สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้าอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นางสาวมนิษา ปุลวัน
นางสาวรัตนาภรณ์ บุญเรือง

วพ.
ม1731ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83969
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ย. 2551

b 11975465
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Regenneration system of forage grass by tissue culture

Miss Manisa Pulavavana

Miss Rattanaporn Boonraung

A Spesial Project Submitted in Partail Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science Biotechnology Program

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้าอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นักศึกษา นางสาวมนิษา ปุลววัน รหัส 47050685

นางสาวรัตนาภรณ์ บุญเรือง รหัส 47050688

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้าอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
นักศึกษา มนิษา ปุลววัน
รัตนาภรณ์ บุญเรือง
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2550
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงหญ้าอาหารสัตว์ 2 สายพันธุ์ คือเมล็ดหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) และเมล็ดหญ้าอะตราตรัม (*Paspalum atratum*) ให้เจริญเป็นแคลลัส พบว่าในเมล็ดหญ้ารูซี่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิด compact callus ได้ 76.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดหญ้าอะตราตรัม เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิด compact callus ได้ 71.4 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้ารูซี่ และเมล็ดหญ้าอะตราตรัมเกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot) การชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม N_6-Benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเท่ากับ 4.1 ยอดต่อเมล็ด และในเมล็ดหญ้าอะตราตรัมของสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเท่ากับ 6.32 ยอดต่อเมล็ด

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงหญ้าอะตราตรัมให้เกิดรากที่สมบูรณ์ในอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 3-indole butyric (IBA) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนรากที่เกิดขึ้นได้ดีสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Regenneration system of forage grass by tissue culture
Name	Miss Manisa Pulavavana
	Miss Rattanaporn Boonraung
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Acadamic Year	2007
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

Study callus induction and plant regeneration media for two specices of forage grasses ; seed of *Brachiaria ruziziensis*, seed of *Paspalum atratum*. The callus induction media contained solid LS medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1 mg/l to stimulate compact callus formantion of *Brachiaria ruziziensis* is 76.9% and *Paspalum atratum* is 71.4%,

Study multiple shoot induction and plant regeneration media for two specices of forage grasses ; seed of *Brachiaria ruziziensis*, seed of *Paspalum atratum*. The results shows that explant of these two species of forage grasses which culture on 1 mg/l N_6-Benzyladenine (BA) can develop to be multiple shoot formation higher than other media. The frequency of multiple shoot to seed in *Brachiaria ruziziensis* is 6.32 per seed, and *Paspalum atratum* is 4.1 per seed.

Study callus induction and plant regeneration media for seed of *Paspalum atratum* The root induction media contained solid LS medium supplemented with 3-indole butyric (IBA) at 5 mg/l can develop to be root formation highest.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และ โครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลงไม่ได้ หากขาดซึ่งความกรุณาจาก ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์อบรมอบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้าทุกด้านทั้งด้านจริยธรรม ด้านการทำงาน รวมถึงความเมตตากรุณาที่มีให้กับข้าพเจ้าในการทำงานและการดำรงชีวิต

กราบขอบคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษและ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อมาคุมสอบโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งคำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า เป็นผลให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอกราบขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งบุคลากรในห้องธุรการ และทางภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่อนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สถานที่การทำงานจนทำให้สามารถดำเนินโครงงานพิเศษนี้จนเสร็จสมบูรณ์ได้

นางสาวมนิษา ปุลววัน

นางสาวรัตนาภรณ์ บุญเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของหญ้าอาหารสัตว์	3
2.1.1 หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน (Temperate forage grasses)	4
2.1.2 หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน (Tropical forage grasses)	4
2.1.2.1 หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*)	5
2.1.2.3 หญ้าอะตราตรัม (*Paspalum atratum*)	6
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)	7
2.2.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)	8
2.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)	8
2.2.3 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส	8
2.2.3.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต	8
2.2.3.2 ธาตุอาหารชนิดต่าง	9
2.2.3.3 แหล่งคาร์บอน	9
2.2.3.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม	9
2.2.3.5 สถานะของอาหารที่เลี้ยง	9
2.2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.5 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	19
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ	19
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลของการวิจัยและวิจารณ์	24
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	46
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่และอะตราตรัมให้พัฒนาเป็นแคลลัส 21
2. อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่ให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก 22
3. อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก 22
4. อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำหญ้าอะตราตรัมให้มีรากที่สมบูรณ์ 23
5. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการเกิด compact callus จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้ารูซี่บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 40 วัน 25
6. แสดงขนาดของแคลลัสในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 40 วัน 29
7. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน 30
8. จำนวนยอดต่อเมล็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน 32
9. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน 35
10. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน	26
2	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน	26
3	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน	27
4	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน	27
5	กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยแคลลัสของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1,3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน	29
6	แสดงแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ	31
7	แสดงลักษณะยอดของหญ้ารูซี่ ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร LS และเติมสารควบคุมการ เจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน	33
8	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
9	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน	37
10	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม ต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน	38
11	แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน	39
12	แสดงลักษณะยอดที่เกิดขึ้น จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าอะตราตรัม บนอาหารLS ที่เติม BA 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน	40
13	แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารครึ่ง LS	41
14	แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่ไม่เติม IBA	42
15	แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัม ที่เพาะเลี้ยง บนอาหาร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	42
16	แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัม ที่เพาะเลี้ยง บนอาหาร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	43
17	แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัม ที่เพาะเลี้ยง บนอาหาร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	43
18	หญ้าอะตราตรัมก่อนการย้ายปลูก	44
19	หญ้าอะตราตรัมหลังจากย้ายปลูก	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันการที่ทางภาครัฐและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้กำหนดนโยบายส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงโคเนื้อและโคนมเพื่อทดแทนการปลูกพืชเศรษฐกิจบางชนิดที่มีปัญหา และได้ผลักดันให้มีการส่งออกผลิตภัณฑ์โคเนื้อและโคนมออกไปยังต่างประเทศ นำรายได้เข้าประเทศปีละหลายล้านบาท ทำให้ได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นจำนวนมาก และได้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็วในทุกภาคของประเทศไทย ทำให้พืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์นั้นมีไม่เพียงพอกับความต้องการของสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้น ปัญหาที่เกิดขึ้นนี้เนื่องมาจาก การเลี้ยงปศุสัตว์นี้จะพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งสภาพภูมิประเทศค่อนข้างแห้งแล้ง มีสภาพพื้นที่เพาะปลูกไม่เหมาะสม รวมทั้งยังขาดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพ และสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เมื่อเข้าสู่ช่วงฤดูแล้งเกษตรกรจะได้รับความเดือนร้อนจากการขาดแคลนเสบียงอาหารสัตว์เป็นประจำทุกปี แนวทางที่จะแก้ไขสถานการณ์นี้ คือ จะต้องมีการปรับปรุงพันธุ์พืชอาหารสัตว์ให้มีคุณภาพดี และมีความทนทานต่อสภาพพื้นที่ต่างๆได้ เพื่อเพิ่มผลผลิตของอาหารสัตว์ให้เพียงพอกับความต้องการของสัตว์ที่เพิ่มขึ้น

พืชอาหารสัตว์ ตระกูลหญ้าจัดเป็นแหล่งอาหารหยาบที่สำคัญสำหรับเลี้ยงโค และมีราคาถูกที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารข้นผสมเสร็จ แต่เนื่องจากพืชอาหารสัตว์มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จึงได้ดำเนินงานโครงการพัฒนาอาชีพการผลิตพืชอาหารสัตว์เพื่อจำหน่าย ทำให้ปัจจุบันมีเกษตรกรจำนวนมากที่หันมาประกอบอาชีพปลูกพืชอาหารสัตว์ เพื่อจำหน่ายให้กับผู้เลี้ยงสัตว์ซึ่งเป็นการสร้างรายได้เสริมให้กับเกษตรกรด้วย ซึ่งพันธุ์หญ้าอาหารสัตว์ที่เกษตรกรนิยมปลูก และ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ส่งเสริมให้แก่เกษตรกร ได้แก่ หญ้ารูซี่ (*Brachairia ruziziensi*) มีลักษณะการเจริญแบบกึ่งเลื้อยกึ่งตั้งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำได้ สามารถผลิตเมล็ดได้มากและมีความงอกสูงทำให้สะดวกต่อการปลูกขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดทำให้เกษตรกรนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย แต่มีข้อเสียคือ มีระยะพักตัวในช่วงฤดูแล้ง แม้ว่าจะมีการให้ปุ๋ยอย่างเต็มที่ก็ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตของหญ้าในช่วงฤดูแล้งซึ่งเป็นช่วงที่ขาดแคลนอาหารหยาบได้ ให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งประมาณ 2.0-2.5 ตันต่อไร่ต่อปี มีโปรตีน 7-10 เปอร์เซ็นต์ และ หญ้าอะตราตัม (*Paspalum atratum*) หรืออุบลพาสพาลั่ม มีลักษณะลำต้นตั้งเป็นกอสูง 1 เมตร เป็นกอใหญ่ใบกว้าง ถ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลูกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จะมีใบดกและมีความน่ากินสำหรับสัตว์ แต่ถ้าปลูกในพื้นที่ๆ แห้งแล้ง จะให้ผลผลิตลดลงมาก และมีใบหยาบสัตว์ไม่ชอบกินให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งประมาณ 2.5-3.5 ตันต่อไร่ต่อปี มีโปรตีน 7-8 เปอร์เซ็นต์ หญ้าสายพันธุ์เหล่านี้จะให้ผลผลิตที่ดีแต่จะประสบปัญหาในช่วงฤดูแล้งคือ ผลผลิตของหญ้าจะลดลงอย่างมาก ทำให้เกิดการแคลนอาหารของสัตว์ในช่วงฤดูแล้ง ดังนั้นจึงควรมีการที่จะศึกษาเทคนิคพื้นฐานในการขยายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีต่างๆ โดยนำเซลล์เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ในสภาพปราศจากเชื้อ (aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้น เป็นต้น โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมเนื้อเยื่อจากต้นอ่อน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดแบบปราศจากเชื้อ (aseptic technique) เพราะทุกชิ้นส่วนของต้นอ่อนสามารถนำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงส่วนเนื้อเยื่อ หรือชิ้นส่วนต่างๆ ที่ได้จากพืชต้องนำมาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิว (surface sterilization) ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถทำได้บนอาหารวุ้นกึ่งแข็ง (agar medium) และในอาหารเหลว (liquid medium) ซึ่งจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่นการหาอาหารที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัสเพื่อจะเจริญเป็นต้นใหม่ หรือการเกิดยอดจำนวนมาก เป็นต้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการทดลองในขั้นสูงเช่น การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการย้ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม การยิงอนุภาคดีเอ็นเอ เพื่อที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าอาหารสัตว์ให้มีความสามารถทนต่อสภาวะแห้งแล้งได้ ซึ่งทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ได้รับผลผลิตจากสัตว์เพิ่มขึ้น และทำให้เกษตรกรผู้ผลิตหญ้าอาหารสัตว์เพื่อจำหน่ายต่างก็มีรายได้เพิ่มขึ้นด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1.ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดของหญ้า ให้เกิดเป็นยอดจำนวนมาก

1.2.2.ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

1.2.3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดรากที่สมบูรณ์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ภายในอนาคต เช่น การฉายรังสี การถ่ายโอนยีน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

ในโลกนี้มีพืชที่จัดอยู่ในวงศ์หญ้า (Graminear หรือ Poaceae) ประมาณ 10,000 ชนิด (species) หรือประมาณ 651-785 สกุล (genera) ขึ้นกระจายกันทั่วไปเกือบทุกสภาพภูมิอากาศ ซึ่งแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันทั้งด้านขนาด รูปร่าง และรูปแบบการเจริญเติบโต พืชเหล่านี้อาจเจริญเติบโตรวมกันเป็นพืชที่กว้างใหญ่ จัดว่าเป็นทุ่งหญ้าธรรมชาติ เช่น ทุ่งหญ้าสะวันน่า (savanna) ทุ่งหญ้าแพรรี่ (prairies) และทุ่งหญ้าสเตปป์ (steppes) มนุษย์ได้นำพืชในวงศ์นี้มาปลูกเป็นทุ่งหญ้าเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ เปลี่ยนอาหารหยาบเหล่านี้เป็น เนื้อ นม และเนย ตลอดจนขนสัตว์เพื่อใช้เป็นเครื่องนุ่งห่ม

2.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของหญ้าอาหารสัตว์

Class : Angiospermae

Subclass : Monocotyledoneae

Order : Graminales

Family : Poaceae (Graminear)

โดยพืชตระกูลหญ้าสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 วงศ์ย่อย (Sub species) ได้แก่

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วงศ์ย่อยแบ่งได้เป็น 28 ชนิด ดังนี้

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

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

2.1.1 หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน (Temperate forage grasses)

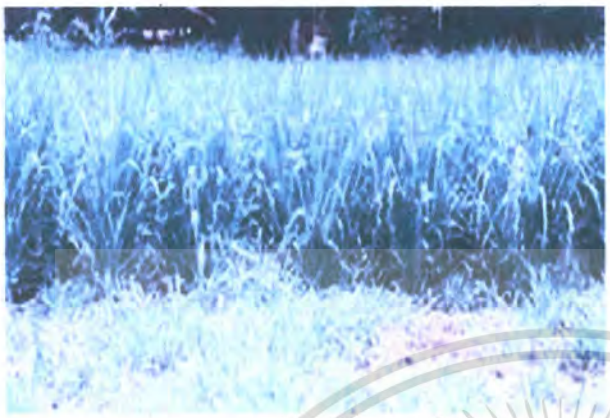
หญ้าอาหารสัตว์เขตอบอุ่น หมายถึง หญ้าที่เจริญเติบโต และใช้เพาะปลูกทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ในสภาพอากาศหนาวเย็น มักอยู่วงศ์ย่อย Festucoideae ได้แก่ หญ้าในสกุล *Agropyron*, *Festuca*, *Dactyli*, *Lolium*, *Poa*, *Bromus* และ *Agrostis* เป็นต้น

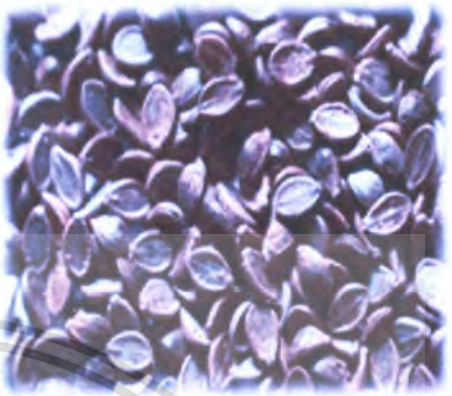
2.1.2 หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน (Tropical forage grasses)

หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน หมายถึง หญ้าที่เจริญเติบโต และใช้เพาะปลูกทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ในสภาพอากาศร้อน มักอยู่ในวงศ์ย่อย *Panicoideae*, *Eragrotoideae* และ *Bambusoidea* ได้แก่ หญ้าในสกุล *Axoonopus*, *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Chkoris*, *Cynodon*, *Digitaria*, *Eragrostis*, *Melinis*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Sorghum* และ *Tripsacum* เป็นต้น หญ้าที่นิยมใช้เพาะปลูกทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ในเขตร้อน ได้แก่ หญ้าขนหรือมอริซัส (*Brachiaria mutica*) หญ้าซิกแนล (*B.brizantha* และ *B.decumbens*) หญ้ารูซี่ (*B.ruzizuensis*) หญ้าบัฟเฟล (*Cenchrus ciliaris*) หญ้าโรดส์ (*Chloris gayana*) และ หญ้าแพงโกล่า (*Digitaria decumbens*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.1 หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*)





หญ้ารูซี่มีชื่อภาษาอังกฤษว่า ruzi grass เป็นหญ้าพื้นเมืองของประเทศคองโก นำเข้าประเทศไทยในปี พ.ศ. 2511 โดยฟาร์มโคนมไทย - เดนมาร์คนำมาจากประเทศออสเตรเลีย เนื่องจากติดเมล็ดดีขยายพันธุ์ได้ง่าย

รูปพรรณสัณฐาน เป็นหญ้าที่มีอายุหลายปี ลักษณะการเจริญเติบโตคล้ายหญ้าขนแต่ใบเล็กและใบคกกว่าหญ้าขน มีเหง้าที่มีข้อสั้น กาบใบยาวกว่าปล้องลำต้น และขนปกคลุม แผ่นใบมีขนาดยาวนุ่มปกคลุมหนาแน่น ลิ้นใบมีลักษณะแบบขนแข็ง (ciliate rim) มีช่อดอกแบบ raceme กลุ่มดอกมีขนปกคลุม และ lower glume สั้น ในหนึ่งกิโลกรัมมีเมล็ด 270,000 เมล็ด

แหล่งที่พบ แพร่หลายในประเทศไทย โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากแพร่พันธุ์ด้วยเมล็ดเกษตรกรสามารถซื้อหาได้

การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม หญ้ารูซี่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนที่มีน้ำฝนเฉลี่ย 1000 มิลลิเมตรขึ้นไป ไม่ทนต่อสภาพน้ำขังเป็นระยะเวลายาวนาน สามารถอยู่รอดได้ในฤดูแล้ง ไม่ทนต่อสภาพน้ำค้างแข็ง อุณหภูมิที่เหมาะ 28 - 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 หญ้าอะตราตรัม (*Paspalum atratum*)

หญ้าอุบลพาสพาลั่มมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Paspalum atratum* แหล่งดั้งเดิม เป็นหญ้าพื้นเมืองของประเทศบราซิล นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อปี 2536 โดย Gibson จาก Australia ลักษณะทั่วไป มีอายุหลายปี ลักษณะลำต้นตั้งเป็นกอสูงประมาณ 1 เมตร และถ้าไม่ตัดปล่อยไว้จนออกดอกจะสูงมากกว่า 2 เมตร เป็นหญ้าที่มีกอใหญ่ ใบกว้าง ขอบใบมีความคม ออกดอกและติดเมล็ดดีมาก เมล็ดไม่มีการพักตัว ทนต่อสภาพน้ำท่วมขังได้ดี ปลูกขยายพันธุ์ได้ด้วยเมล็ดและหน่อพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลมาก ๆ หรือในที่มีอากาศเย็น ถ้าปลูกในพื้นที่ซึ่งมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะมีใบดก มีความน่ากินสำหรับสัตว์ แต่ถ้าปลูกในพื้นที่แห้งแล้งเป็นเวลานาน พื้นที่ที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำหญ้าอะตราตัมจะยังคงอยู่ได้แต่การเจริญเติบโตลดลงมาก ใบหยาบและไม่น่ากินสำหรับสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) (อนุรักษ์, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกองด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

1. **เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex)** เป็นบริเวณที่มีเซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2. **เนื้อเยื่อบริเวณปลายราก (root apex)** เป็นส่วนที่อยู่บริเวณถัดจากส่วนของหมวกราก (root cap) ซึ่งจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับบริเวณส่วนของปลายยอด

3. **เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium)** เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในบริเวณส่วนของราก และลำต้น โดยจะอยู่บริเวณระหว่างกลุ่มของท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem)

4. **เนื้อเยื่อเจริญอยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem)** สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

5. **เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ** ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ได้แก่

5.1 ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อท่ออาหาร และ cortex

5.2 ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

5.3 ใบ (leaf) ในส่วนของมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่เป็นจำนวนมาก เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์

5.4 ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

5.5 ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

5.6 เมล็ด (seed) ในบริเวณส่วนของเมล็ดจะประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ เอ็มบริโอ เอ็นโดสเปิร์ม และใบเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็มบริโอภายในเมล็ดจะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จค่อนข้างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรงไคมา (parenchyma) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆแคลลัสมีขนาดต่างๆกันหลายรูปแบบมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคคิวโอสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภท ได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆฉ่ำน้ำ คล้ายกับฟองน้ำ เรียกว่า friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน เนื้อเยื่อพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิต สามารถที่จะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ ยกตัวอย่างเช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ลำต้น ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เมล็ด เรณู แคมเบียม คอร์เทกซ์ และท่อลำเลียงอาหาร เป็นต้น

2.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตรอาหาร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆจากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆสามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้ว หรือ ช้อนตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้นควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

2.2.3 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

2.2.3.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึง สารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช โดยขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน เช่น ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนสูง เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นราก แต่ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนต่ำ เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นส่วนยอด ถ้าอัตราส่วนสมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นรากและยอด แต่ในบางกรณีอาจขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 ธาตุอาหารชนิดต่าง เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท, กลูตามีน, แอลฟา-คีโตกลูตาลิก, โพรลีน, แอสปาราจีน, อาร์จินีน และ ซิลเวอร์ไนเทรต นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าวยังมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน

2.2.3.3 แหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรัสโตส น้ำตาลซอบิทอล น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลกาแลกโตส เป็นต้น ซึ่งโดยปกติจะใช้น้ำตาลประมาณ 20-40 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์

2.2.3.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะต้องใช้แสงที่มีความเข้มข้นต่ำ หรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

2.2.3.5 สถานะของอาหารที่เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งจะช่วยให้แคลลัสมีพื้นที่สัมผัสอาหารน้อยกว่า

2.2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษฎ์, 2540)

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช พันธุ์ ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืช (explants) ที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุดคืออาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiated) มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมากและเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปแบบที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัส (callus culture) และเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture) ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็ง (semi solid medium) ที่อย่างน้อยที่สุดประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องการครบคือ สารประกอบอนินทรีย์ หรือสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง

แม้พืชจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า และมีลักษณะเป็น seldom autotrophic กล่าวคือ ต้องการทั้งมหธาตุ (macro-element/nutrients) และจุลธาตุ (micro-element/nutrients) ที่ใช้กันตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย นอกจากนั้น ยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามินอย่างมาก ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกออกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืช แล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม อย่างไรก็ตามผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) และ/หรือ การกำเนิดศัพภะ (embryogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันได้โดยง่าย อย่างไรก็ตาม โดยทั่วๆไปแล้วสามารถจำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มๆได้ดังนี้

1. ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ ประกอบด้วย

1.1 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macro-element/nutrients) ได้แก่ C, H, O, N, P, K, Ca, Mg และ S

1.2 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micro-element/nutrients) ได้แก่ Fe, Mn, Cu, Zn, B, Cl และ Mo

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ ประกอบด้วย

2.1 วิตามิน ที่ใช้กันมากได้แก่ thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, inositol, biotin, panthothenic acid, folic acid, choline chloride, riboflavin และ ascorbic acid

2.2 ฮอร์โมน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่

2.2.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins) เช่น

- indole-3-acetic acid (IAA)
- indole butyric acid (IBA)
- naphthaleneacetic (NAA)
- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)

2.2.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) เช่น

- N_6-Benzyladenine (BA)
- Kinetin
- Zeatin
- N_6-isopentenyl adenine (2iP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น

- gibeberellic acid (GA)
- paclobutrazol
- abscissic acid (ABA)
- daminozide
- picloram

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลาย และ เก็บรักษาไว้ในสภาพที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ ดังแสดงไว้ในตาราง

กลุ่มสาร	ชื่อสาร		ตัวทำละลาย	การเก็บ
ออกซิน (auxins)	(IAA)	indole-3-acetic acid	1N NaOH	0 องศาเซสเซียส
	(IBA)	indole butyric acid	1N NaOH	0-5 องศาเซสเซียส
	(NAA)	naphthaleneacetic	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	(2,4-D)	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	(2,4,5-T)	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
ไซโตไคนิน (cytokinins)	(BA)	N_6-Benzyladenine	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	-	Kinetin	1N NaOH	0 องศาเซสเซียส
	-	Zeatin	1N NaOH	0 องศาเซสเซียส
	(2iP)	N_6-isopentenyl adenine	1N NaOH	0 องศาเซสเซียส
สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ	(ABA)	abscissic acid	1N NaOH	0 องศาเซสเซียส
	(GA)	gibeberellic acid	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
		picloram	0.2M KOH	0 องศาเซสเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ EtOH = Ethanol alcohol

NaOH = Sodium hydroxide

KOH = Potassium hydroxide

N = Normality

M = Molarity

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ สารประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ เช่น glucose, sucrose, fructose, saccharose และ mannitol

2.4 กรดอะมิโน ได้แก่ glutamine, asparagines, adenine, glycine และ casein hydrolysate

2.5 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ กล้วยหอมบด และจากมอลท์สกัด

แม้พืชทุกชนิดโดยปกติต้องการธาตุอาหารหลักที่เหมือนกันก็จริง แต่จะต้องการในปริมาณหรือความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีความต้องการที่แตกต่างกันมาก ดังนั้น การเลือกอาหารเพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควรคำนึงถึง

1. ชนิดและสายพันธุ์ พืชต่างชนิดและสายพันธุ์ ส่วนใหญ่ต้องการธาตุอาหารไม่เหมือนกัน

2. อายุและระยะการพัฒนา แม้เป็นพืชชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน ถ้าอายุและระยะการพัฒนาต่างกัน ก็อาจต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน

3. ชนิดของชิ้นส่วนพืช พืชชนิดเดียว หรือแม้กระทั่งต้นเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนของพืชส่วนต่างๆ เช่นใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงจะต้องใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างออกไปจากสูตรที่ใช้เลี้ยงใบหรือราก

4. เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่มีเป้าหมายของการเลี้ยงต่างกัน จำเป็นต้องใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันด้วย ตัวอย่าง ต้องการเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดก็ใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่ง ที่แตกต่างไปจากสูตรที่ต้องการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือราก

5. สถานะของอาหาร ชิ้นส่วนพืชเดียวกันที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็ง (solid medium) อาจได้ผลแตกต่างไปจากการเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid medium) หรืออาหารกึ่งแข็ง (semi solid medium)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์หลายคนจึงได้พยายามคิดค้นสูตรอาหาร ที่คาดหมายว่า น่าจะเหมาะสมในการใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชออกมาเผยแพร่หลายสูตร แต่ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ สูตรของ Murashige and Skoog สูตรของ Linsmaler and Skoog และ สูตรของ Gamborg B-5 เป็นต้น

2.2.5 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับขั้นตอนนี้ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอก เป็นต้น โยจะต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพราะว่าในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ จะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส แพร่กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และจะตายในที่สุดซึ่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ประสบความสำเร็จ

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไป พร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆภายในก็จะสูญเสียไปด้วย สารเคมีสามารถทำปฏิกิริยากับสารในไซโตพลาสซึม จะมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์หรือสารเคมีสามารถจับกับโปรตีนในเอนไซม์ และโปรตีนเสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจะต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

1. มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด
2. สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว
3. สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว
4. ไม่ควรมีสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์
5. ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย
6. ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้

1. แคลเซียมไฮโปรคลอไรด์ ($Ca(OCl_2)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2. โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ($Na(OCl_2)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

3. ไฮโตรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3-12 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-15 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

4. คลอร็อกซ์ (Clorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันโดยทั่วไปตามบ้าน หรือน้ำยาซักผ้าขาวที่มีชื่อทางการค้าว่า ไฮเตอร์ โดยภายในส่วนประกอบของสารเหล่านี้จะมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 5-15 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

5. สารละลายโปรไมด์ (bromide solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

6. ซิวเวอร์ไนเทรต ($Ag(NO_3)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

7. สารละลายไอโอดีน (iodine solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

8. เมอคิวริคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีพอสมควร

9. เมอคิวริไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

10. เมอคิวริโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

11. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ 70 และ95 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 1-5นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

12. กรดกัมมะถัน หรือกรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 20-70 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

13. เบนโซโคเมียมคลอไรด์ (benzalkonium chloride) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 4-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ใช้ 30-60 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยไม่ต้องใช้สารเคมี เช่น การอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light) หรือที่เรียกกันว่าแสง UV การเผาไฟซึ่งใช้กับตัวอย่างที่แข็งๆ เช่น เมล็ด ท่อนไม้ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในวงศ์หญ้า สามารถที่จะชักนำให้เกิดแคลลัส และ ชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ โดยใช้ส่วนต่างๆของหญ้า เช่น ช่อดอกอ่อน เมล็ด ปลายยอด ข้อ ใบอ่อน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง หรือ หรือเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย (cell suspention) ในอาหารสูตรต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น สูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) LS (Linsmaier และ Skoog, 1965) B_5 (Gamborg, 1970) โดยอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส จะประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เช่น 2,4-D ความเข้มข้นต้นแต่ 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะใช่ร่วมกับกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะแข็ง เกาะกันแน่น (compact callus) และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้โดยนำแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีไซโตไคนิน เช่น BA, gibberellic หรือใช้ร่วมกับกลุ่มออกซิน เช่น IAA หรือ NAA หรือเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

Ashok และคณะ (2000) ได้ทำการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของหญ้า Hybrid bermudagrass 'Tifgreen' (*Cynodon dactylon x Cynodon transvaalensis*) และ "Savannah" (*Cynodon dactylon*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้ไม่มีลักษณะเป็นเอ็มบริโอจีนิกแคลลัส เซลล์เกาะกันหลวมๆ พบว่าเมื่อเติม BA ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีรูปร่างเป็นปุ่มเซลล์เกาะกันแน่นขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสจะเกิดขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์จากแคลลัสทั้งหมด สามารถตรวจสอบได้โดยกล้องอิเล็กตรอนไมโครสโคปี และสามารถชักนำให้เกิดเป็นใหม่ได้ บนอาหารที่ประกอบด้วย BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยหญ้าทั้งสองมีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดเป็นต้นเท่ากับ 79.5 และ 83.3 ตามลำดับ ย้ายต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมาชักนำรากในอาหารครึ่งสูตร MS

Bradley และคณะ (2001) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้จากส่วนของเมล็ดหญ้า perennial ryegrass จำนวน 13 สายพันธุ์ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ระหว่าง 6.3–21 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร ที่ประกอบด้วย BAP ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้ 0-58 เปอร์เซ็นต์ และมีการศึกษาถึงผลของระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $CuSO_4.5H_2O$ ที่ระดับความเข้มข้น 5-50 ไมโครโมลาร์ ที่เติมลงในอาหารชักนำแคลลัสที่ประกอบด้วย2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ต้นได้ดีที่สุด ส่วนการเติม $CuSO_4.5H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าฉลาดกระบัง

พบว่าไม่มีผลต่อการทดลองและที่ความเข้มข้นของ $CuSO_4.5H_2O$ 50 ไมโครโมลาร์ จะเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย ทำการย้ายต้นใหม่มาเพาะเลี้ยงบนอาหารครึ่งสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดราก

Gerardo และคณะ (2001) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อหญ้า "Blue Grama" (*Bouteloua Graciris*) (H.B.K) โดยใช้ส่วนของปลายยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ด เป็นเวลา 3 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Picloram, BA, Adenine และ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดออแกโนจีนิกแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรที่ประกอบด้วย Picloram 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Adenine 40 มิลลิกรัมต่อลิตร การเกิดเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสจะต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ ออแกโนจีนิกแคลลัส สูตรที่สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสได้ดีที่สุดคือ สูตรที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.25 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรที่ประกอบด้วย 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารครึ่งสูตร MS หรือ อาหารสูตร MS ที่เติม gibberellic 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Poeaim และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้า *Zoysia* บนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร α-ketoglutaric 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นเวลา 35 วัน คัดเลือกคอมแพคแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ชักนำให้กลายเป็นต้น ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการเกิดคอมแพคแคลลัส และการเจริญเป็นต้นใหม่ขึ้นกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

Lajonchere และคณะ (1993) ทดลองนำชิ้นส่วนของยอดอ่อนของหญ้าพันธุ์ *P. maximum* Jacq. cv. Likoni มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อนและ 2,4-D โดยทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พบว่า สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดเป็น Embryogenic callus ที่มีขนาดใหญ่คืออาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4-D ปริมาณ 2-7 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิด Embryogenic callus ที่ดีที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D 2–3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรพัฒนาแคลลัสเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดคืออาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Poeaim และคณะ (2005) ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอด *Zoysia minima* และ *Z. japonica*, var. Miyako and Himeno บนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.1,1,3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร α-ketoglutaric 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืด คัดเลือกคอมแพคแคลลัส

83969

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ชักนำให้กลายเป็นต้น ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และเจลไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าสามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

1. พันธุ์ของหญ้าอาหารสัตว์ เช่น รูซี่ *(Brachiaria ruziziensis)* และ อะตราตัม *(Paspalum atratum.* Swallen.*)*

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร LS และ วิตามิน เป็นต้น

2.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ คลอร็อกซ์ สารเปียกใบ (tween-20) แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) N_6-Benzyladenine (BA) และ 3-indole butyric (IBA) เป็นต้น

3. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1 บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ปิเปตต์ และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 จานแก้ว และพลาสติก

3.3 ปากคีบ มีดผ่าตัด และด้ามมีด

3.4 ไมโครเวฟ

3.5 ตู้ปลอดเชื้อ

3.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

3.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ

3.8 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรองแบคทีเรีย

3.9 ตู้อบความร้อน

3.10 หม้อนึ่งความดัน

3.11 โครปิเปตต์และทิปขนาดต่างๆ

3.12 หลอดขนาดเล็กต่างๆ

3.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.14 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.15 อุปกรณ์อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนเมล็ดของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

1.1 คัดเลือดเมล็ดหญ้ารูซี่ที่มีความสมบูรณ์มาแกะเปลือกออกโดยนำมาบดในโกร่งให้เมล็ดภายในหลุดออกมา นำเมล็ดที่ได้มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง นาน 3 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนทิชชูปลอดเชื้อนำเมล็ดปริมาณ 20 เมล็ดวางไปบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตใส่ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

1.2 คัดเลือกเมล็ดหญ้าอะตราตรัมที่มีความสมบูรณ์ ทำการทดลองดังการทดลองข้อที่ 1.1

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร โดยการวัดขนาดของแคลลัสดังนี้

1.1 ใช้เวอร์เนียร์วัดความกว้าง และความยาวของแคลลัสของทุกสูตรอาหารนำความกว้างคูณความยาว จะได้พื้นที่ของแคลลัส

1.2 นำค่าที่ได้ของแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย จะได้ค่าประมาณของพื้นที่ของแคลลัส

1.3 เปรียบเทียบพื้นที่ของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตรเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัส

2. บันทึกผลการทดลองของจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4 - D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่และอะตราตรัมให้พัฒนาเป็นแคลลัส

สูตรอาหารที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	1	0.5
2	1	1
3	1	3
4	1	5

การทดลองที่ 2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot)

คัดเลือดเมล็ดหญ้าที่มีความสมบูรณ์มาแกะเปลือกออกโดยนำมาบดในโกร่งให้เมล็ดภายในหลุดออกมา นำเมล็ดที่ได้มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง นาน 3 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนทิชชูปลอดเชื้อ

2.1 สำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้ารูซี่ใช้สูตรอาหาร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ (ตารางที่ 2) ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงสว่าง ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

2.2 สำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าอะตราตรัมใช้สูตรอาหาร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ (ตารางที่ 3) ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงสว่าง ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร โดยการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อเมล็ด

2. บันทึกจำนวนและลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอด

3. สำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้ารูซี่ทำการเก็บผลการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

4. สำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าอะตราตรัมทำการเก็บผลการทดลองเป็นเวลา 90 วัน

ตารางที่ 2 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่ให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก

สูตรอาหารที่	สูตรอาหาร LS	สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	LS	0.1
2	LS	0.5
3	LS	1
4	LS	3

ตารางที่ 3 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก

สูตรอาหารที่	สูตรอาหาร LS	สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	LS	0.5
2	LS	1
3	LS	3
4	LS	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าอะตราตรัมให้เกิดรากที่สมบูรณ์

นำหญ้าอะตราตรัมที่ทำการเพาะเลี้ยงที่มีความสมบูรณ์มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตรความเข้มข้นครึ่ง LS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงสว่าง ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บผลการทดลองเป็นเวลา 15 วัน

ตารางที่ 4 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำหญ้าอะตราตรัมให้มีรากที่สมบูรณ์

สูตรอาหาร LS	สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
LS	0
LS	1
LS	3
LS	5
ครึ่ง LS	0

การทดลองที่ 4 การศึกษาการเจริญหลังจากย้ายสู่สภาพธรรมชาติของหญ้าอะตราตรัม

นำต้นหญ้าอะตราตรัมที่ทำการเพาะเลี้ยงที่มีความสมบูรณ์นำออกมาจากขวดเพาะเลี้ยง ล้างอาหารออกจากรากให้หมด แช่ลงในน้ำยาป้องกันและกำจัดเชื้อราและแบคทีเรีย ปลูกลงในกระถางสำหรับปลูกต้นไม้ ที่บรรจุดินซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เป็นเวลา 20 นาที คลุมด้วยถุงพลาสติกใสขนาดใหญ่เพื่อให้ต้นหญ้ามีการปรับสภาพอย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนเมล็ดของหญ้ารูซี่ให้เจริญเป็นแคลลัส

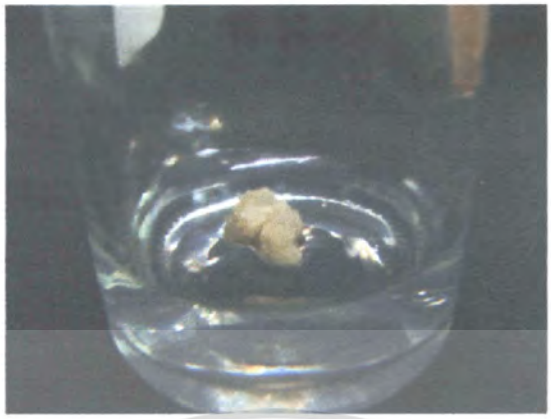
1.1 จากการนำเมล็ดหญ้ารูซี่ที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำเมล็ดหญ้าอะตราตรัมให้เจริญเป็นแคลลัสได้ โดยมีขนาดและลักษณะของแคลลัสที่วัดได้ในอาหารแต่ละสูตรที่ระยะเวลา 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 วัน มาเปรียบเทียบขนาด พบว่า อาหารสังเคราะห์ LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด พบว่า เปอร์เซ็นต์ในการเกิดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรนั้นมีค่าแตกต่างกันอาหาร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดแคลลัสสูงที่สุด คือ 65 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ส่วนลักษณะที่เป็น compact callus มีลักษณะขาวขุ่นอมเหลือง เซลล์เกาะกันค่อนข้างแข็ง ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ดี และลักษณะที่เป็น friable callus มีลักษณะ ใส ฉ่ำน้ำ เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (รูปที่ 1-4) จากการทดลอง พบว่า อาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดเป็น compact callus ได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็น compact callus เท่ากับ 76.9 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการเกิด compact callus จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้ารูซี่บนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 40 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D (มก.ล.)	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	จำนวนที่เกิดแคลลัส (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น		เปอร์เซ็นต์การเกิด Compact callus
				friable	compact	
0.5	20	11	55	4	7	63.6
1	20	13	65	3	10	76.9
3	20	9	45	4	5	55.5
5	20	7	35	4	3	42.8

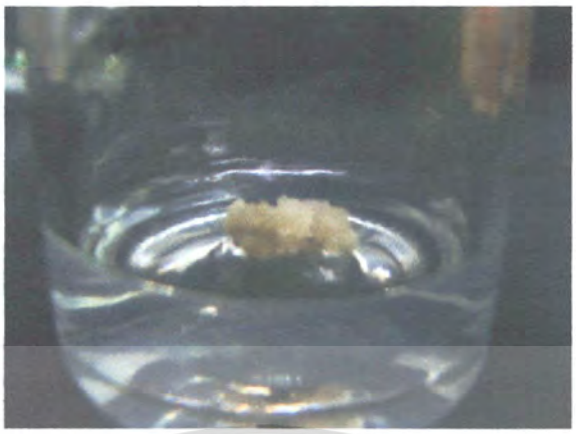
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน

รูปที่ 2 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน

รูปที่ 4 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้ารูซี่ไปเป็นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน

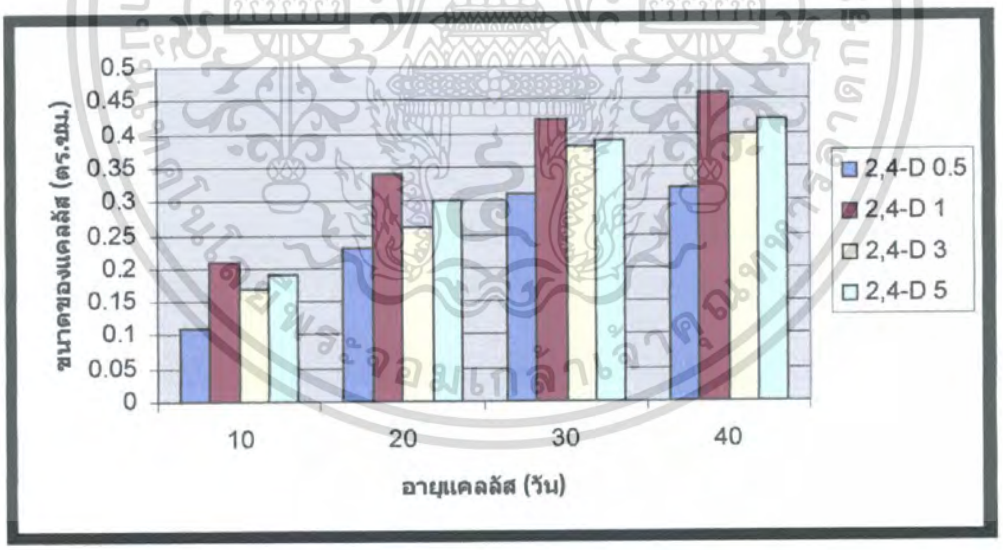
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 จากการนำชิ้นส่วนของเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมให้เจริญไปเป็นแคลลัสได้ โดยมีขนาดและความยาวแตกต่างกันเมื่อคำนวณหาพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสจากความกว้างและความยาวของแคลลัสที่วัดได้ในอาหารแต่ละสูตรที่ระยะเวลา 10, 20, 30 และ 40 วันมาเปรียบเทียบขนาด (ตารางที่ 6) พบว่าอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด (รูปที่ 5) ส่วนความสามารถในการพัฒนาไปเป็นแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสบนอาหารแต่ละสูตรนั้นมรค่าแตกต่างกันอาหาร LS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด คือ 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) ส่วนลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ลักษณะที่เป็น compact callus มีลักษณะขาวขุ่นอมเหลือง เซลล์เกาะกันค่อนข้างแข็ง ส่วนลักษณะที่เป็น friable callus คือมีลักษณะใสฉ่ำน้ำ เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (รูปที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงขนาดของแคลลัสในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 40 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D (มก.ล.)	ขนาดของแคลลัส (ตร.ซม.)			
	เวลา 10 วัน	เวลา 20 วัน	เวลา 30 วัน	เวลา 40 วัน
0.5	0.11	0.23	0.31	0.32
1	0.21	0.34	0.42	0.46
3	0.17	0.26	0.38	0.4
5	0.19	0.3	0.39	0.42



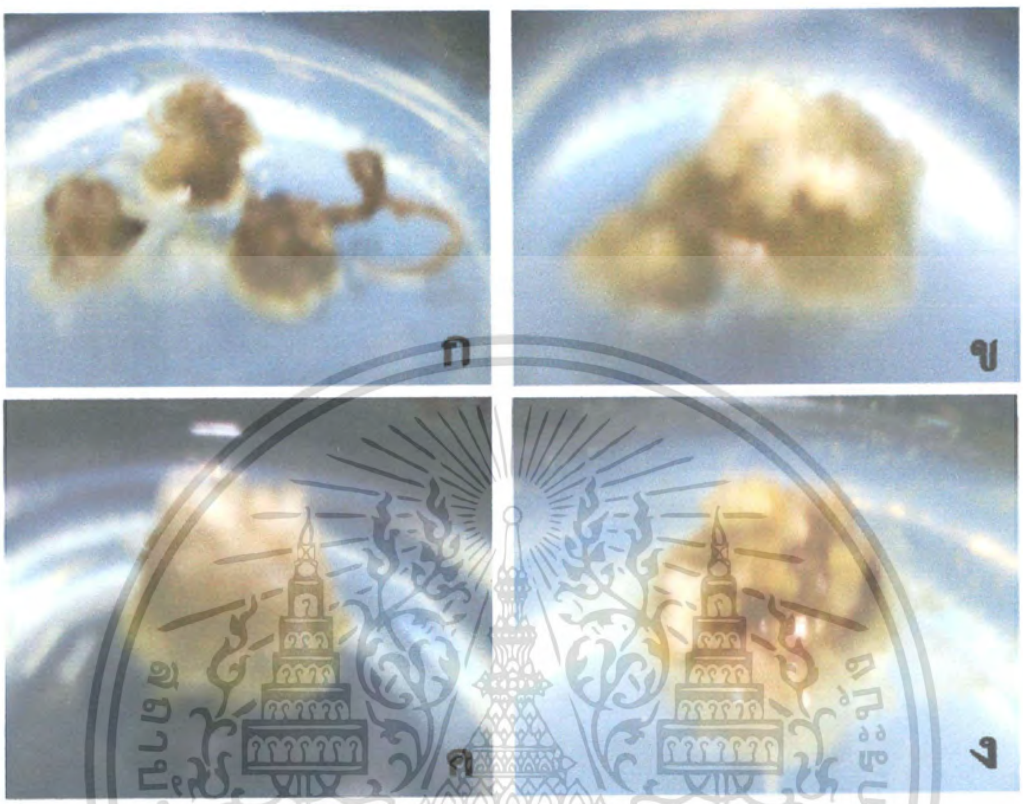
รูปที่ 5 กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยแคลลัสของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D (มก.ล.)	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	จำนวนที่เกิดแคลลัส (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น		เปอร์เซ็นต์การเกิด Compact Callus (เปอร์เซ็นต์)
				compact	friable	
0.5	40	25	62.5	17	8	68.0
1	40	28	70.0	20	8	71.4
3	40	22	55.0	13	9	59.0
5	40	17	42.5	11	6	64.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แสดงแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ

(ก) แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ข) แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ง) แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

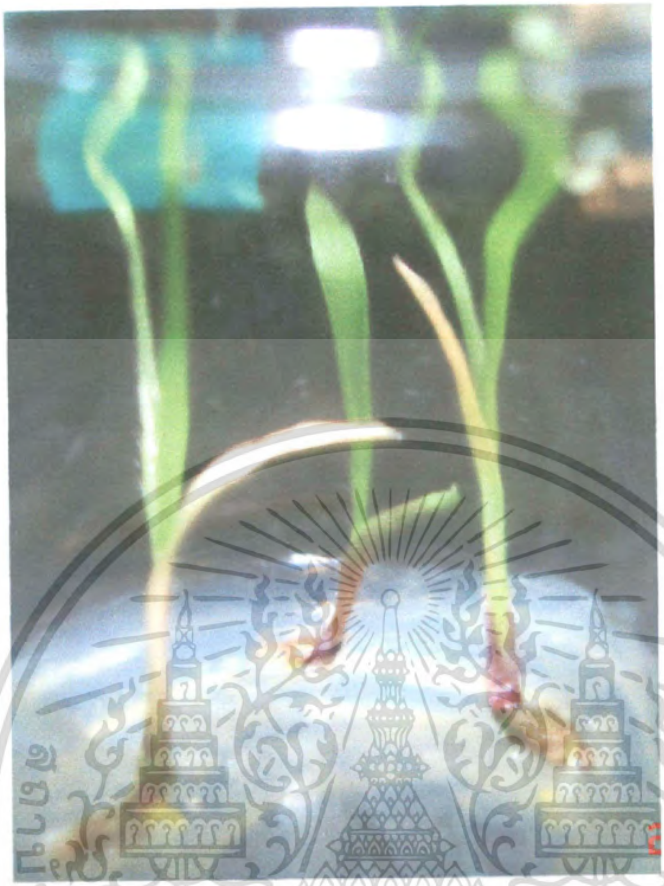
การทดลองที่ 2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot)

2.1 จากการนำชิ้นส่วนของเมล็ดของหญ้ารูซี่ที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2) เป็นเวลา 20 วัน พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่ให้เจริญไปเป็นยอดได้ โดยพบว่าอาหารสูตรที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถทำให้เกิดยอดได้มากสุด 4.1 ยอดต่อเมล็ด (ตารางที่ 8) มีขนาดและความยาวมากที่สุด เมื่อคำนวณหายออดของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตรที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วันมาเปรียบเทียบขนาด พบว่าอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดมากที่สุด (รูปที่ 7)

ตารางที่ 8 จำนวนยอดต่อเมล็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (มก.ล.)	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดขึ้น	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อเมล็ด
0.1	30	97	3.2
0.5	30	92	3.0
1	30	124	4.1
3	30	103	3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงลักษณะยอดของหญ้ารูซี่ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร LS และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำยอดจากเมล็ดหญ้าอะตราตรัมได้ โดยมีจำนวนยอดที่แตกต่างกัน เมื่อคำนวนหาจำนวนยอดเฉลี่ยที่นับได้ในแต่ละสูตรอาหารที่ระยะเวลา 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 วัน มาเปรียบเทียบจำนวนยอดที่เกิดขึ้น พบว่าอาหารสูตรสังเคราะห์ LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นมาก โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจำนวนมาก เท่ากับ 6.32 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) จากการนำเมล็ดหญ้าอะตราตรัมที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรในเวลา 30 วัน (รูปที่ 8-11) และ มีจำนวนยอดที่เกิดมากขึ้นอีก โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจำนวนมาก เท่ากับ 17.55 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) จากการนำเมล็ดหญ้าอะตราตรัมที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรในเวลา 90 วัน (รูปที่ 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การยอด จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติม BA (มก.ล.)	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง (เมล็ด)	จำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดขึ้น	จำนวนเฉลี่ยที่เกิดยอดต่อเมล็ด
0.5	40	65	1.62
1	40	253	6.32
3	40	183	4.57
5	40	54	1.35

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน

อาหารสูตร LS ที่เติม BA (มก.ล.)	จำนวนที่เพาะเลี้ยง (ยอด)	จำนวนยอดที่เกิดขึ้นทั้งหมด	จำนวนเฉลี่ยที่เกิดยอดต่อเมล็ด
0.5	20	94	4.70
1	20	351	17.55
3	20	293	14.65
5	20	67	3.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 8 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 9 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

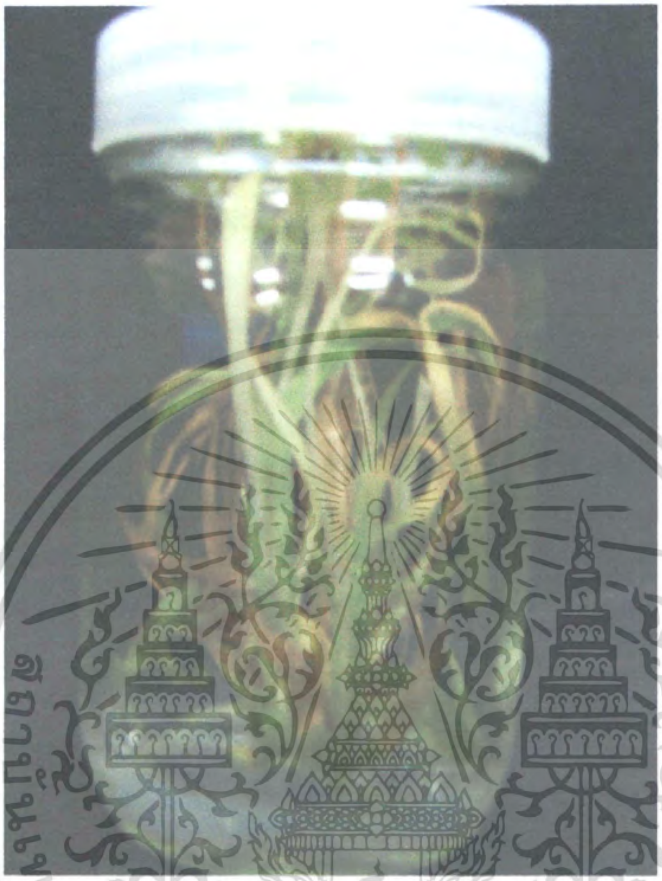
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 11 แสดงการพัฒนาของเมล็ดหญ้าอะตราตรัมไปเป็นยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 แสดงลักษณะยอดที่เกิดขึ้น จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าอะตราตรัมบนอาหาร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน

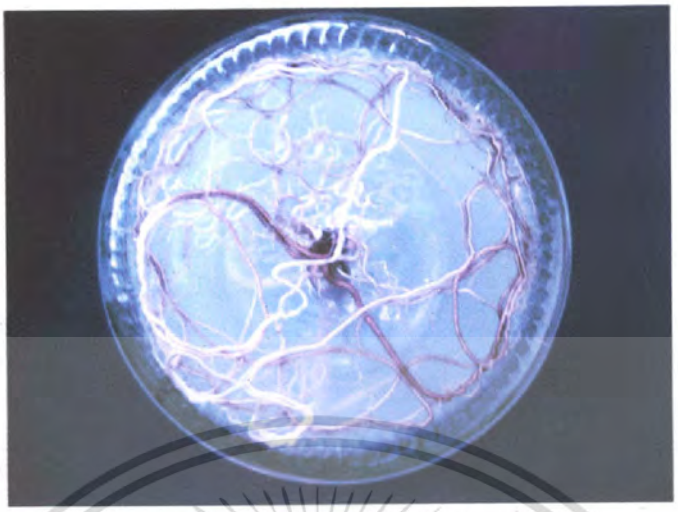
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าอะตราตรัมให้เกิดรากที่สมบูรณ์

3.1 อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตร LS ความเข้มข้นครึ่งหนึ่งจากสูตรอาหารปกติ พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำรากจากต้นใหม่ของหญ้าอะตราตรัมได้ โดยมีปริมาณรากที่แตกต่างกัน เมื่อคำนวณหาจำนวนรากเฉลี่ยที่นับได้ในแต่ละสูตรอาหารที่ระยะเวลา 30 วัน มาเปรียบเทียบจำนวนยอดที่เกิดขึ้น พบว่าอาหารสูตรสังเคราะห์ LS ที่เติม IBA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นมาก โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจำนวนมาก จากการนำต้นใหม่ของหญ้าอะตราตรัมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (รูปที่ 13-17)

รูปที่ 13 แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารครึ่ง LS

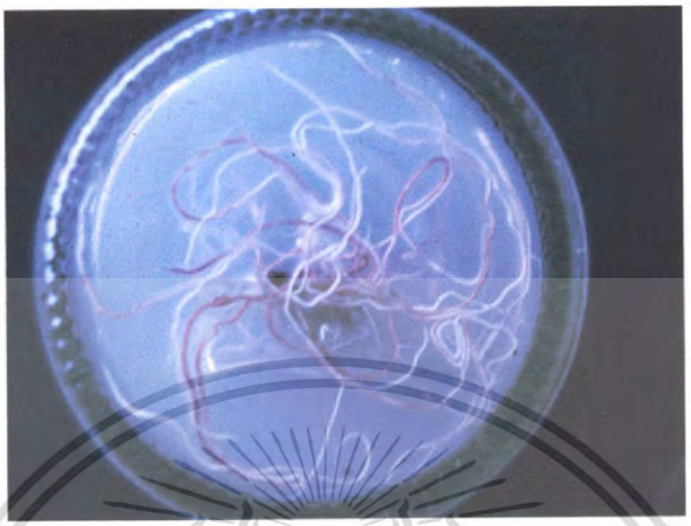
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่ไม่เติม IBA

รูปที่ 15 แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 17 แสดงการพัฒนาของรากในหญ้าอะตราตรัมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

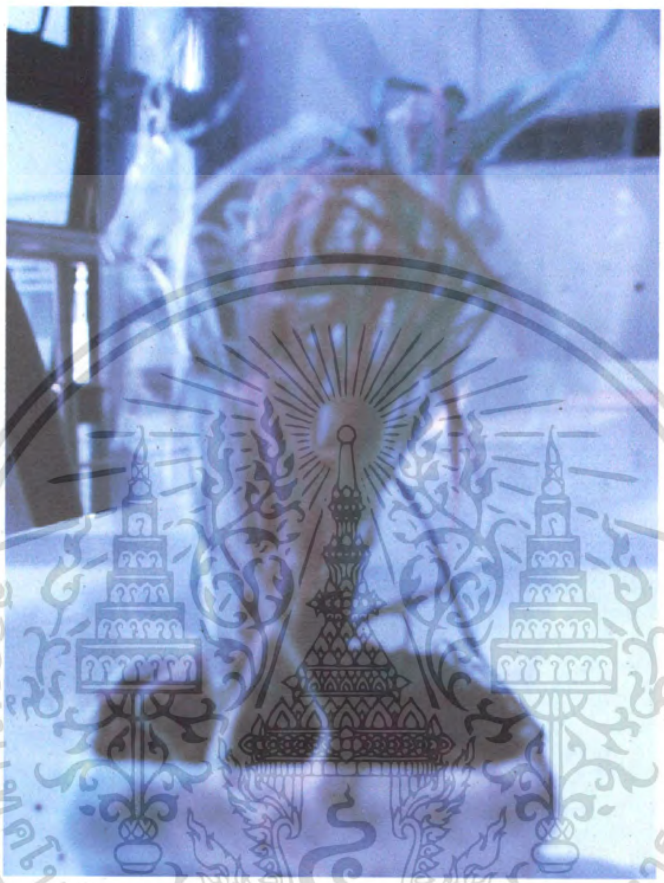
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4 การศึกษาการเจริญหลังจากย้ายสู่สภาพธรรมชาติของหญ้าอะตราตรัม

เมื่อย้ายหญ้าอะตราตรัมที่เจริญจากการทดลองที่ 3 ที่มีความสมบูรณ์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงไปปลูกต่อในถาดพลาสติก วางในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ พบว่า หลังจากย้ายปลูกได้ 2 สัปดาห์ต้นหญ้าสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ (รูปที่ 18-19)

รูปที่ 18 หญ้าอะตราตรัมก่อนการย้ายปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 หญ้าอะตราตรัมหลังจากย้ายปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนเมล็ดของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

1.1 ในการศึกษาการชักนำเมล็ดหญ้ารูซี่ให้พัฒนาเกิดเป็นแคลลัส อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร และเติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus เท่ากับ 76.9 เปอร์เซ็นต์

1.2 ในการศึกษาการชักนำเมล็ดของหญ้าอะตราตรัมให้พัฒนาเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร และเติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 30 วัน พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารที่เหมะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัสเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และเกิด compact callus เท่ากับ 71.4 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot)

2.1 ในการศึกษาการชักนำเมล็ดของหญ้ารูซี่ให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร และเติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน เป็นอาหารที่เหมะสมในการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเท่ากับ 4.1 ยอดต่อเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 จากการศึกษาการชักนำยอดของหญ้าอะตราตรัมบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม α-ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 กรัมต่อลิตร และเติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารแต่ละสูตรจะมีการเกิดยอดในแต่ละความเข้มข้นแตกต่างกัน สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเท่ากับ 6.32 ยอดต่อเมล็ดในระยะเวลา 30 วัน

การทดลองที่ 3 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าอะตราตรัมให้เกิดรากที่สมบูรณ์

อาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรสังเคราะห์ LS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตร LS ความเข้มข้นครึ่งหนึ่งจากสูตรอาหารปกติ พบว่าสูตรอาหารสังเคราะห์ LS ที่เติม IBA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นมาก โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจำนวนมาก จากการนำต้นใหม่ของหญ้าอะตราตรัมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

การทดลองที่ 4 การศึกษาความสามารถหลังจากย้ายสู่สภาพธรรมชาติของหญ้าอะตราตรัม

เมื่อย้ายหญ้าอะตราตรัมที่สมบูรณ์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงไปปลูกต่อในกระถางในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ พบว่า หลังจากย้ายปลูกได้ 2 สัปดาห์ ต้นหญ้าอะตราตรัมสามารถรอดชีวิตอยู่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์, วิรัช สุขสราญ, ฉายแสง ไผ่แก้ว, เกียรติศักดิ์ กล่ำเอม, จีระศักดิ์ แซ่ลิ่ม และ อานุภาพ เส็งสาย. 2549. *พืชอาหารสัตว์พันธุ์ดี*. กรุงเทพฯ : สำนักพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมปศุสัตว์

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. *เทคโนโลยีชีวภาพของพืช*.พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ :สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช :หลักการและเทคนิค*. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทกานต์ อรณนันท์. 2544. *การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าเนเปียร์แคระโดยรังสีแกมมากับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัยฤกษ์ มณีพงษ์. *พันธุศาสตร์*. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช, 2523.

สายัณห์ สดุดี . 2534. *สภาวะขาดน้ำในการผลิตพืช* ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ยาสุชิ มัสสุดะ และ ทัสสุโระ มุระตะ. 2548. *การศึกษาผลของความดันและระยะทางจากเครื่องยิงอนุภาคต่อไมโครแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากเซลล์แขวนลอยของหญ้าสายพันธุ์ "ยูคิกิรุชิ" (Zoysia japonica)*. รวมวารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 36. ฉบับที่ 5-6. น. 954-957.

Asano, Y. 1989. *Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngrass (Zoysia japonica)*, Plant Cell Rep. 8, 141-143.

Asano, Y., Katsumoto H., Inokuma C., Kaneko S., Ito Y and Fujiie A. 1996. *Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of Zoysia japonica Stued*, J. Plant Physiol.149, 413-417.

Ashok, C and Rongda Q. 2000. *Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf- type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 60, 113–120.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bradley, D. E., Bruneau A.H and Qu R. 2001. Effects of cultivar, explant treatmemt, and medium suppements on calls introduction and plantlet regeneration in perennial ryegrass International Turfgrass. *Society Research Journal.* 9, 152-156.

Asano, Y. 1989. *Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngrass (Zoysia japonica)*, Plant Cell Rep. 8, 141-143.

Asano, Y., Katsumoto H., Inokuma C., Kaneko S., Ito Y and Fujiie A. 1996. *Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of Zoysia japonica Stued*, J. Plant Physiol.149, 413-417.

Ashok, C and Rongda Q. 2000. *Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf- type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60, 113–120.

Bradley, D. E., Bruneau A.H and Qu R. 2001. *Effects of cultivar, explant treatmemt, and medium suppements on calls introduction and plantlet regeneration in perennial ryegrass* International Turfgrass. *Society Research Journal.* 9,152-156.

Cemalettin, Y., AslÝ, D., Khalid M., Mehmet A and Sebahattin Z. 2006. *Use of Gamma Rays to Induce Mutations in Four Pea (Pisum sativum L.).* Cultivars Turk J Biol. 30, 29-37.

Chen, C. S., Wang S. M and Cheng Y. K. 1997. *Morphological and RAPD variations of regenerant derived from cell suspension culture of pangolagrass.* International Grass Congress 18, June 8-9, Saskachewan, Wininpeg, Manitoba and Saskatoon. P. 4,15-16.

Gamborg. 1970. *Affect amini acid and ammonium on the growth of plant cell in suspension culture plant physiol.*, 45, 372-375.

Gerardo, A., Aguado S., Jose, L. C., Victor, O. P., Rosario, S.C., Judiyh, M. G and Luis, H. E. 2001. *Tissue culture and plant regeneration of blue gramma grass, Bouteloua gracilis (H.B.K) LAG.EX STEUD.* Invitro cell . Dev. Boil.-plant 37, 182-189.

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

Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. *Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.* 18, 100-127.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murashige T and Skoog F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures.* Physiologia Plantarum,15, 473-497.

Poeaim, A., Matsuda, Y., Inoue, T., Shigeyasu, T and Murata T. 2004. *Optimization of callus induction and plant regeneration from seed explants of Zoysia sp.* J Jpn Soc Turfgrass Sci 31, 3-10.

Poeaim, A., Matsuda Y and Murata T. 2005. *Callus formation and plant regeneration from shoot tip of Zoysis species. Proceedings of the school of agriculture.* Kyushu Tokai University 24, 29-36.

Shivashilanker, G., Mahishi, D. M and Kulkarni R.S. 1988. *A non-flowering green panic grass (panicum maximum var trichoglume) obtained through gamma irradiation Mut.* Bred.News 32, 9-10.

Takahiro, G., Shin-ichi, T., Ryo, A., Osamu, K and Franz, H. G. 2005. *Herbicide-resistant plants by particle inflow gun-mediated gene transfer to diploid bahiagrass (Paspalum notatum).* Journal of Plant Physiology 162, 1367-1375.

Tanpo, H., Toyoda, H. and Kako T. 1997. *Callus induction and plant regeneration in Zoysia grass (Zoysia japonica) Steud.* J. Jpn. Soc., Turfgrass Sci 23, 27-30.

Yu-Ye W., Qi-Jun C., Min C., Jia C and Xue-Chen W. 2005. *Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (Lolium perenne L.) obtained by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene*, Plant Science 169, 65–73.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สูตร Linsmaier และ Skoog (1965) (อนุรักษ์, 2544)

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg/l)
ammonium nitrate	NH_4NO_3	1,690
potassium nitrate	KNO_3	1,900
calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$	440
magnesium sulfate	$MgSO_4.7H_2O$	370
potassium dihydrogen - phosphate	KH_2PO_4	170
boric acid	H_3BO_3	6.2
manganese sulfate	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
zinc sulfate	$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
potassium iodide	KI	0.83
sodium molypdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
cupper sulfate	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
cobalt chloride	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
EDTA Disodium Salt	Na_2EDTA	37.3
Iron sulfate	$FeSO_4.7H_2O$	27.8
myo-inositol	$C_6H_{12}O_6$	100
thiamine-HCl (vitamin B_1)	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	0.4
sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	30,000
pH 5.6		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้