14521

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ห้องสมุด

เรื่อง

การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเฮลิโคเนียในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Multiplication of *Heliconia* sp.

โดย

นายธีรวัฒน์ เลิศลอยปัญญาชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบจาก

(อาจารย์ ดร.สุเม อรัญนารถ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ปพ.
ธ647ก
2536

ภาควิชารับรองแล้ว

(อาจารย์ปัญญา โพธิฐิรัตน์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ 19 เดือน พ.ย. พศ. 36

เลขหมู่.........
เลขทะเบียน 100077
วัน.เดือน.ปี. 17 JUN 2009

T100077

ปพ.
ธ647ก
2536

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ห้องสมุด
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาการเพิ่มปริมาณ ของเฮลิโคเนียในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Multiplication of *Heliconia sp.*

โดย

นาย ธีรวัฒน์ เลิศลอยปัญญาชัย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.สุเม อรัญนารถ

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะ เทคโนโลยีการเกษตร

สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2536

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ห้องสมุด
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่องนี้ที่สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความอนุเคราะห์ และอุปการคุณ จากบุคคลที่ทรงเกียรติหลาย ๆ ท่าน ที่ได้ให้การสนับสนุนและให้ปรึกษาแนะนำในทุก ๆ ด้าน ซึ่งหากขาดบุคคลเหล่านี้แล้ว ปัญหาพิเศษฉบับนี้ก็มิอาจสำเร็จได้อย่างแน่นอน

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ และ ขอบคุณทุกท่านที่ได้กล่าวถึงเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย ได้แก่

1. คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุน และช่วยเหลือทางด้านปัจจัย เงินทอง ทุกสิ่งทุกอย่าง พร้อมกับให้กำลังใจเสมอมา

2. อาจารย์ ดร.สุเม อรัญนารถ ซึ่งเป็น อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่เคารพ ได้ให้คำปรึกษา และ ข้อแนะนำต่าง ๆที่เป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ อีกทั้งยังช่วยกรุณาตรวจแก้ไขสิ่งที่บกพร่องหลายครั้งหลายคราจนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้ได้สำเร็จ อย่างสมบูรณ์ที่สุด อีกทั้งคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุก ๆ ท่าน ที่ให้คำปรึกษาและติชม รวมทั้งให้กำลังใจเสมอมา

3. อาจารย์ ดร. ปัญญา โพธิฐิรัตน์ ที่ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำต่าง ๆ ในการใช้โปรแกรมทางสถิติ เพื่อนำมาใช้ในการเรียบเรียงข้อมูลและประมวลผลข้อมูลต่าง ๆ ทางสถิติได้เป็นอย่างดี

4. เพื่อน ๆ น้อง ๆ ที่เป็นทั้งแรงใจ และแรงกระตุ้นที่ช่วยผลักดันให้ปัญหาพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธีรวัฒน์ เลิศลอยปัญญาชัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเฮลิโคเนียในสภาพปลอดเชื้อ
	In Vitro Multiplication of *Heliconia* sp.
โดย	นายธีรวัฒน์ เลิศลอยปัญญาชัย
สาขา	พืชสวน ภาควิชา เทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. สุเม อรัญนารถ

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเฮลิโคเนียในสภาพปลอดเชื้อนั้นได้ใช้ชิ้นส่วน ตาที่เกิดจากต้น หรือ เหง้าใต้ดิน มาทำการฟอกด้วย ethanol 70 % นาน 1 นาที ตามด้วย Mercuric chloride 0.1 % + Tween20 2 หยด นาน 20 นาที และ Calcium hypochlorite 5 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที หลังจากนั้นลอกกาบชั้นนอกของชิ้นส่วนออก 2-3 ชั้น แล้วฟอกอีกด้วย Calcium hypochlorite 1 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำการทดลองชักนำชิ้นส่วนให้เกิด callus โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่าอาหาร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลงที่เติม adenine sulphate 80 มิลลิกรัมต่อลิตร $NaHPO_4$ 170 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร myoinositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร sodium hydrogen phosphate 170 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด ส่วนการเพิ่มจำนวนยอดทำได้โดยย้ายชิ้นส่วนจากอาหารดังกล่าวไปเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง MS ที่ปราศจากน้ำมะพร้าวและเติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Abstract

A protocol was developed for *in vitro* propogation of *Heliconia sp.*(*H. stricta* and *H. psittacorum*)by culturing terminal and axillary buds of rhizome.Disinfestation methods were tested; the least contamintion was obtained from the following surface sterilization buds were washed in running tap water for 30 minutes, immersed in 70 % ethanol for 1 min, shaken in 0.1% mercuric chloride for 10 min and 5% calcium hypochlorite for 20 min respectively. Later 2-3 layers of young leaves were removed and then argitated in 1 % calcium hypochlorite for 20 min,rinsed three times in sterile distilled water. Cultures were initated on modified Murashige and Skoog(1962) inorganic salts supplemented with the following : 80 mg/l adenine sulphate ; 0.5 mg/l thiamine-HCl ; 100 mg/l myoinositol ; 170 mg/l sodium hydrogen phosphate ; 150 ml/l coconut water and 5 mg/l BA. Shoot multiplication was achieved on the above MS medium without coconut water, but supplemented with 2.5 mg/l BA.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
คำย่อที่ใช้ในรายงาน	1
คำนำ	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์ และ วิธีการ	
-อุปกรณ์	8
-วิธีการ	9
ผลการทดลอง	19
วิจารณ์ผลการทดลอง	33
สรุปผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	40

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลของการทำความสะอาดชิ้นส่วนของ H. *stricta* เมื่อชิ้นส่วนอายุ 1 สัปดาห์ 19

ตารางที่ 2 ผลของการทำความสะอาดชิ้นส่วนของ H. *psittacorum* 19

ตารางที่ 3 ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน H. *psittacorum* เมื่ออายุ 1 เดือน 21

ตารางที่ 4 ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน H. *psittacorum* เมื่ออายุ 2 เดือน 24

ตารางที่ 5 ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตและการเกิดยอดของชิ้นส่วน H. *psittacorum* ที่เกิด callus เมื่ออายุ 2 เดือน 26

ตารางที่ 6 ผลของ BA ต่อการเติบโตและการเกิดยอดของชิ้นส่วน H. *psittacorum* ที่ไม่เกิด callus เมื่ออายุ 2 เดือน 30

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของตา H. *psittacorum* ที่เลี้ยงในอาหาร สูตรดัดแปลง MS ที่มีความเข้มข้นของ BA และ NAA ระดับต่างๆ เมื่ออายุ 2 เดือน	14
ภาพที่ 2 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของตา H. *psittacorum* ที่เลี้ยงในอาหาร สูตรดัดแปลง MS ที่มีความเข้มข้นของ BA ระดับต่างๆ เมื่ออายุ 2 เดือน	18
ภาพที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่ถูกชักนำให้เกิด callus ในระยะต่างๆ กัน	24
ภาพที่ 4 แสดงผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เกิด callus แล้วชักนำให้เกิดยอดที่อายุ 2 เดือน ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ปราศจากน้ำมะพร้าวและเติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน	29
ภาพที่ 5 แสดงผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่ไม่เกิด callus แล้วชักนำให้เกิดยอดที่อายุ 2 เดือน ในอาหารสูตรดัดแปลงที่ปราศจากน้ำมะพร้าวและเติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน	32

คำย่อที่ใช้ในรายงานฉบับนี้

IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
NAA	α-Nephthaleneacetic acid
2,4-D	(2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid
2,4,5-T	(2,4,5-Trichlorophenoxy) acetic acid
BA or 6BA	6-Benzylaminopurine
MS	Murashige and Skoog (1962)
NaOCl	Sodium hypochlorite
Clorox	เป็นชื่อทางการค้าประกอบด้วย NaOCl 5.25 w/w

การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเฮลิโคเนียในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Multiplication of *Heliconia sp.*

คำนำ

ในปัจจุบัน เมืองไทยเริ่มมีความนิยม Heliconia โดยมีการนำเข้าพันธุ์ใหม่ ๆ จากต่างประเทศ ช่อดอกมีสีสวย ดอกบานทน มีคุณสมบัติเหมาะสมใช้เป็นไม้ตัดดอก ส่วนที่เด่นและมีสีสรรสวยสะดุดตา คือส่วนที่เรียกว่า กาบรองดอก หรือ ใบประดับ ในปัจจุบันจึงมีดอก Heliconia จำหน่าย และในอนาคตเชื่อว่า Heliconia คงเป็นไม้ตัดดอกที่ในความนิยมอีกชนิดหนึ่งแน่นอน

ในการปลูก Heliconia (จิรายุพิน,2534) เพื่อทำเป็นไม้ตัดดอกจำเป็นต้องมีต้นพันธุ์สำหรับการขยายพันธุ์จำนวนมากโดยทั่วไปแล้ว Heliconia สามารถขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี คือ 1. การเพาะเมล็ด โดยส่วนใหญ่ได้จากการนำเข้ามาจากต่างประเทศ 2.โดยการแยกหน่อโดยเมื่อดอกบานหมดแล้ว นิยมตัดต้นลงให้เสมอดิน เพื่อกระตุ้นให้หน่อใหม่เจริญ โดยจะเกิดแตกหน่อที่เหง้าลำต้นใต้ดิน แล้วจึงทำการแยกต้นพร้อมหน่อซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้ นับว่าเป็นการขยายพันธุ์โดยวิธีทางธรรมชาติที่ช้ามาก สำหรับการที่จะเพิ่มต้นพันธุ์ในการทำเป็นไม้ตัดดอกเพื่อการค้า และยิ่งในช่วงฤดูหนาวซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการแตกหน่อ ก็จะทำให้เกิดการแตกหน่อได้ช้าลงไปอีก หากมีการสั่งต้นพันธุ์จำนวนมาก ๆ อาจจะเป็นการลงทุนที่ค่อนข้างสูง และบางทีอาจจะไม่คุ้มต่อการลงทุนเพราะ Heliconia พันธุ์ใหม่ ๆ มักจะเป็นพันธุ์ที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัย การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ในปริมาณที่มากในเวลารวดเร็ว

สำหรับงานทดลองนี้เป็นงานทดลองเบื้องต้นสำหรับการขยายพันธุ์ Heliconia โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการทดลองในครั้งนี้ได้ศึกษาถึงวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเริ่มต้นและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ Heliconia เพื่อใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ Heliconia โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

การตรวจเอกสาร

Heliconia มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกาเขตร้อน ทั้งในอเมริกากลางและอเมริกาใต้เป็นพืชที่มีสกุลเดียว (จิรายุพิน,2534) คือ สกุล Heliconiaceae มีถึงประมาณ 150ชนิดซึ่งมีความสูงตั้งแต่ 30 เซนติเมตร จนถึง 6 เมตร (Broschat and Donsehman,1983) อยู่ในวงศ์ Musaceae (Graf,1981)

Heliconia (จิรายุพิน,2534) เป็นพืชล้มลุกข้ามฤดู หรือ หลายฤดูชนิดต้นสูงจะมีลักษณะคล้ายต้นกล้วย มีลำต้นอัดตัวรวมกันแน่นเป็นเหง้าทอดเลื้อยไปใต้ดิน มีก้านใบรวมหุ้มอยู่ด้วยกันแบบกาบกล้วย แต่ผอมกว่า กาบใบนี้จะเรียงสลับกันทำให้ดูเสมือนว่าเป็นลำต้นตั้งอยู่ ใบมักใหญ่คล้ายๆ ใบกล้วย ในบางชนิดหน่อจะเกิดที่โคนต้น แต่บางชนิดหน่อจะเกิดห่างจากต้นเดิม บางชนิดเมื่อใบเจริญเต็มที่ประมาณ 4-5 ใบ จะเกิดช่อดอกขึ้นที่กลางกอ ช่อดอกมีใบประดับรองรับอยู่ใบประดับมีสีสวยงามเป็นส่วนใหญ่ เรียงสลับกันไปลักษณะเหมือนรูปเรือ และ มักจะอยู่ในระนาบเดียวกัน ภายในมีดอกคล้ายดอกกล้วยเล็ก ๆ และมักเรียงอยู่เพียง 1 แถว (กล้วยต้องมี 2 แถว) แต่ละดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ และกลีบดอก 3 กลีบ แต่อยู่ติดกันเป็นหลอดภายในมีเกสร 6 อัน ซึ่งเจริญเพียง 5 อัน ส่วนอีก 1 อัน เป็นหมัน เกสรตัวผู้ยาวไปตามกลีบดอก รังไข่มี 1 อัน ภายในมี 3 ช่อง ภายในเป็นขนนุ่มคล้ายกล้วยเล็ก ๆ เมล็ดแข็ง

ในอดีตนักพฤกษศาสตร์เชื่อว่า Heliconia เป็นพืชที่ใกล้เคียงกับกล้วย

Heliconia psittacorum มีชื่อเรียกทั่ว ๆ ไปว่า "Parrot Flower" หรือ "กล้ามกุ้งสีทอง" เป็นไม้ตัดดอกที่ออกดอกง่าย และเป็นพันธุ์ที่นิยมในการทำไม้ตัดดอกมากที่สุดชนิดหนึ่ง (จิรายุพิน,2534)

Nathan *et al.*(1992) ได้ประสพผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Heliconia พันธุ์ *Heliconia psittacorum L.F.* โดยการใช้ชิ้นส่วนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ตาข้าง หรือ หน่อซึ่งเกิดจากเหง้าโดยนำตาที่ได้มาผ่านน้ำสะอาดประมาณ 15 นาที และ นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย ethanol 80 % 30 วินาที หลังจากนั้นล้างด้วย NaOCl 0.8 %

นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ตัดชิ้นส่วนเหลือประมาณ 3 ลบ.มม. ก่อนจะนำมาเลี้ยงในอาหารให้ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วย NaOCl 0.4 % 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร MS โดยใส่ BA 40 µM/l น้ำมะพร้าว 150 ml/l น้ำตาลซูโครส 30 g/l และ Gelrite 2 g/l ส่วนสูตรอาหารที่เลี้ยงให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด คือ สูตรอาหาร MS ที่ไม่ใส่น้ำมะพร้าว และ เติม BA 10 µM/l สำหรับอาหารที่ทำให้เกิดรากได้เลี้ยงไว้ในสูตรอาหารดัดแปลง MS ที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากนั้นแล้วจึงปรับสภาพของต้นไม้ให้คุ้นเคยกับการเพาะชำในเรือนกระจก

ปิยา และ อุเทน (2533) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Heliconia psittacorum* พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 2 % นาน 60 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์ของหน่อที่ปลอดเชื้อสูงที่สุด เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS + BA 5 mg/l หน่อจะมีการเจริญเติบโตเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารแข็งในสูตรอาหารเดียวกัน ปรากฏว่ามีสารสีน้ำตาลรอบ ๆ หน่อบนอาหารแข็ง ส่วนในอาหารเหลวจะมีสีน้ำตาลอ่อน การเลี้ยงในสภาพ paper bridge จะทำให้หน่อที่ได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหน่อและตายในที่สุด

เบญจมาศ และ Gamborg (2529) ได้ทำการศึกษาชักนำให้เกิด callus ในกล้วยหอมโดยใช้ชิ้นส่วนของแผ่นใบ ก้านใบ และราก เลี้ยงในสูตรอาหาร MS และ Gamborg *et al.* (1968) ที่เพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D; 2,4,5-T , IAA, NAA และ Dicamba ที่ความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 ppm ทุกๆ ความเข้มข้นเพิ่ม BA เข้มข้น 0.5, 2 และ 5 ppm ตามลำดับ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26°c แสงประมาณ 2000 lux จากผลการทดลองพบว่า เฉพาะแผ่นใบเท่านั้นที่ callus เกิดขึ้น โดยประมาณ 50 % และสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิด callus ได้คือ MS ที่เพิ่ม NAA และ BA เท่านั้น และความเข้มข้น (ppm) ที่สามารถชักนำให้เกิด callus คือ 1 NAA + 5 BA , 2.5 NAA + 2 BA , 2.5 NAA + 5 BA , 5 NAA + 5 BA สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ 50 % ส่วน 1 NAA + 2 BA

และ 5 NAA + 2 BA เกิด callus 20 % เมื่อนำ callus มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เพิ่ม BA พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 2.5 ppm สามารถกระตุ้นให้เกิดต้นได้ 30 % และเมื่อย้ายต้นอ่อนลงในสูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าทุกต้นสามารถเกิดรากได้

อรดี และ ปาริชาต (2526) ได้นำชิ้นส่วนปลายยอด และ ตาข้าง ของหน่อกล้วยหอมทอง กล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และ กล้วยน้ำว้าค่อม มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่เติม BA 5 ppm และ น้ำมะพร้าว 15 % สามารถทำให้เกิดยอดจำนวนมาก หลังจากทำการตัดแบ่ง และ เปลี่ยนสูตรอาหารใหม่ทุกเดือน จนได้หน่อเป็นจำนวนมาก ก็เปลี่ยนลงบนอาหารสูตร MS ธรรมดา จะเกิดราก ซึ่งสามารถนำออกปลูกลงดินได้ วิธีนี้จึงนับว่าเป็นเทคนิคในการขยายพันธุ์กล้วยให้ได้กล้วยเป็นจำนวนมาก ในเวลาอันรวดเร็ววิธีหนึ่ง

สุภาพร (2532) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ ได้มีการนำปลายยอดกล้วยไข่มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % ผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเพิ่มขนาด แตกหน่อและ มีการพัฒนาต้นที่แข็งแรงพร้อมรากภายในเวลา 6 สัปดาห์ และ เมื่อนำเอาต้นที่ได้มาตัดแบ่งเป็น 2 ส่วน นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณหน่อจากเดิม 1 ต้น เป็น 24 ต้น ภายในเวลา 3 เดือน

กัลยาณี และ คณะ (2533) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยนำปลายยอดของกล้วยขนาด 1 ลูกบาศก์นิ้ว มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย clorox 10 % นาน 15 นาที ตัดแบ่งตามยาว ออกเป็น 4 ส่วน เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 15 % และ BA 1 mg/l พบว่า เนื้อเยื่อมีการเพิ่มขนาดเปลี่ยนเป็นสีเขียว ตายอด และ ตาข้างที่อยู่ระหว่างซอกใบ มีการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้วยขนาดเล็กได้ภายในเวลา 2 เดือน เมื่อนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาตัดแบ่งเป็น 2 ส่วน ตามยาว และ ย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากน้ำมะพร้าว พบว่าภายในเวลา 1 เดือนสามารถเพิ่มปริมาณได้ 2.44 ต้น ต่อ จำนวนหน่อ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 1 หน่อ

ประภาสินี (2529) ได้ศึกษาถึงเทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทำการ ศึกษาการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลง และ การเพิ่มปริมาณของกล้วยไข่พระตะบองโดยนำหน่อกล้วยไข่พระตะบองขนาดสูง 20 ซม. มาลอกกาบด้วยด้านนอกออก ล้างด้วยน้ำสะอาด ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย clorox 10 % นาน 30 นาที ลอกกาบที่สัมผัส clorox ออกอีก 1-2 ชั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ตัดแล้วลอกกาบออกอีก จนมีขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. ตัดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 15 % และ BA 5 mg/l พบว่า ตาข้างที่อยู่ระหว่างซอกใบมีการเจริญเติบโตเป็นหน่อ กล้วยเล็ก ๆ ได้เมื่อทำการตัดแบ่ง และ ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ถึง 1,025 หน่อในเวลา 20 สัปดาห์ และ ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงและการเพิ่มปริมาณของกล้วย Bungulan ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อพบว่าความเป็น กรด-ด่าง ของอาหารที่เหมาะสม คือ pH 5.6 สารเร่งการเจริญเติบโต กลุ่ม Cytokinin ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณหน่อ คือ น้ำมะพร้าว 20 % หรือ BA 5 mg/l หรือ Kinetin 2.5 mg/l สารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่ม Auxins ที่เหมาะสมต่อการเกิดรากคือ IAA หรือ NAA 1 mg/l

De Guzman *et al.*(1980) ทำการเลี้ยงปลายยอดของกล้วยพันธุ์ Lacatan โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย calcium hypochlorite แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % และ BA 5 ppm พบว่า ในการตัดแบ่ง และ ย้ายอาหารครั้งที่ 1 และ 2 การเพิ่มปริมาณเป็นไปได้ช้ามาก แต่ในครั้งที่ 3 และ 4 การเพิ่มปริมาณเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว

Cronauer and Krikorian (1985) รายงานว่า การเพิ่มปริมาณยอดของกล้วยพันธุ์ *Dwarf cavendish* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำตายอด มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 2 % (v/v) พร้อมกับหยด Tween 20 2 หยด นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง แล้วจึงนำมาเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง MS โดยเติม inositol 5.5 mM , thiamine HCl 2.97 µM น้ำตาลซูโครส 0.12 M ,น้ำมะพร้าว 10 % (v/v)และBA 22µM

แล้วนำมาเลี้ยง ในอาหารเหลว เพื่อชักนำให้หน่อเป็นสีเขียว หลังจากนั้นทำการเพิ่มยอดโดยการย้ายลงในอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็ง แล้วทำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็งที่บรรจุ NAA 5.5 μM และ activated charcoal 0.025 %

Swamy *et al.* (1983) พบว่าปลายยอดของกล้วย Robusta ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % ร่วมกับ BA 10 mg/l และIBA 5 mg/l จะเจริญเป็นต้นเดี่ยว ถ้าไม่มีการตัดแบ่งปลายยอดนั้น แต่ถ้าตัดแบ่งตาข้างที่พักตัวตามซอกใบ จะเจริญเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 35 หน่อ เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % และ BA 10 mg/l เมื่อต้องการให้เกิดรากก็ย้ายลงบนอาหารที่เติม IBA 5 mg/l

Olivia and Barba (1984) รายงานว่า ปลายยอดของกล้วย Saba ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 10 mg/l สามารถเพิ่มปริมาณได้ถึง 200,000 ต้น ภายในเวลา 10 เดือน โดยทำการย้ายอาหารทุก 8 สัปดาห์

Jarret *et al.*(1985)รายงานว่าเมื่อเลี้ยงปลายยอดของกล้วยพันธุ์ Pelipita และ Saba บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l ร่วมกับ IAA 1 mg/l ขนาดของเนื้อเยื่อที่เพิ่มขึ้น 3-5 เท่าของขนาดเริ่มต้นในเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อทำการตัดแบ่ง และ ย้ายลง เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 mg/l ทุก 4-6 สัปดาห์ ยอดเล็ก ๆ จะเพิ่มขึ้นได้ 16 ยอดจากชิ้นส่วน 1 ชิ้น แต่ถ้าเก็บไว้ 4 และ 8 เดือน ยอดจะเพิ่มเป็น 22 และ 31 ยอดตามลำดับ เมื่อต้องการให้เกิดรากก็ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

อุปกรณ์ และ วิธีการ

1.อุปกรณ์

เครื่องมือ และ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองแบ่งออกเป็น 5 หมวด

1.1.เครื่องมือที่ใช้ในตู้ Laminar Flow : ปากคีบ, มีดผ่าตัดเล็กพร้อมด้าม , ตะเกียงอัลกอฮอล์ , กระดาษตะกั่ว , กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml. , อัลกอฮอล์จุ่มฆ่าเชื้อ ผ้าขาวบาง , plate , ไฟแช็ค , บีกเกอร์ ขนาด 100 ml.

1.2.เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร : บีกเกอร์ ขนาด 50 , 100 , 500 และ 1000 ml. , หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ , เครื่องชั่งไฟฟ้า , เครื่องชั่งธรรมดาขนาดเล็ก , ช้อนคนสาร, ช้อนตักสาร , ขวดขนาดเล็กพร้อมฝา , เครื่องวัด pH , กระดาษไข, ตะกร้า , กระบอกตวง ขนาด 50 , 100 , 500 และ 1000 ml. , ปิเปต ขนาด 5 และ 10 ml. , กรวยกรอกอาหาร , หนังยาง , ถุงพลาสติก , เทปวัดการนึ่งฆ่าเชื้อ , นาฬิกาจับเวลา

1.3.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร :

- สารเคมีในสูตรดัดแปลงอาหาร Murashige and Skoog (1962) (ดูส่วนประกอบในภาคผนวก)
- Sodium hydrogen phosphate ($NaHPO_4$)
- Adenine sulphate
- สารควบคุมการเจริญเติบโต

  BA or 6BA (6-Benzylaminopurine)

  NAA (α-Naphthaleneacetic)

1.4.สารเคมีที่ใช้ในการฟอก

- ethanol 70 %
- Clorox (NaOCl 5.25 w/w)

- Calcium hypochlorite
- Mercuric chloride
- Tween 20

1.5.หน่อของ Heliconia ที่ใช้ในการทดลอง

พันธุ์ - *Heliconia stricta cv. Dwarf Jamaican*

- *Heliconia psittacorum*

2.วิธีการ

2.1. การเตรียมอาหาร

การเตรียมสูตรอาหารดัดแปลงของ Murashige & skoog (1962)เตรียม stock solution โดยเตรียม Macroelementsให้มีความเข้มข้นของstockเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ ส่วน Microelements และ Organiccompound จะเตรียม stock ให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ สำหรับ final solution ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร stock ของ Macroelements ซึ่งมีความเข้นข้น 10 เท่า จะใช้ 100 มิลลิลิตร และ Microelements ซึ่งมีความเข้นข้นเท่ากับ 100 จะใช้ 10 มิลลิลิตร จาก stock หลังจากนั้นแล้วปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 5.7 $\pm$ 1 ด้วย NaOH 1 N̲ หรือ HCl 1 N̲ จากนั้นกรอกใส่ขวดอาหารขนาดเล็ก แล้วนำไปนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว นาน 15 - 20 นาที เก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 25 ·c

2.2. การเตรียมหน่อ

1.นำหน่อมาทำการผ่านน้ำไหล นานอย่างน้อยประมาณ 30 นาที โดยทำการลอกกาบชั้นแรก ๆ ที่มีดินติดอยู่ หรือ ที่สกปรกอยู่ออกก่อน

2.นำชิ้นส่วนไปฟอกตามขั้นตอนดังแสดงในการทดลองที่ 1

3.ใช้มีดตัด แล้วลอกกาบออกจนได้หน่อที่มีขนาดเล็กที่สุด ที่จะสามารถลอกกาบออกได้ ตัดฐานออกให้เหลือติดกับกาบของหน่อ ประมาณ 1 - 2 มม. โดยข้อสำคัญ ให้มีตายอดติดอยู่ด้วย และ ตัดส่วนที่สัมผัส กับ สารฟอกทิ้งให้หมด ซึ่งสุดท้ายจะได้ตาที่มีขนาดประมาณ 5 มม.

2.3. สภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25° ± 2°c ความเข้มของแสง 2500 lux โดยมีช่วงแสง 12 ชม. ต่อ วัน

ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน และ บันทึกผลทุกสัปดาห์

2.4. วิธีการทดลอง

2.4.1. <u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาผลของสารฟอกฆ่าเชื้อที่มีต่อการทำความสะอาดชิ้นส่วน

วิธีการ ทำการทดลองดังวิธีการต่อไปนี้

<u>วิธีการที่ 1</u> ใช้ *Heliconia stricta cv. dwarf Jamaican* ในการทดลอง โดยมีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ethanol 70 % นาน 30 วินาที
2. clorox 15.24 % + Tween20 2 หยด นาน 15 นาที
3. clorox 7.62 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

วิธีการที่ 2 ใช้ *Heliconia stricta cv. dwarf Jamaican* ในการทดลอง โดยมีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ethanol 70 % นาน 30 วินาที
2. calcium hypochlorite 5 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
3. calcium hypochlorite 1 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

วิธีการที่ 3 ใช้ *Heliconia psittacorum* ในการทดลอง โดยมีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ethanol 70 % นาน 1 นาที
2. clorox 20 % + Tween20 2 หยด นาน 30 นาที
3. ลอกกาบของหน่อออกก่อนประมาณ 2 - 3 ชั้น
4. clorox 10 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
5. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

วิธีการที่ 4 ใช้ *Heliconia psittacorum* ในการทดลอง โดยมีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ethanol 70 % นาน 1 นาที
2. Mercuric cholride 0.1 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
3. clorox 20 % + Tween20 2 หยด นาน 20 นาที
4. ลอกกาบของหน่อออกก่อนประมาณ 2 - 3 ชั้น
5. clorox 10 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
6. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

<u>วิธีการที่ 5</u> ใช้ *Heliconia psittacorum* ในการทดลอง โดยมีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ethanol 70 % นาน 1 นาที
2. Mecuric chloride 0.1 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
3. calcium hypochlorite 5 % + Tween20 2 หยด นาน 20 นาที
4. ลอกกาบของหน่อออกก่อน ประมาณ 2 - 3 ชั้น
5. calcium hypochlorite 1 % + Tween20 2 หยด นาน 10 นาที
6. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อในวิธีการต่างๆ ไปเลี้ยงบนสูตรอาหารพื้นฐาน **(ดังแสดงในข้อ** 2.1) บันทึกผลการปนเปื้อนของชิ้นส่วน ทุก ๆ 1 สัปดาห์

2.4.2.การทดลองที่ 2 : ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิด callus

ใช้ *Heliconia psittacorum* ในการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design 3 ซ้ำ โดยให้ความเข้มข้นของ BA เป็น factor A มี 4 ระดับ คือ BA 0, 5 ,10 และ 15 mg/l และ ความเข้มข้นของ NAA เป็น factor B มี 3 ระดับ คือ NAA 0, 0.1 และ 1 mg/l

วิธีการ **2.4.2.1.การฟอกฆ่าเชื้อ**

นำหน่อที่ขุดได้มาทำการผ่าน น้ำไหลอย่างน้อยประมาณ 30 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อตาม วิธีการที่ 5 เนื่องจากวิธีนี้ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ในการทดลองที่ 1

2.4.2.2.การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารสูตรพื้นฐานดังที่กล่าวมาแล้ว ในข้อ 2.1 แล้วเติม สารควบคุมการเจริญเติบโตลงใน สูตรอาหารดังที่ได้กล่าวมาแล้วในแผนการทดลอง

2.4.2.3.การบันทึกผลการทดลอง

2.4.2.3.1.การเจริญเติบโต บัณทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนโดยการให้คะแนน ซึ่งมีหลักเกณฑ์การให้คะแนน ดังนี้

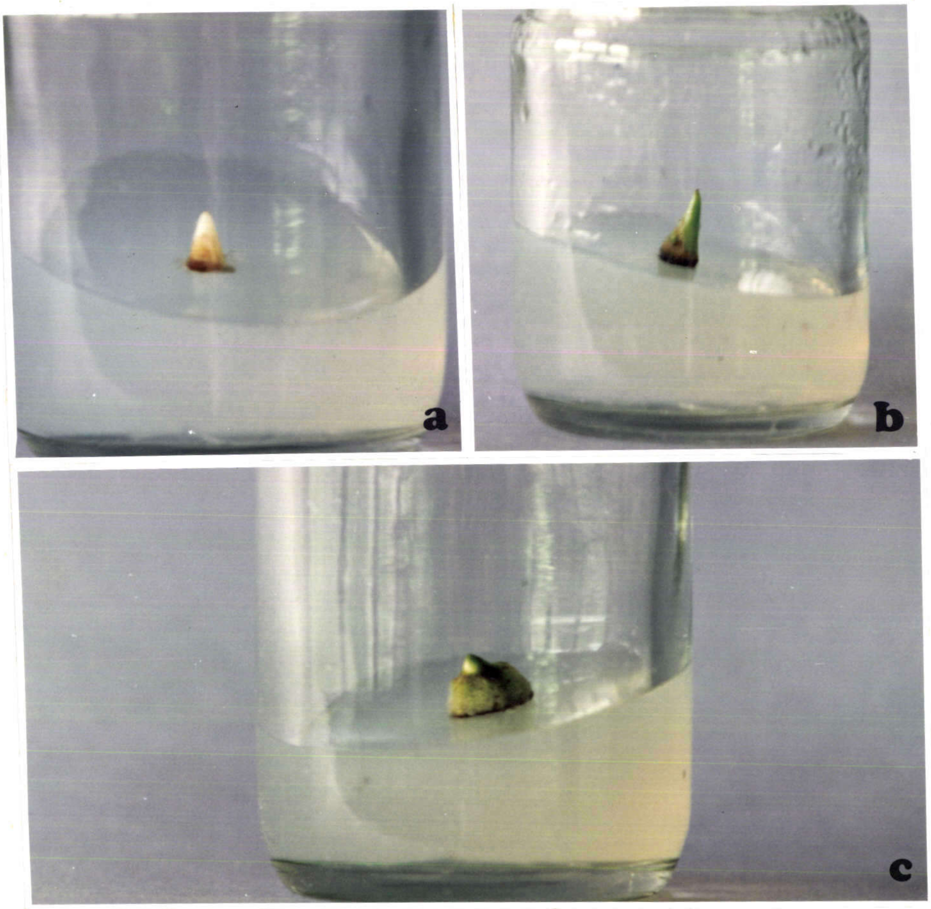
คะแนน 1 : ตามีลักษณะซีดสีเหลือง (ภาพที่ 1a)

คะแนน 2 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวมีการเจริญของตาโดยมีขนาดใหญ่ขึ้นรอบ ๆ ฐานของตามีสีน้ำตาล (ภาพที่ 1b)

คะแนน 3 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวมีการเจริญของตาโดยมีขนาดใหญ่ขึ้นรอบ ๆ ฐานของตามีสีน้ำตาล และจะมีการสร้าง callus สีเหลืองรอบๆ ฐานเกิดขึ้น แบบ *hard callus* (ภาพที่ 1c)

2.4.2.3.2 เปอร์เซนต์ การเกิด callus

2.4.2.3.3 จำนวนวัน ที่เกิด callus



ภาพที่ 1 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของตา *H. psittacorum* ที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มีความเข้มข้นของ BA และ NAA ระดับต่างๆ เมื่ออายุ 2 เดือน

a แสดงการให้คะแนน 1 (กำลังขยาย 1.36x)

b แสดงการให้คะแนน 2 (กำลังขยาย 1x)

c แสดงการให้คะแนน 3 (กำลังขยาย 1.34x)

2.4.3.การทดลองที่ 3 : การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดยอด

การทดลองที่ 3 ใช้ *Heliconia psittacorum* ในการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 ซ้ำ 4 วิธีการ คือ BA 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 mg/l ซึ่งเป็นการทดลองต่อเนื่อง จากการทดลองที่ 2 โดยนำตา ที่มีอายุ 2 เดือน ที่เกิด callus และไม่เกิด callus ที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงใน สูตรอาหารพื้นฐานดังกล่าวแล้วในข้อ 2.1 แต่ไม่ใส่น้ำมะพร้าว แล้วเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

การบันทึกผล

2.4.3.1.การเจริญเติบโต บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนโดยการให้คะแนนซึ่งมีหลักเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

คะแนน 1 : ตาที่มีลักษณะเน่าตาย (ภาพที่ 2a)

คะแนน 2 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม (ภาพที่ 2b)

คะแนน 3 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวและมีการแทงยอดออกมา จำนวน 1 ยอด ยาวประมาณ 1-3 ซม. (ภาพที่ 2c)

คะแนน 4 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวและมีการแทงยอดออกมา จำนวน 1 ยอด และ เกิดการแตกใบ แต่ยังไม่คลี่เต็มที่ โดยที่ต้นยาวประมาณ 3-5 ซม. (ภาพที่ 2d)

คะแนน 5 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวและมีการแทงยอดออกมา จำนวน 1 ยอด และ เกิดใบที่คลี่ตัวเต็มที่แล้ว 1-2 ใบ โดยที่ต้นยาวประมาณ 3-5 ซม. (ภาพที่ 2e)

คะแนน 6 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวและมีการแทงยอดออกมา จำนวน 1 ยอด และ เกิดใบที่คลี่ตัวเต็มที่แล้ว 1-3 ใบ โดยที่ต้นยาวประมาณ 5-10 ซม. (ภาพที่ 2f)

คะแนน 7 : ตาที่มีลักษณะสด สีเขียวและมีการแทงยอดออกมา จำนวน 1 ยอด และเกิดใบที่คลี่ตัวเต็มที่แล้ว 1-3 ใบ โดยที่ต้นยาวประมาณ 5-10 ซม. แล้วมีการแทงยอดข้างเพิ่มที่หลัง ยาวประมาณ 1-3 ซม. จำนวน 1 ยอด (ภาพที่ 2g)

2.4.3.2. เปอร์เซนต์ การเกิดยอด

2.4.3.3. เปอร์เซนต์ ชิ้นส่วนตาย

<u>3. เวลา และ สถานที่</u>

3.1. เวลา

เริ่มการทดลอง	มกราคม 2536
สิ้นสุดการทดลอง	กันยายน 2536

3.2. สถานที่ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

100077

ภาพที่ 2 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของตา *H. psittacorum* ที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มีความเข้มข้นของ BA ระดับต่างๆ เมื่ออายุ 2 เดือน

a แสดงการให้คะแนน 1 (กำลังขยาย 0.72x)

b แสดงการให้คะแนน 2 (กำลังขยาย 0.81x)

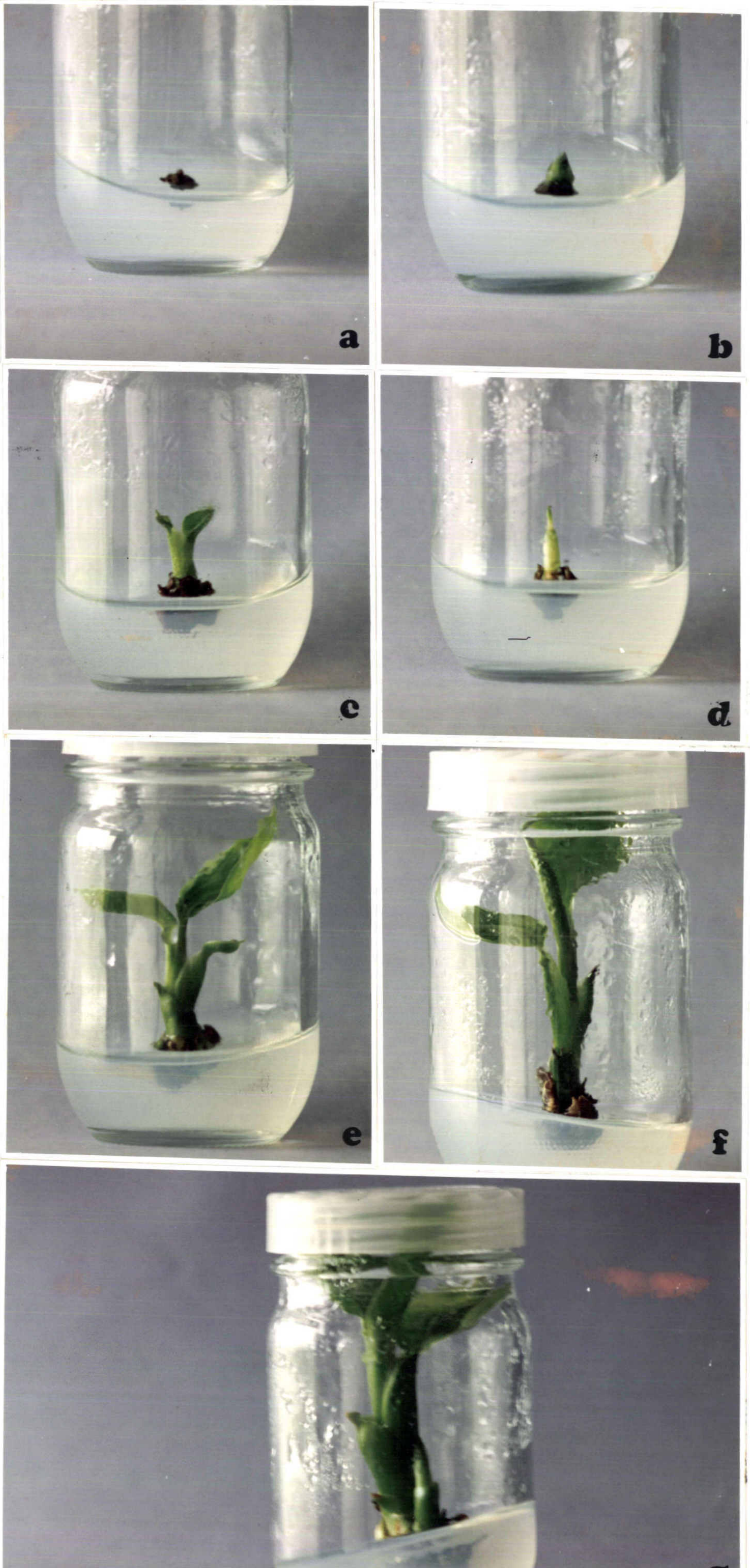
c แสดงการให้คะแนน 3 (กำลังขยาย 0.79x)

d แสดงการให้คะแนน 4 (กำลังขยาย 0.79x)

e แสดงการให้คะแนน 5 (กำลังขยาย 0.81x)

f แสดงการให้คะแนน 6 (กำลังขยาย 0.81x)

g แสดงการให้คะแนน 7 (กำลังขยาย 0.79x)


a
b
c
d
e
f
g

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 : การศึกษาผลของสารฟอกฆ่าเชื้อที่มีต่อการทำความสะอาดชิ้นส่วน

ตารางที่ 1 ผลของการทำความสะอาดชิ้นส่วนของ H. *stricta* เมื่อชิ้นส่วนอายุ 1 สัปดาห์

วิธีการที่	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	% การปนเปื้อน (contamination)
1	5	100
2	5	100

จากตารางที่ 1 พบว่าวิธีการที่ 1 และ 2 ไม่สามารถฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อได้ และการปนเปื้อนส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 2 ผลของการทำความสะอาดชิ้นส่วนของ H. *psittacorum*

วิธีการที่	จำนวน ชิ้นส่วนเริ่มต้น	% การปนเปื้อน(contamination)		รวม % ชิ้นส่วนตาย
		สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	
3	10	20	30	50
4	10	20	20	40
5	10	0	10	10

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าวิธีการที่ 5 จะให้ผลการทดลองดีที่สุดในการทดสอบครั้งนี้ เนื่องจากมี เปอร์เซนต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด คือ 10 % ฉะนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงใช้ วิธีการที่ 5 ในการฟอกฆ่าเชื้อทำความสะอาดชิ้นส่วน

14521

การทดลองที่ 2 : การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน

<u>*ตารางที่ 3* ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน H. *psittacorum* เมื่ออายุ 1 เดือน</u>

วิธีการที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		คะแนนการเจริญเติบโต* (± S.E.)	% การเกิด callus
	BA	NAA		
1	0	0	2.00 ± 0.00 c	0
2	5	0.1	3.00 ± 0.00 a	100.00
3	10	1	2.67 ± 0.47 ab	66.67
4	15	0	2.00 ± 0.00 c	0
5	0	0.1	2.11 ± 0.16 bc	11.11
6	5	1	2.44 ± 0.42 bc	44.44
7	10	0	2.33 ± 0.27 bc	33.33
8	15	0.1	2.22 ± 0.16 bc	22.22
9	0	1	2.11 ± 0.16 bc	11.11
10	5	0	2.22 ± 0.32 bc	22.22
11	10	0.1	2.22 ± 0.32 bc	22.22
12	15	1	2.00 ± 0.00 c	0.00

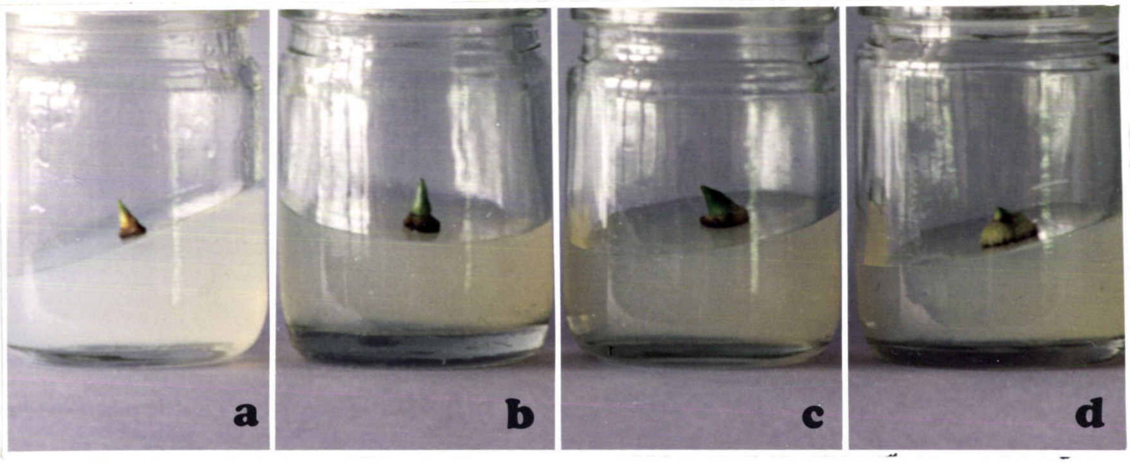
* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อทดสอบโดยวิธี DUNCAN'S NEW MULTIPLE RANGE TEST.

การเจริญเติบโตของตาเมื่ออายุ 1 เดือน

การเจริญเติบโตในระยะสัปดาห์แรก ทุกวิธีการชิ้นส่วน มีการเจริญเติบโตเหมือนกัน คือ ชิ้นส่วนจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลือง (**ดังภาพที่** 3a) กลายเป็น สีเขียว สด และ ที่ฐานรอบๆ ตา จะเกิดสีน้ำตาลคล้ำ โดยมีสีดำที่รอบ ๆฐาน(**ดังภาพที่** 3b)ในระยะสัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 เริ่มมีการสร้าง callus สีเหลืองแบบhard callus(**ดังภาพที่** 3c) ในระยะสัปดาห์ที่ 3 วิธีการที่ 2 และ 3 มี callus เกิดขึ้นโดยวิธีการที่ 2 ชิ้นส่วนจะมีการเกิด callus ครบทุกชิ้นส่วนและมีขนาดของ callus ใหญ่ขึ้น (**ดังภาพที่** 3d) และ วิธีการที่ 3 ชิ้นส่วนจะมีการเกิด callus รอบ ๆ ฐาน โดยมี callus สีเหลืองแบบ hard callus สำหรับในระยะสัปดาห์ที่ 4 วิธีการที่ 3 มีการเกิด callus เกือบครบทุกชิ้นส่วน ส่วนในวิธีการอื่น ๆ มีการเกิด callus บ้างเล็กน้อย ส่วนวิธีการที่ 12 , 4 และ 1 จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น callus เลย เพียงแต่มีขนาดของชิ้นส่วนใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

จะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 จะมีคะแนนการเจริญเติบโตเท่ากับ 3.00 และ มี เปอร์เซนต์การเกิด callus เท่ากับ 100 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ชิ้นส่วนใน วิธีการที่ 2 จะมีการเจริญเติบโตกลายเป็น callus ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 3 ซึ่งมีคะแนน การเจริญเติบโตเท่ากับ 2.67 และ มีเปอร์เซนต์ การเกิด callus 66.67 % ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการอื่น ๆ มีการเจริญเติบโต และ เปอร์เซนต์ การเกิด callus บ้างเล็กน้อย ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้น ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 , 4 และ 12 ซึ่งมีคะแนนการเจริญเติบโต และ เปอร์เซนต์ การเกิด callus เท่ากับ 2.00 และ 0 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นได้ว่า ชิ้นส่วนในทั้ง 3 วิธีการดังกล่าว มีการเจริญเติบโตของตา เป็นสีเขียวเท่านั้น ไม่มีการเจริญเติบโตกลายเป็น callus เลย

และพบว่าในระยะสัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนใน วิธีการที่ 12 มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารโดยที่สีของอาหาร เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงทำการเปลี่ยนอาหารใหม่



ภาพที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่ถูกชักนำให้เกิด callus ในระยะต่างๆ กัน (กำลังขยาย 0.85x)

a: สภาพตาหลังการทำการฟอกทำความสะอาด

b: ตามีการเปลี่ยนสีไปเป็นสีเขียว และ มีขนาดใหญ่ขึ้น

c: ตาเริ่มมีการสร้าง hard callus

d: ตามีการสร้าง hard callus เพิ่มขึ้น

<u>*ตารางที่ 4* ผลของ BAและNAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน H. *psittacorum* เมื่ออายุ 2 เดือน</u>

วิธีการที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		คะแนนการเจริญเติบโต* (± S.E.)	% การเกิด callus
	BA	NAA		
1	0	0	2.00 ± 0.00 e	0
2	5	0.1	3.00 ± 0.00 a	100.00
3	10	1	2.67 ± 0.47 abc	77.78
4	15	0	2.22 ± 0.16 cde	67.67
5	0	0.1	2.11 ± 0.16 de	22.22
6	5	1	2.89 ± 0.16 a	88.89
7	10	0	2.89 ± 0.16 a	66.67
8	15	0.1	2.33 ± 0.00 bcde	11.11
9	0	1	2.67 ± 0.27 abc	55.56
10	5	0	2.78 ± 0.32 ab	88.89
11	10	0.1	2.33 ± 0.27 bcde	66.67
12	15	1	2.56 ± 0.42 abcd	33.33

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อทดสอบโดยวิธี DUNCAN'S NEW MULTIPLE RANGE TEST.

การเจริญเติบโตของตาเมื่ออายุ 2 เดือน

ในระยะสัปดาห์ที่ 5 พบว่า ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 และ 3 มีปริมาณการเพิ่มของ callus เกือบคงเดิม หรือ มี callus เพิ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการอื่นๆ ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากเท่าใด ในระยะสัปดาห์ที่ 6 ชิ้นส่วนใน วิธีการที่ 6 และ 7 เริ่มมีการเกิด callus สีเหลืองแบบ hard callus ในระยะสัปดาห์ที่ 7 ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 6 และ 7 เกิด callus เกือบครบทุกชิ้นส่วน และ มีขนาดเล็กกว่า วิธีการที่ 2 และ 3 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนวิธีการที่ 10,12 และ 9 ชิ้นส่วนเริ่มมีการเกิด callus ในระยะสัปดาห์ที่ 8 ทุกชิ้นส่วนที่มีการเกิด callus จะมีขนาดของ callus ที่ใกล้เคียงกัน

สำหรับคะแนนการเจริญเติบโต และ เปอร์เซนต์การเกิด callus (**ตารางที่** 4)จะพบว่า วิธีการที่ 2,6 และ 7 มีคะแนน การเจริญเติบโตดีที่สุด คือ เท่ากับ 3.00 ,2.89 และ 2.89 เปอร์เซนต์การเกิด callus เท่ากับ 100 % , 88.89 % และ 66.67 % ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 วิธีการ คะแนนการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนเปอร์เซนต์การเกิด callus พบว่า ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 มีเปอร์เซนต์การเกิดสูงที่สุด และ มีการเจริญกลายเป็น callus ได้ครบทุกชิ้นส่วนในการทดลอง ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการอื่น ๆ มีคะแนนการเจริญเติบโต และ เปอร์เซนต์การเกิด callusรองลงมา ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 พบว่า เป็นวิธีการที่ให้ผลไม่ดีนัก คือ มีคะแนนการเจริญเติบโต เท่ากับ 2.00 และ เปอร์เซนต์การเกิด callus เท่ากับ 0 % (**ตารางที่** 4)

ผลการทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแตกยอด

ตารางที่ 5 ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโต และ การเกิดยอดของชิ้นส่วน H. *psittacorum* ที่เกิดcallus เมื่ออายุ 2 เดือน

วิธีการ	BA (mg/1)	คะแนนการเจริญเติบโต (± S.E.)*	%ชิ้นส่วนเกิดยอด	%ชิ้นส่วนตาย
1	2.0	3.17 ± 0.66 b	68.75	6.25
2	2.5	5.42 ± 1.30 a	100.00	0.00
3	3.0	3.92 ± 0.38 ab	100.00	0.00
4	3.5	4.75 ± 0.20 ab	100.00	0.00

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อทดสอบโดยวิธี DUNCAN'S NEW MULTIPLE RANGE TEST

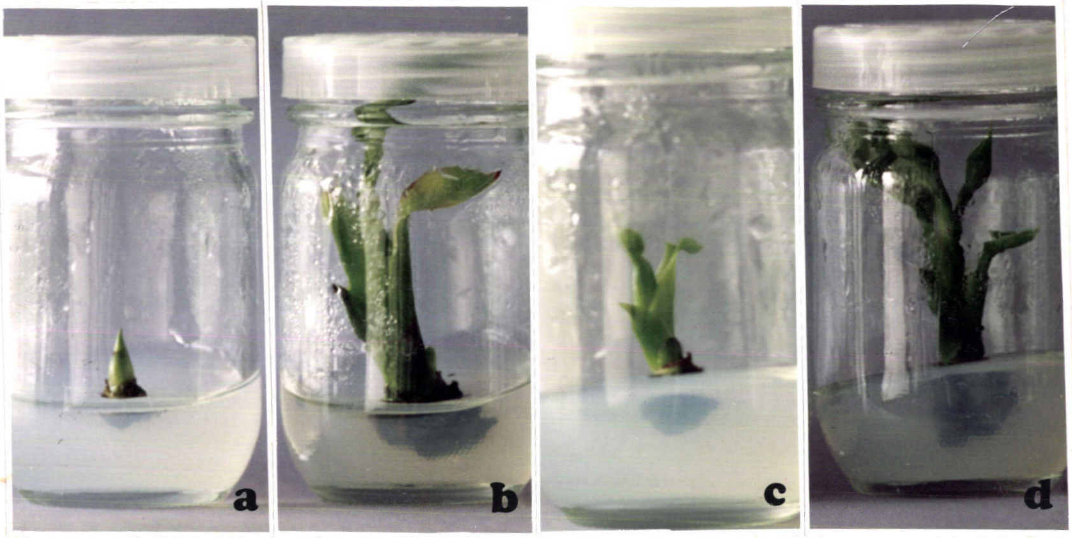
พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของหน่อในช่วงสัปดาห์แรก ทุกชิ้นส่วนไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 เริ่มมีการแทงยอดสีเขียวอ่อน ออกมาจากชิ้นส่วนเดิม โดยจะเกิดยอดออกมายาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการอื่น ๆ ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในระยะสัปดาห์ที่ 3 พบว่า ชิ้นส่วนใน วิธีการที่ 2 เริ่มมีการคลี่ใบเป็นต้น

เล็กๆ โดยมีต้นสูงประมาณ 3 เซนติเมตร ใบมีสีเขียวเข้ม ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 4 เริ่มมีการแทงยอดออกมา ในระยะสัปดาห์ที่ 4 พบว่าชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 เริ่มมีขนาดต้นโตขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีต้นสูงประมาณ 5 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 4 พบว่า เริ่มมีการคลี่ใบออกมาเป็นต้นเล็ก ๆ โดยขนาดของต้นสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และ ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 และ 3 เริ่มมีการแทงยอดออกมาจากชิ้นส่วนเดิม ยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร ในระยะสัปดาห์ที่ 5 พบว่า ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 จะมีขนาดของต้นสูงขึ้น จากเดิมเล็กน้อย และ ใบมีขนาดใหญ่จำนวน 2-3 ใบ วิธีการที่ 4 ชิ้นส่วนมีการเจริญเติบโตจากเดิมเล็กน้อย มีความสูงเพิ่มขึ้น และใบยังคลี่ตัวออกไม่หมดเกิดใบจำนวน 2-3 ใบ ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 และ 3 ยังมีลักษณะการแทงยอดอยู่ แต่วิธีการที่ 3 ชิ้นส่วนมียอดโดยเฉลี่ยแล้วโตกว่า ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 คือ มียอดยาว ประมาณ 3-5 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 มียอดยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร ในระยะสัปดาห์ที่ 6 พบว่าชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 มีขนาดของต้นโตขึ้น โดยมีต้นสูงประมาณ 5-10 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 4 ใบมีขนาดใหญ่ขึ้น จำนวน 2-3 ใบ ใบมีสีเขียวเข้มใบคลี่ออกหมดแล้ว มีต้นสูงประมาณ 5-7 เซนติเมตร และ จะมีขนาดของต้นเล็กกว่าชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 เล็กน้อย ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 4 เริ่มมีการคลี่ใบออกมาจำนวน 2-3 ใบ แต่ใบยังมีขนาดเล็กอยู่ ใบที่เริ่มคลี่จะมีสีเขียวอ่อน ส่วนวิธีการที่ 1 ชิ้นส่วนยังมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักเพียงแต่มียอดยาวขึ้น 2-3 เซนติเมตร ในระยะสัปดาห์ที่ 7 พบว่า ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 มีการเจริญเติบโตจากเดิมเล็กน้อย ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 4 มีขนาดของต้นโตขึ้นโดยมีขนาดของต้นใกล้เคียงกับชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 3 มีบางชิ้นส่วนมีการคลี่ใบเต็มที่แล้ว ซึ่งมีต้นสูงประมาณ 5 เซนติเมตร แต่บางชิ้นส่วนยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง และ ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 บางชิ้นส่วนเริ่มมีการคลี่ใบออกมาบางแล้ว จำนวน 2 ใบ ใบมีสีเขียวอ่อน ต้นสูงประมาณ 3-5 เซนติเมตร แต่บางชิ้นส่วนก็ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง สำหรับในระยะสัปดาห์ที่ 8 พบว่า ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 บางชิ้นส่วนเริ่มมีการแทงยอดใหม่ออกมา มีลักษณะสีเขียวสดขนาด 2-3 เซนติเมตร โดยทุกชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นต้นสูงประมาณ 8-10 เซนติเมตร ใบจริง 2-3 ใบ มีสีเขียวเข้ม **(ดังภาพที่ 4b)** ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 4 ทุกชิ้นส่วนมีต้นสูงโดยเฉลี่ยแล้วประมาณ 7-8

เซนติเมตร มีใบจริง 2-3 ใบ และ มีสีเขียวเข้ม **(ดังภาพที่ 4d)** ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 3 มีบางชิ้นส่วนที่เจริญเป็นต้นแล้วโดยเฉลี่ยมีต้นสูงประมาณ 5-7 เซนติเมตร มีใบจริง 2-3 ใบ และ มีสีเขียวเข้ม และ บางชิ้นส่วนก็ยังมีการคลี่ใบยังไม่เต็มที่ ต้นสูงโดยประมาณ 5 เซนติเมตร **(ดังภาพที่ 4c)**ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 มีบางชิ้นส่วนเกิดเป็นต้นแต่ใบยังคลี่ไม่เต็มที่ มีต้นสูงประมาณ 5 เซนติเมตร และ บางชิ้นส่วนยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง **(ดังภาพที่ 4a)**

ส่วนคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เมื่อชิ้นส่วนอายุครบ 2 เดือน **(ตารางที่ 5)** พบว่า ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 มีคะแนนการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ มีคะแนน 5.42 ส่วนวิธีการที่ 3 และ 4 จะมีคะแนนการเจริญเติบโตรองลงมา คือ 3.92 และ 4.75 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 วิธีการ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 จะมีคะแนนการเจริญเติบโต ต่ำที่สุด คือ 3.17

สำหรับเปอร์เซนต์ในการเกิดยอดเมื่อชิ้นส่วนอายุ 2เดือน **(ตารางที่ 5)** พบว่าชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2, 3 และ 4 มีเปอร์เซนต์การเกิดยอด 100 % มีแต่เพียงชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 เท่านั้นที่มีเปอร์เซนต์การเกิดยอด เท่ากับ 68.75 % เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลง และ บางชิ้นส่วนเกิดการเน่าตาย ดังนั้น วิธีการที่ 1 จึงมีเปอร์เซนต์การตายเท่ากับ 6.25 % ส่วนวิธีการอื่น ๆ เปอร์เซนต์การตายเท่ากับ 0 % **(ตารางที่ 5)**



ภาพที่ 4 แสดงผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เกิด callus แล้วชักนำให้เกิดยอด ที่อายุ 2 เดือน ในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่ปราศจากน้ำมะพร้าว และ เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

a : BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 mg/l (กำลังขยาย 0.68x)

b : BA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 mg/l (กำลังขยาย 0.68x)

c : BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 mg/l (กำลังขยาย 0.79x)

d : BA ที่ระดับความเข้มข้น 3.5 mg/l (กำลังขยาย 0.68x)

ตารางที่ 6 ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโต และ การเกิดยอดของชิ้นส่วน *H. psittacorum* ที่ไม่เกิดcallus เมื่ออายุ 2 เดือน

วิธีการ	BA (mg/l)	คะแนนการเจริญเติบโต (± S.E.)*	%ชิ้นส่วนเกิดยอด	%ชิ้นส่วนตาย
1	2.0	2.64 ± 0.31	50.00	0.00
2	2.5	2.45 ± 0.32	50.00	20.00
3	3.0	2.17 ± 0.49	40.00	40.00
4	3.5	2.42 ± 0.65	70.00	30.00

จากตารางที่ 6 พบว่า ทุกวิธีการชิ้นส่วนมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อคำนวณทางสถิติ พบว่าทุกวิธีการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

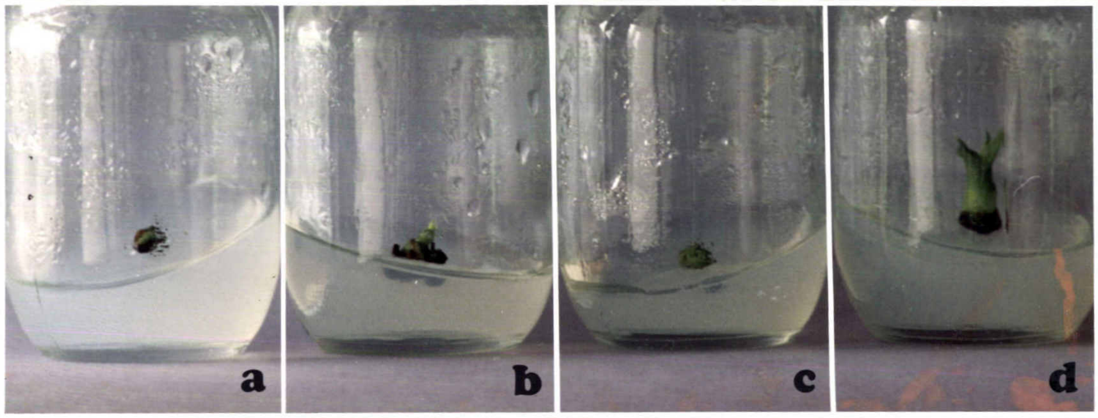
การเจริญเติบโตโดยทั่วไปพบว่าในช่วงสัปดาห์ ที่ 1-4 ทุกชิ้นส่วนยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ในระยะสัปดาห์ที่ 5 พบว่า วิธีการที่ 4 บางชิ้นส่วนเริ่มมีการเน่าตาย โดยชิ้นส่วนจะมีลักษณะสีดำ และ ในระยะ สัปดาห์ที่ 6 วิธีการที่ 2,3 และ 4 มีบางชิ้นส่วนเริ่มมีการแทงยอดออกมา โดยมียอดยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร และ บางชิ้นส่วนมีการเน่าตายเกิดขึ้น ในระยะสัปดาห์ที่ 7 พบว่า วิธีการที่ 2,3 และ 4 มีบางชิ้นส่วนที่เกิดยอด บางชิ้นส่วนที่เน่าตาย และบางชิ้นส่วนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนวิธีการที่ 1 พบว่า มีบางชิ้นส่วนที่มีการเกิดยอด และบางชิ้นส่วนไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ไม่มีการเน่าตายเกิดขึ้น ในระยะสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีวิธีการที่ 2 และ 4 เท่านั้น ที่มีบางชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นต้น แต่เป็นต้นที่มีขนาดเล็ก คือ มีความสูงโดย

ชิ้นส่วนไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ไม่มีการเน่าตายเกิดขึ้น ในระยะสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีวิธีการที่ 2 และ 4 เท่านั้น ที่มีบางชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นต้น แต่เป็นต้นที่มีขนาดเล็ก คือ มีความสูงโดยเฉลี่ย 3 เซนติเมตร และ ใบยังมีการคลี่ไม่เต็มที่ **(ดังภาพที่ 5 b และ d ตามลำดับ)** ส่วนชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 และ 3 โดยส่วนใหญ่แล้วยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง**(ดังภาพที่ 5 a และ c ตามลำดับ)**

ส่วนคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เมื่อชิ้นส่วนมีอายุ 2 เดือน จะพบว่าชิ้นส่วนในทุกวิธีการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ **(ตารางที่ 6)**

สำหรับเปอร์เซนต์การเกิดยอดพบว่า วิธีการที่ 1,2 และ 3 มีเปอร์เซนต์การเกิดยอดไม่แตกต่างกันมากนัก คือ มีเปอร์เซนต์การเกิดยอดเท่ากับ 50 % ส่วนวิธีการที่ 4 มีเปอร์-เซนต์การเกิดยอดดีกว่าวิธีการอื่น ๆ คือ มีเปอร์เซนต์การเกิดยอด เท่ากับ 70 % **(ตารางที่ 6)**

ส่วนเปอร์เซนต์การตาย พบว่า วิธีการที่ 1 มีเปอร์เซนต์การตายเท่ากับ 0 % ส่วนวิธีการอื่นๆ มีเปอร์เซนต์การตายเท่ากับ 20 % ,40 % และ 30 % ตามลำดับ**(ตารางที่ 6)**



ภาพที่ 5 แสดงผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่ไม่เกิดcallus แล้วชักนำให้เกิดยอด ที่อายุ 2 เดือน ในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่ปราศจากน้ำมะพร้าว และ เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ (กำลังขยาย 0.68x)

a : BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 mg/l

b : BA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 mg/l

c : BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 mg/l

d : BA ที่ระดับความเข้มข้น 3.5 mg/l

วิจารณ์ผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1

จากผลทดลองพบว่า วิธีการที่ 5 จะสามารถฟอกฆ่าเชื้อ ชิ้นส่วนได้ดีกว่าวิธีการ อื่นๆ และ มีเปอร์เซนต์การปนเปื้อน น้อยที่สุด สำหรับ *Heliconia psittacorum* เท่านั้น ส่วน *Heliconia stricto cv. dwarf Jamacican* ยังไม่สามารถฟอกฆ่าเชื้อได้ เนื่องจากยังมีเปอร์เซนต์การปนเปื้อน ที่สูงมาก ซึ่งในวิธีการที่ 5 มีการใช้สาร calcium hypochlorite ในการฟอกแทน clorox ซึ่งแสดงให้เห็นว่า calcium hypochlorite มีประสิทธิภาพในการฟอกได้ดีกว่า clorox

ส่วนสาเหตุของการ ปนเปื้อน ส่วนมากเกิดเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย สีขาวขุ่น และ มีลักษณะเป็น colony กลม ๆ มันนวล เกิดรอบ ๆ ฐานของชิ้นส่วน ซึ่งติดมากับ ตาของ Heliconia แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อไม่ได้หมด และ จะมีส่วนน้อยที่เกิดจากเชื้อ รา ดังนั้นสาเหตุการ ปนเปื้อน ส่วนใหญ่แล้วเกิดจากเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา และในการทดลองได้มีการลอกกาบของตาออกก่อนประมาณ 2-3 ชั้น ในขั้นตอนการลอกกาบรอบนอกของตาออก ในระหว่างการฟอกมีผลต่อการฟอก คือสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ทำให้สารฟอกสามารถฆ่าเชื้อได้สะอาดขึ้น และ ทำความสะอาดต่อชิ้นส่วนที่อยู่ข้างในให้สะอาดขึ้นได้

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2

จากผลการทดลองที่ 2 จะเห็นได้ว่า วิธีการที่ 1 คือ BA 0 mg/l และNAA 0 mg/l ชิ้นส่วนไม่มีการเกิด callus เลย สำหรับ NAA จากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่า NAA ให้ผลต่อการพัฒนาการเกิด callus น้อยมาก และเมื่อคำนวนผลทางสถิติแล้วพบว่า NAA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันจะไม่มีผลแตกต่างทางสถิติ

ส่วนวิธีการอื่นๆที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงกลายไปเป็น callus แสดงให้เห็นว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเกิด callus ของชิ้นส่วน โดย

เฉพาะชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง MS ที่ใส่น้ำมะพร้าว 150 mg/l และ BA 5 mg/l พบว่า เนื้อเยื่อมีขนาดใหญ่ขึ้น และ มีการชักนำให้เกิด callus ทั้งนี้เนื่องจาก BA และ น้ำมะพร้าว มีสารพวก myoinositol , 1-3-diphenylurea และ leucoanthocyanin ซึ่งเป็น ฮอร์โมน ที่อยู่ในกลุ่มของ Cytokinin ซึ่งมีความสามารถในการแบ่งเซลล์ และ การเกิดตา(De Guzman,1975)ซึ่งการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต Miller และ Skoog (1975)ได้เสนอไว้ว่า การเกิดเป็นต้น,ราก หรือ callus ของพืชแต่ละชนิดนั้นขึ้นกับ ความสมดุลย์ของปริมาณ auxin และ cytokinin ในอาหาร หากอัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin มีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็น ต้น และ รากที่สมบูรณ์ แต่ถ้าอัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin ไม่เหมาะสมเนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็น ยอด หรือ รากมากขึ้นอยู่กับปริมาณ auxin และ cytokininว่ากลุ่มใดมีมากกว่ากัน หากมีปริมาณ auxin มากทำให้อัตราส่วน auxin ต่อ cytokinin สูงกว่าอัตราส่วนสมดุลย์ เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นก้อน callus และ ราก แต่ถ้ามีปริมาณ auxin น้อย แต่มี cytokinin มาก ทำให้อัตราส่วน auxin ต่อ cytokinin ต่ำ ก็จะทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นยอดมาก จึงเห็นได้ว่าความสมดุลย์ของ auxin และ cytokinin มีความสำคัญมากในการควบคุม morphogenesisของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารเทียม เป็นที่เชื่อกันว่าความสมดุลย์ของ auxin และ cytokinin ที่ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปริมาณ ฮอร์โมนที่อยู่ภายในชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ เช่น ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมีฮอร์โมนชนิดใดชนิดหนึ่งมาก ก็อาจจะมีความต้องการสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดนั้นในอาหารต่ำ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความสมดุลย์ที่แท้จริงของฮอร์โมนในชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ดังรายงานของ Nathan และ คณะ (1992)ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Heliconia psittacorum* พบว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 mg/l และความเข้มข้นของ BA 0 และ IAA 0 mg/l ชิ้นส่วนจะมี เปอร์เซนต์ การเจริญเติบโตของหน่อเท่ากับ 0 ที่ระดับ IAA 0 mg/l และ BA 9.008 mg/l ชิ้นส่วนจะมีเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของหน่อมากที่สุด คือ 53 % และ รายงานการทดลองของ เบญจมาศ และ Gamborg (2529) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอม พบว่า ถ้าความเข้มข้นของ BA มากกว่า NAA โอกาสเกิด callus มากกว่า NAAที่ความเข้มข้นมากกว่า BA

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 3

จากการทดลองที่ 3 พบว่า BA มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด โดยเฉพาะชิ้นส่วนที่เกิด callus สำหรับชิ้นส่วนที่ไม่เกิด callus BA ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด หรือ มีผลก็ไม่มากนักซึ่งจะเห็นได้จากการคำนวณทางสถิติ พบว่า ในชิ้นส่วนที่เกิด callus BA ให้ผลแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนชิ้นส่วนที่ไม่เกิด callus BA ไม่มีผลแตกต่างกันทางสถิติ ดังรายงานของ ไพบูลย์ (2524) ว่า callus ได้รับสภาพที่เหมาะสม และ อาหารที่มีสารกระตุ้นให้กลายเป็น ต้น รากหรืออวัยวะอื่นๆ เซลล์บางส่วนจะกลายเป็น meristematic cell และ เจริญเป็นจุดกำเนิดยอด และ/หรือ ราก หรือ อวัยวะอื่น ๆ ซึ่งจะมีการเจริญเติบโต และ การพัฒนาดีกว่าชิ้นส่วนที่ยังไม่เกิดcallus จากรายงานการทดลองของ Nathan และ คณะ (1992) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Heliconia psittacorum* พบว่าอาหารสูตรดัดแปลง MSที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวและเติม BA 2.252 mg/l ชิ้นส่วนจะมีการเพิ่มปริมาณยอด และ ความสูงของยอดดีที่สุด และ มีรายงานการทดลองของ ประภาสินี (2529)ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย *Bungulan* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ทุกระดับความเข้มข้น เนื้อเยื่อจะมีการเจริญเติบโตเป็นหน่อเล็ก ๆ จำนวนมาก และ ไม่มีรากเกิดขึ้น เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่เติม BA และพบว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดหน่อได้มากที่สุด และ หน่อมีลักษณะแข็งแรง สำหรับสูตรอาหารที่เติม และ ไม่เติม NAA จะไม่มีการแตกหน่อ รายงานของ ปาริชาต (2526) ทดลองนำปลายยอดกล้วยหอมทอง เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว และ BA พบว่า ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารดังกล่าว สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และชักนำให้เกิดหน่อได้มากกว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวและ BA ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับรายงานของ Ma และ Shii (1972) ซึ่งพบว่า cytokinin จำเป็นสำหรับการสร้างตา (bud formation) ในการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดอ่อนของกล้วย ในระยะแรกที่เลี้ยงในอาหาร สูตร MS ที่มี BA และ น้ำมะพร้าว พบว่าไม่มีการเจริญของราก ทั้งนี้ตรงกับการทดลองของ Hussey (1976) ซึ่งได้กล่าวว่า นอกจาก BA จะกระตุ้นให้ตาข้างมีการเจริญเติบโต และการพัฒนาไปเป็นยอด จำนวนมากแล้ว ยังไปยับยั้งการเจริญเติบโตของรากด้วย และรายงานของ

สุภาพร (2532) ทดลองเลี้ยงปลายยอดกล้วยไข่บนอาหารสูตร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว และ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว และ BA พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว และ BA สามารถชักนำให้เกิด หน่อ ได้มากกว่า ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว และ อาหารสูตร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อทำความสะอาดชิ้นส่วน *Heliconia psittacorum* ที่ให้ผลดีที่สุดคือใช้ alcohol70 % เขย่าเป็นเวลา 1 นาทีตามด้วย Mercuric chloride 0.1 % + tween 20 2 หยดเขย่าเป็นเวลา 10 นาที calcium hypochlorite 5 % + tween 20 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นลอกกาบของหน่อออกประมาณ 1-2 ชั้นล้างด้วย calcium hypochlorite 1 % + tween 20 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที สุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ 5 นาที สำหรับการชักนำให้เกิด callus พบว่าการใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลง และเติม BA 5 mg/l เพียงอย่างเดียว จะให้ผลดีที่สุด ซึ่งจะมีการเจริญเติบโตกลายเป็น callus ได้เร็วกว่า วิธีการอื่น ๆ และ มีการพัฒนา เป็น callus ได้ทุกชิ้นส่วน ส่วนการชักนำให้เกิดยอด พบว่าการใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่ปราศจากน้ำมะพร้าว และ BA 2.5 mg/l ให้ผลดีที่สุด สำหรับชิ้นส่วนที่เกิด callus

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี อรรถฉัตร,กวิศน์ วานิชกุล และ จุลภาค คุ้นวงศ์.2533.การเติบโตและการเพิ่มปริมาณต้นของต้นกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.วารสารวิชาการเกษตรศาสตร์.8:2-9.

จิรายุพิน จันทรประสงค์.2534. *เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ.* สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย.กรุงเทพฯ.143-148."เทคโนโลยีการผลิตเฮลิโคเนียตัดดอก".

เบญจมาศ ศิลาย้อย และ O.L.Gamborg.2529.การชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วย.วารสารวิชาการเกษตรศาสตร์.8:181-185.

ประภาสินี รัตโนภาส.2529.เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

ปาริชาต นุกูลการ. 2526. ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อกล้วยหอมทองที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพ ฯ.

ปิยา เสียงดัง และ อุเทน หวังเจริญ.2533.การขยายพันธุ์เข็มม่วงแก้วเจ้าจอมและเฮลิโคเนีย โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.ปัญหาพิเศษ สาขาพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.กรุงเทพฯ.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา.2524.หลักการ และ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพ ฯ.

สุภาพร แก้วสมพงษ์.2532.ผลของ 6-Benzylaminopurine ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่บนอาหารสังเคราะห์.ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพ ฯ.

อรดี สหวัชรินทร์ และ ปาริชาต นุกูลการ.2526.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

Brochat,T.K. and H.M. Donsehman.1983a.Heliconias:A promising new cut flower crop.HortScince.18:2.

Cronauer,S.S.and A.D.Krikoorian.1984. Aseptic multiplication of bananas from excised floral apices. HortScience.20(4): 770-771.

De Guzman,E.V.1975.Project on production of mutants by irradiation of in vitro cultured tissue of coconut and bananas and their mass propagation by the tissue culture techique.*In* : Improvement of Vegetatively Propagated Plants through Induced Mutation.*อ้างโดย* สัมพันธ์ คัมภิรานนท์.2529.สรีรวิทยาของพืช.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.330 น.

_______________,A.C. Decena. and E.M. Ubalde. 1980. Plantlet regeneration from unirradiated and irradiated banana shoot tip tissues cultured in vitro. Phil. Agr. 63:140-146.

Graf,A.B.1981. Tropica. Roehrs company. U.S.A.:1015-1016.

Hussey,G.1976.Plantet regeneration from callus and parent tissue in *Ornithogalum thyrosoides*.J.Exp.Bot.27:375.

Jarret,R.L., W. Rodriguez and R. Fernandez. 1985. Evaluation tissue culture propagation and dissemination of "Saba" and "Pelipita" plantains in Costa Rica. Scientia Hortic. 25:137-147.

Ma,S.S. and C.T.Shii.1972. *In vitro* formation of adventitions buds in bananas shoot apex following decapitation.J.Hort.Soc.of China.18:135-142.

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

Nathan,M.J.,C.J.Goh and P.P.Kumar.1992.*In vitro* propogation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. HortScince.27(5):450-452.

Olivia, P.D. and R.C. Barba. 1984. In vitro culture of *saba* banana (Musa sp. cv. Saba (BBB)). The Philippine Agriculturist. 63:351-358.*อ้างโดย* ประภาสินี รัตโนภาส.2529. เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

Miller,C.O. and F.Skoog. 1975.Chemical regulation of growth and organ fromation in plant tissue cultured *in vitro*. Symp.Soc.Exp Biol.11:118-131.

Swamy,D.R., N.K. Srinivasa Rao. and E.K. Chacko. 1983. Tissue culture propagation of banana. Scientia Hortic.18: 247-252.

ภาคผนวก

สูตรอาหารดัดแปลงของ Murashige & skoog (1962)

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (mg/l)
$(NH_4)NO_3$	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Na_2EDTA	37.3
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Myo-inositol	100

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (mg/l)
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.5
Glycine	2.0
$NaHPO_4$	170
Adenine sulphate	80
Sucrose	30 g
น้ำมะพร้าว	150 ml/l

ตารางผลทางสถิติที่ 1 การเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตของ BA และ NAAต่อการชักนำการเกิด callus ของหน่อ *Heliconia psittacorm* เมื่ออายุครบ 1 เดือน

SOURCE	df	SS	MS	F	F.05	F.01
REP.	2	0.243	0.121	1.345	3.44	5.72
Treatment	11	3.001	0.273	3.025	2.30	3.26
BA	3	1.599	0.533	5.910**	3.05	4.82
NAA	2	0.462	0.231	2.562NS	3.44	5.72
BA,NAA	6	0.940	0.157	1.737NS	2.55	3.76
ERROR	22	1.984	0.090			
TOTAL	35	5.228	0.149			

Grand Mean = 2.277　　CV = 13.186 %　　SE 0.173

* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผลทางสถิติที่ 2 การเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตของ BA และ NAAต่อการชักนำการเกิด callus ของหน่อ *Heliconia psittacorm* เมื่ออายุครบ 2 เดือน

SOURCE	df	SS	MS	F	F.05	F.01
REP.	2	0.599	0.300	4.054	3.44	5.72
Treatment	11	3.632	0.330	4.468	2.30	3.26
BA	3	2.143	0.714	9.667**	3.05	4.82
NAA	2	0.081	0.040	0.547^{NS}	3.44	5.72
BA,NAA	6	1.408	0.235	3.176*	2.55	3.76
ERROR	22	1.626	0.074			
TOTAL	35	5.856	0.167			

Grand Mean = 2.537 CV = 10.716 % SE 0.157

* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

<u>ตารางผลทางสถิติที่ 3</u> การเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตของ BA ต่อการชักนำการเกิด ยอด ของหน่อ *Heliconia psittacorm* ที่ไม่เกิด callus เมื่ออายุครบ 2 เดือน

SOURCE	df	SS	MS	F	F.05	F.01
Treatment	3	0.340	0.113	0.352[NS]	4.07	7.59
Ex.Error	8	2.571	0.321			
Total	11	2.911	0.265			

Grand Mean = 2.41775 CV = 23.45 % LSD.05 = 1.067342

* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

<u>ตารางผลทางสถิติที่ 4</u> การเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตของ BA ต่อการชักนำการเกิด ยอด ของหน่อ *Heliconia psittacorm* ที่เกิด callus เมื่ออายุครบ 2 เดือน

SOURCE	df	SS	MS	F	F.05	F.01
Treatment	3	7.125	2.375	3.619^{NS}	4.07	7.59
Ex.Error	8	5.250	0.656			
Total	11	12.375	1.125			

Grand Mean = 2.537   CV = 10.716 %   LSD.05 = 1.525276

* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ห้องสมุด
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง