รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการเพิ่มปริมาณยอดและการเกิดคัพภะของก่อลิ้ม

Effect of Growth Regulator on the Multiple Shoots and the Somatic Embryogenesis in *Castanopsis indica* A. DC.

ทัศนีย์ ศิริวรรณ

สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

2547

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ชื่อเรื่อง : **ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการเพิ่มปริมาณยอดและการเกิดคัพภะ** ของก่อลิ้ม

ผู้วิจัย : **นางสาวทัศนีย์ ศิริวรรณ**

สาขา : **เกษตรศาสตร์และชีววิทยา**

ปีที่วิจัย : 2546

บทคัดย่อ

การทดลองเพื่อให้ทราบถึงอิทธิพลของสูตรอาหาร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณยอดและการเพิ่มคัพภะ จากการเพาะเมล็ด และการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนก่อลิ้ม พบว่ามีการเกิดยอดที่สมบูรณ์จำนวนมากที่สุดจากการเพาะเมล็ดและการปักชำตาข้างบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 8.89 μM ส่วนการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) เติม BA ร่วมกับ IAA , 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 0 , 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM พบว่าทำให้เกิดรากและเกิดแคลลัส 3 ชนิด ได้แก่ แคลลัสที่เกาะกันหลวม ๆ (friable callus) แคลลัสที่เกาะกันค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม (soft callus) และแคลลัสชนิดที่เกาะกันแน่นแข็ง (compact callus) โดยการใช้อาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA 10.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสชนิดที่เกาะกันหลวม ๆ และเกาะกันแน่นแข็ง ที่พัฒนาเป็น torpedo embryos มากที่สุด หลังจากการตัดแบ่ง 3 ครั้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Title : Effect of Growth Regulator on the Multiple Shoots and the Somatic Embryogenesis in *Castanopsis indica* A. DC.

Auther : Miss TASSANEE SIRIWAN

Field : Agriculture and Biology

Year : 2003

Abstract

Experiment were performed *to* determine the influence of proliferation medium on the maintenance of multiple shoots and somatic embryogenesis *in* *Castanopsis indica* A. DC. seedling and zygotic embryo explants. Multiple shoots were induced on Murashige & Skoog (MS) basal medium supplemented 6 – benzyladenine (BA). *8.89* µM benzyladenine was much more effective for induction of multiple shoots. Rooting , friable callus, soft callus and compact callus were derived from immature zygotic embryos on (½ NO_3) MS medium supplemented with 0 , 0.1, 1.0 and 10.0 µM BA and IAA , 2,4 – D or NAA . After 3 times of subculturing , most torpedo somatic embryos were produced from friable and compact callus on (½ NO,) MS medium supplemented with 10.0 µMBA and 10.0 µM NAA .

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้รับความกรุณาด้านให้คำปรึกษาแนะนำจาก ดร. พิศิษฐ์ วรอุไร ทำให้เห็นถึงความสำคัญในการทำวิจัยเรื่องนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

งานวิจัยนี้ได้รับความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ในการเก็บตัวอย่างพันธุ์ก่อลิ้ม จากเจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง และการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนการเตรียมห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จึงขอขอบคุณอย่างสูงต่อความกรุณาของทุกท่าน

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ที่เป็นกำลังใจในการทำวิจัย และให้ความช่วยเหลือในการจัดพิมพ์ผลการวิจัย จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ทัศนีย์ ศิริวรรณ

มิถุนายน 2547

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(5)
สารบัญภาพ	(6)
บทที่ 1 บทนำ	1- 2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3- 8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	9-12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13-38
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ	39-43
บรรณานุกรม	44-48
ประวัติผู้วิจัย	49

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ	14
2	การเปลี่ยนแปลงของตาข้าง โดยการปักชำยอดอ่อนจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ	16
3	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn , BA , IAA , 2 , 4 – D หรือ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ	19
4	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn ร่วมกับ IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ	20
5	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ	21
6	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn ร่วมกับ 2 , 4 – D ความเข้มข้นต่าง ๆ	22 – 23
7	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ	24
8	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ	25
9	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ 2 , 4 – D ความเข้มข้นต่าง ๆ	26
10	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสจากการตัดแบ่งครั้งที่ 2 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม 2 , 4 – D , Kn และ BA ร่วมกับ IAA , 2 , 4 – D และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ	34 – 35
	การเกิดคัพภะจากการตัดแบ่งแคลลัสครั้งที่ 3 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ IAA , 2 , 4 – D และ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	36

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3)ที่เติม Kn ที่ระดับความเข้มข้น 0 , 0.1 ,1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2,4 – D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์	27
2	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3)ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 , 10.0 μM ร่วมกับ IAA หรือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์	28
3	การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3)ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2,4 – D ที่ระดับความเข้มข้น 0 .1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์	29
4	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส ที่ตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ IAAที่ระดับ ความเข้มข้น 10.0 μM และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ,10.0 μM ร่วมกับ NAA 0.1 , 1.0 , 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์	30
5	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส ที่ตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2 ,4 – D ที่ระดับ ความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์	31
6	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส ที่ตัดแบ่งครั้งที่ 2 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม 2 , 4 – D และ เติม Kn และ BA ร่วมกับ IAA 2,4 – D และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	37
7	การเกิดคัพภะจากการพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ IAA , 2 ,4 – D และ NAA ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	38

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พันธุ์ไม้ในวงศ์ก่อ (Fagaceae) เป็นพันธุ์ไม้ที่มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ พบกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่นเกือบทุกระดับความสูง พันธุ์ไม้วงศ์นี้สามารถนำส่วนต่าง ๆไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ เนื้อไม้ที่มีความแข็งและมีความทนทานสูงใช้ในงานก่อสร้าง ทำเครื่องเรือน ต่อเรือ ทำถังเก็บสุรา กิ่งก้านนำไปทำฟืนและถ่าน ตลอดจนนำไปใช้เพาะเห็ดหอม เปลือกลำต้นมีสารฝาดสูงจึงมีการสกัดไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง และลำต้นก่อบางชนิดมีเปลือกหนาใช้ทำก๊อก (cork) ส่วนปม (gall) มีสารที่สามารถสกัดใช้ทำยาสมุนไพรและทำสีย้อมผ้า (เต็ม , 2536) ผลก่อหลายชนิดรับประทานได้ เช่น เกาลัด *(Castanea sativa* Mill) และก่อในสกุล *Castanopsis* ที่พบในประเทศไทยหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าไม้ก่อเป็นพืชที่มีความสามารถในการดูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และคายก๊าซออกซิเจนได้มากเป็นพิเศษ จึงช่วยให้อากาศบริสุทธิ์ (องค์การสวนพฤกษศาสตร์ , 2546) จึงนับว่าไม้ก่อเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งในทางตรงต่อมนุษย์และช่วยในการรักษาสภาพแวดล้อมและสมดุลของระบบนิเวศ

ก่อลิ้ม *(Castanopsis indica* A.DC.) เป็นไม้ก่อที่พบกระจายพันธุ์อยู่ในป่าดิบเขา และป่าผสมผลัดใบ ในระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 500 – 800 เมตร (คำเหล็ก , 2541) แต่เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม้ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้น้อย มีการตัดต้นจากป่านำไปใช้ประโยชน์โดยไม่มีการปลูกทดแทน เมล็ดเป็นอาหารคนและสัตว์ ผลมีเปลือกหุ้มหนาและแข็ง การงอกต้องอาศัยความชื้นสูง รวมทั้งการศึกษาด้านพฤกษศาสตร์ยังมีน้อย ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณต้นในธรรมชาติได้มาก จำนวนต้นในป่าจึงน้อยลงทุกที

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทในการขยายพันธุ์พืชหลายชนิด ผู้วิจัยจึงได้ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์ก่อลิ้ม เพื่อให้ได้ต้นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว และช่วยเก็บรักษาพันธุ์ก่อต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษา การใช้อาหารสูตร MS (ดัดแปลง) และปรับระดับความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต ในการเพิ่มปริมาณยอดและการเกิดคัพภะก่อลิ้ม ดังนี้

1. ระดับความเข้มข้นของ BA ในอาหารสูตร MS ต่อการเพิ่มปริมาณยอด

2. ระดับความเข้มข้นของ Kn , BA , IAA , 2,4-D และ NAA ในอาหารสูตร MS ที่ ลดปริมาณ NH_4NO_3 ลงครึ่งหนึ่ง ต่อการเกิดคัพภะ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ศึกษาเฉพาะก่อลิ้ม (*Castanopsis indica* A.DC.) ที่พบในจังหวัดพิษณุโลก เนื่องจากเป็นก่อที่มีการกระจายพันธุ์ในพื้นที่สูงปานกลาง จึงพบค่อนข้างมากในเขตอำเภอวังทอง นครไทย และชาติตระการ

1.4 นิยามศัพท์ที่เกี่ยวข้อง

Somatic embryogenesis หมายถึง กระบวนการพัฒนาของคัพภะ ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส

Somatic embryo หมายถึง คัพภะที่เกิดจากเซลล์ร่างโดยไม่เกี่ยวกับเซลล์เพศ

Embryonic callus หมายถึง กลุ่มเซลล์ที่พร้อมเปลี่ยนแปลงเป็นคัพภะ

Embryonic cell หมายถึง เซลล์ที่พร้อมเปลี่ยนแปลงเป็นคัพภะ

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบวิธีการและสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ก่อลิ้ม เพื่อเพิ่มปริมาณในระยะเวลาอันสั้น

2. สามารถใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการขยายพันธุ์ก่อให้มีคุณภาพ และมีลักษณะดีเหมาะสมต่อการปลูกเพื่อให้ผลผลิตทดแทนการนำเข้าผลจำพวกนัท (nut) จากต่างประเทศ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของก่อ

ก่อเป็นพันธุ์ไม้ที่จัดอยู่ในวงศ์ Fagaceae ของอันดับ Fagales แบ่งออกเป็น 8 สกุล จำนวนประมาณ 1,093 ชนิด (วิชาญ ,2536 ; คำเหล็ก , 2541) ดังนี้

1. สกุล *Castanopsis* (Chinkapin) มีประมาณ 150 ชนิด ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตลอดไปถึงหมู่เกาะโซโลมอน

2. สกุล *Lithocarpus* (Tan oak , Tanbark oak) มีประมาณ 300 ชนิด ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออก

3. สกุล *Quercus* (Oak) มีประมาณ 600 ชนิด ส่วนใหญ่กระจายอยู่ตามซีกโลกเหนือทั้งในเอเชียตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียใต้ และยังพบในทวีปยุโรป ทวีปอเมริกาเหนือและใต้

4. สกุล *Trigolobalanus* มีประมาณ 5 ชนิด อยู่ในประเทศโคลัมเบีย 3 ชนิด ประเทศไทย 1 ชนิด และบนเกาะบอร์เนียว 1 ชนิด

5. สกุล *Fagus* (Northera beech) มีประมาณ 90 ชนิด กระจายอยู่ในเขตอบอุ่นบนซีกโลกเหนือ และประเทศในภูมิภาคเอเชียไมเนอร์

6. สกุล *Nothofagus* (Southern beech) มีประมาณ 14 ชนิด กระจายอยู่ในประเทศอินโดนีเซีย ตลอดลงไปทางใต้ในเขตอบอุ่นของทวีปออสเตรเลียและเขตอบอุ่นของทวีปอเมริกาใต้

7. สกุล *Chrysolepsis* (Golden Chinkapin) มีประมาณ 2 ชนิด ขึ้นอยู่ในภาคตะวันตกของสหรัฐอเมริกาและสหราชอาณาจักร

8. สกุล *Castanea* (Sweet chestnut) มีอยู่ประมาณ 12 ชนิด อยู่ในเขตอบอุ่นทางซีกโลกเหนือ เช่น ประเทศในทวีปยุโรป จีน เกาหลีและญี่ปุ่น

ก่ออีมีชื่อเรียกต่าง ๆกัน ได้แก่ ก่อตี (เพชรบูรณ์) ก่อลิ้ม ก่อหยุม (ภาคเหนือ) ก่อหลวง (น่าน) มะก่อหมู (เชียงใหม่) (เต็ม , 2544) จัดอยู่ในสกุล *Castanopsis* มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Catanopsis indica* A.DC. มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ดังนี้ (คำเหล็ก , 2541)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ลำต้น : เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ไม่ผลัดใบ เมื่อโตเต็มที่มีความสูง 20 – 35 เมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 – 100 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านค่อนข้างต่ำ เปลือกนอกเป็นสีเทาดำ แตกเป็นร่องยาวตื้น

ใบ : เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ ใบรูปหอกกลับ (oblanceolate) ฐานใบเบี้ยวแหลม (oblique–acuminate) ปลายใบแหลม (acuminate) ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อยชี้ไปทางปลายใบ ท้องใบสีเขียวเป็นเงามัน หลังใบขาวออกเขียวมีขนปกคลุมห่าง ๆ ขนาดใบยาว 10 – 25 เซนติเมตร กว้าง 5 – 7 เซนติเมตร มีเส้นใบ 14 – 20 คู่ เรียงขนานกัน ก้านใบยาว 0.6 – 1.2 เซนติเมตร ใบอ่อนมีสีแดงชมพู มีขนปกคลุมมากมาย

ดอก : มีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่ในต้นเดียวกัน ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียมีขนสีน้ำตาลแดงปกคลุม มีกลีบรวม (periath) 6 แฉก ปลายกลีบแยกอิสระ มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียซึ่งเป็นหมันปะปนอยู่ด้วย ออกดอกเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม

HR : เป็นช่อยาว 15 – 30 เซนติเมตร รูปทรงกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 – 1.3 เซนติเมตร สูง 1.5 – 1.8 เซนติเมตร เปลือกผลมีสีน้ำตาลเหลือง มีขนนุ่มสีน้ำตาลปกคลุม ด้านในของเปลือกผลมีขนเล็กน้อย เมล็ดมีเนื้อหนารับประทานได้

คิวปูล : มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 – 2 เซนติเมตร ผนังด้านนอกมีหนามแตกแขนงรูปดาว (stellate) ปลายแหลมยาว 0.5 – 1 เซนติเมตร เรียงกันเป็นแถว แถวละ 5 – 6 ชั้น ระหว่างแถวห่างกัน 0.3 – 0.5 เซนติเมตร ผนังด้านในมีขนนุ่มสีขาวอมเหลืองหุ้มผลจนมิด เมื่อผลแก่ผนังคิวปูลแตกออก 4 พู จนทำให้ผลหลุดออกจากกาบ

แหล่งที่พบ : พบในป่าดิบเขาและป่าผสมผลัดใบ ระดับสูงจากระดับน้ำทะเล *500* – 800 เมตร

เขตการกระจายพันธุ์ : ไทย พม่า กัมพูชา เวียดนาม ลาว จีน (มณฑลยูนาน)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

ปัจจุบันมีการนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ประโยชน์ในด้านการขยายพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง ทั้งที่ผ่านการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้เกิดคัพภะ (somatic embryo) โดยผ่านการเกิดแคลลัส และเกิดคัพภะจากชิ้นส่วนของพืชโดยตรง และมีการนำวิธีการนี้ใช้กับพืชที่อยู่ในวงศ์ Fagaceae แต่การศึกษาในสกุล *Castanopsis* มีอยู่จำกัด จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลของผู้ที่ศึกษาพืชในวงศ์เดียวกัน และพืชวงศ์อื่นด้วย

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Bennett และคณะ (1986) รายงานว่าการเลี้ยงตาข้างของ *Quercus shumardii* Buckl. บนอาหารเหลวสูตร WPM ที่เติม BA 8.9 μM สามารถทำให้เกิดการแตกยอดจากตาข้างได้มากที่สุด

Mullins (1987) การเพาะเลี้ยงส่วนตาข้างจากต้นกล้าอายุ 2 ปี และต้นที่มีอายุมากของ *Castanea sativa* Mill. บนอาหารสูตร ½MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS(½NO,) ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดตาข้างได้ภายใน 1 เดือน และอัตราการเกิดยอด 2 – 3 เท่าภายใน 3 สัปดาห์

Pevalek – Kozlina (1991) การทดลองเพาะเลี้ยงตาข้างของ common oat (*Quercus robur* L.) ที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยตัดเป็นท่อน ๆ มี 1 – 2 ตาข้าง เลี้ยงบนอาหาร GD ที่เติม BA 0.9 μM ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดอย่างรวดเร็ว

Piagnami (1988) พบว่าการลดปริมาณ N และ NH_4^+ อาหารสูตร MS (ดัดแปลง) มีผลทำให้การเพิ่มปริมาณยอดของ chestnut จากการเลี้ยงส่วนยอดและตาข้างของต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงจากเอมบริโอ

Purohit และคณะ (2003) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน cotyledonary nodes ของ *Quercus floribunda* Lindl. บนอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติม BA และ GA_3 ที่ 0 , 2.22 4.44 และ22.19 μM พบว่าการใช้อาหารสูตร WPM ที่เติม BA 22.19 μM ทำให้เกิดยอดมากที่สุด 11 ยอด

San – Jose และคณะ (1988) เลี้ยงปลายยอดและตาข้างของ *Quercus robur* L. บนอาหารสูตร Gresshoff and Doy ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใน 4 สัปดาห์ สามารถทำให้ยอดยาวเฉลี่ย 8 มิลลิเมตร

Vieitez และคณะ (1993) เพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดของ *Quercus robur* L. บนอาหารสูตร WPM ที่เติม มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางยอดในแนวนอนบนอาหารเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และย้ายลงอาหารใหม่ที่เติม IAA , IBA หรือ NAA เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่าการใช้ NAA ได้ผลดีที่สุด

Wang (2003) ชักนำให้เกิดตาข้างจากการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอด American chestnut บนอาหาร WPM ที่เติม kinetin , CPPU , TDZ และ Zeatin โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ หลาย ๆ ครั้ง พบว่าอาหารที่เติม CPPU หรือ TDZ ทำให้เกิดตาข้างได้ดีกว่า

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ธวัชชัย (2532) เพาะเลี้ยงตาข้างขนุนบนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA 0 – 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเนื้อเยื่อส่วนตาข้างเกิดยอดจำนวนมากที่สุดเมื่อเติม BA 14 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดขนุนยาวที่สุดเมื่อไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

พินิจ (2003) เพาะเลี้ยงตาข้างมะม่วงหิมพานต์ จากต้นที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0 , 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดจำนวนมากที่สุด 3.8 ยอด

Qi – guang และคณะ (1986) เลี้ยงปลายยอดพลับจีน จากต้นกล้าอายุ 1 เดือน บนอาหารสูตร WPM (ดัดแปลง) พบว่า BA 0.44 μM ส่งเสริมการเกิดยอด แต่เมื่อ BA ความเข้มข้น 4.44 และ 44.4 μM จะยับยั้งการเกิดยอดและส่งเสริมการเกิดแคลลัส

Sugiura และคณะ (1986) เลี้ยงส่วนตาข้างของพลับญี่ปุ่นพันธุ์ Hiratanenashi จากต้นที่โตเต็มที่แล้วบนอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสบผลสำเร็จ

Hiregoudar และคณะ (2003) เพาะเลี้ยง ตาข้าง *Feronia limonia* (L.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP kinetin และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 , 1.0 , 2.0 , 5.0 และ 10.0 μM เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่าการใช้ BA 5 μM ทำให้เกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนที่เลี้ยง และเกิดยอดจำนวนมากที่สุด 7.33 ยอดต่อชิ้นส่วน

2.3 การชักนำให้เกิดคัพภะ

Camper (1995) เพาะเลี้ยง immature embryos ของ white oak (*Quercus alba*) บนอาหารสูตร MS , WPM และ GD ที่เติม NAA หรือ 2 , 4 – D ที่ 1.0 และ 3.0 ร่วมกับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทำให้เกิดยอดในอาหาร WPM บางตัวอย่าง embryos สามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ในอาหารทั้ง 3 สูตร ที่เติม NAA หรือ 2 , 4 – D ร่วมกับ BA และเกิด somatic embryos ดีที่สุดในอาหารสูตร GD ที่เติม 2 , 4 – D ร่วมกับ BA

Xing และคณะ (1996) เพาะเลี้ยง ovule ของ American chestnut (*Castanea dentata* (Marsh.) Bokh.) บนอาหารสูตร WPM ที่เติม 2, 4 – D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับBA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิด somatic embryogenic callus หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เมื่อย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม B_5 ร่วมกับ BA 0.5 μM ภายใต้สภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 เดือน ทำให้เกิด somatic embryos ในระยะ heart shaped mature embryos และชักนำให้เกิดการงอกของ somatic embryos ได้ ในอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Fernandez – Galiano และคณะ (1997) เพาะเลี้ยง zygotic embryos ของ *Quercus fagania* Lamk. สามารถชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ในระยะ early stagesจำนวนมาก จากการตัดแบ่ง 3 ครั้ง ๆ ละ 1 เดือน บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 μM ร่วมกับ NAA 0.5 μM

Xing และคณะ (1997) รายงานว่าการเพาะเลี้ยง ovules ของ American chestnut (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.) บนอาหารสูตร Gamborg's (B_5) ที่เติม 2,4 – D 18.18 μM ร่วมกับ BA 1.11μM ทำให้เกิดการพัฒนาเป็น proembryogenic ที่เป็นกลุ่มก้อน (PEMs) นำมาเลี้ยงบนอาหาร Gamborg's (B_5) ที่เติม BA 0.5 μM ร่วมกับ NAA 0.5 μM ทำให้เกิด 86 – 586 เอมบริโอ ในระยะ cotyledonary *stage* ต่อ PEMs 1 กรัม สามารถเจริญเป็นต้นได้ 3.3 เปอร์เซ็นต์ และเจริญเป็นยอด 6.3 เปอร์เซ็นต์

Mauri และคณะ (2001) รายงานว่าการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ของ *Quercus ilex* L. ที่ยังอ่อน บนอาการสูตร MS ที่ใช้ธาตุอาหารหลักจาก Gamborg's (1966) เลี้ยงในสภาพมืด เป็นเวลา 30 วัน ย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่เติม BA 0.5 μM ร่วมกับ NAA 0.5 μM เลี้ยงใน สภาพที่มีแสง 30 วัน พบว่าเกิด somatic embryogenesis และเกิด somatic embryos จาก embryogenic callus ที่มีลักษณะเกาะกันอยู่หลวม ๆ สีเหลืองอ่อน และชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

Andrade และ Merkle (2003) เพาะเลี้ยง proembryogenic masses จากการเพาะเลี้ยง immature ovules ของ American chestnut บนอาหารสูตร WPM ที่เติม 2,4 – D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายเลี้ยงในอาหาร WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นคัพภะในระยะ cotyledonary stage

Corredoira และคณะ (2003) ได้ทดลองเลี้ยงส่วนใบของ *Castanea sativa* Mill. บนอาหารสูตร MS ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ และมอลโตส 3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การใช้มอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิด Somatic embryos สูงสุด และเมื่อเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 เดือน ในสภาพเย็น 4 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการสร้างยอดและรากได้ 39 เปอร์เซ็นต์

Hernandez และคณะ (2003) ตัดแบ่งใบ *Quercus suber* L. เป็นส่วน ๆ เลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BAP สามารถชักนำให้เกิด embryogenesis ได้

Palva และคณะ (2003) เพาะเลี้ยง immature zygotic embryos ของเมล็ดคำแสด (Annatto : *Bixa orellana*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม activated charcoal , 2,4 – D และ/หรือ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

kinetin พบว่าเกิด embryogenesis และ embryos สูงสุด บนอาหารที่เติม activated charcoal 14 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4 – D 2.26 µM และ kinetin 4.52 µM

สมปอง เตชะโต และคณะ (2544) ขยายพันธุ์มังคุด (*Garcinia magastana* Linn.) โดยใช้ friable callus ขนาด 5×5 มิลลิเมตร จากการเลี้ยงใบอ่อนบนอาหาร MS (1962) ที่เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel 0.17 เปอร์เซ็นต์ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4 – D 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า 2,4 – D 1 มิลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักสดสูงสุด 420 มิลลิกรัม ขนาด 6.7 ตารางมิลลิเมตร และอัตราการเกิดแคลลัส 68.06 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสเกาะกันอยู่หลวม ๆ สีขาวขุ่นอมเหลืองจนถึงสีน้ำตาล เมื่อความเข้มข้นของ 2,4 – D เพิ่มขึ้น 2.5 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักสดของแคลลัสลดลงตามลำดับ และแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อตัดแบ่งแคลลัสบนอาหาร MS ที่เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเกิด nodular callus สูงสุด 22.22 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1.42 nodules ต่อก้อนแคลลัส

Woong – Young , *Sob* และคณะ (1998) นำแคลลัสที่เกาะกันสีเหลืองอ่อนของ cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ที่ได้จากการนำส่วนใต้ใบเลี้ยง เลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม kinetin 0.93 µM ร่วมกับ 2,4 – D 1.81 µM ตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนินและออกซิน หรือ ไซโตไคนินร่วมกับออกซิน พบว่าอาหารที่เติม BA ร่วมกับ NAA เลี้ยงในสภาพที่มีแสง ทำให้เกิดแคลลัสซึ่งสามารถชักนำให้เกิด nodular structures และเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารที่เติมไซโตไคนิน สามารถชักนำให้เกิดรากได้

Kumari Jayasree , P. และคณะ (2004) ทดลองเพาะเลี้ยง immature anthers ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.X) บนอาหาร MS (½ NO_3) ที่เติม 2,4 – D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable callus less friable callus และ compact callus และเมื่อย้ายแคลลัสชนิด less friable callus เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(½ NO_3) ที่เติม Kn 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิด somatic embryos มากที่สุด

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เมล็ดก่อลิ้มอายุ ประมาณ 90 – 100 วัน
2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige & Skoog (ดัดแปลง)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 2, 4 – D (2, 4 – dichlorophenoxy acetic acid) , NAA (napthalene acetic acid) , IAA (indole – 3 – acetic acid) , IBA (indole – 3 – butyric acid) , BA (6 – benzyladenine) , kinetin

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว ได้แก่ Tween – 20 , Sodium hypochlorite

2.4 Ethyl alcohol 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3. เครื่องมือ

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เตาแก๊ส ขวดบรรจุอาหารพร้อมฝา เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง เตาไมโครเวฟ กระบอกตวง บีกเกอร์ และปิเปต

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการผ่าตัดเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอร์

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1 อุปกรณ์ภายในห้อง ประกอบด้วย ชั้นวางขวดที่ติดตั้งหลอดไฟให้แสงสว่างชนิดแสงสีขาว (cool white) เครื่องปรับอากาศ

4.2 ปรับสภาพแวดล้อมภายในห้องให้มีอุณหภูมิ ประมาณ 26 – 28 องศาเซลเซียส ช่วงมีแสงสว่าง 16 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงตามการทดลอง

3.2 วิธีการ

แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง มีวิธีการดำเนินการ การวางแผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล ดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

การทดลองที่ 1.1 การเพาะเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จำนวนมาก โดยใช้เมล็ดก่อลิ้มที่เจริญเติบโตเต็มที่ แต่คิวปูล(cupule) ยังไม่แตก เตรียมฟอกฆ่าเชื้อและดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

(1) ล้างผลที่มีคิวปูลห่อหุ้ม ด้วยน้ำไหล

(2) จุ่มผลฆ่าเชื้อด้วยเอธกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์

(3) แช่ผลในสารละลายทีโพล (teepol) 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที

(4) แช่และเขย่าผลในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 20 เปอร์เซ็นต์ เติม tween – 20 1 – 2 หยด ทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แกะคิวปูล (cupule) ออก แล้วนำส่วนผลก่อแช่เขย่าในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ เติม tween – 20 1 – 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

(5) แกะเปลือก (ovary wall) ที่หุ้มเมล็ดออก นำส่วนเมล็ดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ ½MS ที่ไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต และใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.09 , 0.45 , 0.89 , 4.45 , 8.89 และ 44.45 μM

(6) การวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยในแต่ละสิ่งทดลองทำ 10 ซ้ำ

(7) นำหลอดทดลองไว้ในสภาพมืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำออกไว้ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 1.2 การเพาะเลี้ยงตาข้าง เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยการตัดแบ่งยอดที่สมบูรณ์ จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองที่ 1.1 ตัดแบ่งให้มีความยาว 3 ข้อ ปักชำในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 , 0.89 , 4.45 , 8.89 , 44.45 และ 88.89 μM โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละสิ่งทดลอง ทำ 6 ซ้ำ นำขวดทดลองไว้ในสภาพที่มีแสง 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดคัพภะ

การทดลองที่ 2.1 การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน (immature embryo) ของก่อลิ้ม เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ตามขั้นตอนต่อไปนี้

(1) ฟอกฆ่าเชื้อผลก่อที่มีเปลือกหุ้ม (cupule) ที่ยังไม่แตกออก ทำเช่นเดียวกับการทดลอง ที่ 1.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

(2) แกะเปลือกหุ้ม (ทั้ง cupule และ ovary wall) แยกคัพภะนำเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปรับลด NO_3 ลงครึ่งหนึ่ง และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Kn และ BA ร่วมกับ IAA , 2,4-D และ NAA ที่ระดับ 0 , 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM

(3) วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละสิ่งการทดลองทำ 3 ซ้ำ

(4) นำหลอดทดลองไว้ในสภาพที่มืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

(5) ตัดแบ่งและย้ายแคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ในสภาพที่มืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 2.2 การชักนำให้เกิด embryonic callus และคัพภะ ทำการทดลองดังนี้

(1) คัดเลือกแคลลัสจากการทดลองที่ 2.1 ที่มีขนาด 11 – 20 และ > 20 mm.^{2} ตัดแบ่งเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

(2) วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละสิ่งทดลอง ทำ10 ซ้ำ

(3) นำขวดทดลองไว้ในสภาพมืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

(4) คัดเลือกแคลลัสในลักษณะเป็น embryogenic callus ตัดแบ่งเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ในสภาพที่มืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

3.3 การบันทึกข้อมูล

การทดลองที่ 1.1 บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเมล็ด หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ ๆ โดยเก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงดังนี้

เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ

เปอร์เซ็นต์ความงอก

จำนวนยอดเฉลี่ยต่อเมล็ด

การทดลองที่ 1.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล การบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงดังนี้

จำนวนยอดต่อยอดที่ปักชำ

การทดลองที่ 2.1 บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ad

เปอร์เซ็นต์การเกิดราก

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ชนิดและลักษณะของแคลลัส แบ่งเป็น 3 ชนิด

ชนิดที่ I = friable callus เป็นแคลลัสที่เกาะกันอยู่หลวม ๆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ชนิดที่ 2 = soft callus เป็นแคลลัสที่เกาะกันค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ ผิวเป็นมัน มีลักษณะคล้ายเมือกเคลือบก้อนแคลลัส

ชนิดที่ 3 = compact callus เป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่นอาจแห้งแข็ง

คะแนนการเกิดแคลลัส โดยดูจากขนาด

+	=	< 5	$mm.^2$
++	=	5 – 10	$mm.^2$
+++	=	11 – 20	$mm.^2$
++++	=	> 20	$mm.^2$

การทดลองที่ 2.2 บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาล

ลักษณะของแคลลัส และการเกิด embryogenic callus

คะแนนการเกิดคัพภะ โดยดูจากจำนวนคัพภะที่เกิด ดังนี้

+	=	เกิดคัพภะเล็กน้อย 1 – 3 อัน กระจาย
++	=	เกิดคัพภะเป็นบางส่วนของก้อนแคลลัส
+++	=	เกิดคัพภะกระจายเกือบเต็มก้อนแคลลัส
++++	=	เกิดคัพภะเป็นกระจุกเต็มก้อนแคลลัส

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of varience) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.5 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ทำการวิจัย ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2545 ถึง พฤษภาคม 2547

3.6 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

การทดลองที่ 1.1 การเพาะเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

จากการทดลองเพาะเมล็ดก่อลิ้ม ในอาหารสูตร MS และ ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม BA ที่ความเข้มข้น 0.09 , 0.45 , 0.89 , 4.45 , 8.89 และ 44.45 μM โดยผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พบเมล็ดที่มีการติดเชื้อเพียง 12.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MS ที่เติม BA 4.45 μM และอาหาร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จากการเพาะเลี้ยงในสภาพมืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบการเปลี่ยนแปลงดังนี้ (ตารางที่ 1)

เปอร์เซ็นต์ความงอก เมล็ดเริ่มงอกเมื่อเพาะได้ 1 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS และ ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทุกสูตรอาหารมีรากงอกในสัปดาห์ที่ 2 ส่วนอาหารสูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA 44.45 μM เริ่มเกิดยอดก่อนและเกิดยอดครบทุกสูตรอาหารในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อาหาร สูตร MS มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าอาหารสูตร ½ MS โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ 87.5 และ 83.9 ตามลำดับ

จำนวนยอดที่สมบูรณ์ จากการใช้อาหารสูตร MS และ ½ MS พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่การใช้อาหารสูตร MS จะทำให้มีจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อเมล็ดสูงกว่าการใช้อาหาร ½ MS โดยมีค่าเฉลี่ย 1.8 และ 1.4 ยอดต่อเมล็ดตามลำดับ

การเติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS และ ½ MS ทำให้จำนวนยอดที่สมบูรณ์ต่อเมล็ดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารที่เติม BA 8.89 μM ทำให้มีจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อเมล็ดสูงสุดที่ 3.3 ยอด รองลงมาคืออาหารที่เติม BA 44.45 μM ทำให้มีจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อเมล็ด 1.8 ยอด และในอาหารที่เติม 0.09 μM ทำให้มีจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อเมล็ดต่ำสุด 1.0 ยอด และพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 8.89 μM มีจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อเมล็ดสูงสุด 4.3 ยอด (ตารางที่ 2)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ

BA	ความงอก(%)		จำนวนยอดที่สมบูรณ์		
(μM)	MS	½ MS	MS	½ MS	ค่าเฉลี่ย
0	100 a	87.5 a	1.3 bc	1.4 bc	1.3 b
0.09	75 a	75 a	1.3 bc	0.8 c	1.0 b
0.45	100 a	62.5 a	1.5 bc	1.0 c	1.3 b
0.89	62.5 a	87.5 a	1.0 c	1.4 bc	1.2 b
4.45	87.5 a	87.5 a	1.4 bc	1.3 bc	1.3 b
8.89	100 a	100 a	4.3 a	2.3 ab	3.3 b
ค่าเฉลี่ย	87.5 ns	83.9'	1.8 ns	1.4 ns	
cv (%)	15.1		29.9		

ตัวเลขในแนวตั้งแต่ละคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

การทดลองที่ 1.2 การเลี้ยงตาข้างเพื่อชักให้เกิดยอดจำนวนมาก

จากการปักชำส่วนของยอดอ่อนจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยตัดแบ่งให้มีข้อ 3 ข้อ บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมสาร BA ที่ความเข้มข้น 0.89 , 4.45 , 8.89 , 44.45 และ 88.89 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบการเปลี่ยนแปลงดังนี้ (ตารางที่ 2)

จำนวนยอด จากการใช้อาหารสูตรที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลทำให้จำนวนยอดที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารสูตรที่เติม BA 8.89 μM มีจำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 1.27 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคืออาหารสูตรที่เติม BA 0.89 μM มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.0 ต่อชิ้นส่วน ส่วนอาหารสูตรที่เติม BA 44.45 และ 88.89 μM ไม่มียอดที่ยืดให้เห็นชัดเจน แต่มีลักษณะเป็นกระจุกตายอด

ความยาวยอด จาก การใช้อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติม BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำให้ความยาวยอดที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเติม BA 0.89 μM ทำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดที่ 1.04 เซนติเมตร ส่วนอาหารที่เติม BA 44.45 และ 88.89 μM ไม่เกิดการยืดของยอด

ลักษณะชิ้นส่วน ชิ้นส่วนของยอดที่ตัดแบ่งมี 3 ข้อ ปักชำในอาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบการแตกยอดจากตาบนสุดในอาหารที่เติม BA 0.89 , 4.45 และ 8.89 μM และตาที่ 2 เริ่มมีปุ่มเขียว ๆ โดยเฉพาะในอาหาร MS ที่เติม BA 8.89 μM ทำให้เกิดยอด 1 – 3 ยอดต่อชิ้นส่วน การเติม BA ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจาก 4.45 , 8.89 , 44.45 และ 88.89 μM ทำให้ส่วนโคนต้นที่ปักชำเกิดแคลลัส และปริมาณแคลลัสมากขึ้นตามความเข้มข้นของ BA พบว่าการเติม BA 88.89 μM ทำให้ยอดที่ปักชำและตายอดที่เกิดขึ้นเป็นสีน้ำตาล

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของตาข้าง โดยการปักชำยอดจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ

BA (μM)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)	ลักษณะชิ้นส่วน
0	0.71 c	0.71 c	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
0.89	1.00 ab	1.04 a	แตกยอดที่ข้อบนมีความยาวที่สุด 2 เซนติเมตร มี 7 ใบ จำนวนใบเฉลี่ย 4.25 ใบ
4.45	0.93 bc	0.85 ab	เกิดแคลลัสบริเวณโคน ยอดที่เกิดใหม่อ้วนสั้น
8.89	1.27 a	0.84 ab	เกิดแคลลัสบริเวณโคน ยอดที่เกิดใหม่อ้วนสั้น
44.45	0.71 c	0.71 b	เกิดแคลลัสบริเวณโคนค่อนข้างมาก มีจุดตายอดเป็นกระจุก
88.89	0.71 c	0.71 b	เกิดแคลลัสบริเวณโคนค่อนข้างมาก มีจุดตายอดเป็นกระจุก และชิ้นส่วนพืชเป็นสีน้ำตาล
ค่าเฉลี่ย	0.88	0.81	
Cv(%)	30.3	21.4	

ตัวเลขในแนวตั้งแต่ละคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

แปลงข้อมูลโดยใช้สูตร $X_t = \sqrt{X+1}$

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

4.2 การชักนำให้เกิดคัพภะ

การทดลองที่ 2.1 การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

การทดลองใช้อาหารสูตร MS (½ NO_3) โดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม Kn , BA , IAA , 2,4 – D และ NAA ทั้งที่เป็นสารชนิดเดียวและสาร 2 ชนิดร่วมกัน ที่ความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เลี้ยงในสภาพมืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีผลทำให้ คัพภะก่อลิ้มเกิดการเปลี่ยนแปลงดังนี้

ผลของการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมสารชนิดเดียว

พบว่าการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต การเติม Kn และ BA ทุกความเข้มข้นไม่ทำให้คัพภะเกิดการเปลี่ยนแปลง การเติม IAA ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดเฉพาะรากตั้งแต่ 33 – 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะรากผอมและยาวประมาณ 2 – 4 เซนติเมตร การเติม NAA ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดเฉพาะรากตั้งแต่ 33 – 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะรากค่อนข้างผอมและยาวประมาณ 1 – 4 เซนติเมตร การเติม 2,4 – D ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ทำให้เกิดราก 67 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะรากอ้วนและยาว 1 – 2 เซนติเมตร ส่วนการเติม 2,4 – D 1.0 และ10.0 μM ทำให้เกิดเฉพาะแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นแคลลัสชนิด friable callus และ soft callus มีสีเหลืองอมเขียว การใช้ 2 , 4 – D 1.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 1)

ผลของการเติมสาร 2 ชนิดร่วมกัน

การเติม Kn ร่วมกับ IAA พบว่าทุกความเข้มข้นทำให้เกิดเฉพาะรากตั้งแต่ 33 – 100 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะผอมและยาวประมาณ 1 – 5 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

การเติม Kn ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดเฉพาะราก ส่วนใหญ่เกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นการเติม Kn 1.0 μM ร่วมกับ NAA 1.0 μM และการเติม Kn 10.0 μM ร่วมกับ NAA 1.0 และ 10.0 μM เกิดราก 67 และ 33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ลักษณะรากอ้วนและยาวประมาณ 1 – 5 เซนติเมตร บางคัพภะเกิด 2 ราก (ตารางที่ 5)

การเติม Kn ร่วมกับ 2 , 4 – D พบว่าการเติม Kn 0.1 μM ร่วมกับ 2 , 4 – D 0.1 μM เกิดเฉพาะราก 100 เปอร์เซ็นต์ รากมีลักษณะอ้วนสั้น การเติม Kn 0.1 μM ร่วมกับ 2 , 4 – D 1.0 μM เกิดราก 33 เปอร์เซ็นต์ รากมีลักษณะอ้วนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และเกิดแคลลัส 67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเติม Kn ร่วมกับ 2 , 4 – D ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นทุกระดับความเข้มข้นทำให้เกิดเฉพาะแคลลัสตั้งแต่ 33 – 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นแคลลัสชนิด friable callus และ soft callus ขนาดปานกลางถึงค่อนข้างใหญ่ สีเหลืองปน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

เทาถึงสีน้ำตาลและแคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น (ตารางที่ 6 ภาพที่ 1)

การเติม BA ร่วมกับ IAA พบว่าการเติม BA 0.1 μM ร่วมกับ IAA 0.1 – 10.0 μM ทำให้เกิดเฉพาะรากตั้งแต่ 33 – 67 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะรากอ้วนยาวประมาณ 1 – 4 เซนติเมตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ IAA เพิ่มขึ้น ทำให้ความยาวของรากลดลง การเติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ IAA 0.1 – 10.0 μM ทำให้เกิดเฉพาะแคลลัสตั้งแต่ 50 – 67 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น BA 1.0 μM ร่วมกับ IAA 1.0 μM ทำให้เกิดรากอ้วนสั้น แคลลัสที่เกิดเป็นชนิด friable callus และ compact callus แคลลัสมีขนาดเล็ก พบว่าเมื่อเติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ IAA 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่มีสีเหลืองอมเขียวปนสีน้ำตาล แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น (ตารางที่ 7 ภาพที่ 2)

การเติม BA ร่วมกับ NAA พบว่าการเติม BA 0.1 μM ร่วมกับ NAA 0.1 – 10.0 μM ทำให้เกิดเฉพาะราก 33 – 67 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะรากผอมและยาว 3 – 5 เซนติเมตร การเติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ NAA 0.1 – 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัส 33 – 67 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะการเติม BA 1.0 μM ร่วมกับ NAA 0.1 และ 1.0 μM BA 10.0 μM ร่วมกับ NAA 1.0 μM ทำให้เกิดรากตั้งแต่ 33 - 67 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสที่เกิดเป็นชนิด compact callus ที่มีขนาดเล็กถึงขนาดปานกลาง สำหรับการเติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสชนิด friable callus และ soft callus ขนาดใหญ่ สีเหลืองถึงสีเหลืองอมเขียวปนน้ำตาล และมีแคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น (ตารางที่ 8 ภาพที่ 2)

การเติม BA ร่วมกับ 2,4 – D พบว่าทุกความเข้มข้นทำให้เฉพาะแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นเมื่อเติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2,4 – D 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัส 67 เปอร์เซ็นต์ เป็นชนิด friable callus , soft callus และ compact callus แคลลัสมีขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ ส่วนการเติม 2,4 – D ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้ขนาดแคลลัสใหญ่ขึ้น ได้แก่การเติม BA 0.1 – 10.0 μM ร่วมกับ 2,4 – D 1.0 และ 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสขนาดค่อนข้างใหญ่ ถึงขนาดใหญ่ สีเหลืองปนสีน้ำตาล แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น (ตารางที่ 9 ภาพที่ 3)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของตัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn BA , IAA , 2,4 – D หรือ NAA ความเข้มข้นต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต	0	0	–		
Kn 0.1	0	0	–	–	–
Kn 1.0	0	0		–	–
Kn 10.0	0	0		–	–
BA 0.1	0	0	–	–	–
BA 1.0	0	0	–		
BA 10.0	0	0	–		
IAA 0.1	67	0	–	–	–
IAA 1.0	100	0	–	–	–
IAA 10.0	33	0	–	–	–
NAA 0.1	33	0	–	–	–
NAA 1.0	33	0	–		
NAA 10.0	33	0		–	–
2.4 – D 0.1	67	0	–	–	–
2,4 – D 1.0	0	100	F+I	++++	เกาะกันหลวม ๆกระจาย อ่อนนุ่ม สีเหลืองอมเขียว แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น
2,4 – D 10.0	0	100	F+I	++	เกาะกันค่อนข้างหลวม และแน่น อ่อนนุ่ม ผิวเป็นมัน สีเหลืองอมเขียว

F หมายถึง friable callus , I หมายถึง soft callus , C หมายถึง compact callus

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn ร่วมกับ IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
Kn 0.1 +IAA 0.1	33	0	–	–	–
Kn 0.1 +IAA 1.0	33	0	–	–	–
Kn 0.1 + IAA 10.0	33	0	–	–	–
Kn 1.0 + IAA 0.1	33	0	–	–	–
Kn 1.0 + IAA 1.0	100	0	–	–	–
Kn 1.0 + IAA 10.0	67	0	–	–	–
Kn 10.0 + IAA 0.1	33	0	–	–	–
Kn 10.0 + IAA 1.0	67	0	–	–	–
Kn 10.0 + IAA 10.0	33	0	–	–	–

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ศูนย์วิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
Kn 0.1 + NAA 0.1	100	0	–	–	–
Kn 0.1 + NAA 1.0	100	0	–	–	–
Kn 0.1 + NAA 10.0	100	0	–	–	–
Kn 1.0 +NAA 0.1	100	0	–	–	–
Kn 1.0 + NAA 1.0	0	0	–	–	–
Kn 1.0 + NAA 10.0	100	0	–	–	–
Kn 10.0 + NAA 0.1	100	0	–	–	–
Kn 10.0 + NAA 1.0	67	0	–	–	–
Kn 10.0 + NAA 10.0	33	0	–	–	–

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ก
ข 34.5
ฑ 118 ผ
ฉ.2

151124

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn ร่วมกับ 2,4 – D ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
Kn 0.1 + 2,4 – D 0.1	100	0	–	–	–
Kn 0.1 + 2,4 – D 1.0	33	67	F+I	+++	เกาะกันหลวม ๆถึงค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ สีเหลืองปนเทาแคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น
Kn 0.1 + 2,4 – D 10.0	0	100	I	+	เกาะกันค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่มสีเหลืองปนเทา
Kn 1.0 +2,4 – D 0.1	0	33	F+I	++	เกาะกันหลวม ๆถึงค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม สีเหลือง แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น
Kn 1.0 + 2,4 – D 1.0	0	100	F+I	++	เกาะกันหลวม ๆถึงค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม สีเหลืองปนสีน้ำตาล
Kn 1.0 + 2,4 – D 10.0	0	67	I	++	เกาะกันค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ ผิวเป็นมัน สีเหลืองอมเขียว
Kn 10.0 + 2,4 – D 0.1	0	33	F	++	เกาะกันค่อนข้างหลวม อ่อนนุ่ม สีเหลืองปนสีน้ำตาล แคลลัสเกิดใหม่สี ขาวขุ่น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
Kn 10.0 + 2,4 – D 1.0	0	67	F+I	+++	เกาะกันค่อนข้างหลวมถึงค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม สีเหลืองปนสีน้ำตาลแคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น
Kn 10.0 + 2,4 – D 10.0	0	33	F+I	+++	เกาะกันค่อนข้างหลวมถึงค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ สีเหลืองอมเขียว แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น

F หมายถึง friable callus , I หมายถึง soft callus , C หมายถึง compact callus

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
BA 0.1 +IAA 0.1	33	0	–	–	–
BA 0.1 +IAA 1.0	67	0	–	–	–
BA 0.1 + IAA 10.0	33	0	–	–	–
BA 1.0 + IAA 0.1	0	50	F	+	เกาะกันหลวม ๆ อ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ สีเหลืองอมเขียว แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น
BA 1.0 + IAA 1.0	67	0	–	–	
BA 1.0 + IAA 10.0	0	67	F	++++	เกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองปนสีน้ำตาล แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น
BA 10.0 + IAA 0.1	0	67	F+C	+	เกาะกันค่อนข้างหลวมและค่อนข้างแน่น สีเหลืองอมเขียวปนน้ำตาล
BA 10.0 + IAA 1.0	0	67	F+C	+	เกาะกันค่อนข้างหลวมและค่อนข้างแน่น สีเหลืองอมเขียวปนน้ำตาล
BA 10.0 + IAA 10.0	0	67	F+C	++++	เกาะกันค่อนข้างหลวมและค่อนข้างแน่น สีเหลืองอมเขียวแคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น

F หมายถึง friable callus , I หมายถึง soft calus , C หมายถึง compact callus

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
BA 0.1 + NAA 0.1	67	0	–	–	–
BA 0.1 + NAA 1.0	33	0	–	–	–
BA 0.1 + NAA 10.0	67	0	–	–	–
BA 1.0 +NAA 0.1	67	33	C	+	เกาะกันแน่น แห้งแข็ง สีเหลืองปนสีน้ำตาลมาก
BA 1.0 + NAA 1.0	33	33	C	++	เกาะกันแน่นค่อนข้างแข็ง ผิวเป็นมัน สีเหลืองปนสีน้ำตาล
BA 1.0 + NAA 10.0	0	67	F+C	+++	เกาะกันหลวม ๆและค่อนข้างแน่นแข็ง ผิวเป็นมัน สีเหลืองอมเขียว แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่น
BA 10.0 + NAA 0.1	0	33	C	+	เกาะกันแน่น สีเหลืองปนสีน้ำตาล
BA 10.0 + NAA 1.0	33	33	C	++	เกาะกันแน่น สีเหลืองปนสีน้ำตาล
BA 10.0 + NAA 10.0	0	67	F+C	++++	เกาะกันค่อนข้างหลวมถึงค่อนข้างแน่น ผิวเป็นมัน สีเหลืองอมเขียวปนสีน้ำตาล แคลลัสเกิดใหม่สีขาวขุ่นค่อนข้างมาก

F หมายถึง friable callus , I หมายถึง soft calus , C หมายถึง compact callus

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ 2,4 – D ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	การเกิดราก (%)	การเกิดแคลลัส (%)	ชนิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
BA 0.1 + 2,4 – D 0.1	0	100	C	++	เกาะกันแน่นผิวเป็นมัน สีสีเหลืองปนสีน้ำตาล
BA 0.1 + 2,4 – D 1.0	0	100	F+I	+++	เกาะกันแน่น ค่อนข้างแข็ง ผิวเป็นมัน สีเหลืองอมเขียว
BA 0.1 + 2,4 –D 10.0	0	100	I	++++	เกาะกันค่อนข้างแน่นอ่อนอ่อนนุ่มผิวเป็นมันสีเหลืองอมเขียว ที่เกิดใหม่สีขาวขุ่น
BA 1.0 + 2,4 – D 0.1	0	100	C	++	เกาะกันแน่น แห้งแข็ง สีเหลืองปนสีน้ำตาล จำนวนมาก
BA 1.0 + 2,4 – D 1.0	0	100	F+I	++++	เกาะกันค่อนข้างหลวม ๆถึงค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม สีเหลือง ที่เกิดใหม่สีขาวขุ่น
BA 1.0 +2,4 – D 10.0	0	67	I	+++	เกาะกันค่อนข้างแน่น อ่อนนุ่ม ผิวเป็นมันสีเหลืองปนน้ำตาล
BA 10.0 + 2,4 – D 0.1	0	100	F+C	++	เกาะกันค่อนข้างหลวมและแน่น แห้งสีน้ำตาล
BA 10.0 + 2,4 – D 1.0	0	100	F+C	++++	เกาะกันค่อนข้างหลวม ถึงค่อนข้างแน่น สีเหลืองปนสีน้ำตาล ที่เกิดใหม่สีขาวขุ่น
BA 10.0 + 2,4 – D 10.0	0	67	I	+++	เกาะกันค่อนแน่น อ่อนนุ่ม ผิวเป็นมัน สีเหลืองปนน้ำตาล เกิดใหม่สีขาวขุ่น

F หมายถึง friable callus , I หมายถึง soft callus , C หมายถึง compact callus

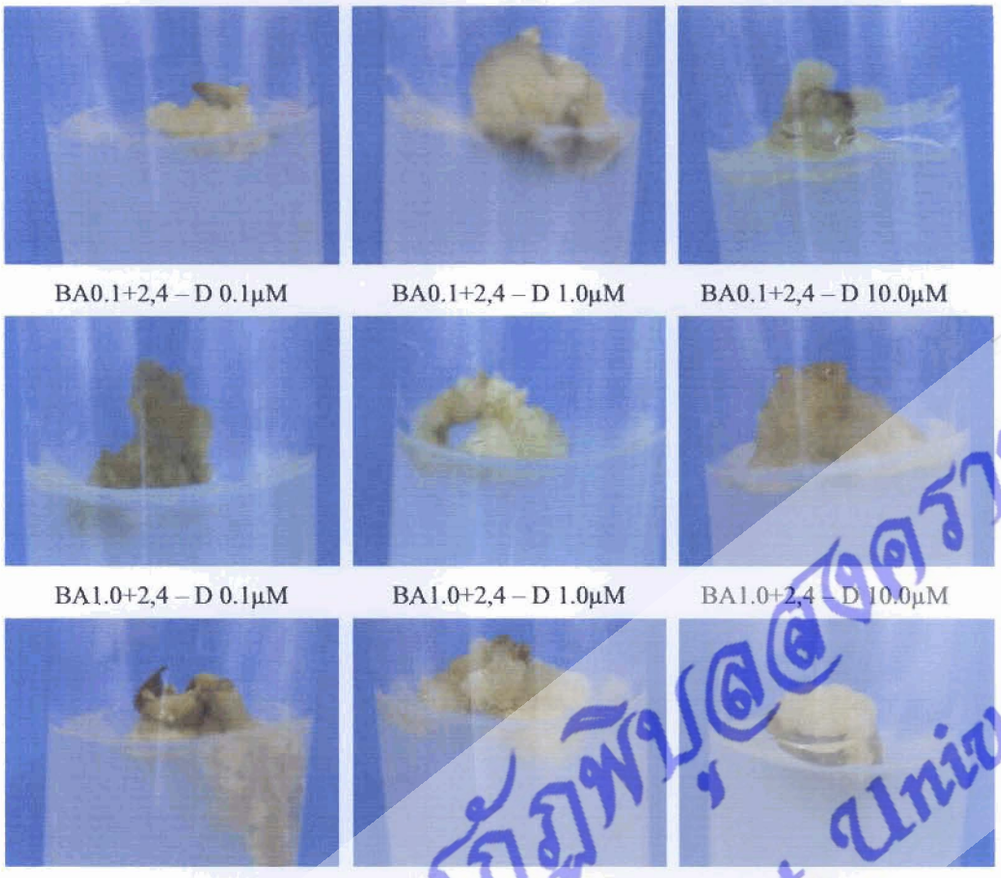
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn ที่ระดับความเข้มข้น 0 , 0.1 ,1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2 , 4 – D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

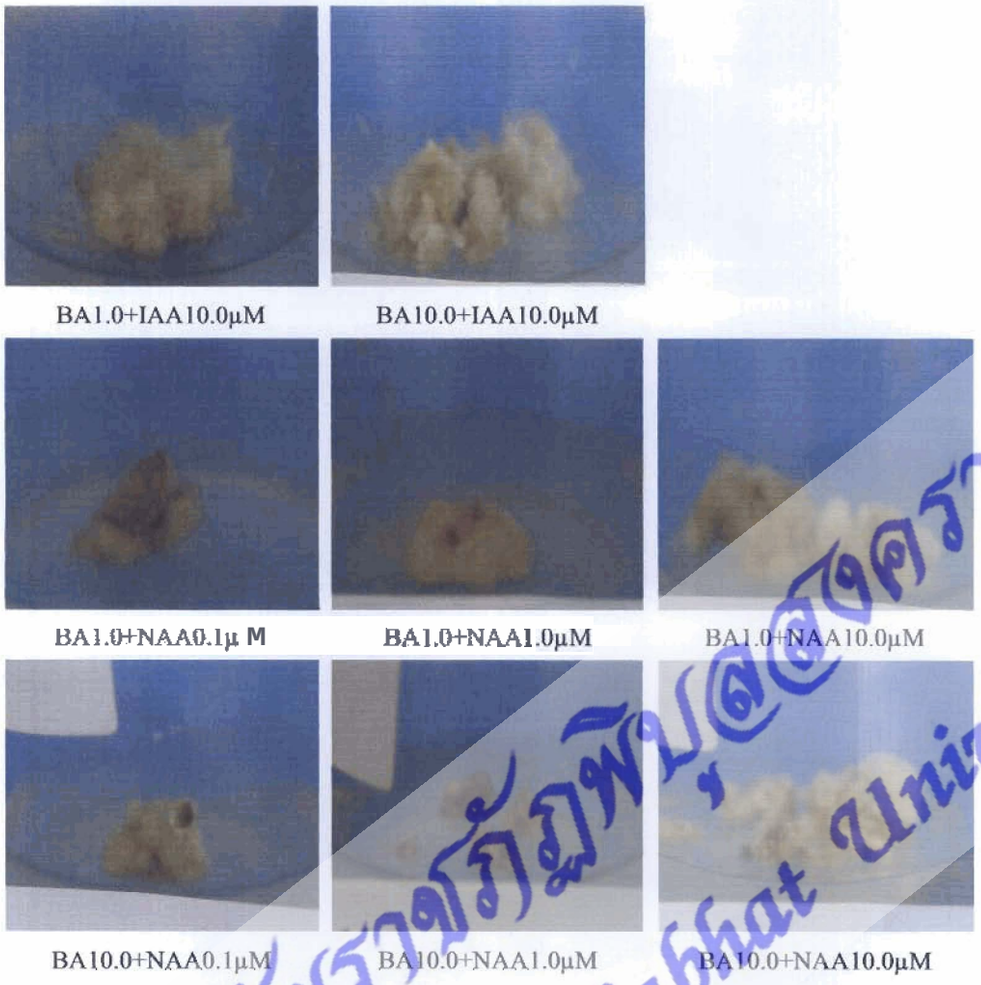
ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 , 10.0 μM ร่วมกับ IAA หรือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



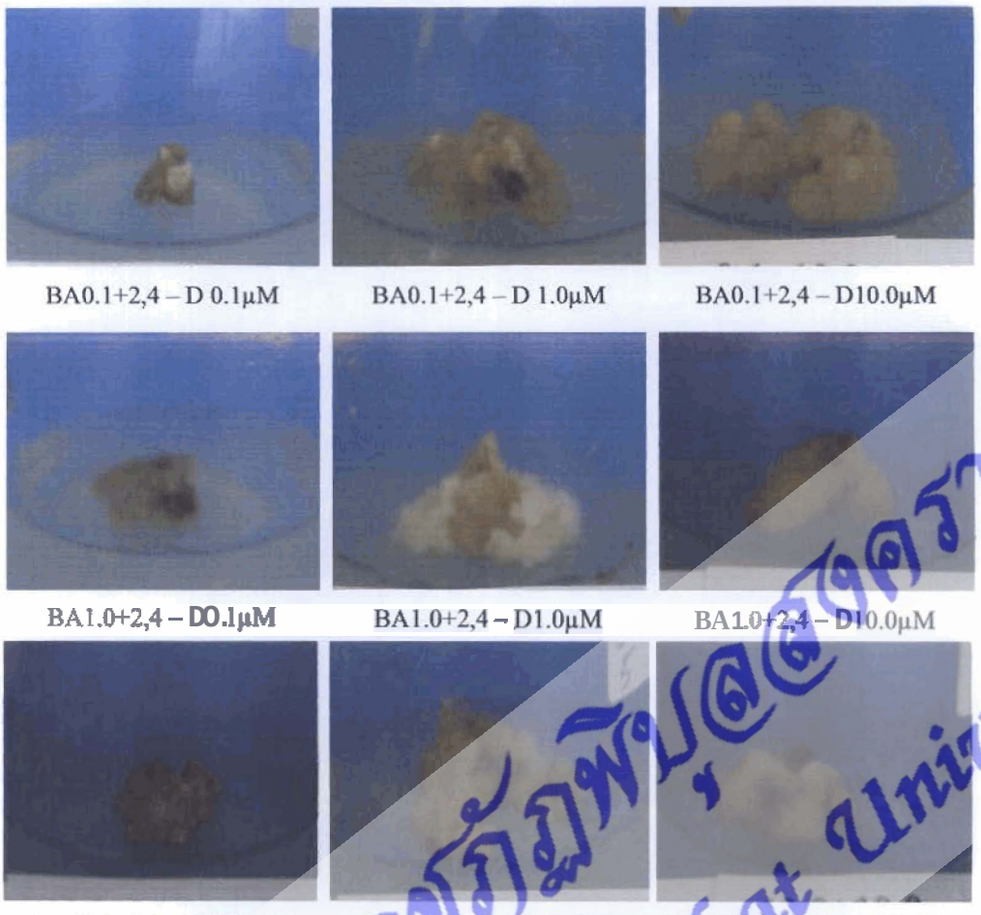
ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของคัพภะอ่อน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2 , 4 – D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส ที่ตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ I AA ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 μM และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 , 10.0 μM ร่วมกับ NAA 0.1 , 1.0 , 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส ที่ตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2,4 – D ที่ระดับ ความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10.0 μM เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

การทดลองที่ 22 การชักนำให้เกิด embryogenic callus และ somatic embryo

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการคัดเลือกแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ ตัดแบ่งเป็นครั้งที่ 2 เลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมในสภาพมืด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า มีการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส การเกิดแคลลัสเป็นสีน้ำตาล และเกิดแคลลัสใหม่ลักษณะต่าง ๆ กันดังนี้

การเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn และBA ร่วมกับ 2,4-D , IAA หรือ NAA ทำให้น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใช้ 2,4-D 1.0 μM , Kn 0.1 μM ร่วมกับ 2,4-D 1.0 μM และ Kn 1.0 μM ร่วมกับ 2,4-D 10.0 μM มีน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นสูงสุด 2.704 , 2.746 และ 2.722 กรัม ตามลำดับ และอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส 7.8 , 7.6 และ 7.5 เท่า ตามลำดับ ส่วนการใช้ BA 0.1 μM ร่วมกับ 2,4-D 1.0 μM ทำให้น้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่ำสุดที่ 1.284 กรัม และอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส 2.9 เท่า (ตารางที่ 10)

การเกิดแคลลัสสีน้ำตาล หลังจากตัดแบ่งแคลลัสเลี้ยงบนอาหารเดิม 1 สัปดาห์ พบว่ามีแคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในบางสูตรอาหาร และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แคลลัสเกิดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น การเติม 2,4-D 1.0 μM , Kn 0.1 μM ร่วมกับ 2,4-D 1.0 μM และ Kn 10.0 μM ร่วมกับ 2,4-D 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสเป็นสีน้ำตาลมาก ส่วนการใช้ BA ร่วมกับ IAA หรือ NAA ทุกความเข้มข้น ทำให้เกิดแคลลัสอยู่ในระดับน้อยถึงปานกลาง (ตารางที่ 10)

ลักษณะแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัส 1 สัปดาห์ พบแคลลัสส่วนใหญ่มีการสร้างแคลลัสใหม่สีขาวใส สีขาวขุ่น สีเหลืองอ่อน หรือสีเหลืองอมเขียว มีลักษณะเป็นแผ่นเกาะรอบก้อนแคลลัส จนถึงเป็นก้อนอัดกันแน่น หรือเป็นเม็ดกลมกระจาย และเป็นกระจุก

การใช้อาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม 2,4-D และ Kn ร่วมกับ 2.4-D ทุกความเข้มข้น ไม่พบการพัฒนาของแคลลัสเป็น embryogenic callus อย่างชัดเจน

การใช้อาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ IAA 10.0 μM พบว่ามีการพัฒนาของแคลลัสอย่างรวดเร็ว เกิดคัพภะถึงระยะ globular shapes บางเซลล์พัฒนาเป็นลักษณะคล้ายราก (rhizoid)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม Rajabhat Mahasarakham University

การใช้อาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA 0.1 และ 1.0 μM ร่วมกับ 2,4-D 1.0 μM พบการพัฒนาของแคลลัสเป็น embryogenic callus และการพัฒนาคัพภะในระยะ proembryo จำนวนมาก ส่วนการเติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2,4-D 1.0 และ 10.0 μM ไม่พบการพัฒนาเป็น embryogenic callus

การใช้อาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้เกิดการพัฒนาเป็น embryogenic callus และคัพภะพัฒนาอยู่ในระยะ proembryo จำนวนมาก (ตารางที่ 10 ภาพที่ 7)

การเกิดคัพภะ การคัดเลือกแคลลัสจากการตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารเดิมครั้งที่ 2 ที่มีการพัฒนาของแคลลัส เป็น embryogenic callus และเกิดแคลลัสสีน้ำตาลอยู่ในระดับน้อยถึงปานกลาง ตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบมีการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเป็นคัพภะอย่างชัดเจน ได้แก่การใช้ BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ IAA 10.0 μM ทำให้เกิดคัพภะถึงระยะ globular shapes จำนวนค่อนมากถึงจำนวนมากเต็มก้อนแคลลัส แต่ไม่สามารถพัฒนาได้ถึง torpedo shapes ส่วนการใช้ BA 0.1, 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2,4-D 10.0 μM ทำให้เกิดคัพภะเล็กน้อยถึงปานกลาง และคัพภะพัฒนาถึงระยะ torpedo shapes และการใช้ BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสอยู่ในระดับปานกลาง ถึงค่อนข้างมาก เกิดการพัฒนาถึงระยะ torpedo shapes ที่มีขนาดใหญ่ แต่การใช้ BA 1.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้แคลลัสและคัพภะเกิดสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว (ตารางที่ 11 ภาพที่ 8)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส จากการตัดแบ่งครั้งที่ 2 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม 2,4-D , Kn และ BA ร่วมกับ LAA ,2,4-D และ NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด	การเกิดสีน้ำตาล	ลักษณะแคลลัส
2,4-D 1.0	2.704 a	7.8 a	+++	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลส่วนมาก ไม่พบลักษณะเป็น embryogenic callus
Kn0.1+2,4-D1.0	2.746 a	7.6 ab	+++	เกิดแคลลัสใหม่สีขาวขุ่นคล้าย embryogenic callus
Kn10.0+2,4-D10.0	2.722 a	7.5 ab	+++	เกิดแคลลัสใหม่สีเหลืองอมเขียว กระจาย คล้ายเป็น embryogenic callus
BA1.0+IAA10.0	2.174 bc	5.8 abc	+	เกิดแคลลัสใหม่สีขาวขุ่นรอบแคลลัสเดิม มีลักษณะ embryogenic callus อยู่ในระยะglobular shaped
BA10.0+IAA10.0	1.446 f	3.6 c	+	เกิดแคลลัสใหม่สีขาวขุ่นเป็นกระจุกใหญ่มีลักษณะ embryogenic callus อยู่ในระยะ globular shaped
BA0.1+2,4-D1.0	1.284 g	2.9 c	++	เกิดแคลลัสใหม่สีขาวขุ่นคล้าย embryogenic callus
BA1.0+2,4-D 1.0	2.035 cd	4.7 bc	++	เกิดแคลลัสใหม่สีเหลืองอ่อน มีลักษณะ embryogenic callus อยู่ในระยะ proembryo จำนวนมาก

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สารควบคุมการการเจริญเติบโต (μM)	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด	การเกิดสีน้ำตาล	ลักษณะแคลลัส
BA1.0+2,4 –D10.0	2.283 b	5.8 abc	+	เกิดแคลลัสใหม่สีเหลืองอ่อน เกาะกันแน่น ไม่พบลักษณะembryogenic callus
BA10.0+2,4 –D1.0	2.189 bc	5.3 abc	++	เกิดแคลลัสใหม่สีขาวขุ่นกระจาย และเกาะกันแน่น ลักษณะคล้ายembryogenic callus บางส่วน
BA10.0+2,4 –D10.0	1.584 ef	3.9 c	+	เกิดแคลลัสใหม่สีเหลืองอ่อน เกาะกันแน่น ไม่พบลักษณะembryogenic callus
BA1.0+NAA 10.0	1.883 d	4.6 bc	++	เกิดแคลลัสขนาดใหญ่ มีลักษณะ embryogenic callus มีกลุ่มเซลล์ในระยะproembryo จำนวนมาก
BA10.0+NAA10.0	1.668 e	4.0 bc	++	เกิดแคลลัสสีขาวขุ่นเป็นกระจุกขนาดค่อนข้างใหญ่ ลักษณะเป็น embryogenic callus มีเซลล์อยู่ในระยะProembryo จำนวนมาก

อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด = น้ำหนักสดสุดท้ายของแคลลัส/ น้ำหนักสดเมื่อเริ่มต้น

การเกิดแคลลัส – ไม่เกิดแคลลัสสีน้ำตาล

+ เกิดแคลลัสสีน้ำตาลเล็กน้อย

++ เกิดแคลลัสสีน้ำตาลปานกลาง

+++ เกิดแคลลัสสีน้ำตาลมาก

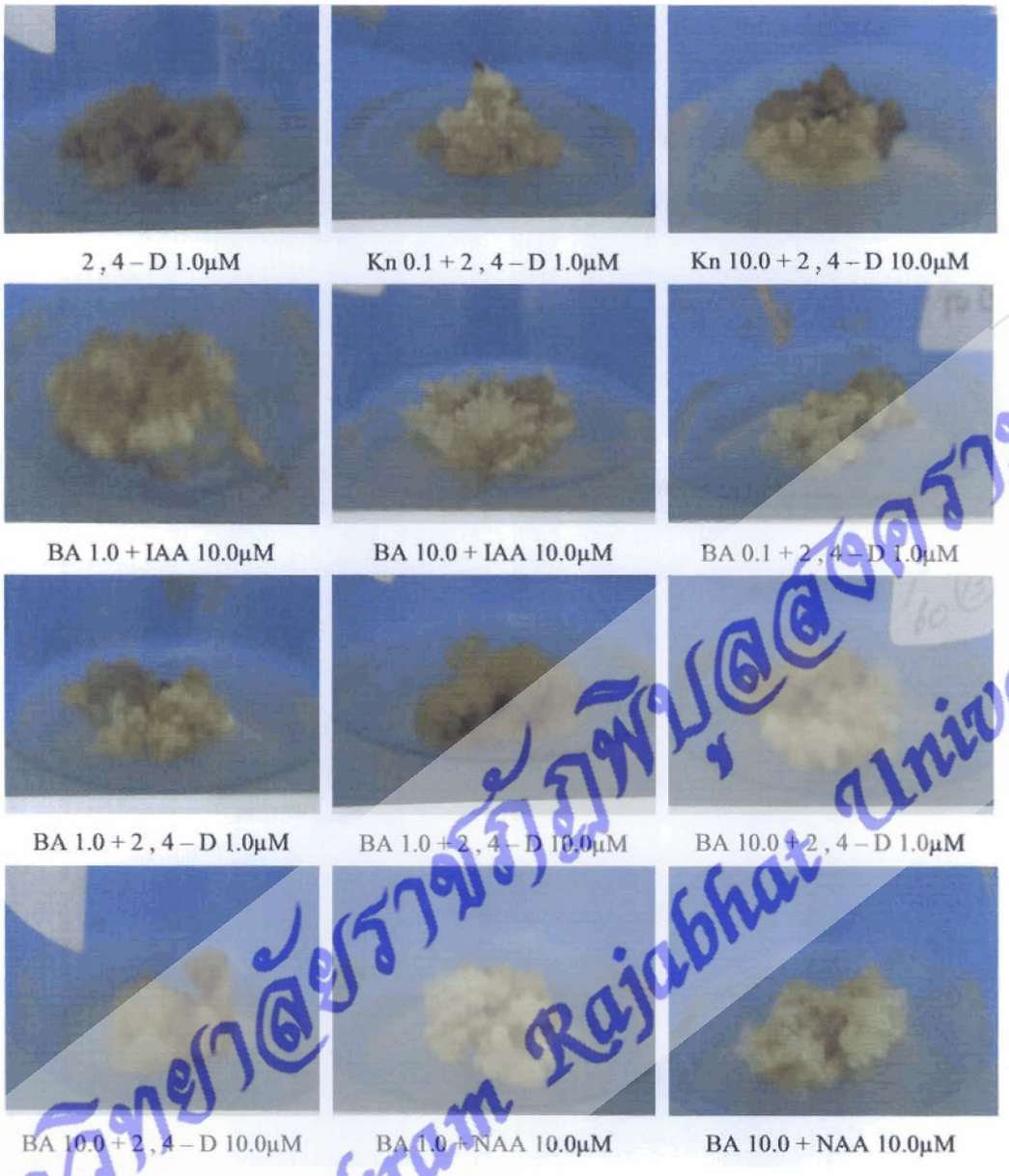
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 11 การเกิดคัพภะจากการตัดแบ่งแคลลัสครั้งที่ 3 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ IAA , 2 , 4 – D และ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)	คะแนนการเกิดคัพภะ	การเกิดและลักษณะคัพภะ
BA1.0+IAA10.0	++++	เกิดคัพภะในระยะ globular shaped เป็นกระจุกเต็มก้อนแคลลัส
BA10.0+IAA10.0	+++	เกิดคัพภะในระยะ globular shaped เป็นกระจุกเกือบเต็มก้อนแคลลัส
BA0.1+2,4 –D1.0	+	เกิดคัพภะในระยะ globular shaped , heart shaped และ torpedo shaped เล็กน้อย
BA1.0+2,4 – D1.0	++	เกิดคัพภะในระยะ globular shaped , heart shaped และ torpedo shaped เป็นกระจุก
BA10.0+2,4 – D1.0	+	เกิดคัพภะในระยะ globular shaped , heart shaped กระจายในบางส่วนของก้อนแคลลัส
BA1.0+NAA1.0	++	เกิดคัพภะในระยะ heart shaped และ torpedo shaped ขนาดใหญ่กระจายห่าง ๆ
BA10.0+NAA10.0	+++	เกิดคัพภะในระยะ heart shaped และ torpedo shaped เป็นกระจุกเกือบเต็มก้อนแคลลัส

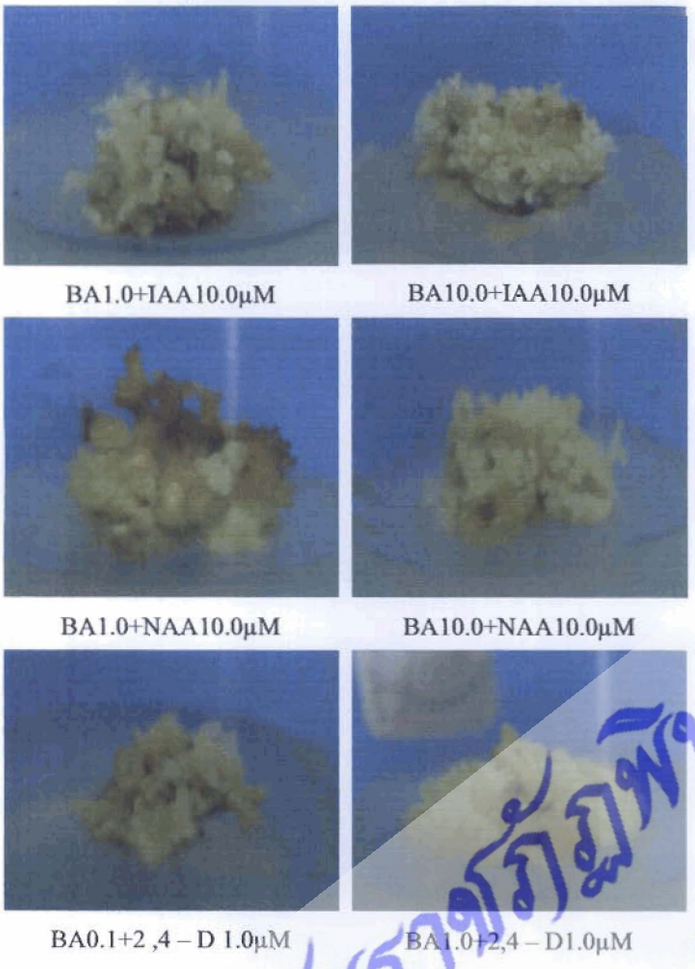
คะแนนการเกิดคัพภะ
+ เกิดคัพภะเล็กน้อย 0 – 24 เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส
++ เกิดคัพภะเล็กน้อย 25 – 49 เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส
+++ เกิดคัพภะเล็กน้อย 50 – 74 เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส
++++ เกิดคัพภะเล็กน้อย 75 – 100 เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส ที่ตัดแบ่งครั้งที่ 2 เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม 2 , 4 – D และเติม Kn และ BA ร่วมกับ IAA , 2 ,4 – D และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



ภาพที่ 7 การเกิดคัพภะจากการพัฒนาของแคลลัส ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (½ NO_3) ที่เติม BA ร่วมกับ IAA , 2 ,4 – D และ NAA ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

การเพาะเมล็ดก่อลิ้มในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำยอดที่สมบูรณ์ตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่าการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์ความงอกได้ยอดที่สมบูรณ์ค่อนข้างสูง ค่าเฉลี่ยที่ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า อายุของเมล็ด ความแก่ของคัพภะ และความเหมาะสมของอาหารสูตร MS ที่มีธาตุอาหารค่อนข้างครบถ้วน การตัดแบ่งต้นอ่อนจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเป็นท่อนมี 3 ข้อ เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จำนวนมากได้ เนื่องจาก BA มีคุณสมบัติเหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก ดังที่มีการทดลองใช้กับพืชวงศ์ก่อและพืชอื่น ๆ หลายชนิด ได้แก่ *Quercus shumardii* Buckl. , *Q. nobur* L. , *Q. floribunda* Lindl. *Castanea sativa* Mill., พลับจีน , พลับญี่ปุ่น , ชนุน , มะม่วงหิมพานต์ , อัลมอนด์ เป็นต้น (Bennett และคณะ , 1986 ; Sugiura และคณะ , 1986 ; Hisajima และคณะ , 1986 ; Qi – guang และคณะ , 1986 ; Sugiura และคณะ , 1986 ; Pevalck – Kozlina , 1991 ; Vieitez และคณะ , 1993 ; Purohit และคณะ , 2002 ; ธวัชชัย , 2532 ; พินิจ , 2536) และการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA 8.89 μM ทำให้การเพาะเมล็ดเกิดยอดอ่อนที่สมบูรณ์เฉลี่ย 4.25 ยอดต่อเมล็ด และทำให้เกิดยอดจากตาข้างของยอดที่ปักชำมากที่สุด เฉลี่ย 2.29 ยอดต่อชิ้นส่วน เช่นเดียวกับการเลี้ยงตาข้างของ *Quercus shumardii* Buckl. บนอาหารเหลวสูตร WPM ที่เติม BA 8.9 μM สามารถทำให้เกิดการแตกยอดจากตาข้างมากที่สุด การเติม BA 44.45 และ 88.89 μM ทำให้เกิดยอดสั้น ๆ เป็นกระจุก และเกิดแคลลัสจำนวนมาก สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงปลายยอดพลับจีน บนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 และ 44.4 μM จะยับยั้งการเกิดยอดและส่งเสริมการเกิดแคลลัส (Qi – guang และคณะ , 1986) และยังพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 88.89 μM เกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาลจำนวนมาก เนื่องจากมีการสะสมของสารฟีนอลจากขบวนการออกซิเดชั่น มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

พืช เกิดและพบได้มากในไม้ยืนต้น (สมปอง , 2532) สอดคล้องกับรายงานของ พินิจ (2536) ที่มีการใช้ BA ความเข้มข้น 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เนื้อเยื่อเกิดสีน้ำตาล 100 เปอร์เซ็นต์และตาย Loh และ Rao (1989) รายงานว่า BA ความเข้มข้น 0.1 – 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ฝรั่งเกิดยอดจำนวนมาก แต่การเติม BA ที่ความเข้มข้น 5 – 20 มิลลิกรัม ทำให้ปลายยอดมีสีน้ำตาล tintไม่เจริญเติบโต การเติมBA มีผลทำให้ความยาวยอดที่เกิดจากตาข้างลดลงตามความเข้มข้นของสาร พบว่าการเติม BA ความเข้มข้น 0.89 μMใน 6 สัปดาห์ ทำให้เกิดยอดยาวเฉลี่ย 1.04 เซนติเมตร สอดคล้องกับการรายงานของ San – Jose และคณะ (1988) เลี้ยงส่วนตาข้างของ *Quercus robur* L. บนอาหาร Gresshoff and Doy ที่เติม BAP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน 4 สัปดาห์ ทำให้เกิดยอดยาวเฉลี่ย 8 มิลลิเมตร

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนจากเมล็ด บนอาหารสูตร MS ที่ลด NH_4NO_3 ลงครึ่งหนึ่ง เติมไซโตไคนินหรือ ออกซินชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ไซโตไคนิน และออกซินที่เป็นสารเดี่ยว ส่วนใหญ่ ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ยกเว้น 2,4 – D ความเข้มข้น 1.0 และ 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสชนิด friable callus และ soft callus ดังรายงานของ รังสฤษฎ์ (2540) กล่าวว่า 2 , 4 – D เป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ แต่ใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนเนื้อเยื่อ และรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ ซึ่งจะใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 – 10.0 μM สอดคล้องกับการทดลองของ Andrade และคณะ (2003) ที่เพาะเลี้ยง immature ovules ของAmerican chestnut บนอาหารสูตรWPM ที่เติม 2 , 4 – D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิด proembryogenic masses และการทดลองของ สุรพล (2531) เพาะเลี้ยงเอมบริโอละหุ่ง บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2 , 4 – D และ NAA พบว่า 2 , 4 – D 3 – 5 มิลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสชนิดเกาะกันหลวม ๆ (friable callus) แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อใช้ NAA

การใช้ Kn ร่วมกับ IAA หรือ NAA ไม่สามาถชักนำให้เกิดแคลลัส แต่พบว่าการใช้ Kn ร่วมกับ 2 , 4 – D ทำให้เกิดแคลลัสชนิดเกาะกันหลวม ๆ (friable callus) และอ่อนนุ่ม (soft callus) ขนาดเล็กถึงปานกลาง สอดคล้องกับการทดลองของ Kumari Jayusree (2004) ทดลองกับ *Hevea brasilliensis* (Muell .) Arg . X สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิดเกาะกันหลวม ๆ อ่อนนุ่ม จนถึงเกาะกันค่อนข้างแน่น ที่มีขนาดเล็กถึงปานกลาง เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS (½ NO_3) ที่เติม Kn 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2 , 4 – D 0.5 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม Rajabhat University

และ Woong – Young (1998) ทดลองเลี้ยงส่วนใต้ใบเลี้ยงของ Cowpea บนอาหารสูตร MS ที่เติม Kn 0.93 μM ร่วมกับ 2,4 – D 1.81 μM ทำให้เกิดแคลลัสได้

การใช้ BA 0.1, 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ 2,4 – D, IAA หรือNAA 0.1,1.0 และ 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสได้จากการเติมสารต่าง ๆ ทุกชนิด โดยพบว่าการใช้ 2,4 – D ความเข้มข้นสูง 1.0 และ 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสชนิดที่เกาะกันหลวม ๆ หรืออ่อนนุ่ม หรือเกาะกันแน่น ส่วนการใช้ BA ร่วมกับ IAA หรือ NAA ความเข้มข้น 10.0 μM ทำให้เกิดแคลลัสชนิดที่เกาะกันหลวม ๆ และชนิดที่เกาะกันแน่น มีขนาดใหญ่เจริญเติบโตเร็ว สอดคล้องกับการทดลองเพาะเลี้ยง immature ovule และ ใบ ของ *Castanea dentata* (Marsh.) Borkk. และ *Castanea sativa* การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ ของ *Quercus ilex* L. และ *Quercus suber* L. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนมังคุด (*Garcinia magostana* Linn.) ของ Xing (1966), Xing (1977) Fernandez – Gaoliano (1977), Mauri (2001), Coredoira (2003), Hernadez (2003) และ สมปอง (2544)

การชักนำให้เกิดคัพภะ

จากการตัดแบ่งแคลลัสเลี้ยงบนอาหารเดิม ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 พบว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA ทำให้เกิดการพัฒนาคัพภะ ถึงระยะ torpedo shaped ซึ่งการใช้ BA 10.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้เกิดคัพภะระยะ torpedo shaped เป็นกระจุกเกือบเต็มก้อนแคลลัส และการใช้ BA 1.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้เกิดคัพภะระยะ torpedo shaped ขนาดใหญ่ กระจายห่าง ๆ เช่นเดียวกับการใช้ BA 1.0 μM ร่วมกับ2,4 – D 1.0 μM ทำให้เกิดคัพภะระยะ torpedo shaped เป็นกระจุกเล็ก ๆ บางส่วนของก้อนแคลลัส ส่วนใหญ่เกิดคัพภะในระยะ globular shaped และ heart shaped ส่วนการใช้ BA 1.0 และ 10.0 μM ร่วมกับ IAA 10.0 μM ทำให้เกิดการพัฒนาคัพภะระยะ globular shaped สอดคล้องกับรายงานของ รังสฤษฎ์ (2540) ที่ศึกษาพบว่า มีสารบางชนิดมีผลต่อการชักนำการเกิดคัพภะ ได้แก่ 2,4 – D, zeatin สารมีผลต่อการกระตุ้นการเกิดคัพภะ ได้แก่ GA_3, IAA, IBA รวมทั้ง BAP มีผลยับยั้งการกำเนิดคัพภะ และการทดลองของ Xing และคณะ (1996) ใช้อาหาร WPM ที่เติม BA 0.5 μM ร่วมกับ NAA 0.5 μM ทำให้เกิดคัพภะของ American chestnut ในระยะ heart shaped ถึง mature embryos Xing และคณะ (1997) ใช้อาหาร Gamborg's (B – 5) ที่เติม BA 0.5 μM ร่วมกับ NAA 0.5 μM ทำให้เกิดคัพภะของ American chustnut พัฒนาถึงระยะ cotyledonary stage Corredoira และคณะ (2003)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

เลี้ยงส่วนใบของ *Castanea sativa* Mill. บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เกิด somatic embryos สูงสุด Mauri และคณะ (2001) ศึกษาการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ของ *Quercus ilex* L. บนอาหารสูตร Gamborg (1966) ที่เติม BA 0.5 μM ร่วมกับ NAA 0.5 μM ทำให้เกิด somatic embryos ส่วน Camper (1995) เพาะเลี้ยง immature embryos ของ *Quercus alba* บนอาหารสูตร GD ที่เติม BA ร่วมกับ 2 , 4 – D ทำให้เกิด Somatic embryos ดีที่สุด

5.2 สรุปผล

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการเพิ่มปริมาณยอด และการเกิดคัพภะของก่อลิ้ม ในสภาพปลอดเชื้อสรุปได้ดังนี้

1. การเพาะเมล็ดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 8.89 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์มากที่สุด เฉลี่ย 4 . 25 ยอดต่อเมล็ด

2. การเพาะเลี้ยงตาข้างของยอดที่เกิดในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 8.89 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด เฉลี่ย 1.29 ยอด ต่อชิ้นส่วน

3. การเพาะคัพภะอ่อนบนอาหารสูตร MS(½NO_3) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเกิดแคลลัสที่เจริญเติบโตดีบนอาหารที่เติม 2 , 4 – D 1.0 μM เป็นชนิด friable callus และ soft callus อาหารที่เติม BA 1.0 μM ร่วมกับ IAA 10.0 μM และ BA 10.0 μM ร่วมกับ IAA 10.0 μM แคลลัสเป็นชนิด friable callus และ compact callus อาหารที่เติม BA 0.1 μM ร่วมกับ 2 , 4 – D 10.0 μM , BA 1.0 μM ร่วมกับ 2 , 4 – D 1.0 μM และ BA 10.0 μM ร่วมกับ 2 , 4 – D 1.0 μM เป็นชนิด friable callus , soft callus และ compact callus ส่วนอาหารที่เติม BA 1.0 μM ร่วมกับ NAA 10.0 μM และ BA 10.0 μM ร่วมกับ 10.0 μM เป็นชนิด friable callus และ compact callus

4. การตัดแบ่งแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(½NO_3) ที่เติม BA 1.0 μM ร่วมกับ IAA , 2 , 4 – D หรือ NAA 3 ครั้ง พบว่าการเติม BA 1.0 μM ร่วมกับ IAA 10.0 μM

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

าให้เกิดคัพภะในระยะ globular shaped มากที่สุด ส่วนการเติม BA 1.0 และ 10.0 μM วมกับ NAA 10.0 μM ทำให้เกิดคัพภะระยะ torpedo shaped มากที่สุด

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ทราบชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอด และการชักนำให้เกิดคัพภะของก่อลิ้ม ดังนั้นเพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการใช้เนื้อไม้ และผลไม้จำพวกนัท(nut) จึงควรทำการศึกษาวิจัยต่อเนื่องในเรื่องต่อไปนี้

1. การศึกษาชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหาร และการปรับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะ และการชักนำให้คัพภะ (somatic embryo) เจริญเป็นต้นอ่อน

2. การศึกษาสภาพแวดล้อมภายนอกห้องปฏิบัติการ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของก่อ

3. การคัดเลือกพันธุ์ก่อที่มีการเจริญเติบโตเหมาะสมต่อการใช้เนื้อไม้ หรือการให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี สามารถทดแทนการนำเข้าผลไม้จำพวกนัท

4. การปรับปรุงพันธุ์ก่อโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือการตัดต่อพันธุกรรม เพื่อผลิตก่อที่มีคุณภาพดี สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในเชิงอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บรรณานุกรม

คำเหล็ก ไชยคารา. 2541. อนุกรมวิธานและการกระจายพันธุ์ไม้วงศ์ก่อ ในจังหวัดพงสาลี สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 164 น.

เต็ม สมิตินันท์. 2536. ไม้ก่อในประเทศไทย. หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 9 น.

_____. 2544. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 810 น.

ธวัชชัย วรรธนะวลัญช์. 2532. การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์ขนุนในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พินิจ กรินท์ธัญญกิจ. 2536. การเพาะเลี้ยงมะม่วงหิมพานต์ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 54 น.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 น.

วิชาญ เอียดทอง. 2536. การศึกษาทางอนุกรมวิธานของพันธุ์ไม้วงศ์ก่อ ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 171น.

สมปอง เตชะโต. 2532. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากร 555มชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 263 น.

สุรพล ขุมทรัพย์. 2531. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อละหุ่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 61 น.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2536. "ต้นก่อ"ดูดก๊าซพิษดีเยี่ยม. มติชน. 26(9275) : 18.

Anrade , G. M. and S. A. Merkle. 2003. Enhancement of American chestnut somatic seedling production. Warnell School of Forest Resouces, University of Georgia. Athens GA 30602.

Ballester , A. ; M.C. Sunchez ; A. M. Vieitez. 1992. New Strategies for *in vitro* propagation of adult chestnut Proc. World Chestnut . World Chestnut Industry Conference, pp. 32 – 40.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Ballester , A. ; M.C. San Jose ; N. Vidal ; J. L. fernundez Lorenzo and A. M. Vieitez. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. Annals of Botany 83 : 619 – 629 .

Bennett , L. K. and F. T. Devies. 1986. *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedling. HortScience 21(4) : 1045 – 1947 .

Chulapa , V. 1990. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) Plant Cell Reports 9 : 398 – 410.

Corredoira , E. ; A. Ballester and A. M. Vieietez. 2003. Proliferation , maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. Somatic embryo originated from leaf explants. Annals of Botany 92 : 129 – 136 .

Daniel , T. C. ; A. M. Scott. 1997 . Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut Can. J. For. Res. 27 (11) : 1805 – 1812.

Fernandez – Galiano , E. ; P. V. Mauri and G. Garcia . 1997. Somatic embryogenesis induction on *Quercus faginea* Lamk. ISHS Acta Horticultural 447 : III International Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding.

Gingas , V. M . 1991 . Asexual embryogenesis and regeneration from male catkins of *Quercus spp.* HortSci. 26 : 1217 – 1218 .

Hegde , M. ; M. Kulasekaran ; K. Shanmughavein and S. Jayasankar. 1991. *In vitro* culture of cashew seedling and multiple plantlet from mature cotyledon. Abstr. Trop. Age. 16 : 79.

Hernandez , I ; C. Celestino ; M. Toribio. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis . Plant Cell Reports. 21 (8) : 759 – 764 .

Hiregoudour . L. V. ; H. N. Murthy ; B. P. Hema ; E. J. Hahn and K. Y. Paek. 2003. Multiple shoot induction and plant regeneration of *Feronia limonia* (L.) Swingle. Sci. Hort. 98 : 357 – 364.

Hisajima , S. ; Y. Arai and K. Ishizuka. 1986. Microplant propagation through multiple shoot formation from seeds , embryos and exised single shoots , pp. 123 – 126. In B.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Napompeth and S. suphadrabundhu (eds.). New Frontiers in Breeding Research. Fac. Agr. Kasetsart Univ. Bangkok.

Janeiro , L. V. ; A. M. Vieitez ; A. Ballester. 1995. Cold storage of *in vitro* culture of wild cherry , chestnut and oak. Ann. Sci. For. For. *52* : 287 – *293* .

Lee K. P. and D. W. Lee . 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seed of wild *Dicentra spetabilis* (L.) LEM. Plant Celt Reports. 22 (2) : 105 – 109 .

Loh. C. S. and A, N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Sci. Hort. *39* : 31 – *39*.

Mauri , P. V. ; J. A. Manzanera and M. M. Marcote. 2001. Cyclic somatic embryogenesis and scheme for multiplication of *Quercus ilex* L. ISHS Acta Horticulturae *560* : IV International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding.

Mullins , K. V. 1987. Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) ISHS Acta Horticulture *212* : Symposium on *In vitro* Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants. ISBN 9066050438 , 130 *(2)*.

Piagnani , C. and T. Eccher. 1988. Factors effecting the proliferation and rooting of chestnut *in vitro* . ISHS Acta Horticultural 227 : International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species.

_____. 1990. Somatic embryo in chestnut. ISHS Acta Horticulturae 280. I International Symposium on In *Vitro* Culture and Horticultural Breeding.

Purohit , V. K. ; L. M. S. Palni ; S. K. Nandi and H. C. Rikhari. 2002 . In *vitro* regeneration of *Quercus floribunda* Lindl. through cotyledonary nodes : an important tree of Central Himalaya. Current Science 83(3) : 312 – 316.

Qi guang , Yang ; P. E. Read ; C. D. Fellman and M. A. Hosier. 1986. Effect of cytokinin , IBA and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. HortScience 21 : 133– 134 .

San Jose, M. C. ; A. Ballester and A. M. Vieitez. 1988. Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L. . Tree Physiol. 4 (3) : *281* – 290 .

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

_____. 1990. Clonal progation of juvelnile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. Silvae Genetica , 39 : 50 – 55 .

Sugiura , A. ; T. Ryu taro ; H. Murayama and T. Tomana. 1986. *In vitro* propagation of Japanese persimmon . HortScience 21 (4) : 1205 – 1207 .

Sunchez , M. C. ; A. M. Vieitez. 1991. In *vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut . Tree Physiol. 8 : 59 – 70 .

Sunchez , M. C. ; M. C. San – Jose ; A. Ballester , A. M. Vieitez. 19%. Reqi[redacted]ts for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derided from mature trees. Tree Physiology , 16 : 673 – 680 .

Sunchez , M. C. ; A. Ballester ; A. M. Vieitez . 1997. Rienvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnuts trees. Ann. Sci. For. 54 : 359 – 370 .

Sunchez , M. C. ; M. C. San Jose ; E. Ferro ; A. Ballester ; A. M. Vieitez . 1997. Improving micropropagation conditions for adult – phase shoot of chestnut . J. Hort. Sci. 72 : 433 – 443 .

Vidal , N. ; A. Ballester ; A. M. Vieitez ; C. Kevers and Th. Gasper. 1994. Biochemical characteristics of chestnut shoots related to *in vitro* multiplication and rooting capacities. Adv. Hort. Sci. 8 : 19 – 24.

Vieitez , A. M. ; M. L. Gonzalez and E. Vieitez. 1978. *In* vitro culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill. Sci Hort. 8 : 243 – 247.

Vieitez , A. M. ; M . Vieitez. 1980. Culture of chestnut shoot from buds *in vitro*. J. Hort. Sci. 55 : 83 – 84.

Vieitez. A. M. ; F. Pintos ; M. C. San Jose ; A. Ballester. 1993. In *vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvelnile and mature *Quercus rubra* L. . Tree Physiol. 12: 107 – 117.

Vieitez ,A. M. ; M. C. Sunchez ; J. B. Amo – Macro ; A. Ballester. 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* tree for micropropagation. Plant Cell , Tiss. Org. Cult 37 : 287 – 295.

Vieitez , F. J. ; M. C. San Jose ; A Ballester , A M. Vieitez. 1990. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut . J. Plant Physiol. 136 : 253 – 256.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Wang , P. and G. Yang. 2003. *In vitro* shoot proliferation of American chestnut. 13 th Biennial Research Symposium , Association of Research Directors , Inc.

Xing, Z. ; W. A. Powell and C. A. Maynard. 1996. Mature somatic embryos of American chestnut from ovule culture. *In vitro* Cell. Dev. Bio. 32 ; 70 – 71A.

_____. 1999. Development and germination of American chestnut somatic embryos . Plant Cell , Tissue and Organ C u b . 57 (1) : 47 – 55 .

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล	**นางสาวทัศนีย์ ศิริวรรณ**
วัน เดือน ปีเกิด	22 ธันวาคม 2494
ภูมิลำเนา	**อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี**
การศึกษา	**พ.ศ. 2516 ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน**
	พ.ศ. 2522 ระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) สาขาส่งเสริมการเกษตร
การทำงาน	**พ.ศ. 2518 – 2547 อาจารย์สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม**
การวิจัย	**พ.ศ. 2522 การศึกษาผลกระทบของการใช้น้ำชลประทาน ที่มีผลต่อการยอมรับวิทยาการเกษตรแผนใหม่ในการทำนา ของเกษตรกรในเขตชลประทานพิษณุโลก**
	พ.ศ. 2525 การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์และการปลูกมะขามหวานในจังหวัดเพชรบูรณ์ (ร่วมวิจัย)
	พ.ศ. 2533 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการยอมรับการเลี้ยงโคนมของเกษตรกร จังหวัดพิษณุโลก
	พ.ศ. 2537 การขยายพันธุ์กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
	พ.ศ. 2539 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
	พ.ศ. 2543 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชม
	พ.ศ. 2544 การเจริญเติบโตและผลผลิตกล้วยน้ำว้า "มะลิอ่อง" ที่ปลูกด้วยต้น จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหน่อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University