1100299

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การขยายพันธุ์เบญจมาศโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Propagation of Chrysanthemum by Tissue Culture

โดย

นาย สาคร ศรีกรด

T100288

อาจารย์ วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ ประธานกรรมการอาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

(นาย อารมย์ ศรีพิจิตต์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ 22 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2537

ปก.
S 629.1
ส692
2537

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 100288
วัน.เดือน.ปี 18 JUN 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขยายพันธุ์เบญมาศโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Propagation of Chrysanthemum by Tissue Culture

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์เบญจมาศที่ใช้ปลูกในแปลงและใช้ปลูกเป็นไม้กระถาง พันธุ์เหลืองไข่ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากส่วนของตาข้าง ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ที่ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962) พบว่าต้นที่ได้มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป ในเวลา 1 เดือน โดยที่ในอาหารแข็งสูตร MS + NAA 0.5 mg/l + Kinetin 0 mg/l มีการเจริญเติบโตและให้จำนวนต้นที่จะทำการตัดแบ่ง (Subculture) ครั้งต่อไปได้มากที่สุด ถึงจำนวน 10.1 ต้น และมีการชักนำให้เกิดรากด้วย พร้อมที่จะย้ายออกปลูกในเครื่องปลูกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วิชัย ลิ้มภาญจนพงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำในการศึกษา และตรวจแก้ปัญหาพิเศษครั้งนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบคุณ เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ ทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษเรื่องนี้ จนสำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจ และทุนทรัพย์ในการศึกษา เป็นอย่างดียิ่งมาตลอด

สาคร ศรีกรด

กุมภาพันธ์ 2531

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
สารบาญตาราง	(1)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลและวิจารณ์	16
สรุป	22
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยการแสดงจำนวนต้นและจำนวนความสูง (อายุ 1 เดือน)	16
2	แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยการแสดงจำนวนต้นและจำนวนความสูง (อายุ 1 เดือน)	18
3	แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยการแสดงจำนวนข้อจำนวนต้น และจำนวนความสูง (อายุ 1 เดือน)	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

เบญจมาศ (Chrysanthemum morifolium L.H.Bailey) เป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่ตลาดมีความต้องการมากในปัจจุบัน เนื่องจากว่ามีการนำไปใช้ประโยชน์มากขึ้น และบางส่วนได้สั่งต้นพันธุ์จากต่างประเทศเข้ามาซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีดอกสีสรรสายงาม สามารถปลูก และปรับตัวได้ดีบางท้องที่ในประเทศไทย แต่ไม่แพร่หลายเพราะพันธุ์ที่มีราคาแพง ซึ่งการขยายพันธุ์ทำได้หลายวิธี เช่น การตัดชำ การตัดหน่อ แต่ทำให้ได้ต้นจำนวนน้อย จึงไม่เหมาะที่จะทำเป็นการค้า โดยเฉพาะธุรกิจใหญ่ๆ ดังนั้นในปัจจุบัน จึงให้ความสนใจในการขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด และสามารถขยายพันธุ์พืชเหล่านั้นได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น มีการนำไปขยายพันธุ์พืชพวกไม้ดอกไม้ประดับในระดับการค้ากันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ จะทำให้ต้นจำนวนมาก และทำให้มีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ จึงเหมาะที่จะทำเป็นธุรกิจการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์เบญจมาศ และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์เบญจมาศให้ต้นจำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) หมายถึงเทคนิคการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่า จะเป็นอวัยวะพืช เนื้อเยื่อ เซล หรือเซลที่ไม่มีผนังที่เรียกว่า โปรโตพลาส (Protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยเกลือ แร่ธาตุ น้ำตาล และไวตามิน ในสภาพปลอดเชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง (อรดี, 2522) การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชั้นสูงได้มีการศึกษาค้นคว้ากันมานานนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1902 โดย Harber Landt ชาวเยอรมัน ได้พยายามที่จะเลี้ยงเซลสีเขียวของพืชในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อแต่ประสบความล้มเหลว ต่อมาในปี ค.ศ. 1921 Molliard ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงด้วยศัพภะ (embryo) ของพืช (Sharp and Larsen, 1977) และหลังจากนั้นไม่นาน คือในปี ค.ศ. 1922 Robbins and kotte' ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายรากในสภาพปลอดเชื้อ จนกระทั่งปี ค.ศ. 1934 White ได้พยายามศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามแนวทางของ Robbins and Kotte โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายรากมะเขือเทศด้วยอาหารที่เติมเกลือแร่ Yeast extract และน้ำตาลที่สะกัดจากอ้อยปรากฏว่าชิ้นส่วนของรากมีการเจริญเติบโตดี และในปีเดียวกันนั้น Gautheret ได้รายงานว่าชิ้นส่วนของแคมเบียม (cambium) ของพืชหลายชนิดเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งเติม Knop's solution crystein hydrochloride และน้ำตาลกลูโคส แล้วสามารถสร้างแคลลัสได้ Sharp and Larsen (1977) ได้อ้างถึงว่า ในปี ค.ศ. 1939 Gautheret ได้ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของหัวแครอทที่เลี้ยงในอาหารประกอบด้วยสารประกอบ อนินทรีย์ น้ำตาลกลูโคส วิตามินบีหนึ่ง (thiamine) ; crystein hydrochloride และ IAA ได้สำเร็จ จนกระทั่งปี ค.ศ. 1953 Miller and Skoog ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ pith ของ ยาสูบ โดยใช้ kinetin กระตุ้นให้เกิดการสร้างตา ต่อมาในปี ค.ศ. 1962 Murashige and Skoog ได้ทำการศึกษาปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อยาสูบ และเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด จนกระทั่งปัจจุบันนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านการขยายพันธุ์ ด้านการปรับปรุงพันธุ์ และการขจัดโรคของพืช ตลอดจนการเก็บรักษารวบรวมพันธุ์และการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศ

จากความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Murashige (1974 ; 1977) จึงได้สรุปหลักการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ดังนี้

ก. การเตรียมเนื้อเยื่อพืชให้ปราศจากจุลินทรีย์ โดยยังคงมีชีวิตอยู่ และนำไปเลี้ยงในอาหารให้มีการเจริญเติบโต และมีการพัฒนาต่อไป

ข. การเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อพืช ตลอดจนอวัยวะและโครงสร้างอื่น ๆ ที่สามารถเจริญไปเป็นต้นพืชได้

ค. การเตรียมต้นพืชก่อนย้ายปลูกลงดิน

นอกจากหลักการดังกล่าวมาแล้วยังมีขั้นตอนในรายละเอียดที่สำคัญและเกี่ยวข้อง คือ

1. ชิ้นส่วนเริ่มต้น (explants) หรือชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องมีการพิจารณาเกี่ยวกับตำแหน่ง และขนาดของชิ้นส่วนอายุ และความสมบูรณ์ของต้นพืช ตลอดจนฤดูกาลที่จะทำการขยายพันธุ์ (Murashige, 1974) ส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยทั่ว ๆ ไปที่นำมาขยายพันธุ์โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ปลายยอด ใบ ราก ช่อดอก ลำต้น และอื่น ๆ ไพบูลย์ (2524) ได้รายงานว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากต้นกล้าหรือส่วนของพืชที่ยังอ่อนจะใช้ได้ดีกว่าเนื้อเยื่อของพืชที่เจริญเติบโตจนเต็มที่แล้ว Murashige (1974) รายงานชิ้นส่วนของพืชที่มีขนาดเล็กจะทำความสะอาดได้ง่ายกว่าชิ้นส่วนใหญ่ แต่อัตราการอยู่รอดและการเจริญต่ำกว่าชิ้นส่วนขนาดใหญ่ จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลายพืชซึ่งใช้ส่วนยอดสุด (terminal dome) ที่มีขนาดต่ำกว่า 0.1 มิลลิเมตร พบว่าการรอดตาย และการเจริญต่ำมาก ทั้งนี้เพราะชิ้นส่วนของพืชที่มีขนาดเล็กเกินไปแต่มีผลดีคือ ต้นพืชได้ปราศจากโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส (Kehr, 1975 : Murashige, 1974 ; 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทำความสะอาดชิ้นส่วน

ชิ้นส่วนของพืชที่จะนำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องปราศจากจุลินทรีย์ทั้งนี้เพราะอาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรท จึงทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็ว และเป็นอันตรายต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างยิ่ง จึงต้องทำให้ชิ้นส่วนนั้นปราศจากจุลินทรีย์โดยสิ้นเชิง Pierik et al.(1974) เลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ที่ยังอ่อนอยู่ของหน้าวัว และศัพภะ โดยทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปร-คลอไรด์ 3% นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นาน 30 นาที แกะเมล็ดออกทำความสะอาดอีกครั้งด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ 1% นาน 20 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นอีก 30 นาที พบว่าได้ผลดี ส่น Bush et al.(1976) ใช้คลอรอกซ์ 5% ร่วมกับ Tween20 2-3 หยด นาน 5 นาที ได้ผลดีในการทำความสะอาดชิ้นส่วนกลีบดอกของเบญจมาศ ดังนั้นการใช้ชิ้นส่วนของพืชแต่ละชนิดจะต้องคำนึงถึงความเข้มข้น และเวลาที่ใช้ในการทำความสะอาดอีกทั้งต้องล้างชิ้นส่วนของพืชด้วยน้ำกลั่นหลังจากทำความสะอาด ด้วยสารเคมีทุกครั้งเพื่อป้องกันการตกค้างของสารเคมีที่จะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชได้ ส่วนใช้สารช่วยให้น้ำยาสัมผัสผิวชิ้นส่วน (Wetting agent) ร่วมกับสารฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อ (Sterilizing agent) นั้น เพื่อช่วยให้ผิวของชิ้นส่วนพืชสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อ (Sterilizing agent) ได้ดีขึ้น ทำให้การทำลายจุลินทรีย์ที่ติดมาได้ผลดียิ่งขึ้น (Fossard, 1976)

3. อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยสารประกอบต่าง ๆ ดังนี้

สารประกอบอนินทรีย์ (Inorganic salts) ธาตุที่จำเป็นได้แก่ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปรตัสเซียม (K) ตัลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก(Fe)กำมะถัน (S) มังกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) อลูมีนัม (Al) ทองแดง (Cu) โมลิบดินัม (Mo) โบรอน(B) คาร์บอน (C) โฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) แต่ในสูตรอาหารบางสูตรธาตุทั้ง 16 ธาตุ มิได้ใช้หมดอาจใช้เป็นบางธาตุเท่านั้น การใช้ธาตุเหล่านี้อาจจะใช้ในรูปสารประกอบ ต่างๆเช่น โปตัสเซียม(K) อาจใช้ในรูปของไนเตรท (NO_3^-) คือ KNO_3หรืออาจใช้ในรูปของซัลเฟต ($SO_4^=$) คือ K_2SO_4 เป็นต้น (ไพบูลย์, 2524)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบอินทรีย์ ได้แก่สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) แบ่งออกเป็น

1. คาร์โบไฮเดรท เป็นแหล่งพลังงานของพืชที่นิยมใช้ได้แก่ น้ำตาลซูโครส (Sucrose) กลูโคส (glucose)และฟรุคโตส (fructose)

2. วิตามิน โดยมากนิยมใช้วิตามินบี วิตามินที่ใช้กันมากได้แก่ ไทอามีน (thiamine) ซึ่งใช้ในระดับความเข้มข้น ประมาณ 0.1-1 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร ไนอาซีน (niacine) หรือนิโคตินิคแอซิด (nicotinic acid) ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไพรีดีอกซีน (pyridoxine) ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ วิตามินตัวอื่น ๆ เช่น ไบโอติน (biotin) ในปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแพนโทธินิค-แอซิด (panthothenic acid) ในปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม ต่อลิตร (ไชบูลย์, 2524)

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ได้แก่

3.1 อ็อกซิน (auxin) ตัวที่นิยมใช้ได้แก่ IAA (3-indoleacetic acid) และ auxin สังเคราะห์ได้แก่ NAA (∝- naphthalene acetic acid) IBA(indolebutyric acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) auxin ส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก การยืดตัวของเซล (cell elongation) การขยายขนาดของเซล (Cell enlargement) และการแบ่งตัวของเซล (Cell division) (Leopole, 1967)

3.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin) ตัวที่นิยมใช้ได้แก่ Kinetin (6-furfurylaminopurine) และ BA (6-benzyladenine) มีคุณสมบัติการแบ่งเซล การขยายขนาดของเซล การเปลี่ยนแปลงของเซล (Cell differentiation) พบว่าเมื่อใช้ cytokinin ร่วมกับ auxin ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอัตราที่เหมาะสม ทำให้เนื้อเยื่อเจริญไปเป็นแคลลัส แต่ถ้าหากปริมาณ Cytokinin สูงกว่าจะมีการส่งเสริมให้เกิดยอด และถ้า auxin สูงจะทำให้เกิด ราก (Skoog and Miller, 1957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 จิบเบอเรลลิน ตัวที่นิยมใช้คือ gibberellic acid (GA_3) กระตุ้นการยืดตัวของเซล และขยายขนาดของเซล (Salisbury, 1969) นอกจากนี้ยังสามารถแทนแสงในการกระตุ้นให้เกิดรากในช่อนกลีบ เมื่อใช้ร่วมกับ auxin ส่วนใหญ่ GA มักให้ผลในช่วงก่อนนำพืชออกปลูกเท่านั้น (Murashige, 1974)

3.4 กรดอะมิโน (amino acid) ตัวที่ใช้มากคือ ไกลซิน (glycine) ซึ่งใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร ส่วนตัวอื่น ๆ ที่ใช้บางกรณี เช่น กลูตามิค แอซิค (glutamic acid) และ แอสปาติค แอซิค (aspartic acid)

3.5 สารที่ได้จากธรรมชาติ (Nutural complexes) การใช้สารที่ได้จากธรรมชาติเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารยังไม่ทราบบทบาทแน่ชัด แต่พบว่าช่วยให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ผลดีขึ้น สารที่ได้จากธรรมชาติที่นิยมเติมในสูตรอาหารมีหลายชนิด เช่นน้ำมะพร้าว ส่วนสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และอื่น ๆ White, 1951)

นอกจากที่กล่าวมาแล้วส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สำคัญอันจะขาดไม่ได้คือน้ำ

4. pH ของอาหาร

pH ของอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อพืชสามารถใช้อาหารต่าง ๆ ได้ดีในสภาพ pH ที่เหมาะสมเท่านั้น Puhan and Martin (1967) แนะนำว่า pH ของอาหารโดยทั่วไปที่เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 5.0-6.5 แต่ที่เหมาะสมที่สุด 5.4 pH ของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืช และขณะอบฆ่าเชื้อโรคในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ Puhan and Martin (1967) แนะนำว่าสามารถใช้ส่วนผสมของ meno และ dihydregen ปรับ pH ให้คงที่ได้ แต่มีขอบเขตจำกัด คือ สามารถปรับได้ที่ประมาณ pH 6.0 หรือสูงกว่าเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สภาพของอาหาร

การที่จะประสบผลสำเร็จหรือล้มเหลวในการเลี้ยงเนื้อเยื่อยังขึ้นอยู่กับสภาพของอาหารที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนว่าเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว ชิ้นเนื้อเยื่อพืชบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารเหลว แต่บางชนิดจะเลี้ยงได้ดีทั้งในระยะแรกและการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว ส่วนการเตรียมย้ายปลูกจะเลี้ยงได้ดีในอาหารแข็ง (Murashige, 1974) สภาพของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจัดเป็นพวกใหญ่ 2 พวก คือ

5.1 อาหารแข็ง(agar medium)ในการเตรียมอาหารแข็งจำเป็นต้องมีการเติมวุ้น ซึ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณา ถึงความเข้มข้นและคุณภาพของวุ้นที่นำใช้ Murashige (1972) ได้อ้างถึง Romberger ที่ได้รายงานการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของ Picea abics ในอาหารแข็งซึ่งในวุ้นที่มีคุณภาพต่าง ๆ กัน ปรากฏว่าอาหารที่ใช้วุ้น Difo "purified" agar มีการเจริญของชิ้นส่วนเริ่มต้นดีที่สุด รองลงไปคือ Difco "Difco" agar และมีการพบว่ามีการเจริญน้อยที่สุด คืออาหารที่ใช้วุ้น Difco "Nobel" agar (Murashige,1974) การเจริญของเนื้อเยื่อนอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณภาพของวุ้นแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของวุ้นในอาหาร ปกติแล้วการใช้ Difco"Bacto" agar ความเข้มข้น 0.6-1.0% ถ้าหากความเข้มข้นมากกว่านี้ทำให้อาหารแข็งมากจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช แต่ถ้าอาหารมี pH ต่ำจะทำให้วุ้นอ่อนตัวลง (Murashige, 1974 ; Romberger and Tabor, 1971)

5.2 อาหารเหลว (Liquid medium)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวโดยใช้ชิ้นส่วนพืชลงในอาหารโดยตรงแต่ต้องวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้บนเครื่องเขย่าตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อให้อากาศถ่ายเทและชิ้นส่วนพืชมีโอกาสหายใจได้ หรือโดยการวางชิ้นส่วนพืชบนกระดาษกรอง (filter paper bridge) glass wool เพื่อค้ำจุนชิ้นส่วนพืชเอาไว้ (Murashige, 1974)

6. สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สภาพแวดล้อมที่เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.1 แสง (Light) เชื่อกันว่าการให้แสงมิได้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เนื้อเยื่อใช้แสงในการปรุงอาหาร แต่เพื่อช่วยการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (morphogenesis) มากกว่า (ไพบูลย์, 2524) การให้แสงแก่เนื้อเยื่อควรพิจารณาดังนี้

ก. คุณภาพของแสง (light quality) จากการทดลองพบว่าแสงสีแดง (red light) และแสงสีน้ำเงิน (blue light) มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด Murashige (1974) ได้กล่าวว่าแสงสีแดงกระตุ้นให้เกิดราก (root initiation) แสงสีน้ำเงินกระตุ้นให้เกิดยอดในพืชบางชนิดส่วนยอดพวก Polilia nutaus จะเกิดตาเมื่อสัดส่วนของแสงสีแดง ต่อแสงสีน้ำเงิน เท่ากับ 11 ต่อ 6 ชั่วโมงต่อวัน

ข. ความเข้มของแสง (light intensity) murashige (1974) รายงานว่าในพืชหลายชนิดความเข้มของแสง 1,000 lux จะเหมาะสมกับช่วงการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ และ 3,000–10,000 lux เหมาะสมในช่วงก่อนการย้ายปลูกในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนหัวของข่อนกลิ่นไทยพบว่า จะเกิดรากเมื่อให้แสง 5,000 lux

ค. ระยะเวลาให้แสง (light duration) โดยทั่วๆ ไปมักให้แสงแก่พืชประมาณ 16 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งให้ผลดีในการเกิดการเปลี่ยนแปลงของพืชหลายชนิด แต่บางพืชนั้นต้องการแสงน้อยกว่า 16 ชั่วโมง เช่นการเลี้ยงเนื้อเยื่อ กะหล่ำดอกต้องได้รับแสง 9 ชั่วโมง จึงจะเกิดตายอด ส่วนเนื้อเยื่อข่อนกลิ่นไทยพบว่าต้องได้รับแสง 12 ชั่วโมงจึงจะเกิดรากได้ (Murashige, 1974 เป็นต้น

6.2 อุณหภูมิ (Temperature) การเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไปมักใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่พืชแต่ละชนิดย่อมมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันไป Murashiqe, (1974) ได้รายงานว่า อุณหภูมิ 25–27 องศาเซลเซียส เหมาะสมกับการเลี้ยงเนื้อ–เยื่อพืชล้มลุก (annual) และพืชกึ่งเมืองร้อน (tropical species) แต่ไม่เหมาะกับพืชพวกเมืองหนาว (temperate perrenial) เช่น ลิลลี่ แกลดิโอลัส ต้องการอุณภูมิ เฉพาะและคงที่ตลอดเวลาที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ และเนื้อเยื่อที่เลี้ยงจะต้องนำมาจากพืชที่ได้รับ อุณหภูมิต่ำ (Chilling)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงจะประสบผลสำเร็จ และก่อนนำมาปลูกลงดิน 4-6 สัปดาห์ ควรให้พืชได้รับอุณหภูมิต่ำอีกครั้ง-หนึ่ง นอกจากนี้พืชบางชนิดต้องการอุณหภูมิสูง ต่ำ สลับกันระหว่างกลางคืน และกลางวัน เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อข่อนกลิ่นไทย เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิกลางวัน 26 องศาเซลเซียส สลับกับกลางคืน 15 องศาเซลเซียส จึงชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่าอุณหภูมิคงที่

สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศเริ่มในปี ค.ศ. 1968 โดย Hill ได้ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศพันธุ์ "Bronze Pride" โดยตัดลำต้นและฐานดอก (receptacle) ของดอกตูม เลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D, NAA, Kinetin และน้ำมะพร้าวในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายลง (subculture) ในอาหารที่มี kinetin 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร และ soya peptone 1 กรัมต่อลิตร ปรากฏว่าเกิดยอด (shoot) จำนวน ซึ่งเป็นแนว-ทางในการขยายพันธุ์เบญจมาศต่อไป

ต่อมาในปี ค.ศ. 1973 Roest and Bokelmann ทำการเพาะเลี้ยงดอกตูมไพรีทรัม (Chrysanthemum cinerariaefolium Vis.) โดยตัดส่วนกลีบดอกออกเกือบหมด แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร Knop's macroelement และ Heller's microelement โดยเติม Difco' Bacto' agar 0.6% และน้ำตาล 2% พร้อมกับเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ลงไปด้วยหลายอัตรา พบว่าเมื่อเติม 6-benzylaminopurine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เนื้อเยื่อเกิดยอดจำนวนมากเมื่อเลี้ยงไปได้ 2 สัปดาห์ และเมื่อย้ายต้นที่ได้ลงดินที่ไม่ได้อบฆ่าเชื้อโดยจุ่มใน auxin (1% β - indoleacetic acid) ก่อนต้นจะเกิดรากมากหลังจากย้ายได้ 3 สัปดาห์ และต้นเจริญเติบโตเป็นปกติ อีก 2 ปีถัดมา Roest and Bokelmann (Roest and Bokelmann, 1975) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศซ้ำ การทดลองในปี 1973 โดยใช้ส่วนก้านดอกย่อย (pedicel) ของเบญจมาศพันธุ์ "Super Yellow" และ "Bravo" เลี้ยงในอาหารของ Murashige and Skoog แต่ใช้ Na FeEDTA แทน Na_2EDTA และเติมกรดบอริค (H_3BO_3) อีก 10 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าขนาดชิ้นส่วน สารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล วิตามิน และแร่ธาตุ มีอิทธิพลต่อการเกิดยอดทั้ง 2 พันธุ์

นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 1974 Earle and Langhans (1974) ได้ทำการขยายพันธุ์เบญจมาศพันธุ์ "Giant # 4 Indianapolis White" โดยการสร้างตายอด (shoot tips) ของกิ่งข้างที่มีใบแรก และใบที่สองคลุมอยู่ ตัดตายอดให้มีขนาด 0.2-1 มิลลิเมตร ฐานกว้าง 1 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารของ Murashige and Skoog ที่มี NAA และ kinetin ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาพห้องที่มีอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส โดยให้แสงไฟด้วยหลอดเรืองแสงที่เรียกว่า Sylvania Lifeline ความเข้ม 1,000 - 4,000 lux พบว่า NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดดีที่สุด จึงนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวต่อไป และพบว่ามีการเกิดเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cell) ยอด (shoot) และจุดกำเนิดใบ (leaf primordia) จำนวนมาก เมื่อนำชิ้นส่วนเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี GA_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการยืดตัวของยอดและใบมากขึ้น และเจริญเป็นต้น (plant lets) ถ้านำต้นที่ได้ไปเลี้ยงบนกระดาษกรอง (filter paper) ที่มีอาหารเหลวหล่อเลี้ยง (wick culture) อยู่ก่อนจะได้ผลดีกว่าย้ายต้นลงปลูกในแปลงเลย เมื่อเลี้ยงต้นจนเติบโตออกดอก ปรากฏว่าสีดอกไม่เหมือนต้นเดิมคือ ได้สีเหลือง 2 ต้น จาก 857 ต้น และจากการทดลองนี้ได้ต้นเบญจมาศที่สูง 15 เซนติเมตร ถึง 9 10^{14} ต้นในเวลา 1 ปี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศเป็นวิธีขยายพันธุ์ที่ให้ผลรวดเร็วมาก และมีโอกาสกลายพันธุ์ได้เช่นกัน

จากการทดลองที่พบว่าได้ ต้นเบญจมาศสีผิดจากต้นแม่ดังกล่าวข้างต้น Bush et al (1976) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนกลีบดอก (petal segments) ผิวกลีบดอก (petal-epidermis) และตายอด (shoot tips) ของเบญจมาศพันธุ์ "Giant # 4 Indianapolis" จนกระทั่งได้ต้นและดอก พบว่าต้นที่ได้จากการเลี้ยงกลีบดอก มีลักษณะสีดอก กลีบดอก ผิดไปจากต้น-เดิมมากกว่าการเลี้ยงจากตายอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน ปี ค.ศ. 1977 Sangwan and Harada ได้ทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศญี่ปุ่น 3 พันธุ์คือ Shasta, Shuokan และ Honey Sweet โดยใช้ส่วนต่าง ๆ ของต้นเบญจมาศ คือ ลำต้น ราก ก้านดอก แผ่นใบ และเนื้อเยื่อส่วนยอด (apical meristem) ในอาหาร Murashige and Skoog ที่มี auxin (2,4-D, NAA, IAA) cytokinin (BA, Kinetin, zeatin) และ gibberellic acid (GA_3) พบว่า ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชดังกล่าวตอบสนองทางด้านกายภาพ (morphogenesis) ต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตในอัตราเดียวกัน auxin อย่างเดียวไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของส่วนต่าง ๆ (organogenesis) ของชิ้นส่วนและจะเกิดตา (bud formation) ถ้ามีทั้ง NAA และ kinetin และพบว่าหลังจากเนื้อเยื่อส่วนยอดเกิดแคลลัสแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่มี GA_3 และ NAA อย่างละ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดเป็นจำนวนมาก (multiple shoot) นอกจากนี้ Sangwan and Harada ยังได้ทดสอบขนาดของชิ้นส่วน (explants) โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 ขนาด คือ 1,2 และ 3 มิลลิเมตร พบว่าขนาด 3 มิลลิเมตรเกิดแคลลัส และยอดก่อนขนาดอื่น ๆ และพบว่า แคลลัสจะเกิดตายอดในอัตราสูงมากในช่วงเดือนแรกของการย้ายอาหาร และจะลดลงเรื่อย ๆ จนไม่เกิดเลยใน 6 เดือนต่อมา

นอกจากนี้ Sangwan and Harada ยังสามารถเลี้ยง cell suspension จนได้เป็นต้นเบญจมาศในอาหาร Murashige and Skoog ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะเกิด cell aggre gate และ clumps หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 5 สัปดาห์ แล้วเจริญต่อไปเป็นแคลลัสและตายอด เมื่อย้ายลงในอาหาร Murashige and Skoog ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

จากรายงานของ สุเม อรัญนารถ (2524) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศโดยการใช้ส่วนต่าง ๆ คือ ตาข้าง (Lateral buds) ลำต้น (stem segments) และส่วนของใบ (leaf segments) ปรากฏว่าส่วนจากตาข้างเลี้ยงบนอาหารแข็งโดยการเพิ่ม 0.02 mg/l NAA และ 2.0 mg/l Kinetin เหมาะที่จะเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทำให้เกิดแคลลัส และสามารถเกิดเป็นต้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง คือ ต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS/ (Murashige and Skoog, 1962)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่

NAA (α - naphthallne acetic acid)

Kinetin (6- furfurylamino purine)

2.3 น้ำตาล

2.4 น้ำกลั่น

3. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารได้แก่ เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ มี บีคเกอร์ กระบอกตวง ปิเปตต์ ขวดแก้วสำหรับใส่อาหารพร้อมฝาปิด เครื่องชั่งหยาบ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง หม้อนึ่งความดัน

4. สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อได้แก่ เอทธิลแอลกอฮอล์ คลอรอกซ์ สารเปียกใบ (Teepol)

5. เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายชิ้นส่วนพืชได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ (bioclean) มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานแก้ว

6. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 25-28°ซ ให้แสงหลอดฟลออเรสเซนต์ ที่มีความเข้มของแสงประมาณ 3000 lux 16 ชั่วโมง และไม่มีแสง 8 ชั่วโมง ซึ่งควบคุมการปิดเปิดไฟด้วยเครื่องอัตโนมัติ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

การทดลองที่ 1

การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้น (explants) ตัดกิ่งเบญจมาศจากต้นแม่มาทำการริดใบ-ออก แล้วทำการตัดออกเป็นท่อน ๆ ซึ่งให้แต่ละท่อนมีตาติดอยู่ 1 ตา แล้วนำไปล้างน้ำสบู่หรือน้ำผงซักฟอก และนำมาทำการฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในน้ำยาคลอรอกซ์ที่มีความเข้มข้น 10% นาน 20 นาที และน้ำยาคลอรอกซ์เข้มข้น 5% นาน 10 นาทีเสร็จแล้วนำเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อและทำการล้างชิ้นส่วนของเบญจมาศด้วยน้ำกลั่นที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อีก 2 ครั้ง และทำการใช้มีดผ่าตัดและปากคีบที่ผ่านการจุ่มแอลกอฮอล์ 95% และเผาไฟ 2-3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่แล้วทำการตัดด้านที่สัมผัสกับคลอรอกซ์ หรือส่วนที่เกิดรอยช้ำจากการตัดครั้งแรกออก และนำส่วนที่มีส่วนของตาข้าง (Lateral bud) มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ตามสูตรต่าง ๆ ดังนี้

สูตรที่ 1.1 MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 0 mg/l

สูตรที่ 1.2 MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 0.5 mg/l

สูตรที่ 1.3 MS + NAA 0.5 gm/l + kinetin 1.0 mg/l

สูตรที่ 1.4 MS + NAA 0.5 gm/l + kinetin 2.0 mg/l

สูตรที่ 1.5 MS + NAA 9.5 gm/l + kinetin 3.0 mg/l

หมายเหตุ ทำสูตรละ 10 ขวด อาหารทุกสูตรใช้น้ำตาล 30 gm/l

เนื่องจากชิ้นส่วนมีการปนเปื้อนสูงเหลือต้นในสูตรที่ 1.2มากที่สุดจึงทำการตัดแบ่ง (Subculture) ต้นออกเป็นท่อน ๆ ซึ่งแต่ละท่อนยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยให้แต่ละท่อนมีข้อ 1 ข้อ ถ้าหากมีข้อ 2 ข้อ ก็ตัดในที่ตาล่างออกเพื่อปักลงในอาหารวุ้น นำไปเลี้ยงในอาหารทั้ง 5 สูตร ๆ ละ 10 ขวด เมื่อเลี้ยงไปได้ 1 เดือน ก็ตัดแบ่งส่วนของต้นเช่นครั้งแรก โดยนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทำสูตรละ 20 ขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้น โดยการนำต้นที่ได้จากการทดลองครั้งที่ 1 จากอาหารแข็งมาเลี้ยงในสูตรอาหารแข็งที่มีระดับความเข้มข้นของมะพร้าว (Coconut Water), NAA และ Kinetin ต่าง ๆ กัน 6 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 2.1 MS + Coconut water 250 mg/l

สูตรที่ 2.2 MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 0 mg/l

สูตรที่ 2.3 MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 0.5 mg/l

สูตรที่ 2.4 MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 1.0 mg/l

สูตรที่ 2.5 MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 2.0 mg/l

สูตรที่ 2.6 MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 3.0 mg/l

หมายเหตุ ทำสูตรละ 20 ขวด และมีการเติมปริมาณน้ำตาลทรายเป็น 40 mg/l

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

1. เวลา

เริ่มทำการทดลอง วันที่ 7 กรกฎาคม 2530

สิ้นสุดทำการทดลอง วันที่ 20 มกราคม 2531

2. สถานที่

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture Lab)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลและวิจารณ์ผล

การทดลองที่ 1

ผลของการฟองฆ่าเชื้อ ผลปรากฏว่ามีเปอร์เซนต์การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียสูงมาก ซึ่งเชื้อนี้เป็นเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารสูตรต่าง ๆ ทุกสูตร แต่มีตาข้างที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ รอดจากการปนเปื้อนเพียงบางสูตร ๆ ละไม่กี่ต้น แต่ก็มีสูตรที่ 1.1 และสูตรที่ 1.2 เท่านั้นที่สามารถนำมาทำการทดลองได้ แต่การทดลองครั้งนี้ได้ใช้ต้นที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีจำนวนมากกว่าสูตรอื่น ๆ

ผลการเจริญเติบโตในอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงไปได้ 1 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 1 และ ตารางผนวกที่ 4-8

ตารางที่ 1 แสดงการเจริญเติบของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยการแสดง จำนวนต้น และจำนวนความสูง (อายุ 1 เดือน)

สูตรอาหาร	จำนวนต้น	จำนวนความสูง (ซม.)
1.1	1.06	4.68
1.2	2.25	5.15
1.3	2.65	3.32
1.4	2.79	3.41
1.5	3.1	2.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่า ถ้าเราพิจารณาในด้านความสูงนั้น พบว่า สูตรที่ 1.2 มีความสูงมากที่สุด และตามด้วยสูตรที่ 1.1สูตรที่ 1.4 สูตรที่ 1.3 และสูตรที่ 1.5 ตามลำดับ ถ้าพิจารณาด้านจำนวนต้นที่แตกใหม่ในอาหาร แต่ละสูตรแล้ว พบว่า อาหารสูตรที่ 1.5 มีจำนวนต้นมากที่สุด และตามด้วย สูตรที่ 1.4 สูตรที่ 1.3 สูตรที่ 1.2 และสูตรที่ 1.1 ตามลำดับ

ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองครั้งนี้ได้มาในลักษณะนี้ก็เพราะอิทธิพลของระดับฮอร์โมนในแต่ละสูตรนั้นเอง โดยในอาหารสูตรที่มี kinetin เพิ่มขึ้น การแตกยอดก็จะเพิ่มมากขึ้น เพราะ kinetin เป็นฮอร์โมนในกลุ่ม Cytokinin ซึ่งมีผลกระตุ้นการแตกยอด แต่ในทางตรงกันข้ามในด้านความสูงจะเห็นว่าอาหารสูตรที่มี kinetin สูงนั้น มีการเจริญทางด้านความสูงน้อยกว่าสูตรซึ่งมี kinetin ต่ำ ทั้งนี้เนื่องมาจาก ความสมดุลย์ระหว่าง Auxin กับ Cytokinin กล่าวคือ ถ้าสมดุลย์ของฮอร์โมน อยู่ในช่วงที่มีผลของ Auxin สูง จะทำให้ต้นที่ได้มีการแตกรากดี และมีผลการเจริญทางความสูงมากกว่าการแตกตาข้าง

100288

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการตัดแบ่งครั้งที่ 2

ผลของการ Subculture ต้นเบญจมาศ ในแต่ละสูตรที่มีอายุ 1 เดือน ออกเป็นท่อน ๆ แต่ละท่อนยาวประมาณ 1.5 ซม. และมีข้อ 1 ข้อ ใน 1 ท่อนนั้น ๆ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม สูตรละ 20 ซ้ำ ซึ่งผลของการเจริญเติบโตในอาหารสูตรต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยแสดงให้เห็นถึง จำนวนต้น และความสูง (อายุ 1 เดือน)

สูตร	จำนวนต้น	จำนวนความสูง(ซม.)
1.1	1.00	4.20
1.2	2.15	4.45
1.3	2.40	2.65
1.4	2.40	3.35
1.5	3.05	3.07

จากตารางที่ 2 พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงต้นเบญจมาศหลังจาก Subculture ครั้งแรก 1 เดือน ในอาหารสูตรเดิม ปรากฏว่า สูตรที่มีจำนวนต้นมากที่สุดคือ สูตรที่ 1.5 คือ มีจำนวนต้นเฉลี่ย 3.05 ต้น มีความสูงเฉลี่ย 3.07 ซม. และในอาหารสูตรที่ 1.3 และ 1.4 มีจำนวนต้นเท่ากัน แต่ความ สูงแตกต่างกัน กล่าวคือ ในอาหารสูตรที่ 1.4 ต้นเบญจมาศ มีความสูงเท่ากับ 3.35 cm. ซึ่งมากกว่า สูตรที่ 1.3 ที่มีความสูง 2.65 ซม. ส่วนในสูตรที่ 1.2 มีจำนวนต้นเฉลี่ย 2.15 ต้น และมีความสูง 4.45 ซม. สำหรับสูตรที่ 1.1 มีจำนวนต้นน้อยที่สุด คือโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1 ต้น (แสดงว่าไม่มีการแตกหน่อเลย) มีความสูงเป็นอันดับสองรองจากสูตรที่ 1.2 สูงเฉลี่ย 4.20 ซม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่าวโดยสรุปจะเห็นว่า สูตรที่มีจำนวนความสูงนั้นพบว่า สูตรที่ 1.2 มีความสูงมากที่สุด และตามด้วยสูตรที่ 1.1 สูตรที่ 1.4 และสูตรที่ 1.3 ตามลำดับ ในอาหารสูตรที่ 1.5 นี้ จะสามารถทำการ Subculture ได้มากที่สุด และตามด้วย สูตรที่ 1.4 สูตรที่ 1.5 สูตรที่ 1.2 และสูตรที่ 1.1 ตามลำดับ เนื่องมาจากอิทธิพลของระดับฮอร์โมน แต่ละสูตรนั้นเอง อาหารสูตรที่มี kinetin เพิ่มขึ้น การแตกยอดก็จะเพิ่มมากขึ้น เพราะ kinetin เป็นฮอร์โมนในกลุ่ม cytokinin จึงมีผลกระตุ้นการแตกยอด แต่ในทางตรงกันข้าม ในด้านความสูง อาหารสูตรที่มี cytokinin ต่ำ ต้นจะมีความสูงมากที่สุด เพราะว่าในอาหารสูตรที่มี cytokinin น้อย Auxin จะสามารถแสดงผลได้มากกว่าในสูตรอาหารที่มี cytokinin มาก ซึ่ง Auxin มีผลทำให้มีการพัฒนาส่วนราก และส่วนยอดและแหล่งที่มี Auxin มากในพืช ได้แก่ บริเวณยอดอ่อน โดยที่ยอดอ่อนจะสร้าง Auxin แล้วส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยการเคลื่อนที่ลงมาข้างล่าง (basepetal movements) แล้วไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของด้านข้าง กล่าวคือ Auxin สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของตาข้างของต้น ทำให้ตาข้างไม่สามารถเจริญเติบโตเต็มที่ ตราบใดที่ตาข้างยังได้รับ Auxin จากยอดอ่อน ถ้าหากทำลายตายอดหรือตัดยอดทิ้ง จะทำให้ตาข้างซึ่งอยู่ต่ำลงมา สามารถเจริญเติบโตได้ทันที ปรากฏการณ์นี้เรียก apical dominance

จากผลของการเจริญเติบโตเมื่อตัดครั้งที่ 2 นี้พบว่า ต้นที่ตัดแบ่งมาจากต้นที่มีความสูง - มาก ก็จะได้ต้นที่สูงมาก ซึ่งแสดงว่าผลของต้นที่นำมาเลี้ยง มีอิทธิพลในความสูงด้วย นอกเหนือจากระดับฮอร์โมน ที่ใช้

ในการทดลองครั้งที่ 1 การเกิดรากจะเกิดในเฉพาะอาหารสูตร 1 เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองที่ 2

เมื่อทำการตัดแบ่ง (Subculture) ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ตารางที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ในอาหารสูตรต่าง ๆ ทั้ง 6 สูตร โดยแสดงถึง จำนวนข้อ จำนวนต้น และจำนวนความสูง (อายุ 1 เดือน)

สูตรอาหาร	จำนวนข้อ	จำนวนต้น	จำนวนความสูง (ซม.)
2.1	8.85	1.35	5.4
2.2	10.1	1.3	6.47
2.3	10	2.4	4.1
2.4	8.1	2.2	3.1
2.5	5	2.6	2.3
2.6	5.15	2.6	2.05

จากตารางที่ 3 ปรากฏการณ์ว่า เมื่อทำการเลี้ยงต้นเบญจมาศในอาหารสูตรต่าง ๆ ทั้ง 6 สูตร สามารถทำให้เกิดการเจริญที่แตกต่างกันไป ตามสูตรอาหารที่ทำการทดลอง ซึ่งในอาหารสูตรที่ 2.2 มีจำนวนข้อมากที่สุด และตามด้วยสูตรที่ 2.3 สูตรที่ 2.1 สูตรที่ 2.4 สูตรที่ 2.6 และสูตรที่ 2.5 มีจำนวนข้อเฉลี่ยเพียง 5 ข้อ ส่วนด้านความสูงของต้นในอาหารสูตรที่ 2.2 ก็มีความสูงมากที่สุด

ถ้าพิจารณาเรื่องการทำการตัดแบ่ง (Subculture) หรือ ด้านการขยายพันธุ์ต่อไปนี้ โดยการ Subculture ออกเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณท่อนละ 1.5 ซม. หรือความยาวแต่ละท่อนจะต้องมีข้อ 1 ข้อ และถ้าหากมี 2 ข้อ ก็ให้ตัดใบที่ตาล่างออกเพื่อปักลงในอาหารวุ้น จะเห็นได้ว่าในอาหารสูตรที่ 2.2 มีจำนวนข้อมากที่สุด จึงส่งผลให้มีการ Subculture ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13599

และตามด้วยอาหารสูตรที่2.3 สูตรที่ 2.1 สูตรที่2.4 สูตรที่ 2.6และสูตรที่ 2.5 ตามลำดับ และในอาหารสูตรที่ 2.2กับสูตรที่ 2.1 มีการเจริญเติบโตของรากอย่างสม่ำเสมอทุกขวด ซึ่งอาหารสูตรที่ 2.2 นี้มีรากขนาดใหญ่ และแข็งแรงกว่าสูตรที่ 2.1 ส่วนการพัฒนาทางด้านส่วนยอดนั้นในเรื่องของความสูงในอาหารสูตรที่ 2.2 และสูตรที่ 2.1 ส่วนมากจะมีจำนวนต้นเพียง 1 ต้น เนื่องจากว่า Auxin ในพืชมีการสร้าง ที่บริเวณยอดอ่อน และเคลื่อนที่ลงมาข้างล่าง ซึ่งสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของตาข้าง และของกิ่งได้ จึงให้มีการพัฒนาส่วนของยอดอ่อนไปเรื่อย ๆ โดยพบว่าจะไม่มีการแตกต้นจากตาข้างหรือ ถ้าพบจะน้อยมาก และทั้ง 2 สูตรนี้ก็พร้อมที่จะนำออกไปปลูกได้ทันที

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาการขยายพันธุ์เบญจมาศโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ใช้กิ่งที่มีตาข้างของเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ นำไปเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อเพิ่มจำนวนต้น ให้ได้จำนวนมากเพื่อจะนำไปปลูกต่อไปพบว่าในการทดลองที่ 1 ต้นที่ได้มีการเจริญเติบโตในอาหารสูตร โดยสูตรที่ 1.1คือ MS + NAA 0.5 mg/l + kinetin 0. mg/l จะได้ต้นที่มีความสูงมากที่สุด และมีรากที่พร้อมออกปลูกได้ในเวลา 1 เดือน สำหรับการแตกต้นพบว่าในอาหารที่มี kinetin เพิ่มขึ้น ก็จะมีการแตกต้นมากขึ้น แต่ความสูงจะลดลงโดยมีข้อปล้องถี่มากขึ้น พร้อมกับมีการเกิด แคลลัส (Callus) ที่บริเวณรอยตัดที่สัมผัสกับอาหารแทนการเกิดราก ซึ่งถ้าพิจารณาในแง่การ Subculture เพื่อเพิ่มจำนวนต้น ต้นที่มีความสูงมากกว่ามีช่วงข้อปล้องยากกว่าจะทำให้เพิ่มจำนวนต้นได้เร็วกว่า เพราะสามารถตัดแบ่งได้มากชิ้นกว่า

ในการทดลองครั้งที่ 2 การใช้ฮอร์โมนเหมือนกับการทดลองครั้งที่ 1 แต่เพิ่มสูตรที่ใช้น้ำมะพร้าว 25% โดยปริมาตรขึ้นมาอีก 1 สูตร และเพิ่มน้ำตาลจาก 30 gm/l เป็น 40 gm/l พบว่าการเจริญเติบโตในแง่ความสูง และการแตกต้นเป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่มีการเจริญเติบโตดีกว่าในช่วงเวลาเท่ากัน ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษานี้ผลสรุปได้ว่า ในการขยายพันธุ์เบญจมาศโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรใช้อาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.5 mg/l หรือจะใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. พรทิพย์ ธนูทอง. 2528. วิธีการเพาะเลี้ยงเซลและเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

2. ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

3. สมเพียร เกษมทรัพย์. 2522. การปลูกไม้ดอก. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

4. สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2529. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารพืชสวน. 16 : 47-56.

5. สุเม อรัญนาถ. 2524. การขยายพันธุ์บุญมาศโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

6. อรดี สหวัชรินทร์. 2522. ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้านการเกษตร. วารสารพืชสวน. 14: 35-43.

7. อรดี สหวัชรินทร์. 2526. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

8. Bush, S.R., E.D. Earle and R.W. Langhans. 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis and shoot tips of the periclinal chimera, Chrysanthemum morifolium "Indianapolis". Amer. J. Bot. 63 : 729 - 737.

9. Earle, E.D. and R.W. Langhans. 1974. Propogation of chrysanthemum in vitro I. Multiple plantlets from shoot tip and the establishment of tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99 : 128 - 132.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Murashige, T. 1974. Plant propogation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25 : 135 - 166.

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

12. Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans and J.A.J. Van Der Meys. 1974. Plantlet formation in callus tissue of Anthurium andraenum Lind. Scientia Hort. 2 : 193 - 198.

13. Puhan, Z. and S.M. Martin. 1967. The industrial potential of plant cell culture. In Hockenhull, D.J.D. 1967. Progress in Industrial Microbiology London : J & A Churchill.

14. Roest, S. and G.S. Bokelmann. 1975. Vegetative propagation of Chrysanthemum morifolium Ram. in vitro. Scientia Hort. 3 : 317 - 330.

15. Sharp, W.R. and P.O. Larsen. 1977. Plant cell and tissue culture : Current application and potential. In Sharp, W.R., P.O.Larsen, E.F. Poddock and V. Saghavan. 1977. Plant Cell and Tissue Culture. Columbus : Ohio State University Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

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

ตารางผนวกที่ 1 Inorganic macronutrients (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 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น 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
$Na_2 MoO_4 \ 2H_2O$	0.25

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 acid	0.5
Na_2 EDTA	37.3

ในสูตรอาหารแข็งใช้ Difco "Bacto" agar 6.5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ ในอาหารสูตรที่ 1.1 ในแต่ละขวด โดยการแสดงให้เห็นถึง จำนวนต้น และจำนวนความสูง (ซม.) (อายุ 1 เดือน)

ขวดที่	จำนวนต้น	จำนวนความสูง (ซม.)
1	1.3	5
2	1.3	4.16
3	1	5.16
4	1	3.83
5	1	5
6	1	5
7	1	5.56
8	1	3.83
9	1	4.5
10	1	4.83
เฉลี่ย	1.06	4.68

สูตรที่ 1.1 นี้มีการเจริญเติบโตทางด้านรากและด้านยอด ทุกขวดสามารถเกิดรากได้หมด รากมีขนาดใหญ่ และแข็งแรงกว่าสูตรอื่น ๆ ลักษณะของใบมีการขยายใหญ่โตเต็มที่เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่น ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ในอาหารสูตรที่ 1.2 ในแต่ละขวด โดยการแสดงให้เห็นถึง จำนวนต้น และจำนวนความสูง (ซม.) (อายุ 1 เดือน)

ขวดที่	จำนวนต้น	จำนวนความสูง(ซม.)
1	2.5	5.5
2	2	4.75
3	2.5	5
4	2	5.5
5	2.5	5.25
6	2	6.25
7	1.5	5
8	3	5.25
9	2.5	5
10	2	4
เฉลี่ย	2.25	5.15

สูตรที่ 1.2 มีการแตกต้นใหม่เพียง 2 ต้น ลักษณะของใบจะมีขนาดใหญ่ไม่มากนัก สีของใบและลำต้น จะมีสีเขียวปกติ ลำต้นอวบสูงกว่าสูตรอื่น ๆ ส่วนมากจะมีการเจริญเติบโตเห็น-เด่นชัดทางส่วนของยอด เพราะยอดมีการพัฒนาเร็วกว่าสูตรอื่น ๆ และในระยะ เวลา 1 เดือน รากก็ยังไม่เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ ในอาหารสูตรที่ 1.3 ในแต่ละขวด โดยการแสดงให้เห็นถึง จำนวนต้น และจำนวนความสูง (ซม.) (อายุ 1 เดือน)

ขวดที่	จำนวนต้น	จำนวนความสูง(ซม.)
1	3	3
2	2.5	3.75
3	3	3.75
4	3	3.5
5	2	3.25
6	2.5	3.5
7	3.5	3
8	2	2.75
9	3	3.5
10	2	3.25
เฉลี่ย	2.65	3.32

สูตรที่ 1.3 มีการแตกต้นใหม่เพียง 2-3 ต้น ลักษณะของใบมีขนาดเล็ก การคลี่ของใบไม่ปกติ ใบจะม้วน ลำต้นมีขนาดเล็ก ลำต้นที่เลี้ยงในสูตรนี้มักจะมีสีซีดบาง ลำต้นไม่อวบ และความสูงก็ไม่มาก แต่มีการเกิดแคลลัสบางเล็กน้อย มีการพัฒนาทางด้านส่วนยอดข้ากว่าสูตรที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ ในอาหารสูตร 1.4 ในแต่ละขวด โดยการแสดงให้เห็นถึง จำนวนต้น และจำนวนความสูง (ซม.) (อายุ 1 เดือน)

ขวดที่	จำนวนต้น	จำนวนความสูง(ซม.)
1	2	3.33
2	3	3.5
3	3.33	4
4	2.33	4.67
5	3.33	3
6	2.67	2.16
7	4	2.5
8	2.67	4
9	2.33	3.67
10	2.33	3.33
เฉลี่ย	2.79	3.41

สูตรที่ 1.4 มีการเจริญและแตกต้นใหม่ 2-3 ต้น ลักษณะของใบยังไม่คลี่เต็มที่ตามปกติ จะมีการม้วนของปลายใบ และมีการเกิดแคลลัสมากเป็นอันดับที่ 2 รองมาจากสูตรที่ 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 8 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศพันธุ์เหลืองไข่ ในอาหารสูตรที่ 1.5 ในแต่ละขวด โดยการแสดงให้เห็นถึง จำนวนต้น และจำนวนความสูง (ซม.) (อายุ 1 เดือน)

ขวดที่	จำนวนต้น	จำนวนความสูง(ซม.)
1	2.67	3.33
2	2.67	3
3	3	2.67
4	2.67	3.17
5	3.33	2.67
6	3.33	2.17
7	2.67	3.33
8	3.33	3.16
9	4	3
10	3.33	2.67
เฉลี่ย	3.1	2.9

สูตรที่ 1.5 มีการเจริญ และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ 3-4 ต้น มีความยาวน้อยกว่าสูตรอื่น ๆ แต่มีการแตกเป็นต้นใหม่มากกว่าสูตรอื่น ๆ และมีการเกิดแคลลัสมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้