สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การขยายพันธุ์สับปะรด (Ananas comosus (L.) Merr.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Propagation of Pineapple (Ananas comosus (L.) Merr. by Tissue Culture)

โดย

นางสาวสกาวเดือน มั่งมี

นางสาวสุดารัตน์ นิติวัฒนะ

.....

อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ ประธานกรรมการอาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(ผศ.ดร. อารมย์ ศรีนิจิตต์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

(วันที่ / เดือน / พ.ศ.)

ปพ.
ส124ก
2533

T100535

ปพ.
ส124ก
2533

ลงทะเบียน 100535
19 JUN 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ขอขอบพระคุณบริษัทสยามอุตสาหกรรมการเกษตร จำกัด ที่เอื้อเฟื้อพันธุ์สับปะรดเพื่อใช้ในการศึกษา และขอขอบพระคุณ คุณชูชาติ วัฒนวรรณ ที่ช่วยเหลือในการถ่ายรูปทำปัญหาพิเศษ รวมทั้งเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา จนปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่กรุณาให้กำลังใจและทุนทรัพย์ในการศึกษาเป็นอย่างดียิ่งตลอดมา

สกาวเดือน มั่งมี

สุคารัตน์ นิติวัฒนะ

มีนาคม 2533

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขยายพันธุ์สับปะรด (Ananas comosus (L.) Merr.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Propagation of pineapple (Ananus comosus(L.) Merr.) by tissue culture

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็ง สูตร MS และสูตร MS ที่เติม kinetin และน้ำมะพร้าว 15% โดยมีความสูงของอาหาร และวิธีการเลี้ยงต่างกัน พบว่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS และ สูตร MS สามารถชักนำให้เกิด เอมบริออยด์ มากที่สุด และอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 mg/l จะชักนำให้เกิดต้นแขนง (plantlets) ที่สมบูรณ์จำนวนมาก และสามารถชักนำให้ต้นแขนงเจริญเติบโตได้ดี เมื่อย้ายต้นแขนงลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 5.0 mg/l และผงคาร์บอน 0.5 g/l ต้นจะสร้างรากได้ดี มีความยาวเฉลี่ยของราก 7.7 ซม. และของส่วนยอด 10.5 ซม. นำต้นสับปะรดย้ายปลูกใน ทรายและถ่านแกลบ 1:1 (โดยปริมาตร) ต้นที่แข็งแรงจะถูกย้ายปลูกในดินที่ผสมในกระถางขนาด 8 นิ้ว อีกครั้งหนึ่งเมื่อต้นสับปะรดอายุ 8 เดือน พบว่ามีความสูงเฉลี่ย 34.5 ซม. ซึ่งจากวิธีการนี้สามารถผลิตสับปะรด clone ใหม่ ๆ ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	22
สรุป	54
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน	23
2	แสดงผลการตอบสนองของ embryoids ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน	27
3	แสดงการเปรียบเทียบผลการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ที่มีระดับความสูงของอาหารแตงต่างกัน โดยแสดงผลการเจริญและพัฒนาเป็นระดับคะแนน	31
4	แสดงการเปรียบเทียบผลการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ โดยวิธีเพาะเลี้ยงแบบเขย่าตลอดเวลา และวางตั้งอยู่กับที่เป็นเวลา 1 เดือน โดยแสดงผลการเจริญและพัฒนาเป็นระดับคะแนน	33
5	แสดงผลการเจริญและพัฒนาของต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยแสดงผลเป็นระดับคะแนน	35
6	แสดงผลการตอบสนองของต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ แบบเขย่าและไม่เขย่าเป็นเวลา 1 เดือน โดยแสดงผลการเจริญและพัฒนาเป็นระดับคะแนน	37
7	แสดงการเจริญเติบโตของรากและยอดของสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS + IAA 5.0 mg/l) เป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งแสดงผลโดยการวัดความยาวของราก และยอดของสับปะรดก่อนที่จะทำการย้ายออกปลูก	39
8	แสดงจำนวนครั้งการรดน้ำที่มีผลต่อสับปะรดที่ย้ายออกปลูกครั้งแรก	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	embryoids type A ซึ่งได้จากการเลี้ยง embryoids ในอาหารเหลวสูตร MS นาน 2 สัปดาห์	42
2	embryoids ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นว่ามีการเจริญเป็น plantlets เพิ่มจากเดิมมาก	43
3	แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS นาน 2 สัปดาห์	44
4	แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + kinetin 0.2 mg/l นาน 2 สัปดาห์	45
5	แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + kinetin 0.5 mg/l นาน 4 สัปดาห์	46
6	แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + kinetin 1.0 mg/l นาน 4 สัปดาห์ และแสดงลักษณะของ embryoids type B	47
7	ลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + CW 15 % นาน 2 สัปดาห์	48
8	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ในระยะเวลาต่าง ๆ (a) 1 เดือน (b) ภายหลัง 1 เดือน (c) 2 เดือน	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9	แสดงผลการเปรียบเทียบ plantlets ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน	50
10	แสดง plantlets ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรชักนำให้เกิดราก พร้อมที่จะนำออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ	51
11	แสดงต้นสับปะรดที่ตั้งตัวได้แล้ว หลังจากนำออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำเป็นเวลา 1 เดือน	52
12	ต้นสับปะรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อย้ายปลูกในกระถางได้ 8 เดือน	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

สับปะรด (Ananas comosus (L.) Merr.) เป็นไม้ผลที่นับวันจะมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น เพราะนอกจากจะปลูกเพื่อจำหน่ายผลสดแล้ว ยังสามารถส่งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อแปรรูปเป็นอาหาร เช่น สับปะรดกระป๋อง และผลิตภัณฑ์สับปะรดอื่น ๆ ซึ่งปัจจุบันอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องภายในประเทศมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ผลผลิตส่วนใหญ่ส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศซึ่งประเทศไทยสามารถส่งออกได้เป็นอันดับ 1 ของโลก แต่การปลูกสับปะรดเพื่อส่งโรงงานนั้น ยังประสบปัญหาอยู่มากเกี่ยวกับคุณภาพที่ยังไม่สม่ำเสมอ เช่น มีแกนขนาดใหญ่เกินไป เป็นต้น ซึ่งปัญหาเหล่านี้จะสามารถแก้ไขได้โดยการปรับปรุงพันธุ์ให้มีรูปร่างคุณภาพของเนื้อ ความหวาน และสี ให้ได้มาตรฐานสม่ำเสมอ รวมทั้งมีแกนขนาดเล็ก ซึ่งปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการนำพันธุ์ที่ดีเข้ามาจากต่างประเทศ เช่น ฮาวาย และฟิลิปปินส์ เป็นต้น ซึ่งเมื่อได้พันธุ์สับปะรดที่ดีเหมาะกับความต้องการของโรงงานแล้ว ก็จำเป็นจะต้องมีวิธีการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้จำนวนต้นที่มากพอที่จะปลูกเพื่อส่งผลป้อนโรงงาน แต่การขยายพันธุ์สับปะรดที่นิยมโดยทั่วไปเป็นแบบไม่ใช้เพศโดยใช้ส่วนต่าง ๆ เช่น จุก หน่อ และตะเกียง ซึ่งวิธีนี้จะสามารถผลิตต้นได้เพียง 2 ต้นจากต้นแม่ 1 ต้น จึงต้องใช้เวลานานหลายปีกว่าจะได้จำนวนต้นสับปะรดมากเพียงพอที่จะปลูกในพื้นที่ 1 ไร่ แม้ว่าได้มีการขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีการตัดแบ่งชำลำต้นจะได้ผลดี คือ สามารถผลิตต้นสับปะรดได้ 25 ต้นต่อปี จากต้นแม่ 1 ต้น (จารุพันธ์, 2526) แต่การเพิ่มจำนวนสับปะรดทั้ง 2 วิธีนี้ มีอัตราการเพิ่มที่ช้ามาก ไม่สามารถที่จะทำให้ได้ต้นสับปะรด clone เดียวกันจำนวนมากเพียงพอ ที่จะใช้ปลูกในระยะเวลาอันสั้น

ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาถึงการขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งในต่างประเทศได้รับความสำเร็จเป็นที่น่าพอใจ ในประเทศไทยได้มีผู้ศึกษามาบ้างแต่ไม่มากนัก ซึ่งวิธีนี้จะเป็นประโยชน์มากเมื่อใช้ร่วมกับการผสมพันธุ์พืช ซึ่งจะทำให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะพันธุกรรมคงเดิมในเวลาอันรวดเร็ว อาจกล่าวได้ว่าการขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้สามารถได้ต้นสับปะรด clone เดียวกันอย่างน้อยที่สุด 5,000 ต้น จาก 1 จุกภายใน 12 เดือน (Zepeda and Sagawa, 1981) หรืออาจจะสามารถผลิตได้ถึง 2 ล้านต้น จากตา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มต้นเพียง 1 ตา ภายในเวลา 2 ปี (Pannetier and Lanaud, 1976) ซึ่งนับว่าเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนพันธุ์ดี clone เดียวกันได้ระยะเวลาอันสั้น และมากเพียงพอที่จะใช้ปลูกเพื่อส่งผลป้อนโรงงาน จากความสำคัญดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาถึงวิธีการขยายพันธุ์สับปะรดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการขยายพันธุ์สับปะรดเพื่อเป็นอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

ศึกษาถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดเพื่อ

1. เพิ่มจำนวน embryoids
2. ชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาเป็นต้นแขนง (plantlets)
3. ชักนำให้ต้นแขนงเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

สับปะรด (Ananas comosus (L.) Merr.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจำพวกไม้เนื้ออ่อนที่มีอายุหลายปี (herbaceous perennial monocotyledonous plant) เช่นเดียวกับไม้ผลเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่ง สับปะรดจัดอยู่ในวงศ์ Bromeliaceae ซึ่งจัดเป็นวงศ์ใหญ่ประกอบด้วยพืชถึง 2,000 ชนิดโดยประมาณ (จารุพันธ์, 2526)

แหล่งกำเนิดดั้งเดิมของสับปะรดอยู่ในบริเวณตอนกลางและตอนใต้ของบราซิล ตอนเหนือของอาร์เจนตินา และปารากวัย (จารุพันธ์, 2526) ส่วนใหญ่พืชในวงศ์นี้จะพบตามสภาพธรรมชาติของมันแถบโซนร้อนและกึ่งร้อนของทวีปอเมริกา เช่น มอสสเปน (จารุพันธ์, 2526)

เราอาจแบ่งสับปะรดออกจากพืชสกุลอื่น ๆ ได้โดยถือเอาลักษณะของผลซึ่งเป็นแบบ Syncarpous type (ผลประกอบด้วย carpel เชื่อมกัน) เป็นลักษณะที่ไม่พบในพืชสกุลอื่น ๆ (จารุพันธ์, 2526)

สับปะรดที่ปลูกเป็นการค้าทั่วโลกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่ม Cayenne กลุ่ม Queen กลุ่ม Spanish กลุ่ม Abacaris และกลุ่ม Maipure (จารุพันธ์, 2526) สับปะรดในกลุ่ม Cayenne นี้เหมาะแก่การส่งเข้าบรรจุกระป๋องและบริโภคสด สับปะรดในกลุ่มนี้อาจแยกเป็นพันธุ์ย่อย (Sub-varieties) ออกไปได้อีกตามแต่ท้องถิ่นที่ผลิตเป็นการค้า ในประเทศไทยมีพันธุ์ ปัตตาเวีย พันธุ์นางแลหรือพันธุ์น้ำผึ้ง นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น St. Michael พันธุ์ Cayenne Lisse ซึ่งมีผลใหญ่แต่จุกเล็กกว่าพันธุ์ Cayenne ที่ปลูกในแอฟริกาใต้และคีนยา (จารุพันธ์, 2526)

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (Smooth Cayenne; Sarawak; kew) นับเป็นพันธุ์เดียวที่มีผู้ปลูกกันเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง สับปะรดนี้มีใบสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านบนเป็นมันเงา ขอบใบเรียบ กลางใบมักมีสีแดงอมน้ำตาล ปลายใบมีหนามเล็กน้อยหรืออาจมีหนามที่ขอบใบด้วย ช่อดอกมีดอกย่อยโดยเฉลี่ยประมาณ 150 ดอก กลีบดอกมีสีม่วงอมน้ำ-เงิน ผลมีขนาดและรูปทรงแตกต่างกันไป น่าสังเกตุว่าหากผลมีขนาดใหญ่มากจะมีรูปทรงโคนใหญ่ปลายเรียว แต่หากเป็นผลเล็กก็มักมีทรงกลม ป้อมหรืออาจเป็นทรงกระบอก เปลือกผลสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขียวปนดำเมื่อแก่ หรืออาจมีสีเหลืองอมส้มเมื่อแก่จัด ตาตื้น เนื้อในของผลสีเหลืองอ่อนหรือเหลืองเข้มในฤดูร้อน (จารุพันธ์, 2526)

ม.ล. จารุพันธ์ ทองแถมและผู้ร่วมงาน (2519) รายงานว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียเป็นพันธุ์ที่เหมาะสำหรับการบรรจุกระป๋อง แต่ก็มีข้อบกพร่องที่ควรปรับปรุงให้ดีขึ้นในเรื่องสีของเนื้อซึ่งยังไม่สม่ำเสมอกันทั้งผล แกนมีขนาดใหญ่กว่ามาตรฐานและกลิ่นอ่อนเกินไป

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (Cayenne variety)

1. ลำต้น (stem) ประกอบด้วยปล้องสั้น ๆ และใบมากมาย ส่วนตาจะติดอยู่ที่ลำต้นในบริเวณโคนใบทั่ว ๆ จะมีความยาว 20-35 เซนติเมตร ขึ้นกับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์

2. ก้านผล (peduncle) เป็นก้านพยุงผลซึ่งมีใบเล็ก ๆ ติดอยู่เชื่อมติดกับส่วนบนของลำต้น อาจมีตาเล็ก ๆ พักตัวอยู่ ซึ่งถ้าสภาพเหมาะสมจะพัฒนาไปเป็นตะเกียง (slip) (จารุพันธ์, 2526)

3. ใบ (leaf) สับปะรดมีใบเป็นแบบ lanoceolate (เกษม, 2522) รูปร่างแคบเรียวยาว ตอนกลางใบมีลักษณะเป็นร่องคล้ายรางน้ำติดกับก้านผลและลำต้น มีความยาวแตกต่างกันไป ภายในใบมีเซลพิเศษทำหน้าที่เก็บสำรองน้ำเอาไว้ใช้ในเวลาแห้งแล้ง ใต้ใบจะมีลักษณะเป็นร่องและสันพาดตามแนวยาว ในร่องจะเป็นที่ตั้งของปากใบซึ่งถูกปกคลุมด้วย trichromes ทำให้ช่วยลดการระเหยของน้ำจากปากใบ ทำให้ทนแล้งได้ดีกว่าพืชอื่น ๆ หลายชนิด จำนวนใบมีตั้งแต่ 50-100 ใบต่อต้นขึ้นอยู่กับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของต้น (จารุพันธ์, 2526)

4. ผล เป็นผลรวม (multiple fruit) ที่เกิดจากการเชื่อมติดกันของผลย่อย (จำนวนตั้งแต่ 100-200 ผล) เข้ากับแกนกลางของช่อดอก ผลสับปะรดทั่ว ๆ ไปมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.2 กิโลกรัม

5. จุก (crown) คือส่วนที่ใช้ขยายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายหน่อ เกิดบนส่วนยอดของผลใช้ปลูกขยายพันธุ์ได้ เป็นส่วนสำคัญในการแบ่งแยกสกุล Ananus ออกจากสกุลอื่น ๆ ในวงศ์ Bromeliaceae นอกจากสกุลสับปะรด (Ananus) แล้วจะไม่มีจุกที่แท้จริง (true crown) เลย ปกติจะมีจุกเดียว แต่บางพันธุ์อาจมีหน่อเล็ก ๆ แตกออกมาจากโคนจุกเดิม เราเรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุกตะเกียง หรือจุกย่อย (crown slips or crownlets)

6. ตะเกียง (slip) คือหน่อที่เกิดจากตาบนก้านผล มีจำนวนแตกต่างกันไป แล้วแต่พันธุ์ และความอุดมสมบูรณ์ของต้นแม่ ตะเกียงที่เกิดในบริเวณโคนผลเรียกว่า bassal slip

7. หน่อข้าง (Aerial sucker) คือหน่อที่เกิดจากตาบนลำต้น ปกติจะมี 2-3 หน่อ

8. หน่อดิน (underground sucker) เป็นหน่อที่เกิดจากตาบนลำต้นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน มีจำนวนน้อย รูปทรงเล็กเรียว ใบยาวกว่าหน่อข้าง

9. หน่ออุ้มลูก (hapas) คือหน่อที่เกิดจากตาในบริเวณจุดเชื่อมระหว่างก้านผลและลำต้น ปกติจะมี 1-2 หน่อ

10. ราก แบ่งได้เป็น 2 พวก คือ รากเหนือดินซึ่งอยู่ตามลำต้นในกาบใบ และรากในดินซึ่งเกิดจากลำต้นใต้ดิน ทำหน้าที่หาอาหารและยึดเหนี่ยวลำต้น

ส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดที่ใช้ในการขยายพันธุ์

นอกจากงานปรับปรุงพันธุ์ซึ่งต้องขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดแล้ว สับปะรดมักจะขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ โดยใช้ส่วนต่าง ๆ ของลำต้น (Rangan and Mathews, 1981)

ส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดที่อาจใช้ในการขยายพันธุ์ได้ มีดังต่อไปนี้ คือ

ก. หน่อดิน (suckers) เกิดจากตาที่อยู่ในบริเวณลำต้นในบริเวณลำต้นใต้ดิน ซึ่งจะเริ่มแทงขึ้นมาพ้นผิวดิน หลังจากเกิดการสร้างดอกแล้ว

ข. หน่อข้าง (shoots) เกิดจากตาที่พักตัวอยู่บนลำต้นในบริเวณโคนใบ หน่อข้างเหล่านี้จะมีน้ำหนักตั้งแต่ 0.5-1 กิโลกรัม ให้ผลเมื่อมีอายุ 14-18 เดือน

ค. ตะเกียง (slips) เกิดจากตาบนก้านผลที่อยู่ในบริเวณโคนผล ตะเกียงมีน้ำหนักเฉลี่ยทั่วไปตั้งแต่ 0.3-0.5 กิโลกรัม ให้ผลเมื่อมีอายุ 20 เดือน

ง. จุก (crown) เติบโตขึ้นเหนือผลสับปะรดหลังจากดอกโรยไปแล้ว จุกจะมีน้ำหนักทั่วไปตั้งแต่ 0.075-0.2 กิโลกรัม ให้ผลตามธรรมชาติเมื่ออายุ 22-24 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(จารุพันธ์, 2526)

อัตราเฉลี่ยของการผลิตส่วนขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศในสับปะรดพันธุ์ Cayenne นี้จะได้ประมาณ 2 ต้น/ปี เพราะฉะนั้นต้องใช้เวลาประมาณ 30 ปีจึงจะสามารถผลิตส่วนขยายพันธุ์เหล่านี้ได้เพียงพอสำหรับปลูกในพื้นที่ 1 เฮกแตร์ จากต้นแม่หนึ่งต้น (Rangan และ Mathew, 1981)

การขยายพันธุ์ดังกล่าวนั้นในบางกรณีที่หาหน่อพันธุ์ได้ยาก มีราคาแพงหรือในกรณีที่ต้องการขยายพันธุ์สับปะรดที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว (Selected clone) ให้ได้ปริมาณมากที่สุดในระยะเวลาสั้นที่สุด ก็อาจใช้วิธีการขยายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น

- วิธีชำตอ
- วิธีตัดแบ่งชำลำต้น (Stem or stump section method) ซึ่งจะได้ต้นสับปะรดใหม่ถึง 25 ต้นต่อลำต้นแม่เพียงหนึ่งต้น (จารุพันธ์, 2526)
- วิธีที่สามารถขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศได้อย่างรวดเร็ววิธีหนึ่ง คือการตัดตาที่โคนลำต้นแม่มาปลูกในเรือนเพาะชำในที่ร่ม ตาบางส่วนจะเจริญเติบโตเป็นต้นเล็ก ๆ พร้อมด้วยรากและจะโตเต็มที่จนให้ผลผลิตในเวลา 2.5-3 ปี (Macluskie, 1939; Purseglove, 1972)
- วิธีตัดแบ่งชำจุก โดยการนำหน่อหรือจุกสับปะรดมาผ่าตามยาวและนำไปชำในกระบะ แต่วิธีการนี้ปรากฏว่าการผ่าแบ่งจุกยิ่งมากชิ้นหรือหากขนาดของชิ้นส่วนขยายพันธุ์ยิ่งเล็กลงก็ยิ่งทำให้ความสูงของหน่อ น้ำหนักหน่อและความยาวของรากที่เกิดขึ้นยิ่งลดลง เปอร์เซนต์รอดของชิ้นส่วนขยายพันธุ์จะเริ่มลดลง การผ่าแบ่งออกเป็น 4 ชิ้นต่อจุกจะเป็นวิธีการที่ดีที่สุดโดยให้เปอร์เซนต์รอดของชิ้นส่วนขยายพันธุ์กับปริมาณหน่อที่ได้สูง และเหมาะที่จะใช้ในการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณหน่อเป็นจำนวนมาก ๆ (พิสมัย และอังสนา, 2522)

<u>การขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

การขยายพันธุ์พืชสามารถกระทำได้หลายวิธีดังได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว แต่วิธีการขยายพันธุ์ที่จะทำให้ได้ต้นที่สม่ำเสมอทางพันธุกรรมสูง และผลิตต้นกล้าให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถกระทำได้โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue Culture) ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระทำได้เป็นผลสำเร็จแล้วในพืชหลายชนิด (Murashige และ Skoog, 1962; Vacin และ Went, 1949)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture) หมายถึงเทคนิคการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะพืช เนื้อเยื่อ เซล หรือโปรโตพลาสมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยเกลือ แร่ธาตุ น้ำตาล และไวตามิน ในสภาพปลอดเชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง (อรดี, 2522)

การขยายพันธุ์สัปปะรดโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ ในต่างประเทศประสบผลสำเร็จเป็นที่น่าพอใจ จึงน่าจะศึกษาการขยายพันธุ์สัปปะรดโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนำมาใช้เป็นการค้า (Mapes, 1973; Murashige, 1977 และ Teo, 1975)

<u>ชิ้นส่วนเริ่มต้น (Explants)</u>

ชิ้นส่วนเริ่มต้น (Explants) ในการขยายพันธุ์สัปปะรดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ Aghion และ Beauchesne (1960) ได้ใช้ตาข้างที่ได้จากจุกของสัปปะรด พบว่าเกิด plantlets (ต้นแขนง) จำนวนเล็กน้อย Mapes (1973) ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงส่วนของ shoot tip ซึ่งจะได้ Protocorm - like bodies และต้นแขนงจำนวนมาก Lakshmi Sita etal (1974) ใช้ตายอดของจุกในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสามารถได้ต้นแขนงจากตายอดเหล่านี้ โดยต้นแขนง 1 ต้นจากตายอดแต่ละตาเท่านั้น Jones และ และ Murashige (1974) ได้รายงานถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อบรอมมีเลียดชนิดหนึ่ง คือ <u>Aechmea fasciata</u> Baker และสัปปะรดอื่น ๆ โดยเริ่มต้นจากการตัดเอาตาข้างที่โคนลำต้นแม่มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ พบว่าประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี Teo (1975) ได้ใช้ meristem tissue หรือเนื้อเยื่อเจริญจากตายอดหรือตาข้างของสัปปะรดมาเลี้ยงในอาหารแข็งหรืออาหารเหลว ทำให้ได้กลุ่มเซลและต้นอ่อนที่มีรากสามารถนำออกปลูกได้ นอกจากนี้ การใช้ใบที่ตัดออกมาจากต้นอ่อนนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ พบว่ายังคงมีการพัฒนาเป็น Callus และสามารถเกิด plantlets ขึ้นใหม่ได้ (Mathews และ Rangan, 1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการรายงานของ Wakasa (1978) พบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นต่าง ๆ เช่น Young syncarp, axillary bud จากหน่อข้าง ตะเกียง จุกเล็ก ๆ และตะเกียงเล็ก ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเกิดก้อนที่คล้ายกับ Protocorm like bodies ที่คล้ายกันแต่ต่อมา plantlets จะแสดงความแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างหลายประการที่เกิดขึ้น เช่น หนาม สีของใบ Wax ที่เคลือบผิวใบ และความหนาแน่นของใบมีความสัมพันธ์กับชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาใช้ โดย syncarp และตะเกียงมีการพัฒนาที่แตกต่างกันอย่างมาก แต่จุกและ axillary bud มีความแตกต่างอย่างมีขอบเขตจำกัด สำหรับในประเทศไทยนั้น สุวรรณา (2521) ได้ทดลองใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ จุก หน่อ pith ใบ และ stem section จาก pure culture พบว่าที่ให้ผลดี คือ จุกและหน่อที่มีส่วนของ apex และ stem section จาก pure cultrue ส่วน pith และใบไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เลย ส่วนสะอาด (2525) ได้ใช้ส่วนตาข้างที่ได้จากจุกของสับปะรดแคระ (Ananas nanus) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ พบว่าประสบความสำเร็จ คือได้ต้นพืชเพิ่มขึ้นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นเช่นเดียวกัน อาจกล่าวได้ว่าการขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้สามารถได้ต้นพืชจำนวนอย่างน้อยที่สุด 5000 ต้นจากจุกเริ่มต้นเพียง 1 จุกในเวลา 12 เดือน (Zepeda และ Sagawa, 1981) หรืออาจจะเป็นไปได้ที่จะสามารถผลิตได้ถึง 2 ล้านต้นจากตาเริ่มต้นเพียง 1 ตาภายในเวลา 2 ปี (Pannetier และ Lanaud, 1976)

การทำความสะอาดชิ้นส่วนของพืช

การใช้สารเคมีในการทำความสะอาดชิ้นส่วนของสับปะรดก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของชิ้นส่วน Teo (1975) ได้ใช้ sodium hypocorite ความเข้มข้น 0.1 % และ 5 % ครั้งละ 10 นาที พบว่าให้ผลดีที่สุด ส่วนสอาด (2525) นำตาข้างจากจุกสับปะรดทำความสะอาดโดยใช้ clorox 10 % แช่ย่านาน 10 นาที แล้วย้ายลงใน clorox 1 % เวลานาน 30 นาที พบว่าให้ผลที่ดีเช่นกัน และใช้สารช่วยให้น้ำยาสัมผัสชิ้นส่วน (Wetting agent) ร่วมกับสารฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(sterilizing agent) เช่น Teepol หรือ Tween-20 นั้นเพื่อช่วยให้พื้นผิวของชิ้นส่วนพืชสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อได้ดียิ่งขึ้น มีผลทำให้การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชได้ผลดียิ่งขึ้น

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อและสภาพของอาหาร

ตามปกติแล้วอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไป จะประกอบไปด้วยองค์ประกอบหลักคือ ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน วิตามินต่างๆ กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulators) เช่น Auxin ได้แก่ IAA, IBA, NAA, 2.4-D ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของราก และ Cytokinin ช่วยกระตุ้นการเติบโตของยอด ได้แก่ Benzyl adenine, kinetin เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีน้ำ และสารอินทรีย์ที่ไม่ทราบองค์ประกอบแน่นอน (Natural complex) เช่น สารที่สกัดจากยีสต์, น้ำมันฝรั่ง และน้ำมะพร้าว เป็นต้น (สุรวิช, 2529)

อาหารสังเคราะห์ที่ใช้มีหลายสูตร ทั้งสภาพอาหารแข็งซึ่งใส่วุ้น และอาหารเหลว ซึ่งอาหาร และสภาพอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป แต่สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดนั้น Teo (1975) ได้ทำการเลี้ยงชิ้นส่วนเริ่มแรก (explants) ในวุ้นอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog ซึ่งเติม 2,4-D และ kinetin ลงไป 10 ppm. และ 5 ppm. ตามลำดับ หรือเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 10 % ซึ่งจะทำให้เกิดกลุ่มเซลและต้นอ่อนจำนวนมาก

Zimmer และ Pieper (1976) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างจากหน่อของไม้สกุล Aechmeas ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับสับปะรดในอาหารเหลวสูตร Knudson-C เติม BA 1 mg/l และ NAA 1 mg/l โดยมี Bleeding sap ของต้น Birch 10 % โดยปริมาตร ซึ่งทำให้เกิดการสร้าง callus และต้นแขนงขึ้นเช่นเดียวกัน แต่เมื่อย้ายลงไปในอาหารที่มี BA จะเกิดการสร้างรากขึ้น

วารุณี (2522) เลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของสับปะรดแคระ (Ananas ananassoides

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Var. nanus) ในอาหารสูตร Murashige and Skoog macronutrients, Nitsch micronutrients และ Nitsch organic addenda ซึ่งเติม BA 1 mg/l หรือเติม IAA 1 mg/l ชักนำให้เกิดต้นแขนงได้ดีที่สุด

Rangan and Mathews (1981) ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของจุกบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม NAA 9.7 M, IBA 9.8 M และ kinetin 9.3 M พบว่ามีการพัฒนาและเพิ่มจำนวนขึ้น และเมื่อย้ายลงในอาหารสูตร MS เติมด้วย NAA 0.96 M และ IBA 1.96 M จะเหนี่ยวนำให้เกิดราก สามารถย้ายปลูกได้

ส่วนการเกิด callus นั้น Rangan and Mathews (1981) ได้พบว่าเมื่อย้ายหน่อของสับปะรดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมด้วย NAA 29.0 M, IAA 29.7 M และ kinetin 9.8 M พบว่าเกิด callus ขึ้นที่ส่วนฐานของชิ้นส่วนเริ่มต้น และเมื่อเลี้ยง callus ที่ได้บนอาหารสูตร MS ที่ผสมด้วย NAA 57.0 uM, CW 15% และ CS 400 mg/l callus ที่ได้จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากมาย ยอดที่เกิดขึ้นใหม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดรากได้เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Modified WH ที่เติมด้วย NAA 0.27 M และ IBA 1.9 M จนสามารถย้ายปลูกบนดินได้ (Rangaswamy, 1961)

น้ำมะพร้าวจัดเป็น Natural complex ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วย myo-inositol, 1,3-diphinyl urea, leucoanthocyanin และ arabinose ester of idoleacdtic acid (IAA-arabinose) สุวรรณา(2521)เลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย MS macronutrients, Nitsch micronutrient และ Nitsch organic addenda ซึ่งเติมด้วย NAA 0-0.1 ppm. kinetin 0-1.0 ppm. BA 0-0.5 ppm. และIAA 0-1.0ppm. เติมหรือไม่เติมน้ำมะพร้าว ส่งเสริมให้มี embryoids และ callusเกิดขึ้น embryoids และ callus เจริญเป็น plantlets เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดียวกันและ plantlets นี้เมื่อถูกย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร White หรือ MS macronutrient หรือ Nitsch micronutrient และ Nitsch organic addenda ซึ่งเติม 2-10 ppm IAA หรือ 0.1 ppm NAA เติมหรือไม่เติมน้ำมะพร้าวทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดรากได้ดี

Zepeda and Sagawa (1981) เลี้ยงส่วนตาข้างที่ได้จากจุกของสับปะรดในอาหารเหลว MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 25 % เป็นเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เติม 0.5-1.0 mg/l มีการชักนำให้เกิดต้นแขนงขึ้น แสดงให้เห็นว่าน้ำมะพร้าวก็มีส่วนส่งเสริมหรือชักนำให้เกิดต้นแขนงขึ้นได้

Mathew และ Rangan (1981) ได้รายงานถึงผลการทดลองที่ได้ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของจุกสับปะรด (Ananas comosus) ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1.8 mg/l, IBA 2 mg/l และ kinetin 2.1 mg/l มีการชักนำให้เกิดต้นแขนงจำนวนมาก จะเห็นได้ว่าระดับของ NAA และ kinetin ที่ใช้สูงกว่างานที่กล่าวข้างต้น มีการใช้ IBA ร่วมด้วย ต้นแขนงที่เกิดขึ้นเมื่อย้ายลงในอาหารที่มี NAA 0.05-0.18 mg/l และ IBA 0.4 mg/l มีการชักนำให้เกิดรากได้ดีเช่นเดียวกัน

จากรายงานดังกล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่ามีผู้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อของสับปะรดในอาหารสูตรต่างๆกัน และสภาพอาหารที่แตกต่างกันมีทั้งที่ประสบผลสำเร็จในการเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลว สำหรับการเลี้ยงในอาหารเหลวนั้น สุวรรณา (2521) พบว่าการเพิ่มปริมาณของ embryoids ในอาหารเหลวมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็งและการเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดในอาหารเหลวที่มีการเขย่า flasks ที่ทำการเพาะเลี้ยงระหว่างการเจริญเติบโต พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ callus และต้นแขนงได้เร็วและมากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวในสภาพ Stationary โดยให้ชิ้นส่วนของพืชแช่อยู่ในอาหาร (Rangan and Mathews, 1981)

Mathews and Rangan(1979) พบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อของสับปะรดในอาหารเหลวนั้นการเขย่า flasks ที่เพาะเลี้ยงระหว่างการเจริญเติบโตเป็นสิ่งที่จำเป็นและสำคัญในการเพิ่มจำนวนของต้นที่ได้และการเป็นรูปเป็นร่างของต้นอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงโดยการเขย่า flasks มีจำนวน multiple shoot 62 ส่วน ในการแช่ชิ้นส่วนพืชในอาหารที่มีจำนวน multiple shoot 26 จึงเห็นได้ว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดในอาหารเหลวที่เขย่าจะสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (Rangan and Mathew, 1981)

<u>ขั้นตอนในการดำเนินการเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด</u>

Murashige (1977) ได้แบ่งขั้นตอนในการเลี้ยงเนื้อเยื่อออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียม Tissue พืชที่มีชีวิตให้ปราศจากจุลินทรีย์และเลี้ยงในอาหารให้มีชีวิตอยู่รอด และอาจมีการเจริญเติบโตและพัฒนา

2. การเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ อวัยวะ embryo และโครงสร้างอื่น ๆ ที่สามารถเจริญไปเป็นต้นพืชได้

3. การเตรียมต้นพืชก่อนที่จะย้ายปลูกลงดิน

ส่วนขั้นตอนต่างๆในการขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Mapes (1973) และ Teo (1975) มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. เลี้ยงชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดการมีชีวิตในอาหารแข็ง (Teo, 1975) หรืออาหารเหลว (Mapes, 1973)

2. มีการเกิดและการเพิ่มจำนวนของ callus, callus like tissue, Protocorm like bodies (Mapes, 1973; Teo, 1975) หรือ adventitios shoots (Murashige, 1977)

3. ชักนำให้เกิดการพัฒนาและเพิ่มจำนวนของ plantlets

4. ชักนำให้เกิดราก เป็นต้นที่สมบูรณ์ย้ายออกปลูกได้

การเจริญของชิ้นส่วนพืชหลังจากนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

อรดี(2522) ได้กล่าวถึงลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนพืช หลังจากที่ได้นำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งมีลักษณะการเจริญเป็น 3 แบบด้วยกันคือ

(1) เจริญเป็น "ต้น" ที่มีรากโดยตรงหรือบางทีมีดอกเรียกว่าเกิด "Organo-genesis"

(2) เจริญเป็น "callus" ซึ่งเป็นกลุ่มเซลที่มีเซลส่วนใหญ่เป็น "Parenchyma cell" ที่ยังไม่ differentiate ไปเป็นต้นหรือราก แต่ก็สามารถทำให้เกิดต้นได้

(3) เจริญเป็น "embryoids" ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับ embryo ที่ได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

zygote ซึ่งเรียกว่า "Zygotic embryo" แต่ embryoid นั้นได้มาจาก "Somatic cell" จึงเรียกว่าเป็น "Somatic embryo" ซึ่งจะเจริญเป็นต้นและมีรากต่อไป

ประโยชน์ในการขยายพันธุ์สับปะรดโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Teo (1975) ได้กล่าวถึงประโยชน์ของการขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ดังนี้

1. การขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีนี้สามารถทำในห้องปฏิบัติการได้ และทำให้ได้สับปะรดจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น

2. ต้นสับปะรดที่ได้มีคุณภาพแน่นอน คือ มีลักษณะเหมือนต้นที่ทำการคัดเลือกแล้ว

3. ต้นสับปะรดที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะใช้พื้นที่ในเรือนเพาะชำในการตั้งตัวน้อยกว่าการผลิตโดยวิธีธรรมดา

4. การขยายพันธุ์สับปะรดโดยวิธีนี้ใช้ส่วนขยายพันธุ์เพียง 1 หน่อหรือ 1 จุก ก็สามารถได้ต้นพืชถึงล้าน ๆ ต้น

5. ต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำไปปลูกได้เลยเมื่อนำออกมาจากเรือนเพาะชำ

6. ประหยัดค่าใช้จ่ายในการขนส่ง และสามารถขนส่งได้สะดวกกว่าการขนส่งหน่อธรรมดา

7. มีประโยชน์ในแง่การปรับปรุงพันธุ์สับปะรดโดยเฉพาะในการ hybrid embryo callus ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจ (Wakasa, 1979)

8. เทคนิคนี้เป็นวิธีที่ทำให้ได้พืชลูกผสมจำนวนมากมาย จาก one single hybrid embryo (Murashige, 1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง คือ ต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งทำไว้เมื่อประมาณเดือนกรกฎาคม 2531
2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
   2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS/(Murashige and Skoog, 1962)
   2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่
   - Kinetin (6- furfurylamino - purin)
   - IAA (indol - 3 - acetic acid)
   2.3 น้ำมะพร้าว
   2.4 น้ำตาลทราย
   2.5 วุ้นผง
   2.6 น้ำกลั่น
   2.7 ผงคาร์บอน
3. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารประกอบด้วย เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดแก้วสำหรับใส่อาหารพร้อมฝาปิด เครื่องชั่งหยาบ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (PH meter) และหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
4. สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ ได้แก่ เอทธิลแอลกอฮอล์ คลอรอกซ์ และ สารเปียกใบ (Teepol)
5. เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) และเครื่องมือที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และจานแก้ว (Petri-dish)
6. เครื่องเขย่า (shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 25-28°c ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงและไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง ควบคุมการปิดเปิดด้วยเครื่องอัตโนมัติ (timer) มีความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์

8. อุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายปลูกต้นสับปะรดได้แก่ ตะกร้าหรือกระบะเพาะชำ เครื่องปลูก เช่น ทราย ดิน ขี้เถ้าแกลบ ขุยมะพร้าว เม็ดโฟม ฯลฯ กระถางดินเผาขนาด 8 นิ้ว สารเคมีกำจัดเชื้อรา เป็นต้น

9. อุปกรณ์ถ่ายภาพได้แก่ กล้องถ่ายรูป ไฟ และอุปกรณ์อื่น ๆ

MS/ รายละเอียดอาหารสูตร Murashige and Skoog แสดงในภาคผนวก ตารางที่ 1, 2 และ 3

วิธีการ

1. การเพิ่มจำนวน embryoids และต้นแขนง (plantlets) เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

นำ embryoids และต้นแขนงจากขวดในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + kinetin 1 mg/l ไม่ใส่วุ้น วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการตัดแบ่ง (subculture) ไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมต่อไป

2. ศึกษาสูตรอาหารและระดับฮอร์โมนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มจำนวน embryoids และการพัฒนาของ plantlets

หลังจากทำการเพิ่มจำนวน embryoids และต้นแขนงจนได้มากเพียงพอแล้ว นำ embryoids ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ จำนวนสูตรละ 10 ขวด (ซ้ำ) ดังนี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 1 1/2 MS

สูตรที่ 2 MS

สูตรที่ 3 MS + kinetin 0.25 mg/l

สูตรที่ 4 MS + kinetin 0.50 mg/l

สูตรที่ 5 MS + CW 15 %

นำไปเลี้ยงโดยวางบนเครื่องเขย่า

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการย้าย embryoids ทั้งหมดที่ได้ลงในอาหารสูตรเดิม และเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 2 สัปดาห์ ทำการบันทึกผลการเจริญและการพัฒนาของ embryoids หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ embryoids และบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

3. ศึกษาการเจริญและการพัฒนาของ embryoids ในสภาพอาหารแข็ง

นำ embryoids ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในข้อ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกับข้อ 2 (ยกเว้นสูตรที่ 1 และ 6 ซึ่งไม่ได้นำมาใช้ในการทดลอง) เติมวุ้นลงในอาหารจำนวน 6 กรัม/ลิตรและผงคาร์บอน จำนวน 0.5 g/l ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลการเจริญและการพัฒนาที่เกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 1 เดือน ตามลำดับ

4. ศึกษาถึงระดับความสูงของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของ embryoids

นำ embryoids ที่ได้จากข้อ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับข้อ 2 โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ทำการทดลองกลุ่มละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยง embryoids ในอาหารเหลวที่มีปริมาณอาหาร 10 ml/ขวด และมีระดับความสูงของอาหาร ประมาณ 1 ซม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100535

กลุ่มที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยง embryoids ในอาหารเหลวสูตรเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่ปริมาณอาหาร 3.0 ml/ขวด และมีระดับของอาหารบางมากคล้ายแผ่นฟิมล์ นำไปเลี้ยงโดยวางบนเครื่องเขย่า หลังจากที่ได้เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกผลการเจริญและการพัฒนาของ embryoids ในอาหารสูตรต่าง ๆ ทั้ง 2 กลุ่ม โดยบันทึกเป็นระดับคะแนนดังนี้

\+ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนาน้อยมาก

++ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนาปานกลาง

+++ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนามากที่สุด

5. ศึกษาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการเจริญและการเกิดของ embryoids ในอาหารเหลว

นำ embryoids ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในข้อ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 2 (ยกเว้น สูตรที่ 6) โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม ทำการทดลอง กลุ่มละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 embryoids มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณอาหาร 10 ml/ขวด แล้วนำไปเลี้ยงโดยวางบนเครื่องเขย่าตลอดเวลา

กลุ่มที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยง embryoids เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่นำขวดที่ทำการเพาะเลี้ยงไปตั้งวางไว้บนชั้นวางขวด โดยไม่มีการเขย่า (stationary) หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวดังกล่าวเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกผลการเจริญและพัฒนาของ embryoids ในอาหารสูตรต่าง ๆ ทั้ง 2 กลุ่ม โดยบันทึกผลเป็นระดับคะแนนดังนี้

\+ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนาน้อยมาก

++ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนาปานกลาง

+++ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนามากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นแขนง

นำต้นแขนงที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในข้อ 1 มีความสูงจากโคนต้นถึงปลายใบประมาณ 2.5 ซม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ โดยเติมวุ้นจำนวน 6 กรัม/ลิตร ดังนี้

สูตรที่ 1 MS

สูตรที่ 2 MS + kinetin 0.25 mg/l

สูตรที่ 3 MS + kinetin 0.50 mg/l

สูตรที่ 4 MS + kinetin 1.00 mg/l

เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตและการพัฒนาของราก และส่วนยอด บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น นับจำนวนราก ความยาวของราก และส่วนยอดหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 เดือน และ 2 เดือน ตามลำดับ

7. ศึกษาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของต้นแขนงในอาหารเหลว

นำต้นแขนงที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในข้อ 1 ที่มีความสูงจากโคนต้นถึงปลายใบประมาณ 2.5 ซม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 2 แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ทำการทดลองกลุ่มละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงต้นแขนง (plantlets) ในอาหารเหลวที่มีปริมาณอาหาร 10 ml/ขวด แล้วนำไปเลี้ยงโดยวางบนเครื่องเขย่าตลอดเวลา

กลุ่มที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงต้นแขนงเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แล้วนำขวดที่ทำการเพาะเลี้ยงไปตั้งวางไว้บนชั้นวางขวดโดยไม่มีการเขย่า (stationary)

หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกผลการเจริญและการพัฒนาของต้นแขนงในอาหารสูตรต่าง ๆ ทั้ง 2 กลุ่ม โดยบันทึกผลเป็นระดับคะแนนดังนี้

\+ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนาน้อยมาก

++ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนาปานกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

+++ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนามาก

++++ มีการเพิ่มจำนวนและการพัฒนามากที่สุด

8. ศึกษาการเกิดราก

นำยอดขนาดประมาณ 5 ซม. จากขวดในสภาพปลอดเชื้อไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS + IAA 5.0 mg/l + วุ้น 6 g/l + ผงคาร์บอน 0.5 g/l หลังจากเลี้ยงไปได้ 1 เดือน นำต้นที่ได้ออกมาจากขวดและล้างวุ้นออกให้สะอาด แล้วทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตของรากและส่วนยอด โดยวัดความยาวของรากจากโคนต้นถึงปลายรากและวัดความยาวของส่วนยอดจากโคนถึงปลายใบ เป็นเซ็นติเมตรและหาค่าเฉลี่ย

9. ศึกษาการย้ายต้นออกปลูก

ใช้ต้นที่ได้จากการศึกษาการเกิดราก นำต้นมาล้างวุ้นออกให้สะอาด แล้วนำไปจุ่มในสารเคมีกำจัดราประเภทดูดซึม จากนั้นนำไปปลูกในวัสดุปลูกซึ่งประกอบด้วย ทราย : ถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปไว้ในตู้สำหรับเพาะชำที่คลุมด้วยพลาสติกป้องกันการสูญเสียความชื้น หลังจากเลี้ยงไปได้ 1เดือน ทำการย้ายต้นจากกระบะเพาะชำนำไปปลูกในกระถางปลูกขนาด 8 นิ้วที่บรรจุวัสดุปลูกซึ่งประกอบด้วย ทราย : ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : เปลือกถั่ว อัตราส่วน 1:1:1:1 แล้วนำไปไว้ในสภาพเรือนเพาะชำปกติเป็นเวลา 6 เดือน โดยให้ปุ๋ยสูตร 15:15:15 แบบเม็ดในระยะแรกที่ย้ายลงปลูกในกระถาง ฉีดพ่นยากันรา และยาป้องกันโรคโคนเน่าในระยะแรกของการย้ายปลูก ทำการบันทึกผลการเจริญตลอดระยะเวลาการปลูกและวัดความสูงของต้นจากโคนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด เมื่อต้นสับปะรดอายุได้ 8 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13795

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

<u>ระยะเวลาในการทดลอง</u>

เริ่มทำการทดลอง เดือน มีนาคม 2532

สิ้นสุดการทดลอง เดือน กุมภาพันธ์ 2533

<u>สถานที่ทดลอง</u>

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

<u>การศึกษาสูตรอาหารและระดับฮอร์โมนที่เหมาะสมสำหรับใช้เพิ่มจำนวน embryoids และการพัฒนาของ plantlets</u>

- ผลจากการนำเอา embryoids ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน ปรากฏว่ามีการเจริญและพัฒนาของ embryoids ดังตารางที่ 1

โดย embryoids ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

(1) embryoids type A เป็น embryoids ที่มีลักษณะไม่อวบน้ำ ไม่ติดกันเป็นก้อน แผ่กระจาย ขนาดเล็กมาก จำนวนมากมาย มีสีเหลืองอ่อน (เป็นกลุ่มเซลที่เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สามารถเขี่ยให้หลุดเป็นก้อนเล็ก ๆ ได้ง่าย ดังภาพที่ 1

(2) embryoids type B มีลักษณะติดกันเป็นก้อน แน่น อวบและฉ่ำน้ำ มีขนาดใหญ่ สีเขียวเข้มหรือเขียวสด ไม่แผ่กระจาย และจำนวนน้อยกว่า type A (กลุ่มเซลส่วนมากเกิดการพัฒนาเป็นก้อน) ดังแสดงในภาพที่ 6

(3) embryoids type C มีลักษณะอวบน้ำ ขนาดปานกลาง ติดกันเป็นก้อน สีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง จำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะกึ่งกลางระหว่าง type A และ type B จำนวนกลุ่มเซลที่พัฒนาเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงผลการเจริญและพัฒนาการของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	ระยะเวลา (สัปดาห์)	เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยที่วัดได้(ซม.)	ลักษณะการเจริญและการพัฒนา
1/2 MS	2	5.4	เป็น embryoids type A แต่ติดกันเป็นก้อนใหญ่ เพิ่มจำนวนจากเดิมมาก เจริญเป็น plantlets จำนวนมาก ลักษณะเห็นเป็นต้นเด่นชัด ใบสีเขียวสด สูงประมาณ 0.5 ซม. ไม่อวบน้ำ แต่แข็งแรง มีรากเกิดขึ้นมากกว่าสูตรอื่น
	4	7.5	embryoids เพิ่มขึ้นน้อยมาก
MS	2	5.6	ลักษณะเป็น embryoids type A มีจำนวนมาก บางส่วนมีการพัฒนาเป็น plantlets แต่มีขนาดเล็กมาก ไม่มีราก และมีบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่ไม่มากนัก
	4	7.5	embryoid ประมาณ 1 เท่าตัว มีการพัฒนาเป็น plantlets จำนวนมาก แต่มีขนาดเล็ก ไม่อวบน้ำ มีรากเกิดขึ้นเล็กน้อย
MS + Kinetin 0.25 mg/l	2	5.0	embryoids type A เพิ่มขึ้น บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีดำบ้างเล็กน้อย มีการเจริญเป็น plantlets สีเขียวสด ขนาดประมาณ 0.25 ซม. มีรากเกิดขึ้นเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ระยะเวลา (สัปดาห์)	เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยที่วัดได้(ซม.)	ลักษณะการเจริญและการพัฒนา
	4	6.5	embryoids เพิ่มขึ้นจากเดิม มีการเจริญเป็น plantlets จำนวนมากขึ้น ใบมีสีเขียวสด ขนาดประมาณ 0.3 ซม. มีรากเกิดขึ้นเล็กน้อย
MS + Kinetin 0.5 mg/l	2	4.5	ลักษณะเป็น embryoids type C จำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีการเจริญเป็น plantlets สีเขียวสด ลักษณะลำต้นและใบ อวบใบแข็งแรง มีรากเกิดขึ้นเล็กน้อย
	4	6.2	มีการเจริญไปเป็น plantlets มากขึ้น ลักษณะอวบน้ำ มีขนาดใหญ่ สูงประมาณ 0.7 ซม. มีรากเล็กน้อย ยาวประมาณ 0.2 ซม.
MS + Kinetin 1.0 mg/l	2	5.6	เป็น embryoids type B มีจำนวนน้อย แต่ขนาดใหญ่กว่าสูตรอื่น ลักษณะอวบน้ำ มีการพัฒนาเป็น plantlets จำนวนมาก ลักษณะอวบน้ำขนาดใหญ่แข็งแรง สีเขียวสด มีรากเล็กน้อย
	4	7.5	embryoids เพิ่มมากกว่าเดิม 1 เท่า มีการพัฒนาเป็น plantlets จำนวนมาก ขนาดใหญ่ อวบน้ำ แข็งแรงและติดกันเป็นก้อน ขนาดใกล้เคียงกับสูตร MS + Kinetin 0.5 mg/l รากเกิดขึ้นเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ระยะเวลา (สัปดาห์)	เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยที่วัดได้(ซม.)	ลักษณะการเจริญและการพัฒนา
MS + CW 15 %	2	4	มีการเจริญและพัฒนาน้อยกว่าสูตรอื่น ๆ embryoids เพิ่มขึ้นเล็กน้อย plantlets เกิดขึ้นน้อยมาก ลักษณะฉ่ำน้ำ สีเขียวเข้ม ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล และตายอย่างรวดเร็ว พบว่ามีการตายของ embryoids และ plantlets มากกว่าสูตรอื่น ๆ
	4	4.5	embryoids เพิ่มขึ้นเล็กน้อย plantlets เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

จากตารางที่ 1 พบว่า การเลี้ยง embryoids ในอาหารสูตร 1/2 MS สูตร MS และสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 mg/l. จะมีการเจริญและพัฒนาของ embryoids มากที่สุดใกล้เคียงกันคือมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยตั้งแต่ 5.4-5.6 ซม. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปได้ 2 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ แต่ลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ในอาหารทั้ง 3 สูตรนี้จะแตกต่างกันคือ embryoids ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS จะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว มีลักษณะเป็น embyroids type A แต่จะติดกันเป็นก้อน จำนวนมากมาย และ มีการพัฒนาเป็น plantlets ที่แข็งแรงได้ในระยะเวลาสั้นกว่าสูตรอื่น ๆ plantlets ที่ได้มีลักษณะเรียวเล็กแต่สูงและแข็งแรง มีรากออกมากกว่าสูตรอื่น ๆ ส่วน embryoids ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร MS มีลักษณะเป็นแบบ type A มีจำนวนมากที่สุดแต่การพัฒนาไปเป็น plantlets จะช้ามากคือในขณะที่สูตรอื่น ๆ สามารถเจริญเป็น plantlets ได้ภายใน 2 สัปดาห์ที่ทำการเพาะเลี้ยง แต่การเลี้ยงในสูตรอาหาร MS นี้ต้องใช้เวลามากกว่า 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ แต่ embryoids ที่ได้มีจำนวนมากกว่าสูตรอื่น ๆ และในการเลี้ยง embryoids ในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 mg/l. นั้นจะมีลักษณะ embryoids แบบ type B อวบน้ำและขนาดใหญ่กว่าสูตรอื่น ๆ แต่มีจำนวนน้อยกว่าสูตร 1/2 MS และสูตร MS ซึ่งการเจริญไปเป็น plantlets ในอาหารสูตรในอาหารสูตรนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นมาก plantlets ที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอื่นและมีสีเขียวเข้มมาก ที่เป็นดังนี้สามารถอธิบายได้ว่า เนื่องจากในอาหารสูตร MS นั้นมีธาตุอาหาร macronutrient ในปริมาณที่เข้มข้นมาก ซึ่งพืชบางชนิดตอบสนองต่อการเจริญในอาหารที่มีธาตุอาหารปริมาณน้อย จึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีเท่าที่ควร เช่น หน้าวัว ดังนั้นการเลี้ยง embryoids ในอาหารสูตร MS จึงมีการเพิ่มจำนวนของ embryoids แต่เพียงอย่างเดียวไม่มีการพัฒนาไปเป็น plantlets หรือมีการพัฒนาเป็น plantlets ได้ก็ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่าสูตรอื่น ๆ การที่ลดส่วนของอาหารลงเป็นสูตร 1/2 MS จึงเป็นการทำให้ธาตุอาหาร macronutrients เจือจางลงเหมาะกับการพัฒนาเป็น plantlets ของ embryoids สับปะรด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสับปะรดเป็นพืชที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS แต่การพัฒนาเป็น plantlets ของ embryoids จะเป็นไปได้ดีกว่าในอาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารลดลง ส่วนการเจริญและพัฒนาของ embryoids ในอาหารที่เติม kinetin นั้นพบว่ามีการพัฒนาเป็น plantlets ที่มีขนาดใหญ่มากขึ้นเมื่อระดับของ kinetin สูงขึ้น และใหญ่ที่สุดเมื่อระดับของ kinetin 1.0 mg/l โดยมีปริมาณ embryoids เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย อธิบายได้ว่า kinetin เป็นสารในกลุ่ม cytokinin ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซล การขยายขนาดของเซลและ cell-differentiation เป็นต้น การใช้ปริมาณ cytokinin สูงจึงส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาเฉพาะส่วนยอด ดังนั้นการใช้ระดับของ kinetin สูงขึ้นจึงมีผลให้เกิดการพัฒนาไปเป็น plantlets มากขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยง embryoids ในสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% ต่อลิตรนั้นมีการเจริญและพัฒนาน้อยที่สุดคือจะมีการเพิ่มจำนวน embryoids ในช่วงระยะแรกของการเพาะเลี้ยงคือประมาณ 1 สัปดาห์หลังจากนั้น embryoids หลังจากนั้น embryoids ที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสีดำและน้ำตาล โดยอาหารในขวดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหมดทุกขวดภายใน 1 สัปดาห์ โดยอาหารในขวดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหมดทุกขวดภายในเวลา 1 สัปดาห์ มีจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

embryoids ที่ตายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก คือตายทั้งขวดถึง 6 ขวด ใน 10 ขวดที่ทดลอง มีลักษณะแบบเดียวกันคือเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และดำแล้วตายในที่สุด จากผลที่ได้นี้ขัดแย้งกับการทดลองของ Zepada และ Sagawa(1986) ที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมันมะพร้าวมีส่วนส่งเสริมหรือชักนำให้เกิดต้นแขนงได้ โดยเลี้ยงส่วนของจุกสับปะรดในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 25% เป็นเวลา 2 เดือน แล้วย้ายลงในอาหารที่เติม BA 0.5-1.0 mg/l จากผลที่ได้จากการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า การเกิด embryoids และ plantlets ไม่จำเป็นต้องเติม kinetin หรือน้ำมะพร้าวในอาหารก็สามารถเลี้ยงให้เกิดได้แต่รูปแบบในการเกิด การเจริญและพัฒนาจะแตกต่างกันดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

<u>การเจริญและพัฒนาของ embryoids ในสภาพอาหารแข็ง</u>

จากการนำ embryoids ไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ โดยเติมวุ้นลงในอาหาร 6 กรัม/ลิตร และผงคาร์บอน 0.5 g/l เลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ปรากฏผลดังตารางที่ 2

<u>ตารางที่ 2</u> แสดงผลการตอบสนองของ embryoids ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน

สูตรอาหาร	ระยะเวลา (เดือน)	ลักษณะการเจริญและพัฒนา
MS	1	บริเวณผิวของอาหารมีการเพิ่มจำนวนของ embryoids จนเต็มพื้นที่ส่วนที่อยู่ใต้อาหารจะตาย มีลักษณะเป็นสีดำหรือน้ำตาล embryoids ที่เหลือมีการพัฒนาไปเป็น plantlets ประมาณ 7-10 ต้นต่อขาดสูงประมาณ 0.5ซม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ระยะเวลา (เดือน)	ลักษณะการเจริญและพัฒนา
	2	เกิดการเจริญและพัฒนาของ embryoids ไปเป็น plantlets จำนวนมากกว่าทุกสูตร คือประมาณ 10-15 ต้น/ขวดสูง ประมาณ 1-2 ซม. embryoids เพิ่มจากเดิม 2-3 เท่า
MS + Kinetin 0.25 mg/l	1	มีการเพิ่มจำนวน embryoids น้อยมาก ส่วนใหญ่จะตาย คือมีสีดำหรือน้ำตาลในแต่ละขวดเหลือ embryoids ที่ยังเขียวอยู่เล็กน้อย มีเพียง 2 ขวดที่มีการเพิ่มจำนวนจนเต็มอาหารประมาณ 5 เท่า ของเดิมมีสีเขียวอ่อนหรือเหลือง และมี 1ขวดที่เจริญไปเป็น plantlets 1 ต้น สูงประมาณ 5 ซม. ลักษณะแข็งแรง ในขณะที่ embryoids ในขวดตายหมด
	2	จำนวน embryoids เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย ไม่มีการพัฒนาไปเป็น plantlets เลยลักษณะเป็น plantlets type A ในขวดที่ตายเกือบทั้งขวดในเดือนแรก กลับมีการพัฒนาเพิ่มจำนวน embryoids ได้อีกบนผิวหน้าอาหารจาก embryoids ที่เหลืออยู่เพียงเล็กน้อยในเดือนแรก
MS + Kinetin 0.5 mg/l	1	embryoids มีการเพิ่มจำนวนจากเดิมประมาณ 6 เท่า ส่วนที่อยู่ติดกับอาหารและใต้อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำ และน้ำตาล embryoids มีสีเขียวอ่อน และมีการเจริญเป็น plantlets ประมาณ 5-10 ต้น/ขวด สูงประมาณ 0.25 ซม. โดยเกิดอยู่บน embryoids ที่มีสีดำหรือน้ำตาล
	2	embryoids เพิ่มจำนวนมากขึ้นเป็น 2 เท่าและมีการพัฒนาไปเป็น plantlets ประมาณ 5-10 ต้น/ขวด สูงประมาณ 0.5-1 ซม. มีสีเขียวสด แข็งแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ระยะเวลา (เดือน)	ลักษณะการเจริญและพัฒนา
MS + Kinetin 1.0 mg/l	1	embryoids เพิ่มจำนวนจนเต็มขวดและต่อมาส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลเหลือเฉพาะส่วนที่อยู่ตอนบนเพียงเล็กน้อย ซึ่งต่อมาส่วนที่เหลือนี้จะเจริญไปเป็น plantlets ประมาณ 4-6 ต้น/ขวด สูงประมาณ 0.3-0.5 ซม. และมีเพียง 1 ขวด ที่มีการพัฒนาเป็นต้น 2 ต้น สูงประมาณ 5.5-6 ซม. ลักษณะแข็งแรงมาก และมี embryoids ที่เพิ่งเกิดใหม่อยู่เล็กน้อย มีสีเขียวอ่อน อวบน้ำที่บริเวณโคนต้นโดยที่ในขวดนั้น embryoids เดิมเปลี่ยนเป็นสีดำหมดแล้ว
	2	มี embryoids เพิ่มมากขึ้นจนเต็มขวด รวมทั้งขวดที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งขวดในเดือนแรก ได้มีการพัฒนาเพิ่มจำนวน embryoids ขึ้นมาอีกจำนวนมาก ลักษณะเป็นสีเหลือง ขนาดเล็ก และมีการเจริญไปเป็น plantlets ประมาณ 6-10 ต้น/ขวด สูงประมาณ 0.3-0.5 ซม. ติดอยู่กับ embryoids ลักษณะอวบน้ำแข็งแรง สีเขียวจัด

จากตารางที่ 2 พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ embryoids ในอาหารสูตร MS และ MS ที่เติม Kinetin 0.5 mg/l มากที่สุด รองลงมาคือสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 mg/l และ 0.25 mg/l ตามลำดับ และพบว่ารูปแบบของการเกิด และการเจริญของ embryoids มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ เมื่อนำ embryoids มาเกลี่ยบนผิวของอาหารแข็ง ในระยะแรกจะมีการเพิ่มจำนวนของ embryoids อย่างรวดเร็วมีลักษณะสีเขียวอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีปริมาณมากจนเต็มขวด ต่อมา embryoids ที่อยู่ติดกับอาหารและจมอยู่ในอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายไป เหลือ embryoids ที่อยู่ข้างบนสุดซึ่งเมื่อในขวดมีการตายของ embryoids เกือบหมดทั้งขวดแล้ว ส่วนที่ยังเป็นสีเขียวอยู่จะเกิดการพัฒนาไปเป็น plantlets ที่มีขนาดใหญ่และแข็งแรงมาก และต่อมาจะเกิดการเพิ่มจำนวนของ embryoids จากส่วนสีเขียวบนส่วนที่ตายแล้วเหนืออาหารขึ้นมาอีกครั้งหนึ่งอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในสูตร MS ที่เติม Kinetin 0.25 mg/l เกิดการตายของ embryoids ก่อนอาหารสูตรอื่น เนื่องจากสภาพของอาหารเหลวเกินไป ซึ่งมีผลให้เกิดการพัฒนาเป็น plantlets ที่มีขนาดใหญ่ก่อนอาหารสูตรอื่น ๆ เช่นกัน จากปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเนื่องจากการเพิ่มปริมาณของ embryoids ในการหายใจ embryoids เหล่านี้จึงตายลงจนเหลือจำนวนที่เหมาะสมสำหรับอากาศและอาหารในขวด จึงสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ด้วยดี เช่นเดียวกับการเลี้ยงแมลงหวี่ในขวดแก้วหรือการเจริญเติบโตของพืชทั่วไป ซึ่งจะสามารถเขียนเป็นกราฟได้เป็นรูป S-shape curve หรือ Sigmoid growth curve นั่นเอง ส่วนของ embryoids ที่อยู่ด้านบนจึงไม่ต้องแย่งอากาศและอาหาร จึงสามารถเจริญและพัฒนาเป็น plantlets ได้ก่อนสูตรอื่น ๆ

และจากการเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยง embryoids ในสภาพอาหารเหลวคือในสภาพอาหารแข็งนั้น พบว่าการเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวมีการเจริญและพัฒนาดีกว่าอาหารแข็ง แต่ไม่สามารถเปรียบเทียบว่าสูตรอาหารแข็งสูตรใดดีที่สุด เนื่องจากมีการเจริญเพียงช่วงหนึ่งและชงักการเจริญเติบโตลงระยะหนึ่ง แล้วจึงมีการเจริญและพัฒนาขึ้นมาอีกครั้งหนึ่งดังที่ได้กล่าวไปแล้ว และระยะเวลาที่ใช้ทดลองสั้นเกินกว่าที่จะสรุปผลที่เกิดขึ้นนี้ได้

<u>การศึกษาระดับของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของ embryoids</u>

หลังจากการนำเอา embryoids มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ที่มีปริมาณและระดับอาหารแตกต่างกันเป็น 2 กลุ่ม เป็นเวลา 1 เดือน โดยวางบนเครื่องเขย่า ปรากฏผลการทดลองดังตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ที่มีระดับความเข้มข้นของอาหารแตกต่างกัน โดยแสดงผลการเจริญและพัฒนาเป็นระดับคะแนน

สูตรอาหาร	การเจริญและพัฒนาของ embryoids	
	เลี้ยงในอาหารที่มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร	เลี้ยงในอาหารที่บางเป็นแผ่นฟิลม์
MS	+++	++
MS + Kinetin 0.25 mg/l	+	+
MS + Kinetin 0.5 mg/l	++	+
MS + Kinetin 1 mg/l	++ [1/]	++
1/2 MS	+++	++
MS + CW 15 %	+ [2/]	+ [2/]

หมายเหตุ + = มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาน้อยมาก

++ = มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาปานกลาง

+++ = มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนามากที่สุด

[1/] = มีจำนวน embryoids น้อยแต่มีการพัฒนาเป็น plantlets จำนวนมาก

[2/] = เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ และตายไปก่อนที่จะเสร็จการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 3 จะพบว่าการเจริญและพัฒนาของ embryoids ในอาหารที่มีระดับความสูง 1 ซม. และมีปริมาณอาหาร 10 ml/ขวด จะมีการเจริญและพัฒนาดีกว่าการเลี้ยงในอาหารที่ระดับของอาหารบางมากคล้ายแผ่นฟิลม์ คือมีระดับคะแนนส่วนมากอยู่ในระดับที่มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาปานกลางถึงมากที่สุด ส่วนในอาหารที่ระดับของอาหารบางจะมีระดับคะแนนการเพิ่มจำนวนและพัฒนาน้อยมากถึงปานกลาง โดยอาหารสูตร 1/2 MS จะมีการเพิ่มจำนวนของ embryoids และการพัฒนาเป็น plantlets สูงสุด และอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 0.25 mg/l และน้ำมะพร้าว 15 % จะมีการเพิ่มจำนวนของ embryoids น้อยที่สุด แต่มีลักษณะการเจริญแตกต่างกันคือ ในอาหารที่เติม Kinetin 0.25 mg/l จะไม่มีการตายของ embryoids ส่วนอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวนั้นเมื่อเลี้ยงในระยะแรกจะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้น แต่ต่อมาไม่นานจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ มีการขับสารสีน้ำตาลออกมาและตายหมดทั้งขวดก่อนการทดลองจะเสร็จสิ้น ซึ่งขัดกับผลการทดลองของ Zepada และ Sagawa (1981) และ สุวรรณา (2529) ส่วนการที่อาหารที่มีระดับอาหารหนา มีการเจริญของ embryoids ได้ดีกว่าอาหารบางนั้น อาจมีสาเหตุเนื่องจากความหนาของชั้นอาหารไม่มากเกินไปจน embryoids จมอยู่ใต้อาหาร และมีการเขย่าอาหารโดยเครื่องเขย่าตลอดเวลา รวมทั้งมีปริมาณอาหารมากเพียงพอที่จะให้ embryoids มีการเจริญตลอดช่วงเวลา 1 เดือนที่ทำการทดลอง แต่อาหารที่บางนั้นมีปริมาณอาหารน้อยเกินไปจนไม่เพียงพอต่อการเจริญของ embryoids ซึ่งจะสังเกตุจากเมื่อมีการเจริญไปได้ระยะหนึ่งแล้วจะมีการเปลี่ยนเป็นสีขาวซีดและแห้งตายไป ส่วนในอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 mg/l นั้นถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มจำนวนของ embryoids ในระดับปานกลาง แต่มีการพัฒนาเป็น plantlets ได้เร็วมากและ plantlets ที่ได้มีขนาดโตกว่าสูตรอื่น ๆ ที่เป็นดังนี้เนื่องจากอิทธิพลของ Kinetin ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่ม Cytokinin จึงส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาของส่วนยอดนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของ embryoids ในอาหารเหลว

หลังจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยง embryoids ในอาหารเหลวด้วยวิธีการที่วางบนเครื่องเขย่าตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโต และวิธีการแช่ embryoids ในอาหารโดยไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 1 เดือน ปรากฏผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบผลการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ โดยวิธีเพาะเลี้ยงแบบเขย่าตลอดเวลา และวางตั้งอยู่กับที่เป็นเวลา 1 เดือน โดยแสดงผลการเจริญและพัฒนาเป็นระดับคะแนน

สูตรอาหาร	การเจริญและพัฒนาของ embryoids	
	เขย่าตลอดเวลา	ตั้งอยู่กับที่
MS	+++	+
MS + Kinetin 0.25 mg/l	++	+
MS + Kinetin 0.5 mg/l	++	+
MS + Kinetin 1 mg/l	+++ [1]/	++
1/2 MS	+++	++

หมายเหตุ + = มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาน้อยมาก

++ = มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาปานกลาง

+++ = มีการเพิ่มจำนวนและพัฒนามากที่สุด

[1]/ = มีจำนวน embryoids เพียงเล็กน้อยแต่มีการพัฒนาเป็น plantlets มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่า embryoids ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เขย่าขวดระหว่างการเจริญเติบโตจะมีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาได้ดีกว่าการเลี้ยงในสภาพ Stationery คือมีระดับคะแนนที่ให้ส่วนมากอยู่ในช่วงที่มีการเพิ่มเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจากผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ สุวรรณา (2521) ที่รายงานว่าการเลี้ยง embryiods ในอาหารเหลวที่มีการเขย่า flasks ระหว่างการเจริญเติบโตจะมีการเพิ่มของ callus และต้นแซนงได้เร็วและมากกว่าการเลี้ยงในสภาพ Stationery โดยให้ชิ้นส่วนของพืชแช่อยู่ในอาหาร Mathews และ Rangan (1981) ก็ยังแสดงให้เห็นถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อของสับปะรดในอาหารเหลวโดยการเขย่า flasks ที่เพาะเลี้ยงระหว่างการเจริญเติบโตเป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนของต้นที่ได้ รวมทั้งการพัฒนาของต้นอ่อน โดยจะสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และมีการพัฒนาได้ดีกว่าในสภาพ Stationary ซึ่งอาจจะเนื่องจากการเขย่า flasks ตลอดเวลาทำให้มีปริมาณออกซิเจนหมุนเวียนภายในขวด และอาหารเหลวจะสัมผัสกับชิ้นส่วนพืชทั่วถึง ทำให้มีการเจริญที่ดีกว่า

<u>ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นแซนง</u>

ผลจากการนำต้นแซนง (plantlets) ขนาดประมาณ 2.5 ซม. มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน แล้วนำมาวัดความยาวของส่วนรากและยอด และสังเกตความแข็งแรง ปรากฏผลดังตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญของรากในอาหารสูตร MS และ MS ที่เติม kinetin 0.25 mg/l ให้ผลดีที่สุดโดยรากจะมีการเจริญลดลงเมื่อระดับของ kinetin เพิ่มขึ้นโดยอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 mg/l จะมีการเจริญของรากน้อยที่สุด ซึ่งตรงข้ามกับผลการเจริญทั้งทางด้านความสูงและความแข็งแรงของส่วนยอด ที่จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับของ kinetin เพิ่มขึ้น โดยอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 mg/l จะมีการเจริญของส่วนยอดมากสุด ลักษณะของต้นมีขนาดใหญ่และแข็งแรงกว่าสูตรอื่น ๆ รากมีลักษณะอวบแข็งแรงแต่ขนาดสั้นป้อม ส่วน plantlets ที่เลี้ยงในอาหารสูตรอื่นจะมีขนาดใกล้เคียงกันโดยที่จะมีการเจริญต่างกันเล็กน้อยตามระดับของ kinetin ที่เพิ่มสูงขึ้น จากปรากฏการณ์สามารถอธิบายได้ว่า เกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมน kinetin ที่มีผลกระตุ้นการเจริญของส่วนยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งถ้าใช้ในปริมาณที่สมดุลย์กับ Auxin แล้วจะทำให้เจริญเป็น callus และถ้าใช้ปริมาณ kinetin สูงจะส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตเฉพาะส่วนยอด ซึ่งจะสังเกตได้จากการทดลองนี้ว่า เมื่อระดับ kinetin สูงขึ้นส่วนยอดจะยาวเพิ่มขึ้นแต่ส่วนรากจะสั้นลงตามลำดับ และจากการทดลองนี้พบว่าเมื่อนำต้นที่มีขนาดแตกต่างกันไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน ต้นที่มีขนาดเริ่มแรกใหญ่และแข็งแรงจะพัฒนาได้เร็วกว่าต้นที่มีขนาดเริ่มแรกอ่อนแอ และต้นที่มีความสูงเริ่มแรกมากกว่า 2.5 ซม. จะพัฒนาได้เร็วกว่าต้นที่มีความสูงน้อยกว่านี้ ซึ่งในบางชวดจะไม่สามารถสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงได้เลย ในกรณีนี้ผลการเจริญและพัฒนาการของรากจะสอดคล้องกับการทดลองของ สุวรรณา (2521) ที่ได้รายงานว่าการเกิดรากในอาหารแต่ละสูตรนั้น พบว่าต้นสับปะรดที่มีขนาดสูงตั้งแต่ 2 ซม. ขึ้นไปจะเกิดรากได้เร็วกว่าต้นที่มีขนาดเล็กลง

ตารางที่ 5 แสดงผลการเจริญและพัฒนาของต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยแสดงผลเป็นระดับคะแนน

สูตรอาหาร	การเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นสับปะรด	
	ส่วนราก	ส่วนยอด
MS	+++	+
MS + kinetin 0.25 mg/l	+++	++
MS + kinetin 0.5 mg/l	++	++
MS + kinetin 1.0 mg/l	+	+++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ + = เกิดการเจริญเติบโตและพัฒนาปานกลาง

++ = เกิดการเจริญเติบโตและพัฒนามาก

+++ = เกิดการเจริญเติบโตและพัฒนามากที่สุด

วิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของต้นแขนงในอาหารเหลว

จากการทดลองนำต้นแขนงที่มีความสูงประมาณ 2.5 ซม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยวิธีการวางขวดบนเครื่องเขย่าตลอดระยะเวลาการเจริญ และวิธีการแช่ต้นพืชในอาหารที่ตั้งอยู่กับที่ (Stationary) เป็นเวลา 1 เดือน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6

ซึ่งจากตารางพบว่า การเลี้ยงต้นแขนงที่โตแล้วในอาหารเหลวทั้งสองวิธีการ จะให้ผลใกล้เคียงกันทั้ง 2 วิธีการ จนไม่อาจนำมาสรุปได้ว่าวิธีการใดมีการพัฒนาของต้นได้ดีกว่า เนื่องจากทั้งสองวิธีการให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยที่สูตรอาหาร MS ที่เติม kinetin 1.0 mg/l จะมีการเจริญและพัฒนามากที่สุด ทั้งวิธีการวางขวดบนเครื่องเขย่า และวิธีการตั้งขวดอยู่กับที่ เช่นเดียวกับในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด และมีปริมาณต้นที่ตายจำนวนมาก จนแทบจะทำการเช็คผลการทดลองไม่ได้ โดยต้นแขนงที่เลี้ยงจนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีดำและตายลงอย่างรวดเร็วทั้งสองวิธีการ จากผลที่ได้นี้อาจอธิบายได้ด้วยอิทธิพลของ kinetin ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่ม Cytokinin ซึ่งมีคุณสมบัติเร่งการแบ่งเซลหรือการเจริญของส่วนยอด และความเหมาะสมของปริมาณของธาตุอาหาร macronutrient ที่พืชแต่ละชนิดต้องการดังได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ส่วนการตอบสนองต่อสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% นั้นก็มีผลสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาทุกการทดลอง ซึ่งผลนี้มีความขัดแย้งกับผู้ที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ซึ่งให้ผลการตอบสนองของ callus, embryoids และต้นแขนงต่ออาหารที่มีน้ำมะพร้าวผสมอยู่ด้วยในทางบวก โดย Teo (1975) ใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D และ kinetin 10 และ 5 ppm. ตามลำดับหรือเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำมะพร้าว 10% ซึ่งให้ผลเป็นอย่างดี Zepada และ Sagawa (1981) ได้เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 25% เป็นเวลา 2 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม BA 0.5-1.0 ml/l พบว่า มีการชักนำให้เกิดต้นแขนงขึ้นและสรุปว่าน้ำมะพร้าวมีส่วนส่งเสริมหรือชักนำให้เกิดต้นแขนง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rangan และ Mathew (1981) ได้เลี้ยง callus โดยใช้อาหารสูตร MS ที่ผสมด้วย NAA 57.0 m , น้ำมะพร้าว 15% และ Casin hydrolysate 400 mg/l แล้วย้ายลงไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% และ Casin hydrolysate 400 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ขึ้นมากมาย จากผลที่ขัดแย้งนี้อาจเนื่องจากสาเหตุหลายประการซึ่งถ้าจะให้ทราบแน่ชัดต้องใช้เวลาศึกษาให้นานกว่านี้ เพราะเนื่องจากการทดลองนี้ใช้ระยะเวลาในการทดลองสั้นเกินไป

ตารางที่ 6 แสดงผลการตอบสนองของต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ แบบเขย่าและไม่เขย่า เป็นเวลา 1 เดือน โดยแสดงผลการเจริญและพัฒนาเป็นระดับคะแนน

สูตรอาหาร	การเจริญในอาหารเหลวที่ไม่เขย่า		การเจริญในอาหารเหลวที่เขย่า	
	ราก	ยอด	ราก	ยอด
1/2 MS	++++	++	++	+++
MS	+++	+	++	+++
MS + kinetin 0.25 mg/l	++	+	+++	++
MS + kinetin 0.5 mg/l	+++	+++	+	++
MS + kinetin 1 mg/l	+++	++++	+++	+++
MS + CW 15%	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ + = เกิดการเจริญเติบโตและพัฒนาน้อยมาก

++ = มีการเจริญและพัฒนาปานกลาง

+++ = มีการเจริญและพัฒนามาก

++++ = มีการเจริญและพัฒนามากที่สุด

* = มีปริมาณต้นที่ตายเป็นจำนวนมาก จนแทบทำการเช็คผลไม่ได้ จึงเช็คเฉพาะต้นที่เหลือที่มีสีเขียวสดเท่านั้น

การเกิดรากและการย้ายออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ

ผลจากการนำยอดขนาดประมาณ 5 ซม. จากขวดในสภาพปลอดเชื้อไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 5.0 mg/l โดยเติมวุ้นลงไป 6 g/l และผงคาร์บอน 0.5 g/l เป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำมาล้างวุ้นออกให้สะอาด เมื่อนำมาวัดความยาวปรากฏว่าต้นที่นำออกปลูกครั้งแรก 33 ต้นมีความยาวของรากตั้งแต่ 5-13.5 ซม. โดยเฉลี่ย 7.7 ซม. และมีความยาวจากโคนต้นถึงปลายใบตั้งแต่ 8-14 ซม. โดยเฉลี่ย 10.5 ซม. ดังตารางที่ 7 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการเจริญเติบโตจากเดิมมากทั้งนี้เนื่องจาก IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่ม Auxin มีคุณสมบัติส่งเสริมการแบ่งตัวของเซล การยืดตัวของเซลและการเจริญเติบโตของรากเมื่อใช้ในปริมาณสูง ต้นสับปะรดที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเหล่านี้เมื่อนำออกปลูกครั้งแรกในกระบะที่มีวัสดุปลูกประกอบด้วยทราย และถ่านแกลบในอัตราส่วน 1:1 และฉีดพ่นยากันราทุกสัปดาห์ พบว่าต้นสับปะรดสามารถอยู่รอดได้ในสภาพปกติ แต่จากการสังเกตพบว่าการให้น้ำทุกวันแก่ต้นสับปะรดจะทำให้เกิดต้นเน่าและตายได้มาก โดยที่การให้น้ำวันเว้นวันจะให้ผลการอยู่รอดของต้นสับปะรดได้ดีกว่า (ตารางที่ 8) แสดงว่าสับปะรดเป็นพืชที่ไม่ต้องการน้ำในการเจริญเติบโตมากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตของรากและยอดของสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MA + IAA 5.0 mg/l) เป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งแสดงผลโดยการวัดความยาวของรากและยอดของสับปะรดก่อนที่จะทำการย้ายออกปลูก

ชวดที่	ความยาวของราก (ซม.)	ความยาวของต้น (ซม.)
1	8.2	11.5
2	7.5	10.1
3	6.7	10.2
4	7.5	11.0
5	5.0	9.1
6	7.2	10.5
7	5.2	12.5
8	8.4	9.0
9	6.5	11.0
10	7.5	12.5
11	6.9	10.7
12	6.6	10.0
13	5.0	9.0
14	7.0	9.5
15	9.0	10.5
16	7.0	10.0
17	10.0	11.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชวดที่	ความยาวของราก (ซม.)	ความยาวของต้น (ซม.)
18	6.0	11.0
19	6.0	10.0
20	9.0	11.0
21	5.5	13.0
22	6.5	8.0
23	8.0	8.5
24	5.0	9.0
25	5.5	10.0
26	13.5	11.0
27	11.5	13.0
28	9.5	12.5
29	7.0	10.0
30	9.0	14.0
31	11.0	12.5
32	9.5	10.0
33	9.7	12.0
เฉลี่ย	7.7	10.5

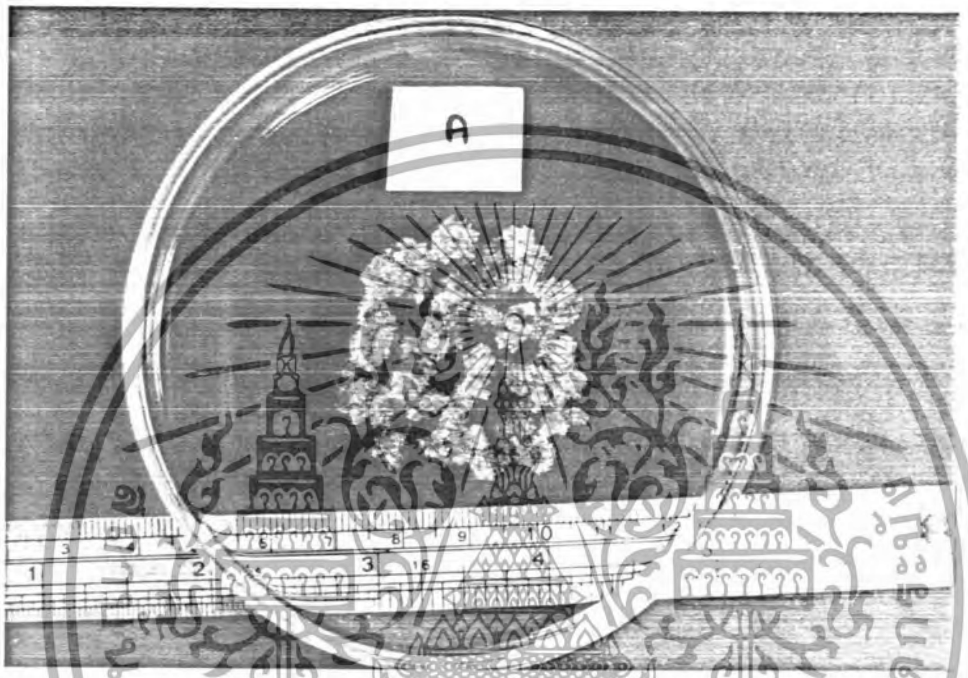
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนครั้งการรดน้ำที่มีผลต่อต้นสับปะรดที่ย้ายออกปลูกครั้งแรก

จำนวนการรดน้ำ	จำนวนต้นที่ปลูก	จำนวนต้นที่เน่าตาย	จำนวนต้นที่อยู่รอด
รดทุกวัน	20	18	2
รดวันเว้นวัน	20	3	17

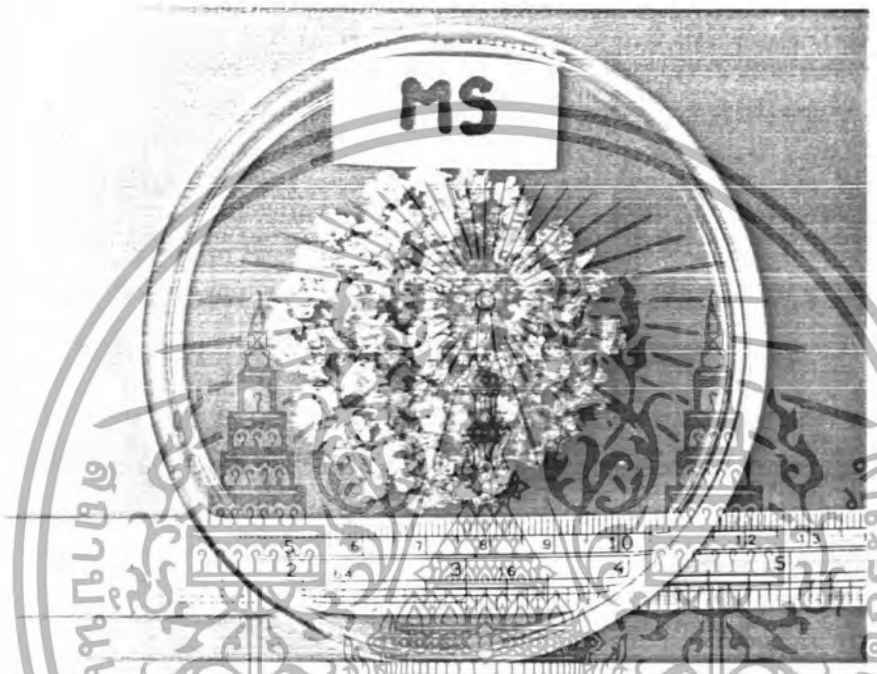
เมื่อย้ายลงในกระถางใหญ่และเลี้ยงจนต้นสับปะรดมีอายุได้ 8 เดือน นับจากเริ่มย้ายปลูก ทำการวัดความสูงของต้น ปรากฏว่าต้นสับปะรดมีความสูงวัดจากโคนต้นจนถึงปลายใบยาวประมาณ 34.5 ซม. ลักษณะต้นมีความแข็งแรงมาก ใบแผ่กว้าง มีการเจริญเติบโตดี นอกจากนี้ยังพบว่า การย้ายปลูกต้นสับปะรดในรุ่นหลัง ๆ นั้นสามารถนำต้นที่ไม่ได้เกิดจากการเร่งให้เกิดรากในอาหารที่ผสม IAA ก็สามารถย้ายออกปลูกและอยู่รอดได้ และยังพบว่าต้นที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อราบางชนิด เมื่อนำมาแช่ในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม IBA 100 ppm. และไม่ใส่น้ำตาล แล้วจึงนำมาปลูกในเครื่องปลูกที่ประกอบด้วยทราย ขี้เถ้าแกลบ โฟม (ซึ่งช่วยระบายน้ำได้ดี) ในอัตราส่วน 1:1:1 และรดด้วยอาหารสูตร 1/2 MS ที่ผสมด้วย IBA 2 ppm. วันเว้นวัน ต้นสับปะรดส่วนใหญ่สามารถอยู่รอดได้ นอกจากนี้ยังพบปัญหาโรคโคนเน่า และโรคใบจุดระหว่างการเพาะเลี้ยง (อาจเกิดจากใช้เครื่องปลูกเก่า ซึ่งอาจมีเชื้อปะปนอยู่ด้วย) โดยที่โรคโคนเน่าจะเกิดในระยะแรกของการย้ายปลูก ส่วนโรคใบจุดมีลักษณะใบจุดสีเหลืองที่ใบและแพร่ระบาดจากต้นหนึ่ง ไปยังอีกต้นหนึ่งได้รวดเร็วมาก หลังจากทำการฉีดยาป้องกันต้นที่ยังไม่เป็นโรคพบว่า สามารถหยุดการระบาดของโรคได้ และต้นที่รอดตายสามารถเจริญต่อได้ตามปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



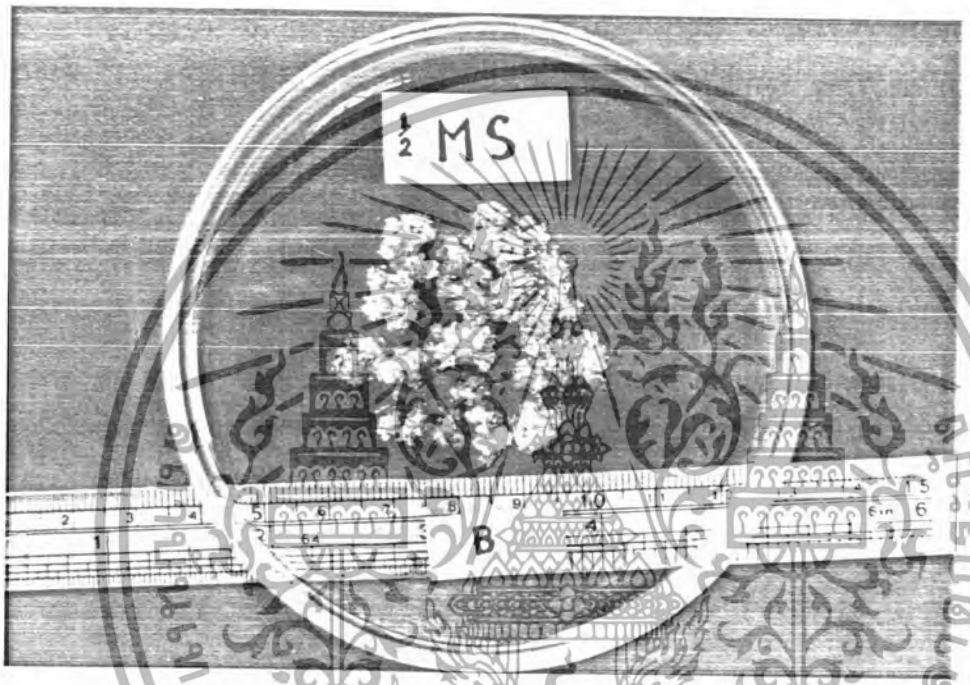
ภาพที่ 1 embryoids type A ซึ่งได้จากการเลี้ยง embryoids ในอาหารเหลว สูตร MS นาน 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



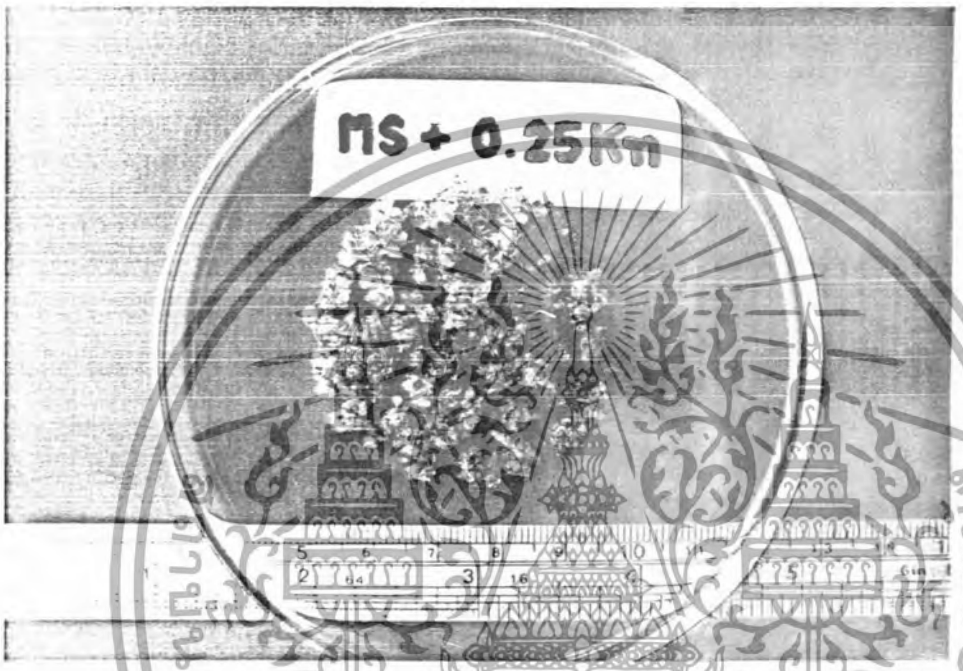
ภาพที่ 2 embryoids ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ จะสังเกตุเห็นว่ามีการเจริญเป็น plantlets เพิ่มจำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของ 1/2 MS นาน 2 สัปดาห์

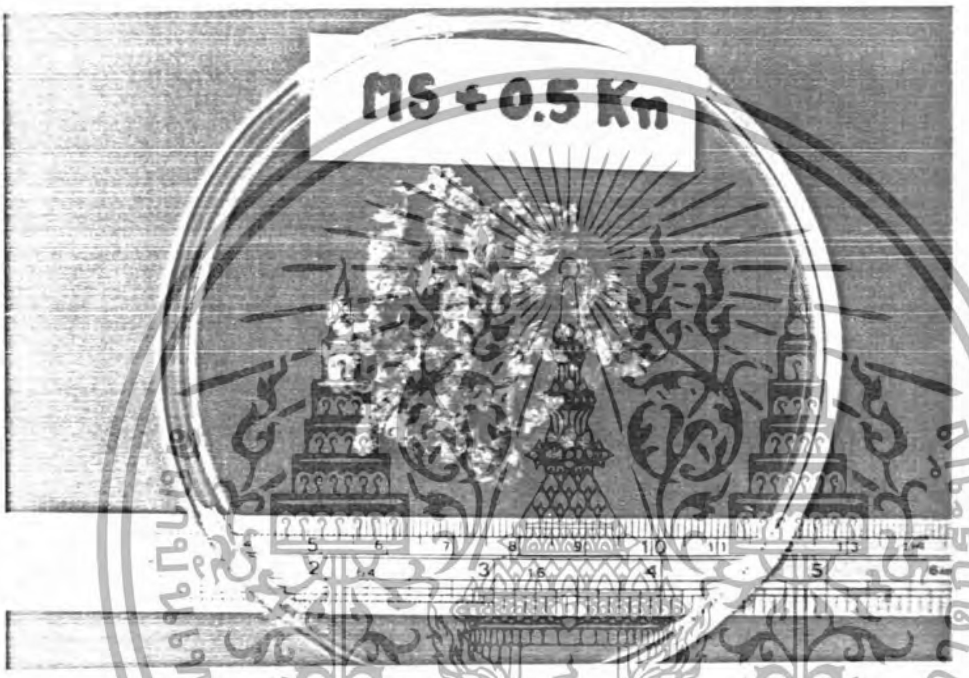
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของembryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + Kinetin 0.25 mg/l นาน 4 สัปดาห์

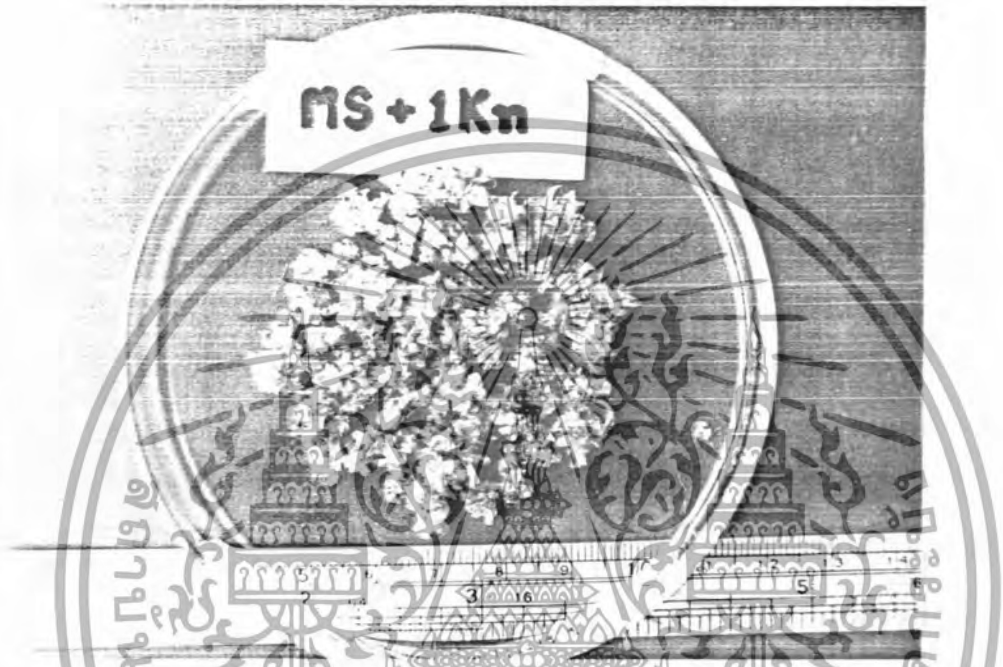
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



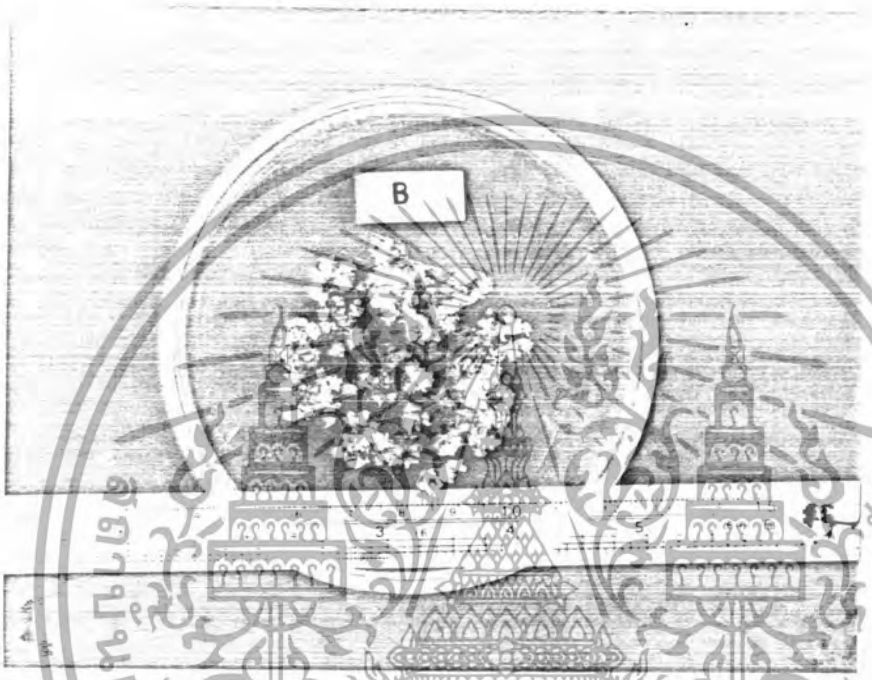
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + Kinetin 0.5 mg/l นาน 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + kinetin 1.0 mg/l นาน 4 สัปดาห์ และแสดงลักษณะของ embryoids type B

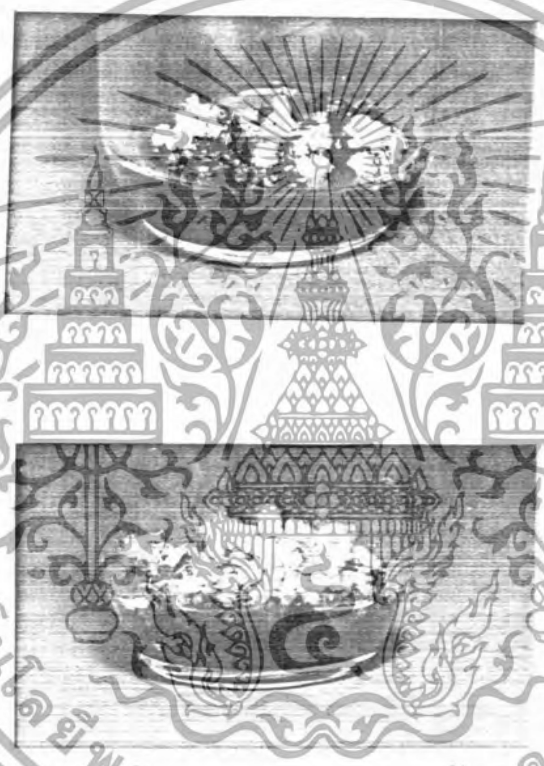
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 ลักษณะการเจริญและพัฒนาของ embryoides ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + CW 15 % นาน 2 สัปดาห์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

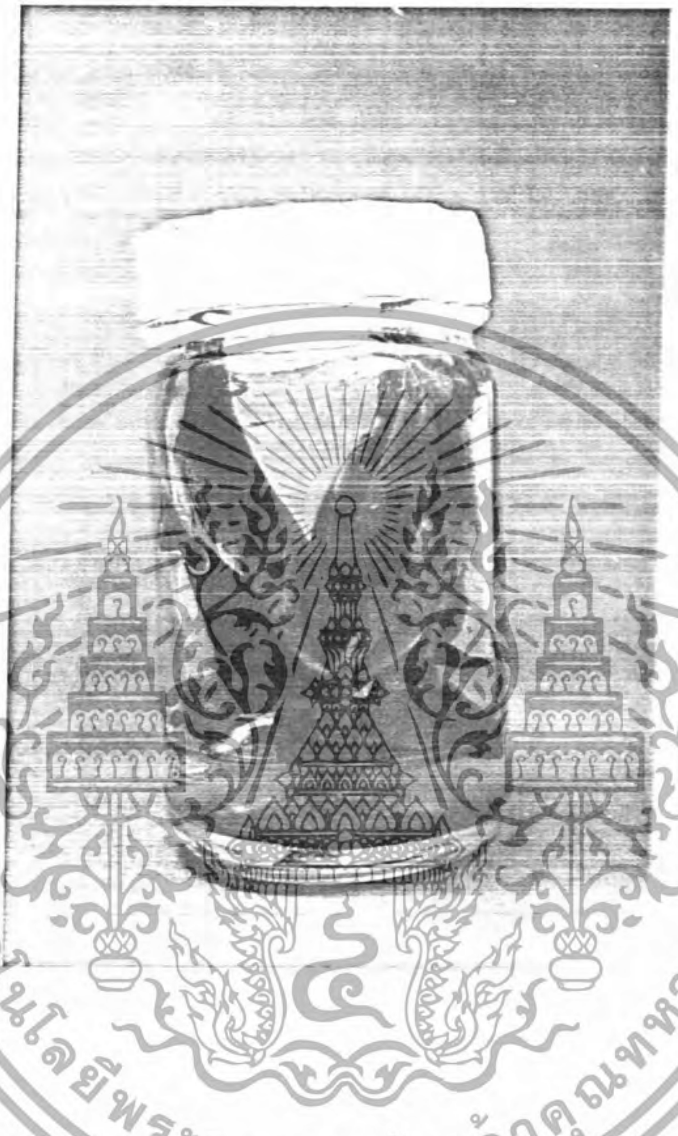


ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาของ embryoids ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ในระยะเวลาต่าง ๆ (a) 1 เดือน (b) ภายหลัง 1 เดือน (c) 2 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบ Plantlets ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 แสดง plantlets ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรชักนำให้เกิดราก พร้อมที่จะนำออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 11 แสดงต้นสับปะรดที่ตั้งตัวได้แล้ว หลังจากนำออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 12 ต้นสับปะรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อย้ายปลูกในกระถางได้ 8 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาการขยายพันธุ์สับปะรด (Ananas comosus (L.) Merr.) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ สรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวน callus หรือ embryoids คือสูตรอาหาร 1/2 MS และสูตร MS แต่เมื่อต้องการชักนำให้เกิดการพัฒนาจาก embryoids ไปเป็น plantlets ควรนำ embryoids มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 mg/l จะให้ plantlets ที่แข็งแรงและขนาดใหญ่ การเพิ่มปริมาณของ embryiods ในอาหารเหลวมีปริมาณเพิ่มขึ้นเร็วกว่าในอาหารแข็ง การเจริญและพัฒนาของ embryoids ในอาหารเหลวที่มีปริมาณมากแต่ไม่มากจนท่วม embryoids พบว่าให้ผลดีกว่าการเลี้ยง embryoids ในอาหารที่มีปริมาณน้อยและระดับของอาหารบางมาก การเพิ่มปริมาณของ embryoids และการเจริญเป็น plantlets ในอาหารเหลว โดยวิธีการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าระหว่างการเจริญเติบโต จะมีการเพิ่มจำนวนของ embryoids และ plantlets ได้เร็วและมากกว่าการเลี้ยงโดยวิธีแช่ชิ้นส่วนพืชในอาหารแบบ Stationary สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นแขนงคือสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 mg/l และควรใช้ต้นที่มีขนาดใหญ่ ความยาวของส่วนยอดมากกว่า 2.5 ซม. และแข็งแรง ใบกว้างเนื่องจากจะให้ผลตอบสนองต่ออาหารทุกสูตรได้ดีกว่าต้นที่อ่อนแอ ใบเรียวเล็กแม้จะมีความสูงเท่ากันก็ตาม

การชักนำให้เกิดรากในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 5.0 mg/l และผงคาร์บอน 0.5 g/l ให้ต้นและรากที่แข็งแรงพร้อมออกปลูกได้ แต่พบว่าต้นที่มีรากที่เกิดจากการทดลองในอาหารสูตรอื่น ๆ ก็สามารถย้ายออกปลูกและอยู่รอดได้เช่นกัน

การย้ายต้นออกปลูกในเรือนเพาะชำ ควรแช่ยากันราก่อนปลูกและใช้ยากันราหลังปลูกทุกสัปดาห์ และควรรดน้ำแบบวันเว้นวัน หรือทิ้งช่วงรดเฉพาะเมื่อสังเกตว่าดินแห้ง ต้นสับปะรดเมื่อแข็งแรงดีแล้วสามารถย้ายออกปลูกได้ในสภาพธรรมชาติ และเมื่อสับปะรดอายุได้ 8 เดือน พบว่ามีความสูงประมาณ 34.5 ซม. และแข็งแรง ในการทดลองครั้งนี้อาหารสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวทุกการทดลองจะให้ผลในทางลบซึ่งขัดกับผลการทดลองของผู้ที่ทำการทดลองมาก่อนหลายท่าน จึงขอเสนอแนะว่าควรจะมีการศึกษาถึงผลของน้ำมะพร้าวเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. เกษม สร้อยทอง. 2522. การปลูกสับปะรด. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

2. จารุพันธ์ ทองแถม ไพรัช ธีระวุฒิชัย และวิชัย หฤทัยธนาสันต์. 2518. การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์และคุณภาพของสับปะรดพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย. รายงานค้นคว้าวิจัย 2518-2519. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

3. จารุพันธ์ ทองแถม. 2526. สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

4. พิศมัย ประจันตะเสน และอังสนา บุณโยภาส. 2522. การขยายพันธุ์สับปะรดโดยการผ่าแบ่งจุก. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

5. สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2529. เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารพืชสวน. 16(7):47-56.

6. สอาด ร่มรื่นสุขารมย์. 2525. การขยายพันธุ์สับปะรดแคระ (Ananas comosus) ในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

7. อรดี สหวัชรันทร์. 2522. ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้านการเกษตร. วารสารพืชสวน. 14(4):35-44.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Ammirato, P.V., P.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada. 1983. Handbook of plant cell culture. Macmillan : Newyork. 970 p.

9. Aghion, D. and G. Beauchesne. 1960. Utilisation de la technique de culture sterile d' organes pour obtenir des clones d' Ananas. Fruits. 15:464-466.

10. Jeanne, B.J. and T. Murashige. 1974. Tissue culture propagation of Aechmea fasciata beaker. and other Bromeliads. The International Propagators' Society. 24:117-126.

11. Macluskie, H. 1939. Pineapple propagation : A new method in Sierra Leone. Trop. Agric. (Trinidad) 16 : 192-193.

12. Mapes, M.O. 1973. Tissue culture of Bromeliads. The International Propagators' Society. 23:47-55.

13. Mathews, V.H., T.S. Rangan and S. Narayanaswamy. 1976. Micropropagation of Ananas sativus in vitro. Z. Pflanzenphysiol. 79:450-454.

14. Mathews, V.H. and T.S. Rangan. 1981. Growth and regeneration of plantlets in callus culture of pineapple. Hortscience. 14:227-234.

15. Murashige, T. and F. skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-487.

16. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annu. Rer Plant Physiol. 25:135-166.

17. Murashige, T. 1974. Current status of plant cell and organ culture. Hortscience. 12(2):127-130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18. Padilla, V. 1973. Bromeliads. Crown Publisher, Inc. : New York.

19. Pannetier, C. and C. Lanaud. 1976. Divers aspects de /' utilisation possible des culture "in vitro" par la multiplication vegetative de /' Annans comosus L. Merr. varietl "Cayenne lisse." Fruits. 31:739-750.

20. Pureglove, J.W. 1972. Tropical Crops : Monocotyledons. John Wiley and Sons. Newyork.

21. Rangaswamy, N.S. 1961. Experimental Studies on famale reproductive structures of Citrus microcarpa Bunge. Phytomorphology. 11:109-127.

22. Rangan, T.S. and V.H. Mathews. 1981. Growth and regeneration of plantlets in callus cultures of pineapple. Hortscience. 14:227-234.

23. Teo, C.K.H. 1975. The significance of tissue culture to malaysian pineapple industry. Malaysian Food Self Sufficiency Conference. 9:1-5.

24. Vacin, E. and F. Went. 1949. Culture solution for orchid seedlings: Bot Goz. 110:605.

25. Wakasa, K.Y. Koya and M. Kodo. 1978. Differentiation from in vitro culture of Ananas commosus. Jpn. J. Breed. 28:113-121.

26. Wakasa, K. 1979. Variation in plants differentiated from the tissue culture of pineapple. Jpn. J. Breed. 28:113-121.

27. Zepeda, C. and Y. Sagawa. 1981. In vitro propagation of pineapple. Hortscience. 16:495.

28. Zimmer, K. and W. Pieper. 1976. In vitro culture of aechmeas. Acta. Hort. 64:25-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ส่วนประกอบของ inorganic macronutrient, micronutrient และ organic contituents ของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) ที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตารางผนวกที่ 1,2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 1 Inorganic macronutrient (mg/l)

Constituents	Murashige and Skoog
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
KH_2PO_4	170

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 Inorganic micronutrients (mg/l)

Constituents	Murashige and Skoog
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
KI	0.83
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 Organic constituents (mg/l)

Constituents	Murashige and Skoog
Glycine	2
Myo-inositol	100
Vitamin B_1	0.1
Vitamin B_6	0.5
Nicotinic acide	0.5
Na_2EDTA	37.3

ในสูตรอาหารแข็งใช้ Difco "Bacto" agar 6.0 g/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้