ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนของปล้อง ใบอ่อน และใบแก่ ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60

Effect of Hormone on Induction in Internode Young Leaf and Mature Leaf Explant of Mulberry Variety Burirum 60

โดย

นางสาวธิติรัชต์ สืบเนียม

นางสาวสุวิมล แป้นแหลม

พิจารณาเห็นชอบโดย

....

(อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

วันที่..27..เดือน..ส.ค...พ.ศ..2543

ไพ
ธ 588 ผ
2542

ภาควิชารับรองแล้ว

....

(อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่..27..เดือน..ส.ค...พ.ศ..2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16989

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนของปล้อง ใบอ่อน และใบแก่ ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60

Effect of Hormone on Induction in Internode Young Leaf and Mature Leaf Explant of Mulberry Variety Burirum 60

T100083

โดย

นางสาวธิติรัชต์ สืบเนียม

นางสาวสุวิมล แป้นแหลม

สาขาวิชาพืชไร่

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2542

ปพ.
ธ588ผ
2542

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 100083
วัน.เดือน.ปี 17 JUN 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ผู้ทำการทดลองขอบพระคุณ อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่ช่วยให้คำชี้แนะ คำแนะนำ ตรวจสอบผลการทดลองให้เหมาะสมและสมบูรณ์

อาจารย์อำไพ สินพัฒนานนท์ นักวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง และให้คำแนะนำเกี่ยวกับหัวข้อการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ร่วมทั้งยังกรุณาเอื้อเฟื้อให้ต้นพันธุ์หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และ นครราชสีมา 60

นายอดิศักดิ์ ทัพพเสรณี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งอุปกรณ์ในการทดลอง ร่วมทั้งแรงกาย และ กำลังใจให้การทดลองครั้งนี้ประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่ ๆ ที่ได้ช่วยเหลือตลอดการทดลอง ร่วมทั้งการจัดทำรูปเล่มให้เสร็จสมบูรณ์

ธิติรัชต์ สืบเนียม
สุวิมล แป้นแหลม
มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนของปล้อง ใบอ่อน และใบแก่ ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60

Effect of Hormone on Induction in Internode Young Leaf and Mature Leaf Explant of Mulberry Variety Burirum 60

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงแคลลัสเริ่มจากการใช้ส่วนของปล้อง ใบอ่อน และใบแก่ ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมออกซินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ 2,4-D ,NAA และ IAA ร่วมกับ BAP ในปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ผลการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสได้มาจากอาหารที่เติม NAA 2.0 mg/l และ BAP 0.5 mg/l และจากการขยายเพิ่มจำนวนแคลลัสที่ได้บนอาหารสูตรเดิม พบว่า สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้เล็กน้อย รองลงมาคือ สูตรอาหารที่เติม 2,4- D 2.0 mg/l และ BAP 0.5 mg/l ความถี่สูงสุดของการเกิดรากได้มาจากสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 20. Mg/l ในชิ้นส่วนของใบแก่ นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดยอดใหม่มากมายตรงบริเวณที่เกิดแคลลัสบนสูตรอาหารที่เติม 2,4- D 0.5 mg/l และ BAP 0.5 mg/l สำหรับชิ้นส่วนของใบแก่และใบอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
สารบาญตาราง	ก
สารบาญภาพ	ข
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
สรุปผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	41

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการพัฒนาของแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบแก่ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่าง ๆ กัน	27
	1.1 สัปดาห์ที่ 3	27
	1.2 สัปดาห์ที่ 4	27
	1.3 สัปดาห์ที่ 5	28
	1.4 สัปดาห์ที่ 6	28
2	แสดงการพัฒนาของแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบอ่อนของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่าง ๆ กัน	29
	2.1 สัปดาห์ที่ 3	29
	2.2 สัปดาห์ที่ 4	29
	2.3 สัปดาห์ที่ 5	30
	2.4 สัปดาห์ที่ 6	30
3	แสดงการพัฒนาของแคลลัสจากชิ้นส่วนของปล้องของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่าง ๆ กัน	31
	3.1 สัปดาห์ที่ 3	31
	3.2 สัปดาห์ที่ 4	31
	3.3 สัปดาห์ที่ 5	32
	3.4 สัปดาห์ที่ 6	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของใบแก่ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4 – D และ BA ต่างๆ กัน	33
2	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของใบอ่อนของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4 – D และ BA ต่างๆ กัน	33
3	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของปล้องของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4 – D และ BA ต่างๆ กัน	34
4	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของใบแก่ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA และ BA ต่างๆ กัน	34
5	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของใบอ่อนของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA และ BA ต่างๆ กัน	35
6	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของปล้องของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA และ BA ต่างๆ กัน	35
7	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของใบแก่ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ต่างๆ กัน	36
8	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของใบอ่อนของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ต่างๆ กัน	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	แสดงการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของปล้องของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ต่างๆ กัน	37
10	แสดงการเจริญของแคลลัสหลังจากเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เป็นเวลา 1 เดือน	37
11	แสดงการเจริญของแคลลัสหลังจากเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เป็นเวลา 40 วัน	38
12	แสดงการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนของใบอ่อนของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 หลังจากเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เป็นเวลา 1 เดือน	38
13	แสดงการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนของปล้องของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 หลังจากเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เป็นเวลา 45 วัน	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง

ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนของปล้อง ใบอ่อน และใบแก่ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60

Effect of Hormone on Induction in Internode Young Leaf and Mature Leaf Explant of Mulberry Variety Burirum 60

คำนำ

หม่อนซึ่งเป็นอาหารที่ดีที่สุดของไหม เป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่จะทำให้การเลี้ยงไหมประสบความสำเร็จ ตามมาตรฐานสากลประมาณว่า ใบหม่อน 1 เมตริกตัน จำเป็นต่อการฟักออกจากไข่ 1 ออนซ์ ซึ่งจะให้ผลผลิตรังไหม 25 - 30 กิโลกรัม ต้นทุนการผลิตใบหม่อนคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมดในการผลิตไหม โปรตีนจากใบหม่อนเป็นแหล่งกำเนิดให้หม่อนไหมผลิตเส้นใย ซึ่งเกือบ 70 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไหมที่ผลิตโดยหนอนไหมได้มาจากโปรตีนของใบหม่อนโดยตรง (Rangswami และคณะ 1976)

อาชีพการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมในประเทศไทยมีมาช้านานแล้วโดยเฉพาะเกษตรกรไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ส่วนภาคตะวันออก เช่น จังหวัดปราจีนบุรี ที่อำเภอตาพระยา อรัญประเทศ และ กบินทร์บุรี (ไชยา, 2532) ในปัจจุบันการเลี้ยงไหมเจริญก้าวหน้าขึ้นมากจนขณะนี้เกษตรกรกำลังหันมาเลี้ยงไหมเป็นอาชีพหลักจนประสบความสำเร็จ โดยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตผ้าไหมไทยมากยิ่งขึ้น จากสถิติสำนักเศรษฐกิจการเกษตร (2532) ผลผลิตเส้นไหมในช่วงปี 2526 - 2530 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยต่อปีร้อยละ 6.82 มูลค่าการส่งออกผ้าไหมและผลิตภัณฑ์ไหมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยต่อปีร้อยละ 19.41 ดังนั้นจึงควรส่งเสริมให้เกษตรกรสนใจปลูกหม่อนเลี้ยงไหมเพิ่มมากขึ้น

ปัจจุบันรัฐบาลได้ส่งเสริมการเลี้ยงไหมมากขึ้น มีมากในทางภาคอีสานและกำลังขยายไปทางภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกและภาคใต้บางท้องที่ อุตสาหกรรมผ้าไหมมีบทบาทสำคัญในการค้า เศรษฐกิจและสังคมมีประมาณ 4 แสนครัวเรือนในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยอาศัยการเลี้ยงไหมเป็นการเพิ่มรายได้และอีก 1 แสนคนมีอาชีพผลิตผ้าไหม (บุศรา, 2534) ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตไหมดิบเป็นอันดับที่ 5 ในเอเซีย รองจาก จีน อินเดีย ญี่ปุ่น และเกาหลี แต่อย่างไรก็ตามการผลิตไหมในประเทศไทยก็ยังไม่เพียงพอแก่ความต้องการภายในประเทศ ดังนั้นเพื่อส่งเสริมการผลิตผ้าไหมให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดแทนการนำเข้าเส้นไหมบางส่วนจึงต้องมีการกำหนดแนวทางและรูปแบบการพัฒนาการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมและการขยายพันธุ์หม่อนอย่างมีประสิทธิภาพ ปกติแล้วการขยายพันธุ์หม่อนจะใช้วิธีการใช้กิ่งปักชำ แนวทางหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมงานในด้านการเร่งขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากก็คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งจะช่วยเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ได้มากในระยะเวลาอันสั้น การศึกษานี้จึงมุ่งพัฒนาเพื่อเพิ่มความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหม่อน ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงหม่อน ต้องชักนำให้เกิดแคลลัสในฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ กัน และทำการเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสในอาหารที่เพิ่มฮอร์โมนแต่ละสูตร

หม่อน (Morus alba) เป็นพืชไม้ยืนต้น ข้ามฤดู ซึ่งใบทั้งหมดของมันมีประโยชน์ทางเศรษฐกิจที่สำคัญมากซึ่งถูกยกให้เป็นอาหารที่สำคัญที่สุดสำหรับตัวไหม(Bombyx morus L.) การขยายพันธุ์ดั้งเดิมโดยการตัดชำ แต่การตอบสนองของมันต่อการปฏิบัติการเกี่ยวกับการทดลองเป็นไปได้ช้ามาก จนเมื่อไม่กี่ปีมานี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เข้ามาเป็นแนวทางใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์ของพืชหลายชนิดที่ซึ่งเราสามารถปฏิบัติการและตรวจสอบพืชอย่างละเอียดได้ในระยะเวลาที่สั้นมาก แรกเริ่มการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหม่อนนั้นมุ่งไปที่การเพิ่มจำนวนหน่อ (shoot) โดยการใช้ชิ้นส่วนของตาจากต้นแก่จากนั้นให้การดูแลเพาะเลี้ยงจนเปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างของตายอด การชักนำให้เป็นต้นโดยตรงจากชิ้นส่วน เช่น ใบ ใบเลี้ยง และไฮโปคอทิล ที่ทำได้สำเร็จการชักนำของชิ้นส่วนโดยผ่านแคลลัสเป็นวิธีการที่มีความสำคัญอย่างหนึ่ง โดยเริ่มตั้งแต่การชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่จากเซลล์เดี่ยว ๆ ซึ่งเป็นขั้นพื้นฐานและมีความจำเป็นสำหรับการศึกษาการปฏิบัติการทางด้านพันธุกรรมในห้องทดลอง ซึ่งในการที่จะทำการเพาะเลี้ยงนั้นการทำงานมีข้อจำกัดเพียงอย่างเดียวคือผลที่มีต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของหม่อนโดยผ่านแคลลัส ด้วยเหตุนี้งานที่นำเสนอออกมาจึงเป็นการดำเนินการเพื่อจะอธิบายถึงเงื่อนไขในการเพาะเลี้ยงที่บังเกิดผลดีที่สุดสำหรับความถี่สูงสุดของการเกิดเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาอิทธิพลของชนิดและระดับของฮอร์โมนที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส
2. ศึกษาและเปรียบเทียบผลของชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหม่อนในสูตรอาหารต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเลี้ยงแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

<u>ลักษณะทั่วไปทางพฤกษศาสตร์</u> (กชกร , 2538 , กรมส่งเสริมการเกษตร ,2539 ,อำไพ , 2537)

หม่อน (Morus alba L.) เป็นพืชใบเลี้ยงคู่อยู่ในสกุล Morus วงศ์ Moraceae ถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเซีย ขึ้นได้ในเขตอบอุ่นและเขตร้อนกระจายอยู่ทางซีกโลกด้สนตะวันออกและตะวันตก มีทั้งพันธุ์ป่าและพันธุ์ที่ใช้เป็นการค้าทั้งหมด 34 ชนิด ที่นิยมปลูกขณะนี้ คือ Morus alba L. , Morus bombycis Koidz และ Morus latifolia Poiret แต่หม่อนที่ใช้ศึกษาทางเซลล์วิทยาของหม่อนชนิดนี้พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 (หยกแก้ว,2519 ;Das,1963)

ใบ (Leaf)

ต้นหม่อนมีองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ ลำต้น ใบ และราก ส่วนที่เห็นชัดเจนและมีความสำคัญในเชิงเป็นผลผลิต คือ ใบ ใบหม่อนแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ ก้านใบ ตัวใบ และหูใบ รูปร่างและโครงสร้างของใบสามารถเปลี่ยนไปได้ตามสภาพแวดล้อม การเรียงตัวของใบแบบสลับ แผ่นใบมีทั้งเรียบและเว้า ตัวใบเป็นส่วนประกอบที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันได้ เช่น รูปร่างใบ การหยักเว้าของตัวใบ ปลายใบ ขอบใบ และฐานใบ รวมถึงลักษณะอื่น ๆ ทั่วไปซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ (กชกร , 2538) ใบหม่อนทั่วไปมีรูปลักษณะปลายใบแหลม ขอบใบหยัก มีรูปร่างหลายแบบอาจมีแฉกหรือไม่มีแฉก หรือมีทั้งใบแฉกและใบไม่แฉกอยู่ในต้นเดียวกัน (อำไพ , 2537) ส่วนของก้านใบจะเชื่อมตัวใบกับกิ่งและเป็นทางผ่านของน้ำและอาหาร ส่วนของหูใบมี 2 อันเจริญอยู่ข้าง ๆ ฐานของก้านใบ หูใบจะร่วงหล่นเมื่อใบเจริญเป็นใบแก่

ดอก (Flower)

หม่อนเป็นพืชที่มีดอกเป็นเพศแยกดอกตัวผู้และตัวเมีย อาจอยู่บนต้นเดียวกันหรือต่างต้น แต่โดยทั่วไปมักพบต้นหม่อนหนึ่งมีดอกเพียงเพศเดียว บางพันธุ์มีดอกเป็นดอกสมบูรณ์ ส่วนใหญ่ในแต่ละพันธุ์จะมีเพศเดียวกัน ด้วยเหตุนี้หม่อนจึงเป็นพืชผสมข้าม ดอกหม่อนมีขนาดเล็กแทบจะไม่มีก้านดอกอยู่รวมกันเป็นช่อ (inflorescence) ขนาดของช่อดอกแตกต่างกันไปได้ตามแต่ชนิดของพันธุ์แต่โดยมากมักมีขนาดเล็กประมาณ 1.5 - 3.5 เซนติเมตร (FAO , 1976) ช่อดอกเกิดจากตาข้างอาจอยู่เป็นกระจุกหรือแยกอยู่เดี่ยว ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตา (Buds)

บนลำต้นของหม่อนจะมีตาอยู่ที่ข้อของกิ่ง ตานี้ใช้ประโยชน์ในการบ่งชี้อายุของใบหม่อนใช้เลี้ยงไหมระยะต่าง ๆ ได้ และใช้ประโยชน์เพื่อการบ่งชี้พันธุ์ตาของหม่อนมี 2 ชนิด คือ ตาหลัก (main bud) และตาเสริม (acessory bud) ซึ่งอาจมีตำแหน่งอยู่ติดกับตาหลักทำให้ไม่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Ratanachta , 1974) หม่อนในเขตหนาว ตาจะเจริญในเดือนเมษายน และเจริญมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม และสิงหาคม หลังจากนั้นจะโตช้า เดือนตุลาคมหม่อนจะสลัดใบและเข้าระยะพักตัว หม่อนสามารถเจริญได้ตลอดปี ในหน้าฝนตาหม่อนจะเจริญได้เร็วในเวลา 6 - 7 วัน หน้าแล้งใช้เวลามากกว่า 10 วัน

ลำต้นและกิ่ง

มีลำต้นสูงใหญ่ ตั้งตรง มีกิ่งก้านมาก แต่หม่อนที่ปลูกเพื่อเลี้ยงไหมลำต้นจะไม่สูง เพราะมีการตัดแต่งกิ่งทุกปี (กรมส่งเสริมการเกษตร , 2539) กิ่งหม่อนมีท่อน้ำ ท่ออาหาร ที่พัฒนาดีโดยมีเลนติเซลล์ทำหน้าที่เหมือนปากใบ (stoma) ความตรงของกิ่ง ความยาวของปล้อง สีของกิ่ง จำนวนกิ่ง จะผันแปรไปตามพันธุ์และวิธีตัดแต่ง

ผลและเมล็ด

เมื่อดอกตัวเมียได้รับการผสมจะเปลี่ยนเป็นผล ซึ่งมีลักษณะเป็นช่อประกอบด้วยเมล็ดเล็ก ๆ จำนวนมาก ผลเป็นช่อเล็ก สีแดง เปรี้ยว ไม่นิยมรับประทานผลหม่อนเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดงและม่วง เมล็ดจะงอกได้ดี การงอกของเมล็ดต้องการแสง อุณหภูมิที่เหมาะสม 33^{0}C เมล็ดหม่อนมีอายุนานกว่า 10 ปี หม่อนเป็นพืชวันยาว ไม่ชอบดินที่เป็นกรด ชอบดินเหนียวที่อุดมสมบูรณ์ pH 5 - 7 (หยกแก้ว , 2519)

ราก (Root)

รากประกอบด้วยรากแก้ว รากแขนง และรากฝอย แต่หม่อนที่ขยายพันธุ์ด้วยกิ่งจะมีรากแขนงและรากฝอยเท่านั้น โดยรากแขนงจะทำหน้าที่ยึดลำต้นและกิ่งให้ทรงตัวอยู่ได้ ส่วนรากฝอยมีหน้าที่ดูดซึมอาหารและน้ำจากดิน (กรมวิชาการเกษตร , 2537 และ 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บุรีรัมย์ 60

ลักษณะประจำพันธุ์

ทางพฤกษศาสตร์

เป็นหม่อนที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์หม่อนหมายเลข 44 จากสาธารณรัฐประชาชนจีน กับพันธุ์น้อย ผ่านการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรปี 2531 เป็นหม่อนต้นเพศเมีย มีลำกิ่งขนาดใหญ่ตัดแต่งแล้วแตกกิ่งได้เร็ว กิ่งสีน้ำตาล ลำต้นตรง ใบมีรูปร่างเป็นรูปไข่ (ovule) ผิวใบและขอบใบเรียบไม่เว้า ก้านใบยาว 3 - 4 เซนติเมตร ขนาดใบกว้าง 18.9 เซนติเมตร ยาว 7.2 เซนติเมตร ระยะปล้อง 5 เซนติเมตร ใบใหญ่หนา อ่อนนุ่มไม่เหี่ยวง่าย พื้นที่ใบมาก (กรมส่งเสริมการเกษตร , 2536) พื้นที่ใบมากให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์พื้นเมืองทุกพันธุ์ให้ผลผลิตเฉลี่ย 4,328 กิโลกรัมต่อไร่

ทางการเกษตร

1. น้ำหนักใบ 100 ใบ (กรัม)	870
2. เปอร์เซ็นต์ใบ	61.2-69.2
3. ผลผลิตเฉลี่ย (กิโลกรัม)	4,327.9
4. อายุใบ	ยาว
5. ความทนทานต่อโรคราแป้ง	ดีกว่าหม่อนน้อย
6. ความต้านทานโรคใบด่าง	ดี (ไม่เป็นโรคใบด่าง)
7. ความต้านทานโรคใบด่าง	ไม่ต้านทาน
8. ความต้านทานต่อแมลง	ดี
9. ความสดของใบหม่อนหลังเก็บเกี่ยว	นานกว่าหม่อนน้อย

คุณค่าทางอาหารของใบ

1. โปรตีน	27.7 %
2. คาร์โบไฮเดรต	40.9 %
3. ไขมัน	5.9 %
4. ความชื้น	5.5 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะดีเด่น

- เป็นหม่อนพันธุ์ที่ขยายพันธุ์ได้ด้วยการใช้ท่อนพันธุ์ปลูกในแปลงโดยตรง หรือนำปักชำก่อนปลูกก็ได้ ทำให้ลดขั้นตอนในการปลูกได้มาก เมื่อปลูกได้ 6 เดือน ก็สามารถเก็บเกี่ยวไปเลี้ยงไหมได้

- ให้ผลผลิตใบหม่อนต่อไร่สูงกว่าหม่อนน้อยในทุกฤดู โดยให้ผลผลิตเฉลี่ย 4,327.96 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี เลี้ยงไหมได้ 9 กล่อง ได้ผลผลิตรังไหม 180 กิโลกรัม มูลค่า 18,000 บาทต่อไร่ต่อปี

- เป็นพันธุ์หม่อนที่มีการเจริญเติบโตดีกว่าหม่อนน้อยทุกฤดูกาล

- อัตราส่วนใบต่อกิ่ง 61.2 - 69.2 %

- ก้านใบใหญ่ ยาวและแข็ง ทำให้เหมาะกับการเลี้ยงไหมแบบกิ่ง เพราะเมื่อนำใบหม่อนไปเลี้ยงไหมแล้ว ทำให้ชั้นเลี้ยงไหมโปร่ง อากาศถ่ายเทได้สะดวก

- ใบหม่อนมีลักษณะนุ่ม หนาปานกลาง ทำให้เหี่ยวช้า สามารถเก็บเกี่ยวไว้ได้นาน หนอนไหมจะได้กินใบหม่อนที่สดเสมอ

- อายุใบยาวกว่าหม่อนน้อย ทำให้อายุการเก็บเกี่ยวได้นานไม่ร่วงง่าย

- ใบหม่อนมีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับหม่อนน้อย

- เป็นพันธุ์หม่อนที่ทนทานต่อโรคราแป้งได้ดีกว่าหม่อนน้อย

- เป็นพันธุ์หม่อนที่ต้านทานต่อโรคใบด่าง

- เป็นพันธุ์หม่อนที่มีทรงต้นแบบตั้งตรง ทำให้สะดวกต่อการทำเขตกรรมและดูแลรักษา

(เอกสารวิชาการ : พันธุ์พืช ฉลองสิริราชสมบัติครบ 50 ปี , 2539)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (โอภาส , 2533)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่นำเอาส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช ได้แก่ เซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะหรือโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีชีวิตมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และอยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น (อรดี , 2522)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรอย่างกว้างขวาง โดยมีวัตถุประสงค์ต่างกันออกไป ผลสำเร็จจะมากหรือน้อย นอกจากจะเกี่ยวข้องกับสูตรอาหาร ปัจจัยภายในชิ้นส่วนพืชและปัจจัยภายนอกแล้ว ความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และ ไซโตไคนิน ก็มีผลอย่างมากต่อการพัฒนาของแคลลัส ถ้าไซโตไคนินต่ำ เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นแคลลัสและราก ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซโตไคนินสูงกว่าออกซินเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอด เมื่อความเข้มข้นของทั้งสองนี้สมดุลกัน เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอดและราก (Skoog และ Miller , 1957) สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่มมีคุณสมบัติดังนี้

1. ออกซิน (Auxin)

ออกซินเป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีอัตราส่วนของไฮโดรเจนและออกซิเจนแตกต่างกันตามชนิดของออกซิน บางชนิดอาจมีไนโตรเจนหรือคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (Weaver , 1972) ในต้นพืชมีการสังเคราะห์ฮอร์โมนชนิดนี้ที่ส่วนยอดและส่วนที่ไม่มีสีเขียว เช่น ใบอ่อน ตลอดจนเอมบริโอที่กำลังเจริญ (Linser และคณะ , 1954) สารที่แสดงคุณสมบัติเป็นออกซินมีดังนี้ indoleacetic acid (IAA) , indolepropionic acid (IPA) , indolebutyric acid (IBA) , naphthaleneacetic acid (NAA) , naphthoxyacetic acid (NOA) , 4 - chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) , 2,4-diclorophenoxyacetic acid (2,4-D) , 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) , 2,4,6-trichlorabenzoic acid (2,4,6-TBA) , 2,3,6-trichlorobenzoic acid (2,3,6-TBA) และ 4-amino-3,5,6 trichloropicolinic acid (Fawcett และคณะ 1952)

ออกซินในพืชสามารถทำปฏิกริยาทางเคมีได้สารใหม่ที่คล้ายคลึงกับออกซิน Thimann และ Skoog (1940) พบว่า IAA สามารถทำปฏิกริยากับโปรตีนบางชนิด ต่อมาได้มีรายงานถึงการทำปฏิกริยาระหว่าง IAA กับน้ำตาลกลูโครส (Zenk , 1961)

ในสภาพที่มีแสง IAA ในต้นพืชจะถูกออกซิไดส์มากทำให้ IAA เกิดขึ้นมากในสภาพมืด ดังนั้น การออกซิไดส์ IAA จึงเกิดได้น้อย มีผลทำให้ IAA ในต้นพืชมีปริมาณสูงกว่าเมื่อได้รับแสง ดังนั้นแสงจึงมีผลทางอ้อมต่อการทำลายสารนี้ (มนตรี , 2530)

<u>ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u>

1. เร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยช่วยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโรสขององค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโรส (มนตรี , 253)

2. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิค

3. กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดการและขั้นตอนที่ทำให้พืชเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากความสัมพันธ์กับระดับออกซินภายในต้นกับสภาพแวดล้อมถ้าออกซินภายในต้นมีระดับต่ำก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อการเกิดรากที่สมบูรณ์ (Fonnesbench และ Fonnesbench , 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ไซโตไคนิน (Cytokinin)

ไซโตไคนิน เป็นฮอร์โมนพืชอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ การควบคุมการสร้างอวัยวะ สารไซโตไคนินในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นพวกอนุพันธ์ของ 6-amino-purine สารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ 6-amino-purine ก็สามารถทำหน้าที่เป็นไซโตไคนินได้อย่างดีเช่นกัน เช่น Kinetin , 6-benzyl-amino-purine (6 BAP) แต่สารสังเคราะห์บางตัวก็ไม่แสดงคุณสมบัติการเป็นไซโตไคนินเลย เช่น 6-dimethyl-amino-purine และ 2-dimethyl-amino-6 hydroxy-purine ปกติเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฮอร์โมนออกซินอยู่ด้วย เมื่อใส่ฮอร์โมนไซโตไคนินเข้าไปจะช่วยให้มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (พรทิพย์ , 2528)

หลักการอย่างกว้าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ (รังสฤษดิ์ , 2540)

1. ฮอร์โมน (hormones)

พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับฮอร์โมน 2 กลุ่มคือ ออกซิน และ ไซโตไคนิน ทั้งนี้ผันแปรขึ้นกับชนิดพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช และระดับหรือสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในสูตรอาหาร ซึ่งมีข้อสังเกตสำคัญคือ

สัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนิน > ออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด (shoot formation)

ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซิน > ไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดราก (root differentiation)

อย่างไรก็ตามในกรณีการสร้างยอด (adventitious shoot formation) และกระตุ้นการแตกกิ่งข้าง (enhanched axillary branching) ฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้จะต้องมีอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ยกเว้นในพืชบางชนิดที่อาจต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว

ในทางปฏิบัติ ต้องทดสอบหาสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสม โดยทำการทดสอบเป็นชุด (series experimentation) ที่นิยมใช้ในกลุ่มของไซโตไคนินได้แก่ kinetin, BAP, 2-ip และ zeatin และพบว่า 2-ip มักให้ผลดีกว่า BAP และ kinetin เนื่องจาก BAP ให้อัตราการเกิดยอดต่ำและเป็นพิษ ตัวอย่างในการเพาะเลี้ยง Rhododendron sp. ยอดอาจตายได้ถ้าเติม BAP มากในอัตรา 2.5-20 มก./ล. ในทางกลับกันพบว่า 2-ip ให้ผลดีอย่างมากในการเพาะเลี้ยง blueberry โดยทั่ว ๆ ไปควรใช้ไซโตไคนินในอัตรา 0.5-30 มก./ล. (ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ 1-2 มก./ล.) อย่างไรก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มักพบว่าถ้าใช้ในอัตราที่สูง จะชักนำการสร้างตาพิเศษและอาจเกิดแคลลัสพร้อมกันด้วย ดังนั้นในกรณีที่จำเป็นต้องใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากๆ อาจแก้ไขการเกิดตาพิเศษและแคลลัสนี้ได้โดยเร่งการยืดตัวของยอดด้วยกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ก่อนที่จะชักนำให้เกิดราก

สำหรับออกซินนั้น เนื่องจากพืชสามารถสังเคราะห์ IAA ขึ้นเองได้ และมีปริมาณที่แตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์ จึงนิยมใช้ออกซินสังเคราะห์เช่น NAA และ IBA ในความเข้มข้น 0.1-1.0 มก./ล. แทน ส่วน 2,4-D นั้นมีผลอย่างมากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วย จึงควรหลีกเลี่ยงที่จะใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการชักนำให้เกิดกิ่งข้างและตาพิเศษ แต่ใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการชักนำให้เกิดคัพภะอย่างไรก็ตาม 2,4-D นับว่าเป็นออกซินที่มีความสำคัญมากที่สุด

เนื่องจากอาหารกึ่งแข็งจะง่ายต่อการจัดการและดูแลเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ดังนั้นโดยทั่ว ๆ ไปจึงนิยมใส่วุ้นในอัตรา 0.6-8 % อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดจำเป็นต้องใช้อาหารเหลวเพื่อช่วยในการอยู่รอด เช่น Cattleya sp., bromeliads และ Caphalotus follicularis โดยการเขย่าเพื่อให้ยอดแยกจากกันในลักษณะคล้าย ๆ กับมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ไปในตัว

2. อาหารสำหรับชักนำการเกิดราก (rooting medium)

ในพืชหลายชนิด อาหารที่มีปริมาณเกลือต่ำ (1/2 —> 1/4 strength) ได้ผลดี เช่น ใน Narcisus sp. (1/2 strength) และบ่อยครั้งที่พบว่า gladiolus, Narcisus sp. และ สตรอเบอรี เกิดรากได้ในอาหารที่ปราศจากฮอร์โมน แต่โดยทั่วไปแล้วแนะนำให้เติมออกซิน (NAA และ/หรือ IBA) ในอัตรา 0.1-1.0 มก./ล.

พืชบางชนิดพบว่ามีสารบางอย่างช่วยในการเกิดรากให้ดียิ่งขึ้น เช่น ยูคาลิปตัส (Eucalytus ficifolia) เมื่อใช้ riboflavin ร่วมกับ IBA และไว้ในที่มีแสงความเข้มข้นต่ำ ($10 \mu E\ m^{-2}s^{-1}$) จะช่วยให้รากยืดตัวยาวขึ้น ขณะที่ถ้าไม่มี riboflavin จะทำให้รากค่อนข้างสั้นและรากข้างเจริญเฉพาะบริเวณใกล้ผิวอาหารเท่านั้น ในพืช rosaceous fruit หลายชนิด การเกิดรากสามารถกระตุ้นได้ด้วยสารพวก phloroglucinol (PG) แต่ผลการศึกษายังมีข้อโต้แย้งกันอยู่หลายประการ สารจำพวกนี้จัดเป็นสารประกอบ phenolic พบว่าในส่วนของท่อลำเลียงน้ำ (xylem sap) เช่น ในแอปเปิ้ล ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการสร้างยอดและราก โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นอ่อนของพืชบางชนิด เช่น Cinchona ledgeniana จะไม่สามารถอยู่รอดหากไม่มีการใช้ PG และ ยังพบว่าสารนี้ไปกระตุ้นการเกิดยอดและรากของ Pissardi sp. (พลัม) ใน subterranean clover (Trifolium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

subterranean) ซึ่งเป็นถั่วพืชอาหารสัตว์อายุข้ามปี พบว่า PG สามารถเพิ่มการเกิดรากจากเดิม <10% เป็น >20% (รังสฤษดิ์, 2540) อย่างไรก็ตามผลของสาร PG นี้มีลักษณะที่ค่อนข้างจำเพาะต่อยีโนไทป์ของพืชและในพืชบางชนิดมีรายงานว่าอาจมีผลในทางยับยั้ง

3. แสงและอุณหภูมิ (light and temperature)

แม้ว่าโดยปกติแล้วการเพาะเลี้ยงพืชในอาหารสังเคราะห์จะไม่พึ่งการสังเคราะห์แสงมากนัก แสงก็ยังมีความจำเป็นต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาทางด้านสัณฐานที่ถูกควบคุมด้วย พันธุกรรม (morphogenic process) โดยทั่ว ๆ ไปแล้วต้องการความเข้มแสงในช่วง 1,000- 5,000 ลักซ์ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืชด้วย ตัวอย่าง ยอดของ Gerbera sp. (เยอบีรา) และไม้ดอกล้มลุกหลายชนิด ต้องการความเข้มแสงอย่างต่ำประมาณ 300 ลักซ์ และที่เหมาะสมที่สุดคือประมาณ 1,000 ลักซ์ ถ้าความเข้มแสงสูงเกิน 3,000 ลักซ์ จะมีผลในทางยับยั้งได้ สำหรับความยาวนานของช่วงแสง (photoperiod) กล่าวได้ว่าไม่ค่อยมีข้อจำกัด และนิยมให้แสงนาน 16/8 ชั่วโมง กลางวัน/กลางคืน สำหรับอุณหภูมินั้น อุณหภูมิคงที่ 25°C นิยมใช้กันมากที่สุด แม้ว่าในพืชบางชนิดอาจได้ผลดีกว่าหากใช้อุณหภูมิสลับที่สูงหรือต่ำกว่านี้ก็ตาม

4. ชนิดของพืช (species)

ในไม้ยืนต้นที่มีอายุยาวและเกิดรากได้ยาก การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก และทำได้เฉพาะในพืชบางชนิดเท่านั้น ส่วนใหญ่มักพบว่าเกิดเป็นแคลลัสก่อน จึงจำเป็นต้องชักนำให้เกิดสภาพ juvenile ในชิ้นส่วนของพืชที่เลี้ยงเสียก่อน โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า copping ที่มีการให้ฮอร์โมนช่วย รวมทั้งการเปลี่ยนอาหารให้บ่อยครั้ง

การเพาะเลี้ยงแคลลัส (สมปอง ,2536)

แคลลัสคือกลุ่มเซลล์ที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพการเลี้ยงในหลอดทดลองซึ่งปลอดเชื้อ ดังนั้นไม่ว่าจะนำชิ้นส่วน ลำต้น ใบ ราก มาตัดวางเลี้ยงบนอาหารแข็งจะถูกชักนำให้มีการแบ่งเซลล์บริเวณรอยตัด หรือบริเวณที่มีบาดแผลเพื่อซ่อมแซมตัวเอง กระบวนการดังกล่าวเกิดหลังจากทำการเพาะเลี้ยง 3 - 5 วัน เมื่อได้แคลลัสจำนวนมากหลังจากเลี้ยง 3 - 4 สัปดาห์ แล้วตัดแยกเฉพาะก้อนของแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่ หรือสูตรเดิม เพื่อพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสนั้นควรมีการเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นให้เหมาะสม หากใช้สารเคมีระดับความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ต้นพืชที่ได้ไม่ตรงตามพันธุ์ หากหลีกเลี่ยงไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควรทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้น ๆ เพื่อให้แคลลัสได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงช่วงสั้น หลังจากนั้นรีบย้ายแคลลัสไปเลี้ยง ในอาหารชักนำยอดหรือต้นอ่อนต่อไป สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำแคลลัสได้ดีในช่วงแรกคือ 2,4-D อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดต้องการ NAA ดังนั้นควรเลือกใช้ให้ตรงกับความต้องการของพืชแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ในอาหารเติมสารควบคุมต่าง ๆ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ แคลลัสที่มีโครงสร้างร่วนเปราะประกอบด้วยเนื้อเยื่อพาเร็นไคมา มีสีเหลืองหรือเหลืองครีมมีลักษณะโปร่งมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วมองดูแล้วคล้ายฟองน้ำ กับแคลลัสที่มีโครงสร้างแน่นทึบประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่มีรูปร่างเป็นก้อนกลม แข็ง อาจมีการสร้างคลอโรฟิลล์ทำให้เห็นสีเขียวเข้ม เมื่อตัดดูทางกายวิภาคพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์/กลุ่มเซลล์ไปเป็นรูปร่าง เช่น ยอด หรือต้นอ่อน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส (รังสฤษดิ์ ,2540)

1. **ขนาดและรูปร่าง (size and shape)**

ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงแม้ไม่มีข้อจำกัดหรือ ข้อวิกฤต แต่ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงเล็กจนเกินไป นั่นคือมี **critical minimum size** ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กกว่านี้แล้วจะไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ ตัวอย่าง ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหาร (root phloem tissues) ของรากแครอท (Daucus carota) ที่มีน้ำหนักเพียง 3.8 มก. สามารถเกิดแคลลัสได้ แต่ถ้าเป็นเนื้อเยื่อจากหัว (tube meristematic tissues) ของ Jesusalem artichoke แล้ว อาจมีขนาดเล็กเกินไปทั้งนี้เพราะเซลล์ของแครอทมีขนาดเล็กกว่า จึงมีเปอร์เซ็นต์ถูกทำลายหรือถูกกระทบกระเทือนขณะแยกเนื้อเยื่อน้อยกว่า

2. **สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators)**

โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่ว ๆ ไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซิน > ไซโตไคนิน) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ (ออกซิน < ไซโตไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล (ออกซิน = ไซโตไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ นั้นพบว่า ออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01 - 10.0 มก./ล. และ ไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1 - 10.0 มก./ล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

3. ธาตุอาหาร (nutrients)

นอกจากต้องการธาตุอาหารที่เป็นสัดส่วนประกอบหลักทั่ว ๆ ไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโนเช่น กลูตามิน แอสปาติน อาร์จินิน พิวรีน และ ไพริมิดิน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

4. แหล่งของคาร์บอน (carbon sources)

ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และ/หรือแซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4%

5. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors)

โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำ หรือไม่ใช้แสงเลย (เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25^{o}C นอกจากนี้ ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

6. สภาพอาหาร (media status)

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

ข้อควรพิจารณาในการเลี้ยงแคลลัส (Kathiravan และคณะ ,1997)

ในการชักนำกำเนิดแคลลัส ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อถูกนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและต้องการเทคนิคการกดเพียงเบา ๆ ให้ชิ้นส่วนดังกล่าวจมลงไปในวุ้นเล็กน้อยเพื่อให้เนื้อเยื่อพืชสัมผัสกับอาหารได้ดี ขึ้น ถ้าเป็นส่วนปลายรากจะเกิดแคลลัสได้ดีขึ้นถ้าวางราบลงบนอาหาร ขณะที่ชิ้นส่วนที่ตัดมาจากลำต้นควรวางในแนวตั้งให้ปลายที่ถูกตัดจมอยู่ในวุ้น ปิดฝาจานด้วยแผ่นฟิล์ม Parafilm หรือ Clingfilm หรือ กระดาษกาวพลาสติกที่ยืดหยุ่นเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ ขณะเดียวกันให้อากาศที่มีออกซิเจนผ่านเข้าไปได้ ปกติควรเพาะไว้ในที่มืดที่ 25^{o}C แม้ว่าบางพืชอาจจำเป็นต้องใช้แสงความเข้มข้นต่ำ ในสภาพอาหารที่เหมาะสมแล้ว ชิ้นส่วนพืชจะสร้างแคลลัสมากพอที่จะแบ่งและเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) ภายใน 3 - 8 สัปดาห์ แยกเอาแคลลัสที่เกิดขึ้นใหม่ออกจากชิ้นส่วนพืชเดิม (ที่คงเหลืออยู่) โดยใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ชิ้นส่วนแคลลัสที่แยกต้องมีขนาดไม่เล็กจนเกินไปเพื่อไม่ให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ปกติแล้วการเปลี่ยนอาหารจะกระทำทุก ๆ 4 สัปดาห์ และแคลลัสจากพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรควรแยกออกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8 - 10 ชิ้น อย่างไรก็ตาม ขนาดที่เล็กที่สุดที่ใช้ได้ดีขึ้นกับขนาดของชิ้นส่วนที่เลี้ยงตอนแรกและผันแปรขึ้นกับชนิดพืช ชนิดและอายุของชิ้นส่วนพืชเช่นเดียวกัน

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (โอภาส ,2533)

1. **แสง (Light)**

1.1 <u>คุณภาพของแสง</u> (light quality) แสงสีแดง (red light) และ แสงสีน้ำเงิน (blue light)มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด Murashige (1974) ได้กล่าวว่า แสงสีแดงกระตุ้นให้เกิดราก (root initiation) และ แสงสีน้ำเงินช่วยกระตุ้นให้เกิดยอดในพืชบางชนิด ส่วนยอดของพวก <u>Pohlia</u> <u>nutaus</u> จะเกิดตาเมื่อสัดส่วนของแสงสีแดงต่อแสงสีน้ำเงินเท่ากับ 11 ต่อ 6 ชั่วโมงต่อวัน และใช้ Gro Lux Lamps หรือ Fluorescent lamps ไม่ควรใช้ incandescent lamps

1.2 <u>ความเข้มข้นของแสง</u> (light intensity) ในพืชหลายชนิดความเข้มของแสงระดับ 1,000 จะเหมาะสมกับช่วงการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ และ 3,000 - 10,000 Lux จะเหมาะสมในช่วงก่อนการย้ายปลูก

1.3 <u>ระยะเวลาให้แสง</u> (light duration) โดยทั่วไปมักให้แสงแก่พืชประมาณ 16 ชั่วโมงต่อวัน เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อกระหล่ำดอกต้องได้รับแสง 9 ชั่วโมงจึงจะเกิดตายอด ส่วนเนื้อเยื่อซ่อนกลิ่นไทย พบว่าต้องได้รับแสง 12 ชั่วโมงจึงจะเกิดรากได้เป็นต้น

2. **อุณหภูมิ (Temperature)** การเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไปมักใช้อุณหภูมิ 25°C พืชแต่ละชนิดย่อมมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันไปที่ระดับอุณหภูมิ 25 - 27°C เหมาะสมกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพวกพืชล้มลุก (annuals) และพืชกึ่งเมืองร้อน (tropical species)

Kathiravan และคณะ (1997) ได้ศึกษาถึงการสร้างราก และการชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของหม่อน <u>Morus</u> <u>alba</u> โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสเริ่มจากส่วนของไฮโปคอทิล ก้านใบ ใบอ่อน ใบแก่ และต้นของ <u>Morus</u> <u>alba</u> บนอาหาร MS เสริมออกซินต่าง ๆ อย่าง 2,4-D , NAA และ IAA ร่วมกับการเติม BAP ความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสได้มาจากอาหารที่เสริม IAA และ BAP adventitious shoot bud ได้จากการชักนำแคลลัสของไฮโปคอทิล แต่ไม่มีการตอบสนองจากการสังเกตจากแคลลัสของแหล่งชิ้นส่วนอื่น ความถี่สูงสุดของการพัฒนา adventitious shoot bud ได้จากการสังเกตภายใน 4 - 5 สัปดาห์ บนอาหาร MS เสริมด้วย NAA (0.05mg/l) และ BAP (0.75mg/l) การชักนำให้เกิดต้นใหม่มีการ subculture บนอาหารสูตรชักนำรากเสริมความแข็งแรงด้วย IBA และทำการปรับสภาพหลังจากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นส่วนของไฮโปคอทิล ,ใบอ่อน และก้านใบจะตัดมาจากต้นกล้าที่มีอายุ 20 - 25 วัน ชิ้นส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS โดยการเติมแบบรวมกันและความเข้มข้นต่าง ๆ กันของออกซิน เช่น indole - 3 - acetic acid (IAA) , 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) , naphthalene acetic acid (NAA) และ cytokinin - 6 - benzylaminopurine (BAP) ,casein hydrolysate 300 mg/l , น้ำมะพร้าว 200 ml/l และ PVP (polyvinyl pyrrolidone) 100 mg/l สำหรับการชักนำแคลลัส ชิ้นส่วนวางเลี้ยงในที่มีแสง 1,500 ลักซ์ที่ 25^{o}C และความชื้นสัมพัทธ์ 65 % pH ของอาหารปรับที่ 5.8 ก่อนทำการนึ่ง ทำการเลี้ยงต่ำสุด 50 ขวดในแต่ละ treatment

1 เดือนหลังจากเริ่มเกิดแคลลัสจะมีการพัฒนาไปจนปราศจากร่องรอยของชิ้นส่วนและทำการ subculture ในอาหาร LS (Linsmarier และ Skoog , 1965) ที่ปรับปรุงโดยการเติม NAA (0 - 1 mg/l) เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกันเติม BAP (0 - 1 mg/l) การเริ่มเกิดตา (adventitious bud) จะแสดงออกภายใน 40 วัน กลุ่มของแคลลัสจะเป็นก้อนกลม ๆ เล็ก ๆ เป็นตุ่มสีค่อนข้างเขียวจากส่วนของไฮโปคอทิล ตัวอย่างแคลลัสที่ fixed ใน NAA (Formalin : Acetic acid : 95 % Ethanol 5 : 9 : 90) สำหรับการศึกษาทางด้านกายวิภาค นี้เป็นวิธีเอาน้ำหรือความชื้นออกในชุดของ tertiary budanol และฝังอยู่ในขี้ผึ้งพาราฟีน และชิ้นส่วนหนา 10 ไมโครเมตร และย้อมสีด้วย haematoxylin หน่อที่ได้จากการชักนำแล้วขนาด 6 – 8 ซม. จะตัดมาเลี้ยงบนอาหารพื้นฐาน MS ที่เติม indole - 3 - butyric acid (IBA 0.5 mg/l)ต้นที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่รากมีการพัฒนาดีจะนำออกมาจากภาชนะที่เพาะเลี้ยงหลังจากนั้นทำการล้างรากในน้ำไหล แล้วย้ายลงกระถางที่บรรจุ เวอร์มิคูไลต์ (vermiculite) และดินสเตอไรซ์ เป็นสัดส่วนเท่า ๆ กัน และเก็บไว้ภายใต้สภาพที่ปกคลุมด้วย polythene ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกบาง ๆ สำหรับเป็นฉนวนและกันน้ำ ต้นที่ได้จากการชักนำให้เป็นต้นใหม่ที่แข็งแรงจะย้ายลงสู่เนอสเซอรี่

การชักนำแคลลัส

ความสามารถในการเกิดแคลลัสของแต่ละชิ้นส่วนจะแตกต่างกันออกไป เช่น ไฮโปคอทิลใบอ่อน ใบแก่ ส่วนของปล้อง และก้านใบ จะพิจารณาบนอาหาร MS ที่เติมออกซินต่าง ๆ กัน เช่น IAA ,2,4-D , NAA และไซโตไคนิน (BAP) การกระทำของความสามารถในการทำงานร่วมกันของออกซินและไซโตไคนินสำหรับการชักนำแคลลัสให้เป็นผลสำเร็จจะเห็นได้ชัดในพืชใบเลี้ยงคู่ ส่วนของไฮโปคอทิลและปล้องจะแสดงออกถึงการเริ่มต้นของแคลลัสเมื่อ 7 วัน หลังจากทำการเลี้ยงชิ้นส่วนนั้น แต่ในทางตรงกันข้ามก้านใบ ใบอ่อนและใบแก่จะแสดงออกถึงการเริ่มต้นของแคลลัสหลังจากวันที่สิบไปแล้วเท่านั้น การก่อให้เกิดแคลลัสในแบบหลังนี้จะเกิดเป็นสีน้ำตาลดำ แข็งและแน่นและมีการเจริญของรากเกิดขึ้นด้วย ส่วนของไฮโปคอทิลและปล้องพบว่า เป็นชิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดแคลลัสตามมาด้วย ใบแก่ ใบอ่อนและก้านใบ แคลลัสที่ได้มาจากชิ้นส่วนต่าง ๆ กันจะแสดงความแปรปรวนหรือแตกต่างกันในลักษณะเฉพาะของรูปร่างลักษณะและกายวิภาค

โดยธรรมชาติของแคลลัสจะแตกต่างกันไปตามการรวมกันของฮอร์โมนต่าง ๆ กัน จำนวนสูงสุดของแคลลัสแบบก้อนกลมเล็ก ๆ แน่น สีเหลือง ได้จากชิ้นส่วนของไฮโปคอทิลและปล้องบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว แต่ถ้าเพิ่ม BAP จะมีผลให้ได้แคลลัสที่แน่นทึบหรือก้อนกลมเล็กสีค่อนข้างเขียว จากรายงานของ Hunautt (1989) กล่าวว่า ไซโตไคนินมักจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดความแน่นทึบและมีสีเขียวเพิ่มขึ้น จากการสังเกตของคณะวิจัยนี้ก็ให้หลักฐานสนับสนุนข้อเท็จจริงนี้ด้วยเหมือนกัน จากการเปรียบเทียบพบว่าแคลลัสจากไฮโปคอทิลมีการตอบสนองดีกว่าแคลลัสบนอาหารที่เพิ่ม 2,4-D /IAA /NAA อย่างใดอย่างหนึ่ง อย่างไรก็ตาม 2,4-D สามารถชักนำได้ปริมาณที่มากกว่าอีก 2 treatment นั้น การรวมกันของ BAP (0.5 mg/l) กับ aforesaid auxin จะได้แคลลัสก้อนกลมเล็กสีค่อนข้างเขียว ชิ้นส่วนของก้านใบจะแสดงให้เห็นถึงการตอบสนองในการเกิดแคลลัสที่ดีสำหรับการรวมกันของ 2,4-D กับ BAP

การ regeneration ทำได้เฉพาะจากแคลลัสที่กึ่งร่วนและแน่นทึบสีเขียวที่ได้มาจากชิ้นส่วนของไฮโปคอทิลอย่างเดียวเท่านั้น สิ่งนี้สอดคล้องกับคำวินิจฉัยของ Ghugale และคณะ (1971) , Oka และ Okyma (1981) และ Kim และคณะ (1985) Mendoza และ Futsudhara (1990) ได้แจ้งถึงการพัฒนาของตายอดจากแคลลัสก้อนกลมเล็ก ๆ สีเขียวและแน่น จากการศึกษาทางกายวิภาคของแคลลัสลักษณะนี้ซึ่งเรียกว่าอัตราส่วนขนาดใหญ่ของเซลล์ซึ่งไซโตพลาสซึมแน่นทึบมีเม็ดแป้งเล็ก ๆ และ nuclei ลักษณะยื่นนูนอยู่มากมาย Warrag (1989) ก็สังเกตพบว่าเซลล์ที่มีผนังบาง ๆ จะมีก้อนกลม ๆ เล็ก ๆ มากมายมีไซโตพลาสซึมแน่นทึบและ nuclei ลักษณะยื่นนูนใน embryogenic callus ด้วย แคลลัสที่แน่นและแข็งแสดงให้เห็นถึงปริมาณที่มากมายของปัจจัยสำคัญที่หลากหลาย แคลลัสที่ได้จากใบแก่และใบอ่อนแสดงให้เห็นถึงจำนวนที่มากของเซลล์ที่ไม่มีแวคิวโอล

ในการศึกษาในปัจจุบัน แคลลัสที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็กสีเหลืองแกมเขียวและแน่นทึบที่ได้มาจากชิ้นส่วน aforesaid ที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS สำหรับการ regemeration หลังจากนั้น 3 - 4 สัปดาห์ ลักษณะพองออกบาง ๆ จะเกิดขึ้นบนผิวหน้าของแคลลัสของไฮโปคอทิล แล้วทำการ subcultured บนอาหารที่เติม NAA (0.5 mg/l) ในระดับต่ำและ BAP (0.75 mg/l) ในระดับสูง เมื่อครบสัปดาห์ที่หกลักษณะที่โป่งพองออกนั้นจะเจริญกลายไปเป็นต้นใหม่ ระหว่างประเภทต่าง ๆ ของการสำรวจแคลลัสนั้นการเกิด adventitious shoot จะปรากฏเฉพาะแคลลัสจากไฮโปคอทิลเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lakshmi sita และคณะ (1979) และ Oka และคณะ (1982) ก็ได้สังเกตพบว่าพวกยูคาลิปตัส ก็มีไฮโปคอทิลที่เหมาะสมสำหรับการ regeneration ให้เป็นต้นใหม่ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติตามธรรมชาติของความเยาว์วัยของแหล่งชิ้นส่วนพืช

Sahog และคณะ (1997) รายงานว่า ขั้นตอนสำหรับการชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่อย่างมีประสิทธิภาพที่ได้มาจากต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่ให้ผลดีพอ ๆ กับระยะที่เป็นต้นกล้าของ Morus indica L. ดังนี้ แคลลัสที่ทำการชักนำเป็นผลสำเร็จจากส่วนของปล้องได้มาจากต้นที่มีอายุ 5 ปี วางเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2.0 mg/l ของ 2,4-D และ 0.5 mg/l ของ BA ส่วนของไฮโปคอทิลได้มาจากแคลลัสที่งอกเป็นต้นกล้า อายุ 15 วัน ในห้องทดลองบนอาหาร MS ที่เติม 2.0 mg/l 2,4-D เพียงอย่างเดียว แคลลัสของปล้องขยายพันธุ์ได้ดีบนอาหาร MS ร่วมกับ 0.5 mg/l BA casein hydrolysate (CH) และน้ำมะพร้าวสด 15 % (CW) แต่ในทางตรงกันข้ามแคลลัสของไฮโปคอทิล จำเป็นต้องใช้การรวมกันของ 2.0 mg/l NAA และ 0.2mg/l BA สำหรับการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ ความถี่สูงสุดของการชักนำให้เป็นต้นใหม่ (83%) รวมทั้งจำนวนสูงสุดของการสร้างตายอด (6 ตาต่อแคลลัส) ทำได้สำเร็จจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของปล้องบนอาหาร MS ที่เติม 0.5 mg/l BA สำหรับแคลลัสที่ได้มาจากไฮโปคอทิลการชักนำให้เกิดตายอดเกิดขึ้น (65% , 4 ตาต่อแคลลัส) บนอาหาร MS กับ BA ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม 1.0 mg การสังเกตลักษณะทางกายวิภาคมีการยืนยันการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสจากชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ชิ้นส่วนของปล้องมีการตอบสนองได้ดีกว่าชิ้นส่วนของไฮโปคอทิลเกี่ยวกับการพัฒนาของแคลลัสและการเจริญไปเป็นต้นจากชิ้นส่วนของอวัยวะ สิ่งสำคัญในการชักนำให้เป็นต้นพืชที่มีอิทธิพลเป็นอย่างยิ่งคืออายุของแคลลัส การเกิดรากทำการชักนำ 98 % ของต้นที่มียอดบนครึ่งหนึ่งของอาหาร MS ที่เติม 1.0 mg ของ IBA พืชต้นใหม่ที่เกิดจากรากแล้วนำไปปรับสภาพและนำไปพิสูจน์ความสำเร็จในแปลงทดลอง

การตัดแบ่งและเปลี่ยนอาหาร ต้นที่มีขนาดความยาว 3 - 5 เซนติเมตรเป็นขนาดที่เหมาะสำหรับตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ที่มีตาข้างและกิ่งเล็ก ๆ ติดอยู่ ตัดแบ่งและนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งภายในเวลา 1 เดือน จะเกิดต้นซึ่งสามารถใช้ตัดแบ่งเพื่อเปลี่ยนอาหารครั้งต่อไปได้ (Oka และ Ohyama , 1986)

อริยาและสาริณี (2532) เลี้ยงใบอ่อนของหม่อน (Morus alba Var S 54)ที่ได้จากต้นอ่อนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร ดัดแปลงและ B_5 เนื้อเยื่อแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดและเส้นกลางใบของใบอ่อนเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 mg/l และ BA 0.5 mg/l และชักนำให้เกิดต้นโดยการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100083

สูตร MS ที่เติม 1.0 mg/l แล้วย้ายยอดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่มีความเข้มข้นสารอาหารเพียงครึ่งเดียว และเติมน้ำมะพร้าว 10 % เพื่อชักนำให้เกิดราก เมื่อต้นอ่อนเหล่านี้สูงประมาณ 2 - 3 นิ้วจึงย้ายลงปลูกในกระถางที่ใส่ vermiculite จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นหม่อนประมาณ 90 %

Sharma และ Thorpe (1990) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อน (Morus alba L.) จากตาข้างพบว่า การใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l น้ำตาล 3 % สามารถเพิ่มปริมาณหม่อนได้มากถึง 13 เท่า และการเติมผงถ่านในปริมาณ 0.5 หรือ 0.1 % ลงในอาหารสูตรดังกล่าวสามารถยับยั้งการเกิดแคลลัสบริเวณโคนต้นได้ และทำให้เกิดรากได้ภายใน 2 สัปดาห์ สามารถย้ายปลูกลงในดินผสม vermiculite ในอัตราส่วนเท่ากันได้

วิฑูรย์ และเสาวณีย์ (2532) พบว่าเมื่อมีปริมาณวุ้นเพิ่มขึ้นจะทำให้ความยาวของรากเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลง และจะมีค่ามากที่สุดที่ระดับของวุ้น 6.0 g/l ทั้งนี้เนื่องจากอาหารวุ้นที่แข็งจะทำให้การดูดซึมน้ำและธาตุอาหารของเป็นไปได้ยาก ส่วนอาหารที่มีปริมาณวุ้นน้อยรากสามารถดูดซึมน้ำและธาตุอาหารได้ง่ายกว่าทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าในสูตรอาหารที่มีวุ้นสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. clean culture หม่อนบุรีรัมย์ 60
2. สารเคมีต่าง ๆ
   2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS; 1962)
   2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BA (6-benzyladenine) , 2,4-D (2 , 4 - dichlorophenoxyacetic acid) , IAA (indloeacetic acid) , NAA (α - napthalene acetic acid)
   2.3 น้ำตาล ได้แก่ Sucrose
   2.4 ผงวุ้น
   2.5 น้ำกลั่น
3. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (analytical balance) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) กระบอกตวง บีกเกอร์ ปิเปต ขวดแก้วพร้อมฝาปิด หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
4. เครื่องมือและสารที่ใช้ในการตัดแยกย้ายชิ้นส่วน ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานแก้ว ขวดอาหารที่เตรียมและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอุณหภูมิประมาณ $25 \pm 3^{0}C$ พร้อมชั้นวางมีหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว (white light fluorescence) ความเข้มแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
6. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการถ่ายรูป

วิธีการ

1. <u>การเตรียมอาหาร</u>
   1.1 ชั่งสารเคมีต่าง ๆ ตามสูตร Murashige and Skoog (MS; 1962) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) เพื่อสะดวกในการใช้เตรียมอาหารแต่ละครั้ง
   1.2 เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารสูตร MS อัตรา 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 เติม hormone ในอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อทดสอบระดับที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของแคลลัสในแต่ละชิ้นส่วนของหม่อน ดังนี้

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของฮอร์โมน	
	AUXIN	CYTOKININ
สูตรที่ 1	2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)
	0	0
	0.5	0
	1.0	0
	2.0	0
	0.5	0.5
	1.0	0.5
	2.0	0.5
สูตรที่ 2	IAA (mg/l)	BA (mg/l)
	0	0
	0.5	0
	1.0	0
	2.0	0
	0.5	0.5
	1.0	0.5
	2.0	0.5
สูตรที่ 3	NAA (mg/l)	BA (mg/l)
	0	0
	0.5	0
	1.0	0
	2.0	0
	0.5	0.5
	1.0	0.5
	2.0	0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16989

1.4 เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายอาหารจนได้ปริมาตรตามต้องการ

1.5 ปรับความเป็นกรด - ด่างของสารละลายโดยใช้ 1N KOH และ 1N HCL จน pH ของอาหารเป็น 5.6

1.6 เติมวุ้นสำหรับสารละลายอาหารปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย

1.7 บรรจุอาหารลงขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121^{0}C ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น เพื่อนำมาใช้เลี้ยงพืชทดสอบ

2. <u>ศึกษาการพัฒนาของแคลลัสที่เกิดจากแต่ละชิ้นส่วนของหม่อนซึ่งเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับ</u> hormone auxin and cytokinine ต่าง ๆ กัน

โดยนำ clean culture ของหม่อนบุรีรัมย์ 60 อายุ 25 วัน มาตัดเอาส่วนต่าง ๆ ดังนี้

- ปล้อง (ปล้องที่ 2-3 จากยอด)
- ใบอ่อน (ใบที่ 2-3 จากยอด)
- ใบแก่ (ใบที่ 4-5 จากยอด)

นำแต่ละชิ้นส่วนมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ hormone auxin and cytokinin ต่าง ๆ ตามที่ได้เตรียมไว้แล้วในข้อ 1.3 โดยทำการเพาะเลี้ยงใบแก่ แต่ละความเข้มข้นของ hormone ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ , ใบอ่อนและปล้อง ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ (โดยวางเลี้ยง 1 ชิ้น/ขวด)

นำไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 $\pm$3 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อแต่ละชิ้นส่วนมีการเจริญและพัฒนาของแคลลัสและรากได้ 1 สัปดาห์ สังเกตดูลักษณะการพัฒนาของแคลลัสและรากของแต่ละชิ้นส่วนในแต่ละความเข้มข้นของฮอร์โมน

บันทึกผลการเจริญและพัฒนาตัวของแคลลัสและรากแต่ละชิ้นส่วนในแต่ละความเข้มข้นของฮอร์โมน อาทิตย์ละครั้ง จำนวน 6 ครั้ง โดยเริ่มครั้งแรกเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแต่ละชิ้นส่วนเป็นเวลา 1,2,3,4,5 และ 6 อาทิตย์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

บันทึกผลการทดลอง

1. การให้คะแนนแคลลัสที่พัฒนาขึ้นมาจากชิ้นส่วนของหม่อนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ความเข้มข้นฮอร์โมนต่าง ๆ ดังนี้

-	หมายถึง	ไม่เกิดแคลลัส
+	”	เกิดแคลลัสน้อย
++	”	เกิดแคลลัสปานกลาง
+++	”	เกิดแคลลัสมาก

2. การให้คะแนนรากที่พัฒนาขึ้นมาจากชิ้นส่วนของหม่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ความเข้มข้นฮอร์โมนต่าง ๆ ดังนี้

-	หมายถึง	ไม่เกิดราก
#	”	เกิดรากน้อย
##	”	เกิดรากปานกลาง
###	”	เกิดรากมาก

3. การให้คะแนนยอดที่เกิดจากแคลลัสที่พัฒนาขึ้นมาจากชิ้นส่วนของหม่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ความเข้มข้นฮอร์โมนต่าง ๆ ดังนี้

-	หมายถึง	ไม่เกิดยอดที่เกิดจากแคลลัส
*	”	เกิดยอดที่เกิดจากแคลลัสน้อย
**	”	เกิดยอดที่เกิดจากแคลลัสปานกลาง
***	”	เกิดยอดที่เกิดจากแคลลัสมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเริ่มต้นของแคลลัสจะเกิดขึ้นภายใน 2 – 3 สัปดาห์ โดยสังเกตจากการพองตัวของชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหาร ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นแคลลัสในสัปดาห์ที่ 3 โดยจะมีการแบ่งตัวเพิ่มขนาดขึ้นพร้อมกับการเจริญของราก หลังจากนี้สังเกตการเจริญและพัฒนาของแคลลัสอีกในสัปดาห์ที่ 4 – 5 ให้ผลเป็นดังนี้

<u>ใบแก่</u>

ใบแก่ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4 – D ความเข้มข้น 0.5 – 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียวพบว่าจะเกิดรากเพียงเล็กน้อยแต่ไม่เกิดแคลลัสเลย ส่วนสูตรอาหารที่เติม 2,4 – D ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เกิดแคลลัสได้ดีพอควรและเกิดรากเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 1) แคลลัสที่ได้มีลักษณะก้อนกลมเล็ก กึ่งร่วนสีเขียวซีด เกิดเฉพาะบริเวณก้านและโคนใบ จากการทดลองพบว่าความถี่สูงสุดของการเกิดรากจะเกิดบนอาหารที่เติม 2,4 – D 0.5 , 1.0 และ 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียว และ 2,4 – D 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังทำการเพาะเลี้ยง ส่วนความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสจะเกิดบนอาหารสูตรที่เติม 2,4 – D 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l นอกจากนี้ยังพบว่ามีการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดใหม่ได้ดีพอควรบริเวณก้านและโคนใบในอาหารสูตร 2,4 – D 1.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 1.4) (ภาพที่ 1)

ใบแก่ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี IAA เพียงอย่างเดียวพบว่าจะเกิดแคลลัสและรากได้ดีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนสูตรอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ BA 0.5 mg/l พบว่าเกิดเฉพาะแคลลัสพอควรและไม่เกิดรากเลย (ตารางที่ 1) แคลลัสที่ได้มีลักษณะแห้งและแน่นทึบสีเหลืองเข้มถึงน้ำตาลเข้ม จากการทดลองพบว่าเกิดรากได้เพียงเล็กน้อยบนอาหารสูตรที่เติม IAA 1.0 และ 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียว ส่วนความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสจะเกิดบนอาหารสูตรที่เติม IAA 0.5 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 1.4) (ภาพที่ 4)

ใบแก่ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี NAA เพียงอย่างเดียวพบว่าจะเกิดรากได้ดีกว่าแคลลัส ส่วนแคลลัสที่ได้มีลักษณะก้อนกลมเล็กร่วนสีเหลืองอ่อน เกิดได้ดีบริเวณก้านและโคนใบ จากการทดลองพบว่าความถี่สูงสุดของการเกิดรากจะเกิดบนอาหารสูตรที่เติม NAA 1.0 mg/l เพียงอย่างเดียว ส่วนความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสจะเกิดบนอาหารสูตรที่เติม NAA 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 1.4) (ภาพที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบอ่อน

ใบอ่อนที่วางเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4 – D เพียงอย่างเดียวจะเกิดรากน้อยมากและไม่เกิดแคลลัสเลย ส่วนสูตรอาหารที่เติม 2,4 – D ร่วมกับ BA 0.5 mg/l พบว่าเกิดแคลลัสได้ดีและเกิดรากเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหรือแทบจะไม่เกิดเลย (ตารางที่ 2) แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็กกึ่งร่วนสีเขียวอ่อน เกิดเฉพาะบริเวณก้านและโคนใบ จากการทดลองพบว่าเกิดรากได้เพียงเล็กน้อยในสูตรอาหารที่เติม 2,4 – D 1.0 และ 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียวและอาหารสูตรที่เติม 2,4 – D 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ส่วนความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสจะเกิดในอาหารสูตรที่เติม 2,4 – D 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l นอกจากนี้ยังพบว่าการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดใหม่ได้ดีบริเวณก้านและโคนใบในสูตรอาหารที่เติม 2,4 – D 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ด้วย ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 2.4) (ภาพที่ 2)

ใบอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี IAA เพียงอย่างเดียว พบว่าเกิดรากได้เพียงเล็กน้อยและไม่เกิดแคลลัสเลย ส่วนสูตรอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เกิดเฉพาะแคลลัสได้พอควรและไม่เกิดรากเลย (ตารางที่ 2) แคลลัสที่ได้มีลักษณะแห้ง แน่นทึบสีน้ำตาลดำทั่วทั้งใบ จากการทดลองพบว่าเกิดรากได้เพียงเล็กน้อยในสูตรอาหารที่เติม IAA 0.5 mg/l และ 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียว ความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสเกิดในสูตรอาหารที่เติม IAA 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 2.4) (ภาพที่ 5)

ใบอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA เพียงอย่างเดียว พบว่าเกิดรากและแคลลัสโดยเฉลี่ยได้ดีพอควร ส่วนสูตรอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เกิดเฉาะแคลลัสได้ดีแต่ไม่เกิดรากเลย (ตารางที่ 2) แคลลัสที่ได้มีลักษณะก้อนกลมเล็ก ร่วน สีเหลืองอ่อน เกิดได้ดีบริเวณรากและโคนใบ จากการทดลอง พบว่าเกิดรากเล็กน้อยบนสูตรอาหารที่เติม NAA 0.5 และ 1.0 mg/l เพียงอย่างเดียวและเกิดรากได้ดีในสูตรอาหารที่เติม NAA 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียว ส่วนความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสเกิดขึ้นทั้งในสูตรอาหารที่เติม NAA 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 2.4) (ภาพที่ 8)

ปล้อง

ปล้องที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี 2,4-D เพียงอย่างเดียว พบว่าไม่เกิดการพัฒนาของแคลลัสและรากเลย ส่วนสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เกิดแคลลัสได้พอควรและไม่เกิดรากเลย (ตารางที่ 3) แคลลัสที่ได้มีลักษณะแน่นทึบ สีเหลืองเข้มหรือน้ำตาล จากการทดลองพบว่าไม่เกิดการพัฒนาของรากเลย และเกิดการพัฒนาของแคลลัสได้พอควรบนสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 ในสัปดาห์ที่ 6 หลังทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 3.4) (ภาพที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปล้องที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี IAA เพียงอย่างเดียว พบว่าเกิดรากได้เพียงเล็กน้อยหรือแทบจะไม่เกิดเลย และเกิดแคลลัสโดยเฉลี่ยดีพอควร ส่วนสูตรอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เกิดแคลลัสพอควรและไม่เกิดรากเลย (ตารางที่ 3) แคลลัสที่ได้มีลักษณะแข็ง แน่นทึบ สีน้ำตาลดำ จากการทดลองนี้ พบว่าไม่มีการพัฒนาของรากเลยหรือมีน้อยมาก และเกิดการพัฒนาของแคลลัสได้พอควรบนสูตรอาหารที่เติม IAA 0.5 , 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดใหม่ได้ดีในอาหารสูตรที่เติม IAA 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 3.4) (ภาพที่ 6)

ปล้องที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA เพียงอย่างเดียว พบว่ามีการเจริญของรากดีและเกิดแคลลัสเล็กน้อยแบบร่วน สีเหลืองเข้ม ส่วนสูตรอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เกิดแคลลัสได้ดีแต่ไม่เกิดรากเลย (ตารางที่ 3) แคลลัสที่ได้มีลักษณะก้อนกลมเล็ก กึ่งร่วน สีค่อนข้างเขียว จากการทดลอง พบว่าความถี่สูงสุดของการเกิดรากเกิดขึ้นในสูตรอาหารที่เติม NAA 0.5 mg/l เพียงอย่างเดียว ส่วนความถี่สูงสุดของการเกิดแคลลัสพบได้ในสูตรอาหารที่เติม NAA 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l นอกจากนี้ยังพบว่า เกิดการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดใหม่ได้เล็กน้อยในสูตรอาหารที่เติม NAA 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 3.4) (ภาพที่ 9)

จำนวนสูงสุดของแคลลัสแบบกึ่งร่วน ก้อนกลมเล็ก สีเหลืองเข้มได้มาจากชิ้นส่วนของปล้องบนอาหาร MS ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว แต่ถ้าเพิ่ม BA จะมีผลให้ได้แคลลัสที่แน่นทึบ ก้อนกลมเล็ก สีค่อนข้างเขียว ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Kathiravan และคณะ (1997) และจากรายงานของ Hanault (1989) ซึ่งกล่าวว่า ไซโตไคนินมักทำให้เนื้อเยื่อเกิดความแน่นและมีสีเขียวเพิ่มขึ้น

จากการเปรียบเทียบระหว่างชิ้นส่วนของใบอ่อน ใบแก่ และปล้อง พบว่า ชิ้นส่วนของใบจะเกิดการเจริญและพัฒนาของแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนของปล้อง สาเหตุที่ชิ้นส่วนของใบอ่อนและใบแก่เกิดรากและแคลลัสได้ดีกว่าส่วนของปล้อง เนื่องจากส่วนของปล้องขณะทำการเพาะเลี้ยงจะปล่อยสารสีน้ำตาล (phenolic compound) ออกมาจากบาดแผลที่เกิดจากการตัดแยกเนื้อเยื่อมากกว่าส่วนของใบ ในขณะที่ส่วนของใบอ่อนและใบแก่จะทำการวางเลี้ยงทั้งใบ ซึ่งจะเกิดบาดแผลเพียงตรงก้านใบเท่านั้น สารนี้มีผลในการยับยั้งการเจริญและพัฒนาของแคลลัสทั้งยังทำให้แคลลัสที่ได้มีสีคล้ำไปด้วย ทั้งนี้การวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ชิ้นส่วนของพืชปลดปล่อยสารพิษออกมาได้ สำหรับแคลลัสต้องการความเข้มแสงต่ำหรือไม่ต้องการแสงเลย (รังสฤษดิ์, 2540) ดังจะเห็นได้ชัดจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหม่อนที่วางเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม IAA จะพัฒนาเป็นแคลลัสได้น้อยกว่าสูตรอาหารที่เติม 2,4 – D และ NAA เนื่องจาก IAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นฮอร์โมนที่ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยแสงมากกว่าที่มืด (รังสฤษดิ์ , 2540) นอกจากนี้ชิ้นส่วนของปล้องที่เล็กเกินไปก็อาจทำให้เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายหรือกระทบกระเทือนจากการแยกเนื้อเยื่อและสารพิษมีได้มากกว่าชิ้นส่วนของใบ แต่จากการศึกษาของ Kathiravan และคณะ (1997) รายงานว่า ส่วนของปล้องจะเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีกว่าส่วนของใบอ่อนและใบแก่ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่า การทดลองนี้ได้ใส่สารดูดซับสารพิษลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย

สูตรอาหารที่ใช้สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ อาหาร MS ที่เติมออกซิน ได้แก่ 2,4 – D , IAA และ NAA และไซโตไคนิน ได้แก่ BA สูตรอาหารที่มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสให้ได้จำนวนมากที่สุด คือ สูตรอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA รองลงมาคือ สูตรอาหารที่เติม 2,4 – D ร่วมกับ BA และ IAA ร่วมกับ BA แต่สูตรอาหารที่ทำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดได้ดี คือ สูตรอาหารที่เติม 2,4 – D ร่วมกับ BA 0.5 mg/l สำหรับชิ้นส่วนของใบอ่อนและใบแก่ สูตรอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ BA 0.5 mg/l พบว่า เกิดยอดได้พอควรสำหรับชิ้นส่วนของปล้อง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่เติม NAA ถึงแม้ว่าจะให้จำนวนแคลลัสสูงสุดแต่แคลลัสที่ได้ไม่มีคุณสมบัติที่จะพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ คือ มีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็ก ค่อนข้างร่วน สีเหลือง ส่วนแคลลัสที่ได้จากสูตรอาหารที่เติม 2,4 – D จะเป็นแคลลัสที่มีลักษณะก้อนกลมเล็ก กึ่งร่วน สีค่อนข้างเขียว ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถจะพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Kathiravan และคณะ (1997)

สูตรอาหารที่ไม่มี BA มีผลให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดรากได้ดีกว่าสูตรอาหารที่มี BA เนื่องจากมีสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนิน ซึ่งจะส่งเสริมการเกิดราก ตามรายงาน หลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ของ รังสฤษดิ์ (2540)

จากการทดลองนี้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่เลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารภายใน 1 – 2 สัปดาห์แรกไม่พบการเจริญและพัฒนาของแคลลัส จะเริ่มสังเกตเห็นการเกิดของแคลลัสได้ในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยง ดังนั้น จึงทำการบันทึกผลตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไปตามตารางข้อมูลดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากจากชิ้นส่วนของ **ใบแก่** ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 1.1 สัปดาห์ที่ 3

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1.2 สัปดาห์ที่ 4

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	#	-	#	-	-	-	#	+	#	+	#
0.5	-	-	+	-	** ++	-	++	-	-	-	+	-	+	-	++	-	-	-	-	-	+	-	+	-

ตารางที่ 1.3 สัปดาห์ที่ 5

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	+	#	-	#	-	-	+	#	++	##	++	#
0.5	-	-	-	#	** ++	-	++	-	-	-	++	-	+	-	++	-	-	-	+	-	++	-	+++	-

ตารางที่ 1.4 สัปดาห์ที่ 6

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	+	#	+	#	-	-	+	#	++	###	++	#
0.5	-	-	-	#	** ++	-	++	-	-	-	++	-	+	-	++	-	-	-	++	-	+++	-	+++	-

ตารางที่ 2 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากจากชิ้นส่วนของ **ใบอ่อน** ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่าง ๆ กัน

<u>ตารางที่ 2.1 สัปดาห์ที่ 3</u>

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<u>ตารางที่ 2.2 สัปดาห์ที่ 4</u>

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	#	-	#	-	#	-	-	-	#	-	-	++	#
0.5	-	-	*** +++	-	++	-	++	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-

ตารางที่ 2.3 สัปดาห์ที่ 5

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	#	-	#	-	#	-	-	-	#	+	#	+++	##
0.5	-	-	*** +++	-	++	-	++	#	-	-	+	-	+	-	++	-	-	-	++	-	++	-	++	-

ตารางที่ 2.4 สัปดาห์ที่ 6

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	#	-	#	-	-	-	#	-	#	-	#	-	-	-	#	++	#	+++	###
0.5	-	-	*** +++	-	++	-	++	#	-	-	-+	-	++	-	++	-	-	-	+++	-	+++	-	+++	-

ตารางที่ 3 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากจากชิ้นส่วนของ **ปล้อง** ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 บนอาหารแข็งสูตร MS **ที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่าง ๆ กัน**

ตารางที่ 3.1 สัปดาห์ที่ 3

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3.2 สัปดาห์ที่ 4

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	#	+	-	+	-
0.5	-	-	+	-	++	-	++	-	-	-	+	-	++	-	+	-	-	-	-	-	+	-	++	-

ตารางที่ 3.3 สัปดาห์ที่ 5

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	++	-	-	-	-	##	++	-	+	-
0.5	-	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-	++	-	+++	-	+	-	-	-	+	-	++	-	++	-

ตารางที่ 3.4 สัปดาห์ที่ 6

Cytokinin	Auxin																							
	2,4 – D								IAA								NAA							
	0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0		0.0		0.5		1.0		2.0	
	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	Callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก	callus	ราก
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	##	+	-	+++	-	-	-	-	###	++	-	+	-
0.5	-	-	+	-	++	-	++	-	-	-	** ++	-	++	-	++	-	-	-	+	-	+++	-	+++	-

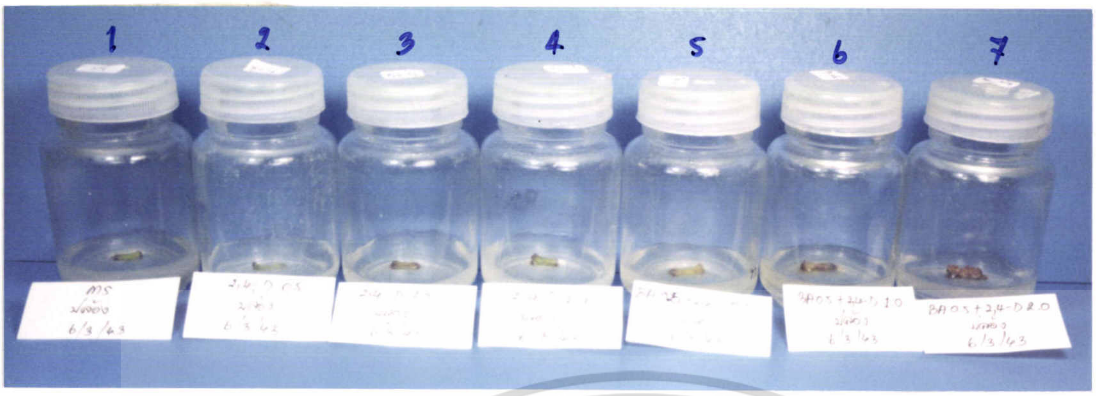
ภาพที่ 1 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ใบแก่**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **2,4 – D** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + 2,4 – D 0.5 mg/l
3. MS + 2,4 – D 1.0 mg/l
4. MS + 2,4 – D 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 2.0 mg/l

ภาพที่ 2 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ใบอ่อน**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **2,4 – D** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + 2,4 – D 0.5 mg/l
3. MS + 2,4 – D 1.0 mg/l
4. MS + 2,4 – D 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 2.0 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



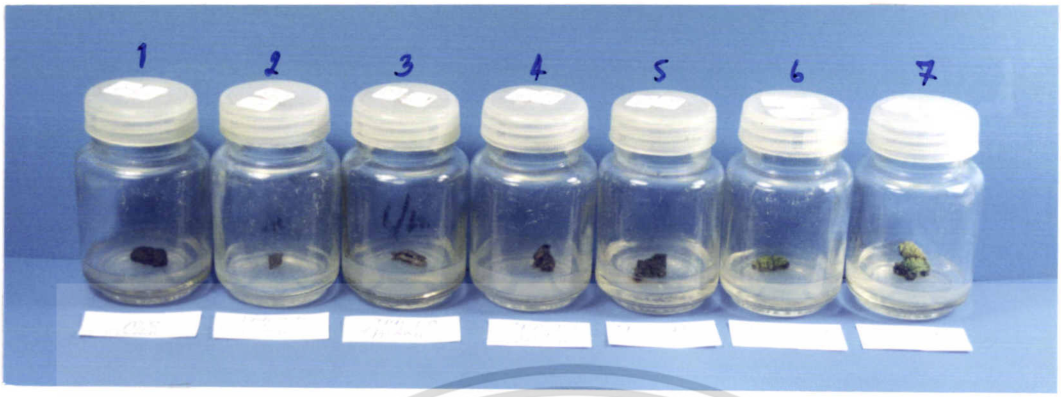
ภาพที่3 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ปล้อง**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **2,4 – D** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + 2,4 – D 0.5 mg/l
3. MS + 2,4 – D 1.0 mg/l
4. MS + 2,4 – D 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + 2,4 – D 2.0 mg/l

ภาพที่ 4 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ใบแก่**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **IAA** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + IAA 0.5 mg/l
3. MS + IAA 1.0 mg/l
4. MS + IAA 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 2.0 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ใบอ่อน**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรMS ที่เติม **IAA** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + IAA 0.5 mg/l
3. MS + IAA 1.0 mg/l
4. MS + IAA 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 2.0 mg/l

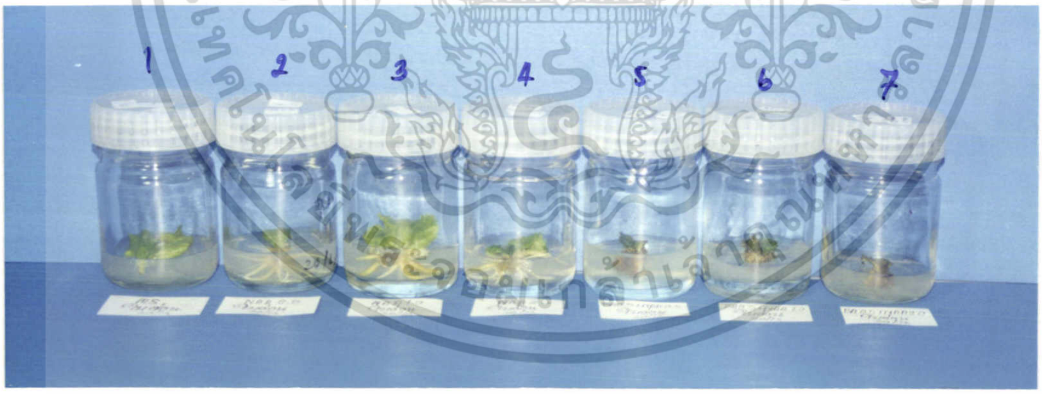
ภาพที่ 6 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ปล้อง**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **IAA** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + IAA 0.5 mg/l
3. MS + IAA 1.0 mg/l
4. MS + IAA 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + IAA 2.0 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 7 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ใบแก่**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **NAA** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + NAA 0.5 mg/l
3. MS + NAA 1.0 mg/l
4. MS + NAA 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 2.0 mg/l



ภาพที่ 8 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ใบอ่อน**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS **ที่**เติม **NAA** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + NAA 0.5 mg/l
3. MS + NAA 1.0 mg/l
4. MS + NAA 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 2.0 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9 แสดงการพัฒนาของแคลลัสและรากที่เกิดจากชิ้นส่วนของ**ปล้อง**ของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **NAA** และ **BA** ต่าง ๆ กัน ดังนี้ (อายุ 1 เดือน)

1. control
2. MS + NAA 0.5 mg/l
3. MS + NAA 1.0 mg/l
4. MS + NAA 2.0 mg/l
5. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l
6. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 1.0 mg/l
7. MS + BA 0.5 mg/l + NAA 2.0 mg/l

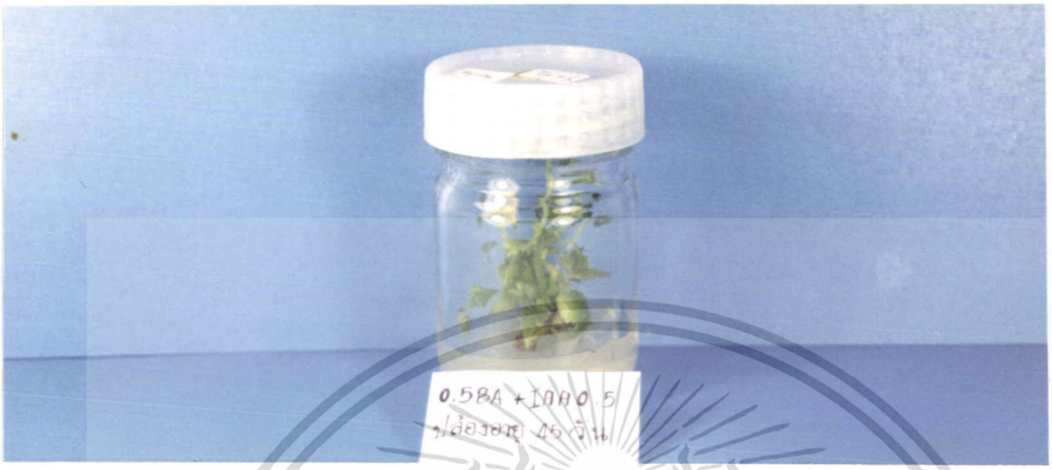
ภาพที่ 10 แสดงการเจริญของแคลลัสหลังจากย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (**NAA** 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l) ต่อไปอีกเป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 11 แสดงการเจริญของแคลลัสหลังจากย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (**NAA** 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l) ต่อไปอีกเป็นเวลา 40 วัน

ภาพที่ 12 แสดงการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนของ**ใบอ่อน**หลังเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม **2,4 – D** 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 13 แสดงการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนของ**ปล้อง**หลังจากเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม **IAA** 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l เป็นเวลา 45 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

อิทธิพลของปฏิกิริยาระหว่างออกซินกับไซโตไคนินมีผลเป็นอย่างมากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสให้เป็นผลสำเร็จ โดยธรรมชาติของแคลลัสจะแตกต่างกันไปตามการรวมกันของฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ความสามารถในการเกิดแคลลัสก็จะแตกต่างกันออกไประหว่างชิ้นส่วนของใบแก่ ใบอ่อน และปล้อง สำหรับชิ้นส่วนที่มีแนวโน้มในการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดี คือ ชิ้นส่วนของใบอ่อน รองลงมา คือ ชิ้นส่วนของใบแก่และปล้องซึ่งให้ผลการเจริญและพัฒนาของแคลลัสไม่แตกต่างกัน

สำหรับสูตรอาหารที่มีแนวโน้มในการเจริญและพัฒนาของแคลลัสให้ได้จำนวนมาก คือ สูตรอาหารที่เติม NAA 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l (ภาพที่ 10 และ 11) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่เติม 2,4 – D 1.0 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l และสูตรอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ตามลำดับ

การพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอดหรือต้นใหม่นั้นจะเกิดได้เฉพาะจากแคลลัสที่มีลักษณะกึ่งร่วนและแน่นทึบ สีค่อนข้างเขียว บนอาหารสูตรที่เติมออกซินร่วมกับไซโตไคนินเท่านั้น โดยจากการทดลองนี้ การเกิดยอดหรือต้นใหม่เกิดได้ดีที่สุด จากชิ้นส่วนของใบอ่อน ในสูตรอาหารที่เติม 2,4 – D 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l (ภาพที่ 12) รองลงมาคือ ชิ้นส่วนของใบแก่บนสูตรอาหาร 2,4 – D 1.0 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l ตามลำดับ สำหรับชิ้นส่วนของปล้องแคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้นใหม่ได้พอควรบนอาหารสูตรที่เติม IAA 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 0.5 mg/l (ภาพที่ 13)

จะเห็นได้ว่าความสามารถในการเกิดแคลลัสและการเกิดรากของชิ้นส่วนพืชจะแตกต่างกันออกไป โดยขึ้นกับปัจจัยภายในและภายนอกของชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบ ความสมดุลระหว่างออกซินกับไซโตไคนิน ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ระดับความเข้มแสงที่เหมาะสม และสารยับยั้งการเจริญเติบโตที่ชิ้นส่วนของพืชเองปล่อยออกมาตามบาดแผลที่เกิดจากการตัดแยกเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กชกร เดชากิจไพศาล.2538.การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสรีระวิทยาและสัณฐานวิทยาบางลักษณะของหม่อน 5 พันธุ์.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ . 103 หน้า .

กรมวิชาการเกษตร . 2539 . หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 . เอกสารวิชาการ : พันธุ์พืชฉลองศิริราชสมบัติครบ 50 ปี พุทธศักราช 2539 .กรุงเทพ ฯ . 127 หน้า

กรมส่งเสริมการเกษตร . 2539 . การปลูกหม่อนเลี้ยงไหม . (พิมพ์ครั้งที่ 6) . ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย . กรุงเทพ ฯ . 47 หน้า .

พรรณนภา ศักดิ์สูง . 2538 . แหล่งพันธุกรรมของหม่อน . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเพ ฯ . 99 หน้า .

พรทิพย์ ธนูทอง . 2528. วิธีการเพาะเลี้ยงเซลส์และเนื้อเยื่อ . มหาวิทยาลัยขอนแก่น.ขอนแก่น. 112 หน้า .

มนตรี เพชรทองคำ .2530. สรีระวิทยาของพืช มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพ ฯ. 557 หน้า

เยาวพา จิระเกียรติกุล. 2539. การชักนำให้หม่อนเกิดการกลายและคัดพันธุ์ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 75 หน้า

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540 . การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า.

วิฑูรย์ บุษกรเรืองรัตน์ และ เสาวนีย์ ศุภนิมิตวาสนา. 2532. การขยายพันธุ์เยอบีรา โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง , กรุงเทพฯ.

สมปอง เตชะโต. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก. (พิมพ์ครั้งที่ 2). สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ . 201 หน้า

โอภาส วรวาท. 2533. ผลของน้ำตาลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและผลของสูตรอาหารต่อการพัฒนาการเกิดต้นในการเพาะใบเลี้ยงของข้าวขาวดอกมะลิ 105 . ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง . กรุงเทพฯ . 38 หน้า

อรดี สหวัชรินทร์. 2522 . ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทางด้านการเกษตร. วารสารพืชสวน 14 (4) : 35 – 45 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อำไพ สินพัฒนานนท์. 2537. การจำแนก การศึกษาโครโมโซมและการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหม่อนบางพันธุ์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . 61 หน้า

Fewcett , C.H. , J.M.A. Inhram and R.L. Wain. 1952. B – oxidation of phenoxyallyl carboxylic acids in plant tissue . Nature. 181 : 1387 – 1389.

Fonnesbench , A. and M. Fonnesbench . 1980 . In vitro propagation of Monsters diliciosa . Hort . sci . 15(6) : 740 – 741 .

Ghugale , D . D . , D . D . Kulkurni , D . D . and R . Narasiman . 1971. Effect of auxin and gibberellic acid on growth and differentiation of Morus alba and Populus nigra tissue in vitro . Indian J . Exp . Biol . , 9 , 381 – 384 .

Hunault , G . , P. , Desmarest , J . , Du – manior . 1989 . Foeniculum vulgare Miller cell culture regeneration and the protection of anethole . In : Bio – Technology in Agriculture and forestry ; Medicinal and aromatic plant , (eds) YPS . Bajaj , Springer Verlage Berline , Heidelberg . pp 185 – 212 .

Kathiravan , K . , A. Shajahan and A . , Gnapathi . 1995 . Evaluation of in vitro response of mulberry genotypes . Sericologia , 35 (2) , 305 – 317 .

Kim , H. R. , R. R. , Patel , and T. A. Thorpe . 1985 Regeneration of mulberry plantets througt tissue culture . Bot . G RAZ ., 146 , 335 – 340 .

Laksmaier , E. M. and F. Skoog . 1965 . 0ganic growth factor requirements of tobacco culture . Physiol . plant . ,18 , 100 – 127 .

Mendoza , A. B . and Y. Futsudhara . 1990 . Vigna radiata (L.) wilczek . Japan . J. Breed . , 40 , 457 – 467 .

Murashige , T . and F .Skoog . 1962 . A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture . Physiologia Pl . 15 : 473 – 497

Oka ,S. , E. C. ,Yeung , T. R. , Thorpe. 1982. Shoot formation in Eucalyptus globutus hypocotyl explant . Newzealand J. Fer Sci . , 12 (3) : 50 – 509 .

Skoog , F . and C. D. Miller . 1957 . Chemical regeneration of growth and organ formation in vitro . Symp . Soc . Exp . Biol . 11: 118 – 131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้