zoyiseae

หญ้าอาหารสัตว์แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันทั้งในด้านขนาด รูปร่าง และรูปแบบการเจริญเติบโต ซึ่งจะช่วยให้เราสามารถจำแนกพันธุ์หญ้า เพื่อนำหญ้าไปใช้ประโยชน์ได้ถูกต้อง เมื่อแบ่งตามการปรับตัวต่อภูมิอากาศ ลักษณะ โครงสร้าง และการใช้ประโยชน์ได้ 2 กลุ่ม คือ

2.1.1 หญ้าอาหารสัตว์เขตอบอุ่น (Temperate forage grasses)

หญ้าอาหารสัตว์เขตอบอุ่น หมายถึง หญ้าที่เจริญเติบโต และใช้เพาะปลูกทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ในสภาพอากาศหนาวเย็น มักอยู่วงศ์ย่อย Festucoideae ได้แก่ หญ้าในสกุล *Agropyron, Festuca, Dactyli , Lolium, Poa , Bromus, Agrostis, Phleum* เป็นต้น

2.1.2 หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน (Tropical forage grasses)

หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน หมายถึง หญ้าที่เจริญเติบโต และใช้เพาะปลูกทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ในสภาพอากาศร้อน มักอยู่ในวงศ์ย่อย *Panicoideae, Eragrotoideae* และ *Bambusoidea* ได้แก่ หญ้าในสกุล *Axonopus, Brachiaria, Cenchrus, Chloris, Cynodon, Digitaria, Eragrostis, Melinis, Panicum, Paspalum, Pennisetum, Paspalum, Setaria ,Sorghum, Tripsacum* เป็นต้น หญ้าที่นิยมใช้เพาะปลูกทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ในเขตร้อน ได้แก่ หญ้าขนหรือมอริชัส (*Brachiaria mutica*) หญ้าซิกแนล (*B. brizantha* และ *B. decumbens*) หญ้ารูซี่ (*B. ruziziensis*) หญ้าบัฟเฟล (*Cenchrus ciliaris*) หญ้าโรดส์ (*Chloris gayana*) หญ้าแพงโกลา (*Digitaria decumbens*) หญ้าโมแลส (*Melinis minutriflora*) หญ้ากินนี (*Panicum maximum*) หญ้าพลิเคทูลัม (*Paspalum plicatulum*) หญ้าอะทราตัม (*Paspalum atratum*) หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) หญ้าซีตาเรีย (*Setaria anceps*) หญ้าจอห์นสัน (*Sorghum halepense*) เป็นต้น

2.1.2.1 หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis* : Ruzi)

หญ้ารูซี่เป็นหญ้าพื้นเมืองของประเทศคองโก นำเข้ามาในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2511 โดยฟาร์มโคนมไทยเดนมาร์ค นำมาจากออสเตรเลีย เนื่องจากติดเมล็ดดี ทำให้ง่ายต่อการขยายพันธุ์ ปัจจุบันกรม ปศุสัตว์ผลิตเมล็ดหญ้ารูซี่ มากกว่าเมล็ดพันธุ์ชนิดอื่นทั้งหมด

หญ้ารูซี่เป็นหญ้าที่มีอายุหลายปี ลักษณะการเจริญเติบโตคล้ายหญ้าขน แต่ใบเล็กกว่า หญ้ารูซี่มีเหง้า (rhizome) ที่มีข้อสั้น สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้นที่มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1,000 มิลลิเมตร ขึ้นไปชอบดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง และมีการระบายน้ำดี ไม่ทนต่อสภาพน้ำขังเป็นระยะเวลานาน สามารถอยู่รอดได้ในช่วงฤดูแล้งแต่ไม่ให้ผลผลิต ในสภาพที่มีการให้น้ำได้ในช่วงฤดูแล้งให้ผลิตเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ของหญ้าเนเปียร์แคระ เมล็ดหญ้ามีระยะพักตัวนานประมาณ 6 เดือน เมล็ดที่เก็บใหม่ๆ จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำลายละยะพักตัวโดยการแช่กรดซัลฟิวริก 15 นาที

2.1.2.2 หญ้ากินนีสีม่วง (*panicum maximum* : purple guinea)

หญ้ากินนีสีม่วงมีแหล่งดั้งเดิมในประเทศแทนซาเนีย (Tanzania) นำเข้าประเทศไทยเป็นครั้งแรกในปี 2530 โดยใช้ชื่อว่า กินนี TD58 เนื่องจากนำต้นและสีใบแตกต่างจากหญ้ากินนีชนิดอื่นโดยมีสีม่วงในบริเวณโคนต้น หน่อมีสีม่วงแม้กระทั่งช่อดอก ใบสีเขียวเข้ม ดังนั้นจึงเรียกกันว่า กินนีสีม่วง

หญ้ากินนีสีม่วงเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับหญ้ากินนีธรรมดาขึ้นได้ในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว ไม่ทนต่อสภาพน้ำขัง ต้องการดินที่มีการระบายน้ำดี และมีความอุดมสมบูรณ์พอสมควร เจริญเติบโตได้ไม่ดีในดินเค็ม และดินที่เป็นกรดจัด และต้องการอุณหภูมิสูงเพื่อการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิต่ำหญ้ากินนีจะให้ผลผลิตที่ต่ำลง

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหญ้า (สายัณห์, 2531)

2.2.1 ระบบราก (roots) พืชวงศ์หญ้ามีระบบรากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) ประกอบด้วย รากขนาดเล็กเท่าๆ กันมากมายเกิดที่บริเวณข้อของลำต้นที่อยู่ใต้ดิน หรือใกล้ผิวดินมีการสานกันแน่นเป็นแผ่น เมื่อเมล็ดเริ่มงอกจะมีรากอันแรกเจริญจากส่วนรากอ่อน (radicle) ของต้นอ่อนของเมล็ดเรียกว่า primary root และรากแขนง (seminal roots) เกิดบริเวณข้อที่ใบเลี้ยงติดอยู่ (scutellar node) ประมาณ 6-7 ราก รากชุดนี้เป็นรากชั่วคราว ซึ่งใช้สำหรับการตั้งตัวของพืชในระยะแรก ส่วนรากถาวรชุดแรกเกิดที่ข้อถัดขึ้นไปที่มีกาบหุ้มยอดอ่อน (coleoptile) ติดอยู่ซึ่งเรียกข้อนี้ว่า coleoptilar node รากถาวรชุดอื่นๆ จะเกิดที่ข้อที่อยู่ใกล้ผิวดิน รวมทั้งบริเวณข้อของลำต้นที่เลื้อยไปตามผิวดินและใต้ดิน เรียกรากเหล่านี้ว่ารากค้ำจุน (adventitious roots)

2.2.2 ลำต้น (shoot) ลำต้นหญ้าเจริญมาจากส่วนของยอดอ่อน (plumule) ในเมล็ด ลำต้นแรกที่งอกขึ้นมานี้เรียกว่า main stem ต้นหญ้าสามารถแตกหน่อหรือแขนง (tillers) ได้มากมายและรวดเร็วจากข้อล่าง ๆ ของลำต้นทำให้มีลักษณะเป็นกอ ลำต้นหญ้ามีลักษณะกลมหรือค่อนข้างแบนแบ่งเป็นข้อและปล้อง (node and internode) ให้เห็นชัดเจน ส่วนของปล้องมักมีลักษณะเป็นรูกลวงภายในและตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของข้อ ปล้องบริเวณโคนต้นจะสั้น ส่วนยอดจะยืดยาวออก โดยเฉพาะเมื่อหญ้าจะออกดอก ที่ข้อทุกข้อมีตาราก ตายอดและใบอยู่ ซึ่งทั้งตารากและตายอดนี้ พร้อมที่จะเจริญได้ทันทีเมื่อมีสภาพการณ์เหมาะสม จึงทำให้หญ้าขยายพันธุ์โดยใช้ท่อนพันธุ์ได้ดี การเจริญของต้นหญ้ามีหลายลักษณะ คือ

2.2.2.1 แบบลำต้นตั้งตรง (erect lateral shoots) ได้แก่ หญ้ากินนี หญ้าเนเปียร์ หญ้าบัฟเฟล หญ้าตาเรีย หญ้าจอห์นสัน เป็นต้น

2.2.2.2 เจริญขนานไปกับพื้นผิวดิน เรียกว่า ไหล (stolon) เช่น หญ้าขน หญ้าซิกแนล และที่เจริญอยู่ใต้ผิวดิน เรียกว่า เหง้า (rhizomes) เช่น หญ้าแพรก อย่างไรก็ตาม พวกหญ้าที่มีลำต้นเลื้อยไปกับผิวดินและใต้ดิน เมื่อออกดอกส่วนของช่อดอกจะตั้งขึ้น ลำต้นหญ้ามีการแตกกอ (tillering) 2 ลักษณะ คือ

1. extravaginal หมายถึง การแตกหน่อที่หน่อใหม่แทงทะลุกาบใบออกมา
2. intravaginal หมายถึง การแตกหน่อที่หน่อใหม่โผล่ขึ้นมาภายในกาบ หญ้าส่วนใหญ่มีการแตกหน่อแบบ intravaginal

2.2.3 ใบ (leaf) ใบหญ้าเกิดที่ข้อของลำต้น ในขณะที่ยังอ่อนอยู่จะถูกลำต้นม้วนห่อหุ้มยอดอ่อนไว้อย่างเหนียวแน่น ใบหญ้าประกอบด้วย

2.2.3.1 กาบใบ (leaf sheath) เป็นส่วนกาบที่ห่อหุ้มลำต้น และอยู่ติดกับลำต้นที่ส่วนข้อ

2.2.3.2 ตัวใบ (leaf blade หรือ laminar) เป็นแผ่นใบ มีรูปร่างกล้ายหอกยาวเรียว ปลายแหลม มีเส้นกลางใบอยู่ตรงกลาง และเส้นใบ (veins) ขนานไปตามความยาวของตัวใบ

2.2.3.3 เยื่อกันน้ำฝนหรือลิ้นใบ (ligule) เป็นเยื่อที่อยู่ตรงส่วนต่อของกาบใบและตัวใบ ด้านในมักมีสีขาวหรือสีน้ำตาล มีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช จึงใช้ในการจำแนกชนิดและพันธุ์หญ้าได้หูใบหรือเขี้ยวใบ (auricle) เป็นส่วนของเยื่อหรือขนที่ยื่นออกมาทางด้านข้างตรงส่วนต่อของกาบใบและตัวใบ

ใบหญ้าเกิดเรียงเป็น 2 แถวสลับกันไปรอบลำต้น เมื่อมีการแตกหน่อหรือแขนงใหม่ ใบแรกของแขนงใหม่จะเปลี่ยนเป็นเยื่อสีขาวไม่มีตัวใบ ทำหน้าที่ห่อหุ้มยอดอ่อนและป้องกันการเสียดสีของแขนงใหม่กับลำต้นเดิม เยื่อดังกล่าวนี้ เรียกว่า prophyll

2.2.4 ช่อดอก (inflorescences) ดอกหญ้ามีลักษณะเป็นช่อ ประกอบด้วยกลุ่มดอกที่เรียกว่า spikelet ติดอยู่บนแกนกลาง (axis) ที่ตั้งอยู่บนก้านช่อดอก (peduncle) ก้านของกลุ่มดอกเรียกว่า pedicel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งอยู่ติดบนก้านช่อดอกย่อย (rachis) แกนกลางที่ก้านช่อดอกย่อยติดอยู่เรียกว่า rachilla หญ้าบางชนิดกลุ่มดอกไม่มีก้านและติดอยู่บนก้านช่อดอกโดยตรงเรียกกลุ่มดอกดังกล่าวนี้ว่า sessile spikelet

กลุ่มดอกประกอบด้วยดอกย่อย (florets) หนึ่งหรือหลายดอก โดยที่ฐานมี empty glumes อยู่ 2 อัน ซึ่งเจริญมาจาก ใบประดับ (floral bracts) empty glumes มีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช บางชนิดอาจเป็นเยื่อบางๆ เล็กๆ เช่น ในเมล็ดข้าวโพด หญ้าจอห์นสัน หรือเป็นเกล็ดหุ้มส่วนฐานเอาไว้ เช่น ในเมล็ดหญ้ากินนี หรือใหญ่ขึ้นจนหุ้มดอกย่อยไว้ เช่น เมล็ดหญ้าซิกแนลเป็นต้น ดอกย่อยประกอบด้วยกาบ 2 กาบประกบกัน กาบล่างมักมีขนาดใหญ่กว่าเรียกว่า lemma และกาบบนเรียกว่า palea ภายในมีเกสรตัวผู้ (stamen) อยู่ 1 2 3 หรือ 6 อันขึ้นกับชนิดหญ้า แต่ส่วนใหญ่มักจะมีอยู่ 3 อัน ที่ส่วนปลายของทุก ๆ อันจะมีกระเปาะอยู่เรียกว่า อับเรณู (anther) ซึ่งมีสีแตกต่างกัน เช่น สีเหลือง ม่วง หรือเป็นลายประ นอกจากนี้ภายในดอกยังมีเกสรตัวเมีย (pistil) 1 อัน ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) และมียอดเกสรตัวเมีย (stigma) ชูขึ้นมาเป็น 2 แฉก ซึ่งมีลักษณะคล้าย ๆ ขนนก (feathery stigma) ที่ฐานรังไข่มักมีเกล็ดเล็ก ๆ 2-3 อัน เรียกว่า lodicules ทำหน้าที่ปิดเปิด lemma และ palea ส่วนที่ปลายของ lemma ของหญ้าบางชนิดจะมีหางยาวออกไปเรียกว่า awn และมีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช

เมื่อดอกเจริญเติบโตเต็มที่และมีสภาพแวดล้อมเหมาะสม ส่วน lemma และ palea จะเปิดออก อับเรณูจะโผล่ออกมาและแตกออกพร้อมทั้งมีละอองเกสร (pollen grains) ร่วงออกมา ลักษณะการบานของดอกหญ้านี้เรียกว่า anthesis ซึ่งแสดงว่าดอกเหล่านี้พร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้

ช่อดอกของพืชตระกูลหญ้ามีหลายแบบ จำแนกได้ดังนี้

2.2.4.1 raceme เป็นช่อดอกที่มีกลุ่มดอกย่อยอยู่บนแกนก้านช่อดอก โดยมีก้านของกลุ่มดอกย่อยยาวเท่าๆ กันเชื่อมติดอยู่

2.2.4.2 spike เป็นช่อดอกลักษณะคล้ายกับ raceme แต่กลุ่มดอกย่อยไม่มีก้าน (sessile spikelet)

2.2.4.3 panicle เป็นช่อดอกที่ประกอบด้วยช่อดอกย่อยหลายช่อรวมกัน จึงทำให้ช่อดอกมีกิ่งก้านสาขามากมาย และมีลักษณะแตกต่างกันมากมาย เช่น บางชนิดมีช่อดอกย่อยแตกออกไปจากชุด เดียวกันเรียกว่า digitate panicle เช่น หญ้าโรดส์ หญ้าแพงโกล่า เป็นต้น หญ้าส่วนใหญ่มีช่อดอกเป็นแบบ panicle

2.2.5 ผลและเมล็ด (fruit and seed) เป็นส่วนที่มีเปลือก (pericarp and seed coat) เชื่อมติดกันตลอด เรียกว่า caryopsis มีลักษณะเป็น one-seed fruit เมล็ดหญ้าเจริญมาจากไข่อ่อนทั้งที่ได้รับการผสมหรืออาจไม่ได้รับการผสมจากละอองเกสร แต่สามารถเจริญขึ้นมาในรังไข่ เมล็ดหญ้ามัก อยู่ใน lemma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับ palea ลักษณะของเมล็ดหญ้าที่เจริญขึ้นมาโดยไม่มีการผสมเกสรนี้เรียกว่า apomixis มีหญ้าหลายชนิดที่มีเมล็ดเกิดขึ้นในลักษณะนี้ ได้แก่ หญ้าโรดส์ หญ้าซิกแนล หญ้ากินนี และหญ้าเนเปียร์ เป็นต้น เมล็ดหญ้ามีใบเลี้ยงเดียว เรียกว่า scutellum มีต้นอ่อนที่ฐานของเมล็ด เรียกว่า คัพภะ (embryo) ประกอบด้วยยอดต้นอ่อน (plumule) และปลายรากต้นอ่อน (radicle) ในเมล็ดมีอาหารสะสมอยู่ในรูปของ endosperm

2.3 ทฤษฎีและหลักการ

2.3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อเซลล์ หรือเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะที่ควบคุมสิ่งแวดล้อม อันได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบแต่ไม่ว่าจะเป็นแบบใดก็ตามในที่สุดก็สามารถบังคับให้เกิดเป็นต้นได้เป็นจำนวนมาก (อรดี, 2542)

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (Parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาดต่างๆ กัน มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคคิวโอล (vacuole) จำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลด์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น เรียกว่า compact callus แต่ถ้าแคลลัสเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus

ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่างๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงสุดในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของเอ็มบริโอ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่ออื่นๆของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ คือ แคมเบียม (Cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้หรือแกนลำต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (pholoem vessels) ไซเลมพาเรนไคมา (xylem parenchyma) และเอ็นโดสเปอร์ม (endosperm) (รังสฤษฎ์, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การเจริญของเนื้อเยื่อพืชสามารถจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและรากได้โดยแบ่งการพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้ 2 กระบวนการ (อนุรักษ์, 2537)

2.3.2.1 กระบวนการเกิดออแกนโนจีนีซิส (organogenesis) คือ การพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรือ อวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวกันของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมา ที่อยู่ใกล้เคียงกันเป็นเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็ก ช่องว่างภายในเซลล์เล็ก และมีไซโตพลาสซึมที่มีความหนาแน่นมาก กลุ่มเซลล์จะมีการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดเวลา กลุ่มเซลล์นี้ เรียกว่า meristemoid ซึ่งจะเจริญต่อไปกลายเป็นจุดกำเนิดของยอดหรือราก (shoot or root primodia) และการจะเกิดเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ จะเป็นอิสระต่อกันขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อเจริญนั้นได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญไปเป็นเนื้อเยื่ออะไร

2.3.2.2 กระบวนการเกิดเอ็มบริโอจีนีซิส (Embryogenesis) คือ การพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยเกิดจากกลุ่มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนเริ่มต้นเกิดจาก ไซโกตแบ่งเป็น 2 เซลล์ (proembryo) เซลล์ที่มีขนาดเล็กจะอยู่ด้านบน เรียกว่า apical cell ส่วนเซลล์ขนาดใหญ่อยู่ด้านล่างเรียกว่า basil cell มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า globular shape embryo

ขั้นตอนที่ 2 กลุ่มเซลล์ globular shape embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ heart shaped embryo

ขั้นตอนที่ 3 กลุ่มเซลล์ heart shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ torpido-shape embryo

ขั้นตอนที่ 4 คือ ขั้นตอนสุดท้าย กลุ่มเซลล์ torpido-shape embryo จะมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอในขั้นตอนนี้ กลุ่มเซลล์สามารถจะเจริญเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยเนื้อเยื่อด้านบนของเอ็มบริโอจะเจริญไปเป็นยอด และเนื้อเยื่อด้านล่างคือส่วนที่สัมผัสอาหารจะเจริญไปเป็นราก

ข้อแตกต่างระหว่างกระบวนการออแกนโนจีนีซิส และกระบวนการเอ็มบริโอจีนีซิส คือ

1. การเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก การพัฒนาเกิดออแกนโนจีนีซิส นั้น การเกิดยอดหรือรากจะเกิดอิสระต่อกัน โดยยอดอาจจะเกิดบริเวณหนึ่ง รากอาจจะเกิดอีกบริเวณหนึ่ง แม้จะเกิดบนก้อนแคลลัสเดียวกัน แต่ในบางครั้งการเกิดยอดและรากอาจจะเกิดใกล้เคียงกันมากจนอาจเชื่อมต่อกันได้ทำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ได้ แต่การเกิดเอ็มบริโอจีนีซิสนั้นการเกิดยอดและรากจะต้องติดต่อกัน เพราะยอดและรากเจริญมาจากเซลล์เดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทิศทางของการเกิดยอดและราก การพัฒนาเกิดเป็นยอดหรือรากในแคลลัสนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหรือสิ่งที่มากระตุ้นให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งเนื้อเยื่อเจริญนี้สามารถจะเจริญไปเป็นยอดหรือรากก็ได้ จึงเชื่อว่าการเกิดกระบวนการออแกนโนจีนีซีสมีทิศทางที่แน่นอน สำหรับกระบวนการเกิดเอ็มบริโอจีนีซิสนั้น มี 2 ทิศทาง เพราะส่วนหนึ่งของเซลล์จะเกิดเป็นยอด ส่วนอีกด้านหนึ่งจะเกิดเป็นรากแน่นอน

3. การเชื่อมต่อระหว่างท่อน้ำ ท่ออาหาร (vascular bundle connection) ในท่อน้ำ ท่ออาหารของส่วนยอดและรากที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการออแกนโนจีนีซีส อาจจะต่อเชื่อมหรือไม่ต่อเชื่อมถึงกันก็ได้ แต่ท่อน้ำ ท่ออาหารของยอดและรากที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการเอ็มบริโอจีนีซิสจะต้องติดต่อเชื่อมถึงกัน การดูว่าเนื้อเยื่อเชื่อมถึงกันหรือไม่ ทำได้โดยการนำเนื้อเยื่อพืชไปตัดดูโครงสร้างภายใน

2.3.3 ปัจจัยต่างๆ การพัฒนาของเนื้อเยื่อของพืช (ไพบูลย์, 2524)

2.3.3.1 ปัจจัยภายใน (endogenous factors)

1. ลักษณะทางพันธุกรรม เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบจะพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้โดยการพัฒนาผ่าน organogenesis ในขณะที่แครอทจะผ่าน embryogenesis

2. สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช เนื้อเยื่อพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างกันที่ชิ้นส่วนเช่น ยอด ใบ ราก ก็จะมีสารความคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ภายในแตกต่างกัน สภาพของเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตกับเนื้อเยื่อที่มีการพักตัวจะมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชหลังจากนำมาเพาะเลี้ยง

2.3.3.2 ปัจจัยภายนอก (exogenous factors)

1. แสง (light) แสงที่ให้กับพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญ พืชที่เจริญในแปลงปลูกกับที่เจริญในหลอดทดลองจะมีความต้องการแสงที่แตกต่างกัน พืชที่เจริญในหลอดทดลองยังไม่มีการสังเคราะห์แสงเนื่องจากได้รับคาร์โบไฮเดรตจากน้ำตาล อย่างไรก็ตามแสงยังมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชในหลอดทดลองเช่น ช่วยในการสร้างราก การสร้างต้นใหม่จากแคลลัส เป็นต้น และต้นพืชที่อยู่ในช่วงย้ายออกจากหลอดทดลองจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์แสงเพื่อเตรียมพร้อมออกสู่ภายนอกหลอดทดลอง แต่ถ้าความเข้มแสงมากเกินไปอาจทำให้พืชตายได้ ลักษณะของแสงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มแสง (light intensity) ช่วงแสง (photoperiod) และคุณภาพของแสง (light quality)

1.1 ความเข้มแสง มีรายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพหลอดแก้วมากกว่าทางด้านช่วงแสง ถ้าหากพืชในสภาพหลอดแก้วได้รับความเข้มแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย ควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1,000-4,000 ลักซ์ (lux) (1 ฟุตกำลังเทียน = 10.75 ลักซ์) การที่พืชต้องการความเข้มแสงต่ำ สันนิษฐานว่าการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้วถูกจำกัดด้วยปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ ในหน่อไม้ฝรั่ง เยอบีร่าและสับปะรด ความเข้มแสงที่เหมาะสมในระยะเพิ่มจำนวนคือ 1,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสงคือ 1,000-3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันการให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูกลงดิน

1.2 ช่วงแสง ไม่ค่อยมีนักวิจัยทดลองด้านช่วงแสงกับการเจริญของเนื้อเยื่อในสภาพหลอดแก้วมากนัก โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง 14-16 ชั่วโมง บางครั้งได้รับตลอด 24 ชั่วโมง หรือเลี้ยงในที่มืด เช่น การเลี้ยงแคลลัส และการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ โดยหลักการแล้ว ช่วงแสงที่เหมาะสมควรเป็นช่วงแสงที่พืชนั้นเจริญอยู่ในธรรมชาติ ช่วงแสงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ในการเจริญเป็นรากและยอดของเนื้อเยื่อแคลลัสยาสูบและเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของหน่อไม้ฝรั่ง ช่วงแสงที่เหมาะสมคือ 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะหล่ำเพื่อให้สร้างยอดจะใช้ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ โดยรับช่วงแสง 9 ชั่วโมงต่อวัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นขององุ่นพันธุ์ที่เป็นวันสั้นจะเกิดรากเมื่อได้รับวันสั้น แต่ถ้าเพาะเลี้ยงองุ่นวันยาวจะออกรากเมื่อพืชได้รับวันยาว

1.3 คุณภาพของแสง หลอดฟลูออเรสเซนต์เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดไฟที่ให้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light) จะยับยั้งการสร้างยอด การใช้แสงสีแดงจะดีกว่าสีน้ำเงินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อยาสูบ แสงสีแดง (660 นาโนเมตร) ยังทำให้เกิดการสร้างราก แสงสีขาวและสีน้ำเงินจะทำให้การเจริญของแคลลัสดีกว่าแสงสีเขียวและสีแดงหรือเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืดโดยทั่วไปแสงสีแดงและอินฟราเรดจะกระตุ้นการเกิดยอด และแสงสีแดงยับยั้งการเกิดยอดในมอส (*Pohlia nutans*) การสร้างตายอดต้องการแสงทั้งแสงสีแดงและสีน้ำเงิน โดยถ้าได้รับแสงสีแดง 11 ชั่วโมงตามด้วยสีน้ำเงิน 6 ชั่วโมงทุกวันจะทำให้เกิดตายอดจำนวนสูงสุด แต่ถ้าให้แสงชนิดเดียวจะไม่ช่วยในการสร้างยอด จากตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืช ต้องการคุณภาพแสง ความเข้มแสง และช่วงแสงที่เหมาะสม

2. อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (temperature) อุณหภูมิที่ใช้มักคงที่ประมาณ 24-26 องศาเซลเซียสในการทดลองอาจเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส หรือสูงถึง 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช มักต่ำกว่าในธรรมชาติ จึงควรเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่ำกว่าธรรมชาติ อุณหภูมิที่ต่ำมากเกินไปเช่น เย็นจัดถึง 4 องศาเซลเซียส จะทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชหยุดการเจริญเติบโต บางครั้งพืชต้องการอุณหภูมิต่ำสลับการอุณหภูมิสูง เช่น การสร้างรากของทานตะวันจะดีขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 26 องศาเซลเซียส กลางคืน 15 องศาเซลเซียส การเลี้ยงแคลลัสของพืชบางชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน อุณหภูมิทำให้พืชเกิดการพ้นระยะการพักตัว (break dormancy) ใน *gladiolus hortulans* หัวหรือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นต้นพืชที่ปลูกลงดินได้ต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส นาน 4-6 สัปดาห์ก่อนการย้ายลงดินเช่นเดียวกับลิลลี่ต้นจะพักตัวจึงต้องทำให้พ้นระยะการพักตัวโดยเลี้ยงที่ในที่มืดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูก

3. ความชื้น (humidity) เนื่องจากความชื้นในหลอดแก้วค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำ ก็จะเกิดการสูญเสียน้ำภายในหลอดส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกิดไปก็จะเอื้ออำนวยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในหลอดทดลองสูงมากจะทำให้พืชเกิดอาการฉ่ำน้ำ (vitrification)

4. ออกซิเจน (oxygen) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ การเลี้ยงบนอาหารเหลวอาจใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนสะพานกระดาษ หรือ วางบนเครื่องเขย่า

5. คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) จะเป็นแหล่งพลังงานของพืชซึ่งเกิดการสังเคราะห์แสงแต่ถ้าเกิดการสะสมมากเกินไปก็จะเป็นอันตราย

6. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมลงในอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากที่จะกระตุ้นให้พืชเกิดการเจริญของเนื้อเยื่อ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมจากภายนอกจะต้องเกิดการสมดุลย์กับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชจึงจะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการเจริญไปในทิศทางที่ต้องการ จำเป็นต้องมีการทดลองเพื่อหาจุดสมดุลย

7. ปัจจัยอื่นๆ เช่น ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (size of explant) สภาพของอาหารเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว การเปลี่ยนอาหาร (subculture) ส่วนประกอบอาหารอื่น ๆ นอกเหนือจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

แม้พืชทุกชนิดโดยปกติต้องการธาตุอาหารหลักที่เหมือนกัน แต่จะต้องการในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีความต้องการที่แตกต่างกันอย่างมาก ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น ควรคำนึงถึง (ศิวพงศ์, 2541)

2.3.4.1 ชนิดและสายพันธุ์ (species and cultivars)

พืชต่างชนิดและต่างสายพันธุ์ ส่วนใหญ่มักต้องการธาตุอาหารที่ไม่เหมือนกัน

2.3.4.2 อายุและระยะการพัฒนา (age and stage of development)

แม้เป็นพืชชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน ถ้าอายุและระยะการพัฒนาต่างกัน ก็อาจต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน

2.3.4.3 ชนิดของชิ้นส่วนพืช (explant materials)

พืชชนิดเดียวกัน หรือแม้กระทั่งต้นเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนของพืชจากส่วนต่างๆ เช่น ใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงจะต้องใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างไปจากสูตรที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนของรากหรือใบ

2.3.4.4 เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง (target of culture)

พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่มีเป้าหมายของการเลี้ยงที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันด้วย เช่น ต้องการเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดก็ใช้อาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างไปจากสูตรที่ต้องการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือเกิดราก

2.3.4.5 สถานะของอาหาร (state of media)

ชิ้นส่วนพืชเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารแข็ง อาจได้ผลที่แตกต่างไปจากการเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารกึ่งแข็ง อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปัจจุบันมีหลายสูตรตามผู้คิดค้น เช่น อาหารสูตรของ Murashige and Skoog (1962), Vacin and Went (1949), Gamborg (B5) (1970), Nitsch and Nitsch (1956), Heller (1953), และ White (1963) เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช พันธุ์พืช ตลอดจนชนิด และสภาพของชิ้นส่วนพืช (explant) ที่จะนำมาเลี้ยง แม้พืชทั้งต้นจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนมากนักก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น จำเป็นต้องธาตุอาหารและสารบางอย่างที่จำเป็นซึ่งมีความซับซ้อน และมีลักษณะเป็น seldom autotrophic กล่าวคือ ต้องใช้ทั้งมหธาตุและจุลธาตุ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่าจะมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ (รังสฤษดิ์, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

1.2 แร่ธาตุอาหารรอง (micronutrients หรือ trace elements) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้เช่นกัน ได้แก่ เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมล โคบอล (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล ทองแดง (Cu)ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล สรุปโดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีความสำคัญ มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

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

2.2.2 อินโนซิทอล (Inositol) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ ปกติจะใช้ในรูปของไมโอ-อินโนซิทอล (Myo-inositol) ใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-50,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3 กรดอะมิโน (Amino acid) ซึ่งมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ไกลซีน (Glycine) ใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อะลานีน (Alanine) อาจีนีน (Arginine) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปาราจีน (Asparagine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสปาติก (Aspartic acid) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีสทีน (Cystein) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน (Glutamine) กรดกลูตามิก (Glutamic) ใช้ประมาณ 8 มิลลิโมล ลิวซีน (Leucine) เมทไทโอนีน (Methionine) ฟีนิลอะลานีน (Phemylalanine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน (Ploline) ใช้ประมาณ 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซอลีน (Serine) ทริปโตเฟน (Trytophan) และไทโรซีน (Tyrosine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทั่วไปประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปของ L มากกว่าในรูปของ D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

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

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

2.4.1.1 พวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

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

2.4.1.2 พวกที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่

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

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

3. 2,4,5-Trichorophenoxyacetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า 2,4,5-T สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์

4. 3-Indolebutyric acid หรือเรียกย่อๆ ว่า IBA สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ อะซิโตนและอีเทอร์

5. 2-napthoxyacetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า NOA สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ อะซิโตน และกรดอะซิติค

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

67287

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.1 6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน หรือไคเนติน สามารถละลายในเมทานอล และเอทานอล

2.4.2.2 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน หรือ BA หรือ BAP สามารถละลายในเมทานอล และเอทานอล

2.4.2.3 2-ไอโซเพนทินิล อะมิโนเพียวรีน หรือ 2ip

2.4.2.4 ซีเอทิน (Zeatin) เป็นสารที่เกิดในธรรมชาติ

2.4.3 จิบเบอร์เรลลิน (Gibberellins) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อย ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอเลลลิก หรือ GA, สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญเกิดขึ้น กรดจิบเบอเลลลิกสามารถเคลื่อนย้ายผ่านท่อน้ำและท่ออาหารสามารถละลายในเมทานอล เอทานอล และอะซิโตน

2.5 สารอื่นๆ เช่น สารอินทรีย์อื่นๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ น้ำมันฝรั่ง กล้วย น้ำข้าวโพด สารสกัดจากมอลและอื่นๆ เป็นต้น บทบาทของสารเหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตยังไม่ทราบแน่ชัด ผงถ่านเมื่อเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกจากเซลล์ เช่นพวกฟีโนลิกต่างๆ จะทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่ได้รับอันตรายต่อสารดังกล่าว และสามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตได้เร็ว ข้อเสียคือ มีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่สามารถดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตมาใช้ได้อย่างเต็มที่ ซึ่งมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ

2.6 วุ้น (agar) ทำหน้าที่ช่วยยึดเกาะของเนื้อเยื่อต่างๆ ในการเตรียมอาหารสามารถเตรียมเป็นอาหารแข็ง และอาหารกึ่งแข็งได้ สำหรับวุ้นทั่วๆ ไปใช้ประมาณ 0.8-1 เปอร์เซ็นต์

2.3.5 เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อและการฟอกฆ่าเชื้อของเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษฎ์, 2541)

การติดเชื้อของพืชเมื่อเลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง (in vitro) อาจมาจากหลายสาเหตุ เช่น อาจติดมากชิ้นส่วนของพืช อาหาร อากาศ เครื่องมือ เทคนิคการฆ่าเชื้อและการผ่าตัดไม่ดี เป็นต้น กลไกที่เชื้อเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของพืช เนื่องจาก เชื้อเหล่านี้จะเจริญได้เร็วในอาหารวิทยาศาสตร์ แม้จะไม่มีชิ้นส่วนพืชเลี้ยงอยู่ก็ตาม ผลที่ตามมา คือ ความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารจะลดลง เชื้อเหล่านี้ยังใช้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรต และผลิตสารที่เป็นพิษต่อพืชออกมา เช่น เอทิลแอลกอฮอล์ กรดแอซีติก ทำให้พืชขาดอาหารคาร์โบไฮเดรต ธาตุอาหารอื่นก็ไม่อยู่ในสภาพที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้ เมื่ออาหารอยู่ในสภาพที่เป็นกรด นอกจากนั้นเชื้อเหล่านี้ยังปล่อยสารที่เป็นพิษกับพืช ปัจจุบันมีสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในหารฟอกฆ่าเชื้อของตัวอย่างพืช มีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5.1 แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ($Ca(OCl)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 9-10 % เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.5.2 โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.25-2.63 % เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.5.3 ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 10-12 % เวลาที่ใช้ 5-15 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.3.5.4 คลอรอกซ์ (Clorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน ที่จริงแล้วก็คือสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์นั่นเอง ความเข้มข้นที่ใช้ 5-10 % เวลาที่ใช้ 5-20 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.5.5 สารละลายโบรไมด์ (Bromide water) ความเข้มข้นที่ใช้ ประมาณ 1-2 % เวลาที่ใช้ 2-10 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.5.6 ซิลเวอร์ไนเตรท ($Ag(NO_3)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ ประมาณ 1 % เวลาที่ใช้ 5-30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.3.5.7 สารละลายไอโอดีน (Iodine water) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3 % เวลาที่ใช้ 30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.3.5.8 เมอคิวริคคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 % เวลาที่ใช้ประมาณ 10 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีพอสมควร

2.3.5.9 เมอคิวริคไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 % เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.3.5.10 เมอคิวริคโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 % เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.3.5.11 แอลกอฮอล์ (Alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ 70-95 % เวลาที่ใช้ 2-5 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.5.12 กรดกำมะถัน หรือกรดซัลฟุริค (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 20-70 % เวลาที่ใช้ 5-20 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ ในการฆ่าเชื้อโดยที่ไม่ใช้สารเคมี เช่น การอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light) หรือที่เรียกกันว่าแสง UV การเผาไฟซึ่งใช้กับตัวอย่างที่แข็งๆ เช่น เมล็ด ท่อนไม้ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการใช้ คือ โซเดียมไฮโพคลอไรท์ (sodium hypochlorte) แคลเซียมไฮโพคลอไรท์ (calcium hypochlorite) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เป็นต้น ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้น้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในบ้าน เช่น Clorox ผลิตภัณฑ์นี้มีโซเดียมไฮโพคลอไรท์ 5.25 เปอร์เซ็นต์ อัตราที่ใช้ คือ 10-20 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรท์จะทำงานได้ไม่ดีเมื่อมีพีเอชมากกว่า 8 และจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อสารละลายมีพีเอช 6 และเพื่อให้การทำงานของคลอรีนมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ควรเติมสบู่เหลวเข้าไปในสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรท์ เช่น Tween-20 2 – 3 หยด ถ้าไม่มีสามารถใช้น้ำยาล้างจาน และในขณะที่ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ต้องเขย่าสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรท์ตลอดเวลาหรืออาจวางบนเครื่องเขย่าได้ เวลาในการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรท์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชว่าทนต่อสารละลายคลอรีนนานแค่ไหน ถ้ามีความทนทานมากก็ใช้เวลานานขึ้นได้

2.3.6 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการประยุกต์ใช้ (ประสาสตร์, 2536)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทอย่างมากทั้งในด้านการเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และด้านการแพทย์ ดังนั้นประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถกล่าวได้ดังนี้

2.3.6.1 เพื่อการขยายพันธุ์ (micropropagation)

โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ จากไดอะแกรมประกอบข้างล่างนี้ จะเห็นว่าจากที่เราเริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพืชเพียงต้นเดียว และทำการย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง และแต่ละเดือนต้นพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ 10 ต้น เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 6 เดือน เราสามารถผลิตต้นพืชในหลอดทดลองได้ถึง 1 ล้านต้นซึ่งไม่มีวิธีอื่นใดที่จะผลิตต้นกล้าพืชให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วเช่นนี้

2.3.6.2 เพื่อการผลิตพืชที่ปราศเชื้อไวรัส (virus-free plant propagation)

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการผลิตพืช คือ โรค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรียเป็นอันดับแรก เพราะถ้าหากว่ามีอนุภาคของเชื้อเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) เพราะทั้งอนุภาคของแบคทีเรียและสปอร์ของราสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหารและจะปรากฏกลุ่ม colony ของจุลินทรีย์เหล่านั้น ที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เราจึงสามารถเก็บออกมาขจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก และจะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์ชนิดอื่น ฉะนั้นต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจึงไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็น สามารถทราบได้ก็ต่อเมื่อเกิดอาการบนต้นพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนของพืชที่นับว่ามีความปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ apical meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และเนื้อเยื่อของคัพภะ(embryo) ที่อยู่ในเมล็ด อันเนื่องจากอนุภาคของไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหาร (phloem) และท่อน้ำ (xylem) แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อน้ำและท่ออาหารที่จะติดต่อกับส่วนอื่น ๆ ของต้นพืช

2.3.6.3 เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (plant improvement)

โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีนส์ (DNA ricombination) และการย้ายยีน (gene transformation)

2.3.6.4 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant)

สามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง หรือต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช เป็นต้น

2.3.6.5 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถที่จะคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อม เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น

2.3.6.6 เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite)

พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชเหล่านั้น ในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่เราต้องการได้มากขึ้น

2.3.6.7 เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช (biochemical and Physiology study)

ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองนั้นสามารถที่จะติดตามการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและอย่างใกล้ชนิด เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการควบคุมตัวแปรต่างๆ ในหลอดทดลองทำได้ง่ายได้กว่าแปลงทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6.8 เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (germplasm conservation, gene bank)

ปัจจุบันพืชพรรณหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปหรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง ด้วยเหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด หรือมีสารที่ทำให้เกิดความเครียดของน้ำ (water stress) ขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามาก ๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อบ่อยๆ จนกว่าเมื่อใดที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อนั้นสามารถย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในสภาพเช่นนี้เซลล์และเนื้อเยื่อจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 พันธุ์ของหญ้าอาหารสัตว์

3.1.1.1 หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*)

3.1.1.2 หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*)

3.1.1.3 หญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum TD 58*)

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร LS

3.1.2.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอร็อกซ์ และสารเปียกใบ (tween-20)

3.1.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BA และ 2,4-D

3.1.2.4 แอลกอฮอล์ 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

3.1.3 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.3.1 บีกเกอร์

3.1.3.2 ขวดรูปชมพู่

3.1.3.3 ปิเปต

3.1.3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.3.5 ช้อนตักสารเคมี

3.1.3.6 แท่งแก้วคน

3.1.3.7 จานแก้ว

3.1.3.8 กระบอกตวง

3.1.3.9 มีดผ่าตัด

3.1.3.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.3.11 เครื่องเขย่า

3.1.3.12 เตาอบไมโครเวฟ

3.1.3.13 ตู้เย็น

3.1.3.14 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.15 กล้องสเตอริโอไมโครสโคป

3.1.3.16 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรองเยื่อกรอง

3.1.3.17 กล้องจุลทรรศน์

3.1.3.18 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบเครื่องชั่ง

3.1.3.19 ตู้อบความร้อน

3.1.3.20 ไมโครปิเปตต์และทิปขนาดต่างๆ

3.1.3.21 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

3.1.3.22 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อหรือเมล็ดของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

1.1 เลือกตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าไนล์นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลานาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนทิชชูปลอดเชื้อแล้ว ตัดปลายทั้ง 2 ข้างของชิ้นเนื้อเยื่อออก นำไปวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะมืด ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

1.2 คัดเลือกเมล็ดหญ้ารูซี่ที่มีความสมบูรณ์มาแกะเปลือกออกโดยนำมาบดในโกร่งให้เมล็ดภายในหลุดออกมา นำเมล็ดที่ได้มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง นาน 3 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลานาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนทิชชูปลอดเชื้อทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะมืด ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

1.3 คัดเลือกเมล็ดหญ้ากินนีสีม่วงที่มีความสมบูรณ์ ทำการทดลองดังการทดลองข้อที่ 1.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร โดยการวัดขนาดของแคลลัสดังนี้

1.1 ใช้เวอร์เนียวัดความกว้าง และความยาวของแคลลัสของทุกสูตรอาหาร

1.2 นำความกว้างคูณกับความยาว จะได้พื้นที่ของแคลลัส

1.3 นำค่าที่ได้ของแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย จะได้ค่าประมาณของพื้นที่ของแคลลัส

1.4 เปรียบเทียบพื้นที่ของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตรเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัส

2. บันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่

นำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อและเมล็ดจากอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 อายุ 60 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการย้ายลงอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกลักษณะการพัฒนาของแคลลัสในการเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวและการเกิดยอดอ่อน และทำการคำนวณจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส ในอาหารแต่ละสูตร ที่เวลา 30 วัน เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำส่วนข้อและเมล็ดของหญ้าให้พัฒนาเป็นแคลลัส

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต
	2 ,4-D (มก.ล.)
1	1
2	3
3	5

ตารางที่ 2 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต
	BA (มก.ล.)
1	1
2	2
3	3
4	4

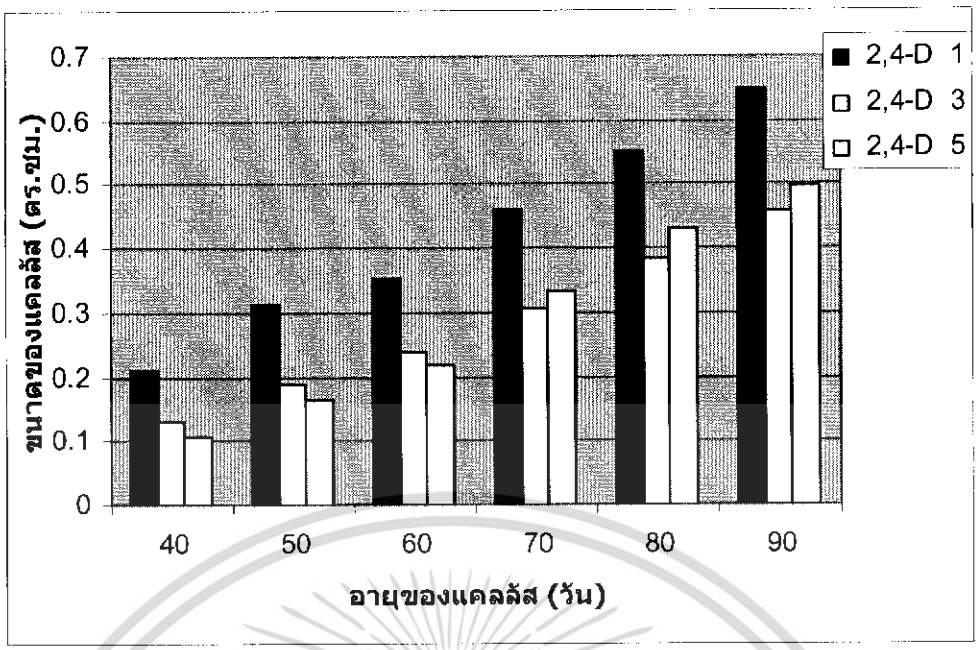
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าและเมล็ดให้เจริญไปเป็นแคลลัส

1.1 จากการนำชิ้นส่วนข้อของหญ้าไนล์ที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ให้เจริญไปเป็นแคลลัสได้ โดยมีขนาดและลักษณะของแคลลัสที่แตกต่างกัน เมื่อคำนวณหาพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสจากความกว้างและความยาวของแคลลัสที่วัดได้ในอาหารแต่ละสูตรที่ระยะเวลา 40 50 60 70 80 และ 90 วัน มาเปรียบเทียบขนาด พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด (รูปที่ 1) ส่วนความสามารถในการพัฒนาไปเป็นแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์ในการเกิดแคลลัสบนอาหารแต่ละสูตรนั้นมีค่าแตกต่างกัน อาหาร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด คือ 64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ก็มีความแตกต่างกัน คือ เกิดลักษณะที่เป็น compact callus มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นอมเหลือง เซลล์เกาะกันค่อนข้างแข็ง ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ดี และลักษณะที่เป็น friable callus มีลักษณะ ใส ฉ่ำน้ำ เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ จากการทดลอง พบว่า อาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดเป็น compact callus ได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็น compact callus เท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

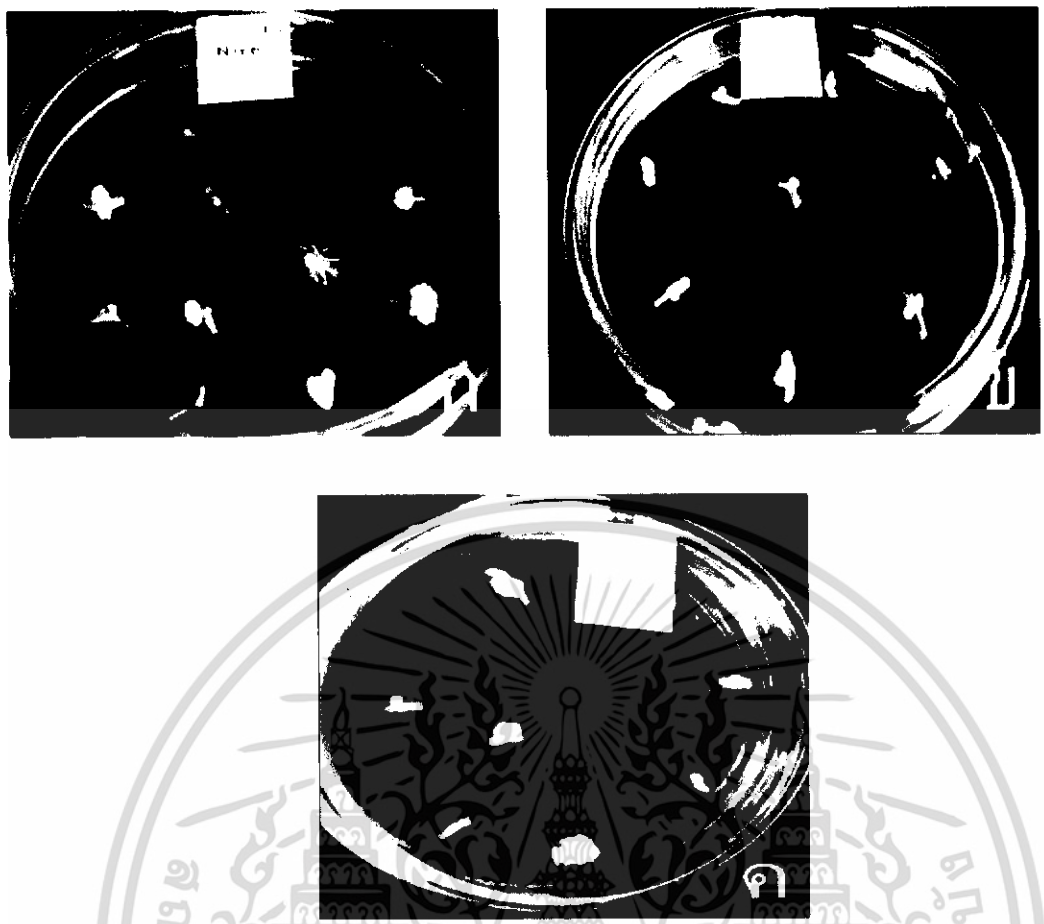


รูปที่ 1 กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยแคลลัสของหญ้าไนล์บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 40 50 60 70 80 และ 90 วัน

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการเกิด compact callus จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน

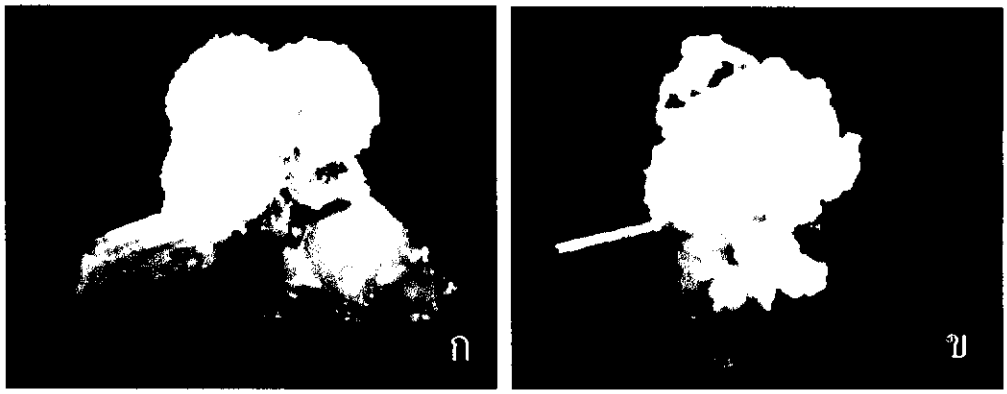
อาหารสูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	จำนวนที่เกิดแคลลัส (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น		เปอร์เซ็นต์การเกิด Compact callus
2,4-D (มก.ล.)				friable	compact	
1	25	16	64	4	12	48
3	25	14	56	4	10	40
5	25	13	52	6	7	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงการพัฒนาของส่วนข้อของหญ้าไนล์ไปเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร I.S ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน
(ก) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ข) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



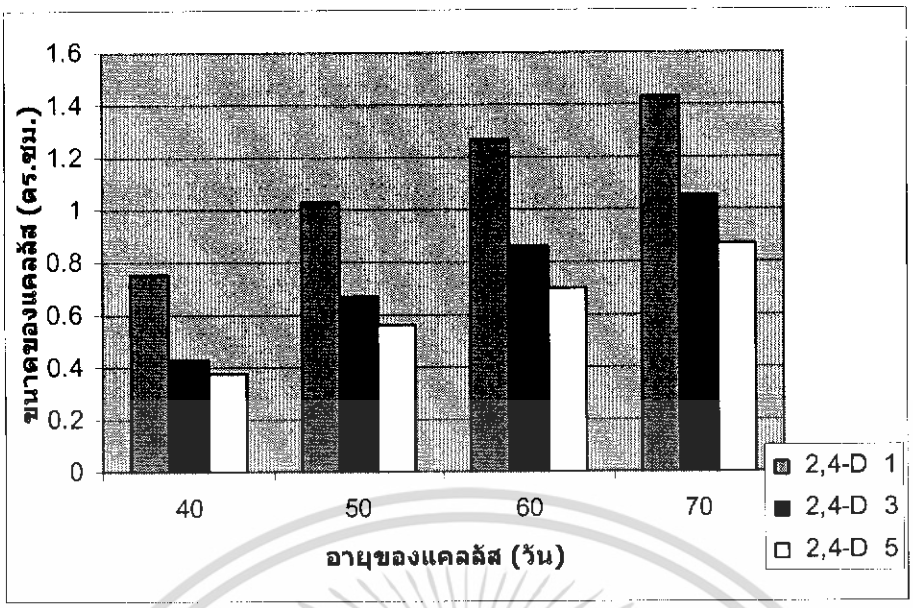
รูปที่ 3 แสดงลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้น จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์ บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน

(ก) friable callus

(ข) compact callus

1.2 จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้ารูซี่ บนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) พบว่า อาหารแต่ละสูตรนั้นสามารถชักนำให้เมล็ดของหญ้ารูซี่ให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยมีขนาดและลักษณะที่แตกต่างกัน จากการคำนวณหาพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสโดยใช้เวอร์เนียวัดความกว้างและความยาวของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร ที่ระยะเวลา 40 50 60 และ70 วัน เมื่อนำพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ มาทำการเปรียบเทียบจะพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด (รูปที่ 4) ส่วนความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสนั้น หลังจากที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์ในการเกิดแคลลัสของอาหารแต่ละสูตรนั้น จะมีค่าที่แตกต่างกันไป โดยอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่ให้พัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 66.7 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าลักษณะของแคลลัสที่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น compact callus คือ มีสีขาวขุ่น เซลล์เกาะกันค่อนข้างแข็ง หรือมีลักษณะเป็น friable callus คือมีสีขาวใส ฉ่ำน้ำ เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ จากการทดลอง พบว่า อาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดเป็น compact callus ได้ดีที่สุด คือ อาหาร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

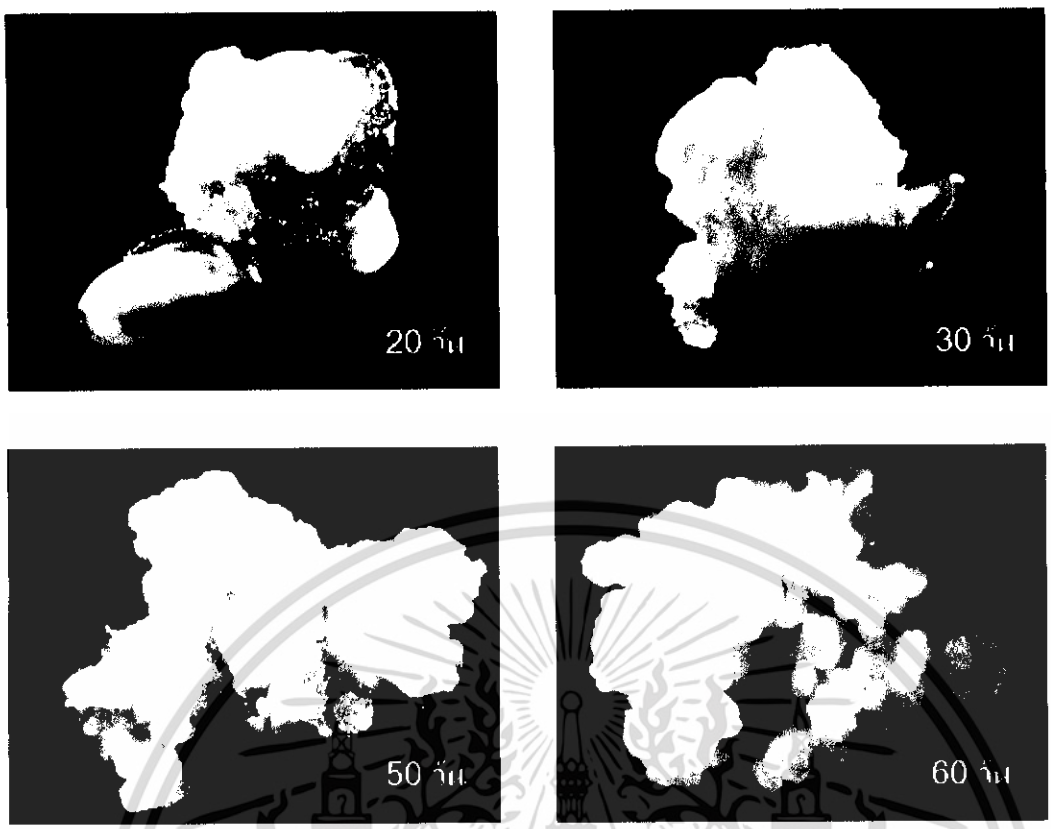


รูปที่ 4 กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสของหญ้ารูซี่บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 40 50 60 และ 70 วัน

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการเกิด compact callus จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้ารูซี่บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	จำนวนที่เกิดแคลลัส (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น		เปอร์เซ็นต์การเกิด Compact callus
2 ,4-D (มก.ล.)				friable	compact	
1	15	10	66.7	4	6	40
3	15	9	60.0	5	4	26
5	15	8	53.3	5	3	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ที่เจริญไปเป็นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 20, 30, 50 และ 60 วัน

1.3 จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าเกินนีสีม่วงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เมล็ดของหญ้าเกินนีสีม่วงพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) โดยอาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ และลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่าแคลลัสที่ได้จากอาหารแต่ละสูตรนั้นไม่มีความแตกต่างกัน คือ เป็นแบบ friable callus มีลักษณะสีขาวใส จำนำเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (รูปที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าเกินนีสีม่วงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต		จำนวนที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	จำนวนที่เกิดแคลลัส (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น
BA (มก./ล.)	2,4-D (มก./ล.)				
0.1	0.5	30	22	73.3	friable
0.1	1	30	20	66.7	friable
0.1	3	30	19	63.3	friable
0.1	5	30	14	46.7	friable

รูปที่ 6 ลักษณะแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าเกินนีสีม่วงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำแคลลัสให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่

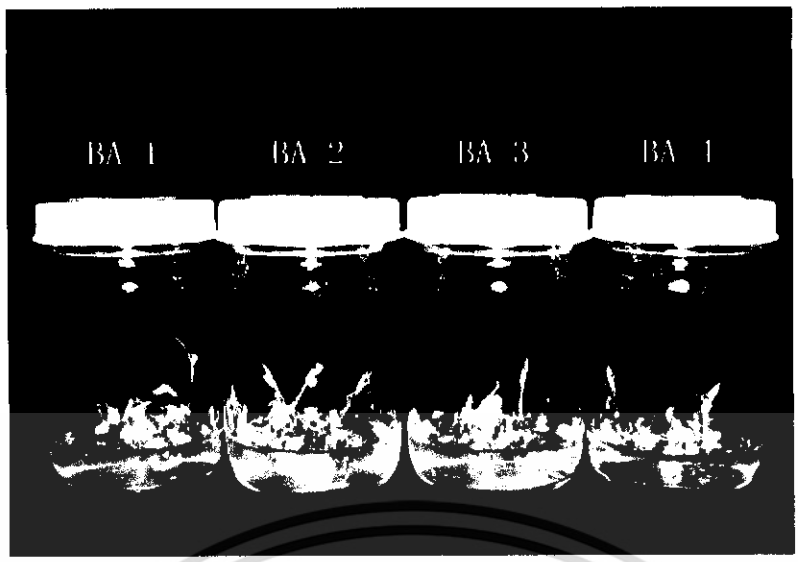
นำแคลลัสของหญ้าที่มีอายุ 60 วันที่ได้จากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรที่เหมาะสม คือ อาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2) เป็นเวลา 20 วัน พบว่า แคลลัสของหญ้าไนล์และหญ้ารูซี่ สามารถตอบสนองโดยเกิดเป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวและมีการพัฒนาเป็นยอดอ่อนได้ดีใกล้เคียงกันในอาหารทุกๆ สูตร (รูปที่ 7-8) และจากการคำนวณจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสของหญ้าไนล์ ที่เวลา 30 วัน พบว่า อาหารสูตรที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด เท่ากับ 4.2 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 6) ในส่วนการพัฒนาของแคลลัสนั้น หลังจากย้ายลงบนอาหารชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ที่ระยะเวลา 10 วัน พบว่า แคลลัสจะมีการพัฒนาเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีสีเขียวเกิดขึ้น และมีการพัฒนาเพิ่มขึ้น (รูปที่ 9 ก-ข) ที่เวลา 15 - 20 วัน พบว่า กลุ่มเซลล์สีเขียวบนแคลลัสได้พัฒนาเกิดเป็นยอดขึ้น (รูปที่ 9 ค-ฉ) และที่เวลา 30 วัน พบว่า แคลลัสมีการพัฒนาส่วนของยอดเพิ่มขึ้นและเริ่มมีการพัฒนาในส่วนของรากเกิดขึ้น (รูปที่ 10)

ส่วนการศึกษาในหญ้ากินนีสีม่วงนั้น พบว่า แคลลัสไม่มีการตอบสนองและพัฒนาในอาหารทุกสูตรที่ทำการเพาะเลี้ยง เนื่องจากแคลลัสที่ได้จากการชักนำจากเมล็ดของหญ้ากินนีสีม่วงนั้น มีลักษณะเป็น friable callus มีความสามารถในการพัฒนาเกิดเป็นต้นได้ต่ำหรือไม่สามารถพัฒนาเกิดเป็นต้นได้เลย

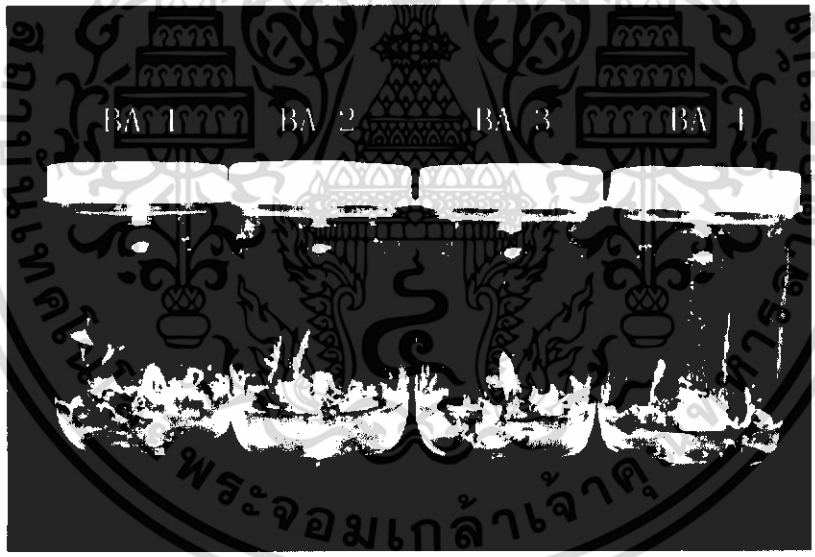
ตารางที่ 6 จำนวนยอดต่อแคลลัสที่ได้จากการชักนำแคลลัสของหญ้าไนล์ให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (มก.ล.)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดขึ้น	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส
1	10	42	4.2
2	10	33	3.3
3	10	38	3.8
4	10	33	3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

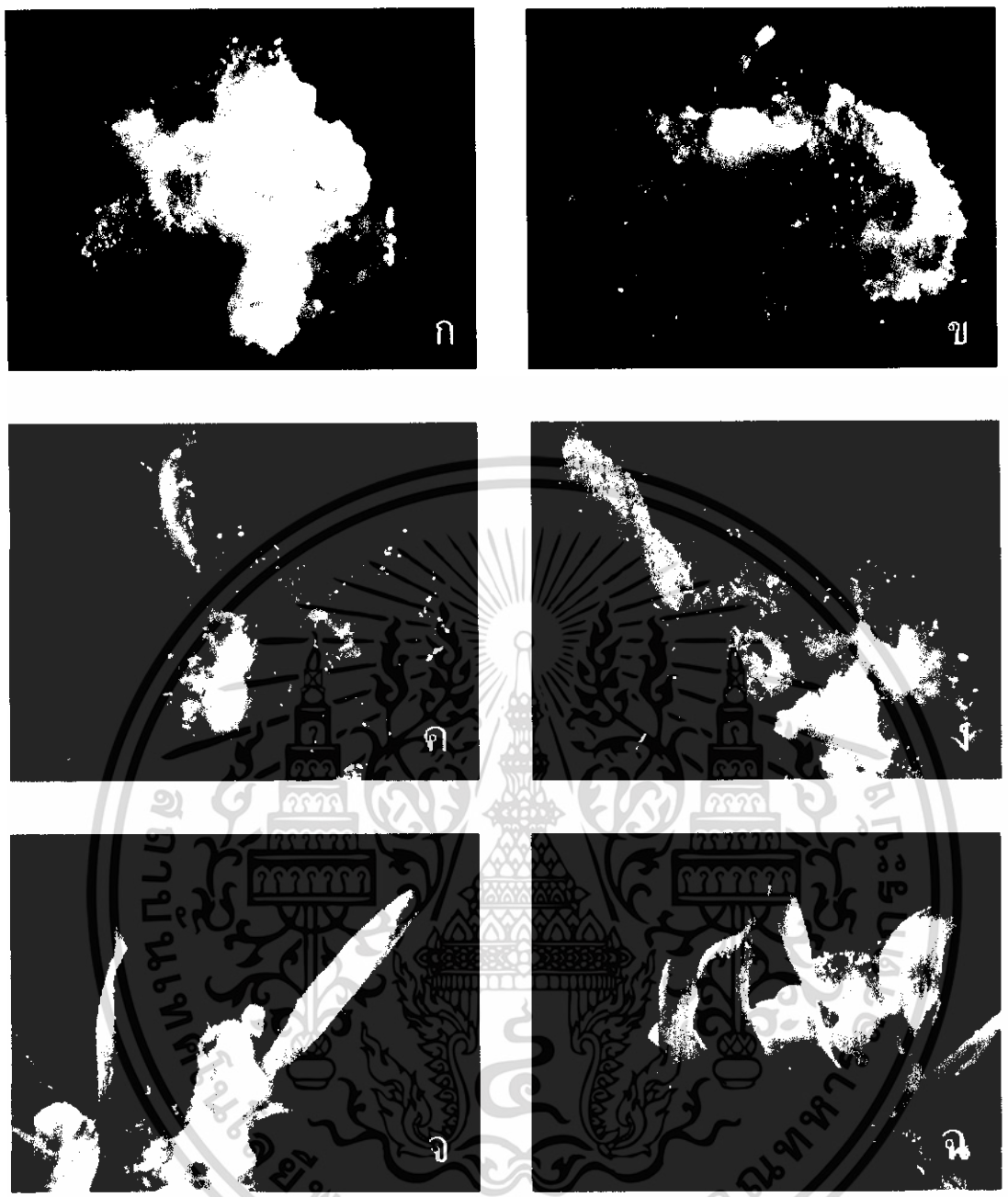


รูปที่ 7 แสดงลักษณะแคลลัสของหญ้าไนล์ หลังจากย้ายไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน



รูปที่ 8 แสดงลักษณะแคลลัสของหญ้ารูซี่ หลังจากย้ายไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

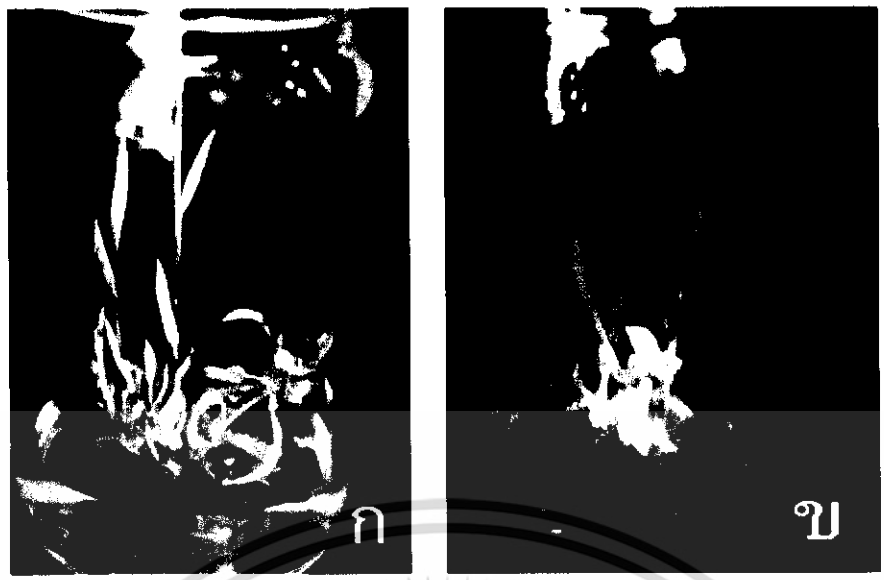


รูปที่ 9 การพัฒนาของแคลลัสของหญ้าไนล์ หลังจากย้ายลงอาหารชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังภาพ (ก- ฉ)

(ก-ข) แสดงกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสที่ถูกชักนำพัฒนาให้เกิดเป็นต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 10 วัน

(ค-ฉ) แสดงให้เห็นถึง การเริ่มงอกของยอด จากกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงได้เป็นเวลา 15-20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 ลักษณะต้นใหม่ที่พัฒนามาจากแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่ในระยะเวลา 30 วัน

ก. หญ้าไนล์

ข. หญ้ารูซี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อหรือเมล็ดของหญ้าให้เป็นแคลลัส

1.1 ในการศึกษาการชักนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ให้พัฒนาเกิดเป็นแคลลัส พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus เท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์

1.2 ในการศึกษาการชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่ให้พัฒนาเป็นแคลลัส พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 66.7 เปอร์เซ็นต์และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์

1.3 ในการศึกษาการการชักนำเมล็ดของหญ้าของหญ้ากินนีสีม่วง ให้พัฒนาเกิดเป็นแคลลัส พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสที่ได้ทั้งหมดมีลักษณะเป็น friable callus

การทดองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่

จากการศึกษาการชักนำแคลลัสของหญ้าไนล์และหญ้ารูซี่บนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในอาหารแต่ละสูตรจะเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวขึ้นบนแคลลัส และสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ภายในระยะเวลา 25-30 วัน แต่อาหารสูตรที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด เท่ากับ 4.2 ยอดต่อแคลลัส

ในการศึกษาการชักนำแคลลัสของหญ้ากินนีสีม่วง บนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่ประกอบด้วย BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในอาหารแต่ละสูตรแคลลัสไม่มีการตอบสนองและไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็น friable callus ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ต่ำ หรือไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดิริฎา มานะวิบูลย์. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้ารูซี่โดยรังสีแกมมากับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตร์ศาสตร์.

ธนภักษ์ อินยอด. 2545.การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าอะตราตัมโดยรังสีแกมมากับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตร์ศาสตร์.

ประสาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 158 น.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 109 น.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ.2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 น.

สายัณห์ ทัดศรี. 0247. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 534 น.

ศิวพงษ์ จำรัสพันธุ์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สถาบันราชภัฏอุดรธานี. อุดรธานี. 187 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2537. หลักเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 14 น.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. หลักการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 72 น.

Ashok C. and Rongda Q., 2000. Effect of 6-Benzyladenine in callus induction medium. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 60: 113-120.

Gamborg O.L.1970. In:Bhojwani S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture* :Theory and Practice. Elsevier Science Publishers B.V. Netherland. 502 p.

Heller R.1953. In:Bhojwani S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture* :Theory and Practice. Elsevier Science Publishers B.V. Netherland. 502 p.

Lajonchere, G., A.R. Mesa, M. Prieto and O. Toral. 1993. Somatic embryogenic and plant regeneration from apical meristems of *Panicum maximum* Jacp. CV. Likoni. *Pas. For.* 16: 3201 – 3206

Murashige T.and Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15: 473-479

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nayak S., Debata B. K. and Sahoo S., 196. Rapid propagation of laemongrass (*Cymbopogen flexuous* (Nees.) Wates). *Plant cell Report*. 15:267-370.

Nitsch J. P.and C. Nitsch .1956. In: Street H.E. 1977. *Plant Tissue and Cell Culture* 1977. Blackwell Scientific Publications Oxford London England. 614 p.

Vacin and Went .1949. ใน : รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตศาสตร์. 219 น.

White P.R.1963. In : Bhojwani S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant Tissue and Cell Culture*. Elsevier Science Publishers B.V. Netherland. 502 p.

Yuexia Wang, Bridget A. Ruemmele, Joel M. Chandlee, W. michael Sullivan , Janee Knapp, and Albert P. Kausch. 2002. Embryogenic callus induction and plant regeneration media for bentgrasses and annual bluegrass. *In Vitro Cell*. Dev. Biol. Plant 38 : 460–467.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อนุรักษ์, 2544)

สารอาหาร	สูตรอาหาร MS (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สูตรอาหาร LS (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650	1690
KNO_3	1900	1900
$MgSO_4.7H_2O$	370	370
KH_2PO_4	170	170
$CaCl_2.2H_2O$	440	440
H_3BO_3	6.2	6.2
KI	0.83	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0. 25	0. 25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025
$MnSO_4.4H_2O$	6.9	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	8.6
$CuSO_4.5II_2O$	0.025	0.025
Na_2 EDTA	37.25	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	27.85
Inositol	-	100
Nicotinic acid	0.5	-
Pyridoxine HCL	0.5	0.50
Thiamine HCL	0.1	0.40
Glycine	2	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้