การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและซัสเพนชันจากใบอ่อนของต้นกล้าสะเดาเทียม [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs.]

Plant Regeneration from Embryogenic Callus and Suspension Derived from Young Leaf of Neem Trees Seedling [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs.]

อรอุมา รุ่งน้อย

On-uma Rungnoi

เลขหมู่ QK925 .015 2539 ฉ.2

Order Key 28991

Bib Key 96949

21 ก.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2539

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและซัสเพนชันจากใบอ่อนของต้นกล้าสะเดาเทียม [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs.]

ผู้เขียน นางสาวอรอุมา รุ่งน้อย

สาขาวิชา พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ สันติประชา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและซัสเพนชันจากใบอ่อนของต้นกล้าสะเดาเทียม [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs.]

ผู้เขียน นางสาวอรอุมา รุ่งน้อย

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงส่วนใบอ่อนอายุ 7 10 และ 14 วัน ของต้นกล้าสะเดาเทียมโดยใช้ชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ ชิ้นส่วนแผ่นใบที่ไม่มีเส้นกลางใบ และชิ้นส่วนก้านใบเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การเพิ่มปริมาณและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ในขณะเดียวกันย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน จากนั้นศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกัน จากการศึกษาพบว่า ชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีและไม่มีเส้นกลางใบให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) เติม 1-naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin (KN) เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ การเพิ่มปริมาณและรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้จากการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทุก 3 สัปดาห์ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 6-benzyladenine (BA) เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันพบว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร Schenk และ Hildebrandt (SH) เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ โดยย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอสูงสุด การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสประสบความสำเร็จในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.53-1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3-5 ไมโครโมลาร์ การเพิ่มจำนวนยอดรวมได้สูงสุดในอาหารสูตร MS เติม NAA

เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร การชักนำการเจริญเติบโตของยอดได้ผลดีในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ การชักนำรากได้ผลในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ เติม indole-3-butyric acid (IBA) เข้มข้น 10-15 ไมโครโมลาร์ โดยวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และย้ายไปวางเลี้ยงในที่มีแสงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ การชักนำการสุกแก่ของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันประสบผลสำเร็จในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ชักนำการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอได้ในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วย้ายไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ เติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงในที่มืด 1 สัปดาห์ และย้ายไปเลี้ยงในที่มีแสงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

Thesis Title	Plant Regeneration from Embryogenic Callus and Suspension Derived from Young Leaf of Neem Trees Seedling [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs.]
Author	Miss On-uma Rungnoi
Major Program	Plant Science
Academic Year	1995

ภาควิชา พืชสวน คณะเกษตร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ได้รับมอบ
21 ก.ค. 2543

Abstract

Culturing of young leaf 7, 10 and 14 days old explants of neem trees seedling using leaf blade with and without midrib and petiole were investigated. The embryogenic callus was cultured on various media and plant growth regulators in order to proliferation and maintenance. The embryogenic calli were also transferred to the liquid medium for induction of embryogenic suspension. Regeneration of embryogenic callus and embryogenic suspension were carried out by transferring the callus and somatic embryo to various media supplemented with various types and concentrations of plant growth regulators.

The results showed that leaf blade with and without midrib cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 10 μM 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 μM kinetin (KN) gave the best embryogenic callus induction. Proliferation and maintenance of the callus were regularly subcultured at 3 week intervals in MS medium supplemented with 10 μM NAA and 1μM KN or 0.5-1.0 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2 μM benzyladenine (BA). Culturing of embryogenic suspension were regularly subcultured at 2 week intervals in liquid Schenk and Hildebrandt (SH) medium supplemented with 0.5 μM 2,4-D and 2 μM BA gave the best number of somatic embryo. Plant regeneration from the callus to embryoids were obtained in MS medium supplemented with 0.53-1 μM NAA and 3-5 μM BA. The greatest

number of shoots induction was obtained in MS medium supplemented with 0.1 μM NAA, 2 μM BA and 500 mg/l casein hydrolysate. A healthy growth of the shoots was in SH medium supplemented with 0.1 μM NAA and 2 μM BA. Root induction could be cultured in 1/2 MS medium supplemented with 10-15 μM indole-3-butyric acid (IBA) by culturing in the dark for 1week followed in the light for 3 weeks. Maturation of embryogenic suspension was induced by plating them on SH medium supplemented with 0.1 μM and NAA and 2 μM BA. Germination of the embryoid was induced on SH medium supplemented with 0.1 μM NAA 2 μM BA and 500 mg/l casein hydrolysate and transfered culture in the dark in 1/2 MS medium supplemented with 15 μM NAA for 1week followed in the light for 2 weeks.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี กรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลภ สันติประชา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำการทำวิจัย การเขียน และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อ อาจารย์วิทยา วนาภิชิต อาจารย์ยืนยง วาณิชณ์ปกรย์ ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สำนัก งานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีการศึกษา 2536-2537 และได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประจำปีการศึกษา 2537

อรอุมา รุ่งน้อย

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	16
2. วิธีการวิจัย	
วัสดุ	17
อุปกรณ์	18
วิธีการ	20
3. ผล	27
4. วิจารณ์	60
5. สรุป	74
เอกสารอ้างอิง	76
ภาคผนวก	85
ประวัติผู้เขียน	91

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน	28
2	ความสามารถในการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบอายุ 7 10 และ 14 วัน ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	30
3	อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนแผ่นใบในอาหารสูตร MS	32
4	อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตร MS	44
5	ผลของน้ำมะพร้าวต่อการชักนำยอดรวมและการเจริญของยอดในอาหารสูตร MS 47	46
6	อิทธิพลของความเข้มข้นของ NAA และ BA ต่อความสามารถในการชักนำยอดรวมและการเจริญของยอดในอาหารสูตร MS	47
7	ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มยอดรวมและการเจริญของยอด (อาหารแต่ละสูตรเติม 50 NAA เข้มข้น 0.1 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 และ 3 ไมโครโมลาร์)	51
8	ผลของสูตรอาหารต่อการเกิดยอดรวมและการเจริญของยอด (อาหารแต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร)	52
9	ความสามารถในการชักนำรากจากต้นที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารสูตรสูตร 1/2 MS เติม IBA เข้มข้น 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์	57
10	ผลของสูตรอาหารต่อความสามารถในการเกิดรากจากต้นที่ได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหาร 4 สูตร แต่ละสูตรเติม IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์	58
11	การชักนำรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอในอาหารสูตร 1/2 MS	58

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ชิ้นส่วนใบอ่อนอายุ 7 10 และ 14 วัน ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	29
2	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบอ่อนซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	33
3	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 ระดับความเข้มข้น ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์	34
4	ชิ้นส่วนใบอ่อนที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS WPM MH และ SH แต่ละสูตร เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	35
5	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลาต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ	36
6	ผลของสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ และการเจริญของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน	38
7	ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำในอาหารเหลวสูตร SH เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ	39
8	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์	40
9	ผลของระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงต่อจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ	41
10	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารเพื่อชักนำพืชต้นใหม่ในอาหารเติมไซโตไคนินต่างกัน	43
11	พืชต้นใหม่จากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตรต่าง ๆ เติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์	49
12	ลักษณะของยอดในอาหารสูตร MS WPM MH และ SH แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์	50
13	ลักษณะของยอดรวมและความสูงยอดในอาหารสูตร MS WPM MH และ SH แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น	50

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
	2 ไมโครโมลาร์	
14	โซมาติคเอ็มบริโอในเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเมื่อวางเลี้ยงในอาหารแข็ง	54
15	โซมาติคเอ็มบริโอในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	55
16	รากจากต้นที่ชักนำจากยอดที่พัฒนาจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตร 1/2 MS เติม IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์	59
17	รากจากต้นที่ชักนำจากโซมาติคเอ็มบริโอในอาหารสูตร 1/2 MS เติม NAA เติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์	59

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ABA	=	abscisic acid
BA	=	6-benzyladenine
BAP	=	6-benzylaminopurine
B5	=	Gamborg medium
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
GA3	=	gibberellic acid
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	indole-3-butyric acid
KN	=	kinetin
LS	=	Linsmaier and Skoog medium
MH	=	Medium for Hevea
MS	=	Murashige and Skoog medium
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
NN	=	Nitsch and Nitsch medium
2-iP	=	2-isopentenyl adenine
PVP	=	polyvinylpyrroridone
SH	=	Schenk and Hildebrandt medium
WPM	=	woody plant medium
ZEA	=	zeatin

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันประเทศไทยกำลังประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนไม้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากพื้นที่ป่าไม้ลดลงอย่างรวดเร็วอันเกิดจากการตัดไม้ทำลายป่าของมนุษย์ ตลอดจนการเพิ่มขึ้นของประชากรทำให้มีการบุกรุกพื้นที่ป่าเพิ่มมากขึ้นเพื่อใช้เป็นที่ทำกินและที่อยู่อาศัย จากข้อมูลดาวเทียม ปี 2534 ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าไม้เหลือเพียง 85.43 ล้านไร่ คิดเป็น 26.64 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ประเทศ จึงจำเป็นที่จะต้องรักษาป่าเดิมที่มีอยู่และปลูกป่าใหม่เพิ่มเติมขึ้นอีก 13.36 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นเนื้อที่ประมาณ 42.85 ล้านไร่ จึงจะได้พื้นที่ป่าของประเทศครบ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามเป้าหมายของคณะกรรมการนโยบายป่าไม้แห่งชาติ (กรมป่าไม้, 2536ก) จากการขาดแคลนไม้ดังกล่าวทำให้ประเทศไทยต้องสั่งไม้เข้าจากต่างประเทศ เช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย สาธารณรัฐสังคมนิยมสหภาพพม่า ลาว เวียดนาม และกัมพูชา รัฐบาลจึงต้องเสียเงินตราให้ต่างประเทศเป็นจำนวนมากจากการสั่งไม้เข้าประเทศมีปริมาณสูงขึ้นทุกปี และนับวันความต้องการก็ยิ่งมีสูงขึ้น (สุทัศน์ จูงพงศ์ และไววิทย์ บูรณธรรม, 2536) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องเร่งดำเนินการปลูกสร้างสวนป่าเพื่อลดปัญหาการขาดแคลนไม้ดังกล่าว โดยใช้พันธุ์ไม้ที่มีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่และเป็นพันธุ์ไม้ที่โตเร็ว ใช้ได้ตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไป และใช้ประโยชน์ได้หลายวัตถุประสงค์คุ้มค่ากับการลงทุน ในปัจจุบันพันธุ์ไม้ที่เป็นไม้เศรษฐกิจได้รับความสนใจจากเกษตรกรอย่างมากคือสะเดาเทียม ซึ่งเป็นไม้พื้นเมืองที่ขึ้นง่าย โตเร็ว และสามารถใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างดี ตลอดจนเป็นอาชีพที่มั่นคงและเพิ่มรายได้อีกทางหนึ่ง เนื่องจากสะเดาเทียมเป็นพันธุ์ไม้โตเร็วดูแลรักษาง่าย และมีคุณสมบัติของเนื้อไม้ที่แข็งแรง มีลวดลายสวยงาม รวมทั้งให้ผลตอบแทนต่อไร่สูงมาก (กรมป่าไม้, 2536ข)

สะเดาเทียมมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs. เป็นพันธุ์ไม้ที่จัดอยู่ในตระกูลเดียวกับสะเดาไทยหรือสะเดาบ้าน *A. indica* var.

siamensis Valuton. และสะเดาอินเดีย *A. indica* A. Juss. ลักษณะโดยทั่วไปของสะเดาเทียมมีลำต้นตรง เปลือกเรียบเมื่ออายุยังน้อย เมื่ออายุมากขึ้นเปลือกจะแตกล่อนเป็นแผ่น โคนต้นเป็นพูพอนเล็กน้อย เนื้อไม้มีเสี้ยนตรงสีน้ำตาลแดง ใบเป็นรูปช่อแบบขนนก ใบย่อยรูปหอก แก้มใบมน ฐานใบบิดเบี้ยวไม่เท่ากัน ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อยยกเว้นขณะที่ยังเป็นต้นกล้าขอบใบจะหยักเป็น ฟันเลื่อย ใบหนาเกลี้ยงและมีสีเขียวเป็นมัน ดอกมีสีขาวอมสีเขียวอ่อนและเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ผลเป็นรูปรีผลอ่อนสีเขียว ถ้ากรีดดูมีน้ำยางสีขาวไหลออกมา เมื่อแก่ผลจะมีสีเหลือง (วรรณลาภ โพธิชัย, 2536)

ถิ่นกำเนิดของสะเดาเทียมยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าน่าจะนำเข้ามาจากต่างประเทศ เนื่องจากมีการกระจายพันธุ์อยู่ในแถบหมู่เกาะสุมาตรา ประเทศมาเลเซีย หมู่เกาะบอร์เนียว ประเทศฟิลิปปินส์ หมู่เกาะนิวกินี และหมู่เกาะฮารู ประเทศอินโดนีเซีย (วรรณลาภ โพธิชัย, 2536) สำหรับประเทศไทยพบสะเดาเทียมทั่วไปในภาคใต้ ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงมา (สมปอง ทองดีแท้, 2536) โดยพบมากที่จังหวัดตรัง พัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราช ส่วนมากพบปะปนกับไม้ป่าอื่น ๆ ซึ่งโดยธรรมชาติแล้วพบว่าสะเดาเทียมสามารถขึ้นได้ดีในพื้นที่มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 600-1,400 มิลลิเมตรต่อปี และมีช่วงแล้งไม่ยาวนานเกินไป ส่วนดินที่สะเดาเทียมสามารถเจริญเติบโตได้คือดินร่วนปนทราย แต่ก็พบขึ้นได้ในดินเกือบทุกชนิดทุกประเภทแม้แต่ในดินลูกรัง (กรมป่าไม้, 2536ข)

ปัจจุบันความต้องการใช้ประโยชน์จากสะเดาเทียมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปลูกสร้างบ้านเรือน และการนำไปใช้ในการปลูกสร้างสวนป่าในบริเวณที่เป็นป่าเสื่อมโทรม หรือการทำธุรกิจในการปลูกสร้างสวนสะเดาเทียมเชิงพาณิชย์ขนาดใหญ่มีสูงมาก แต่มักประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนต้นกล้า เนื่องจากสะเดาเทียมผลิตเมล็ดได้เพียงปีละครั้งและมีการติดเมล็ดน้อยมาก (สมปอง ทองดีแท้, 2536) นอกจากนี้แล้วเมล็ดยังมีการเสื่อมสภาพได้ง่ายในเวลาอันรวดเร็ว (วรรณลาภ โพธิชัย, 2536) จึงเป็นอุปสรรคในการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด การพัฒนาแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นสิ่งที่สามารถแก้ปัญหาได้ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์พืชได้ในปริมาณมาก และเป็นการเพิ่มศักยภาพสำหรับโครงการปลูกป่าทดแทนป่าที่ถูกโค่นหรือถูกไฟไหม้ให้สูงขึ้น วิธีการดังกล่าวนำมาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ตามวิธีการปกติได้ยาก หรือมีปัญหาในการขยายพันธุ์ เช่น ติดเมล็ดน้อย และเมล็ดมีอัตรา

การงอกต่ำ (Paques, 1986 อ้างโดย Lelu *et al.*, 1994) การนำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้กับงานการปลูกสร้างสวนป่า ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคตนั้นจัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และย่นระยะเวลาในการดำเนินการ ทั้งนี้นอกจากจะสามารถขยายพันธุ์สะเดาเทียมได้ในปริมาณมากแล้ว ยังให้ต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ การผลิตกล้าสามารถกระทำได้ตลอดฤดูกาลในขณะที่การปลูกโดยอาศัยเมล็ดจะทำได้เพียงปีละครั้งเท่านั้น

ตรวจเอกสาร

1. การชักนำแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มโดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ โดยทั่วไปแบ่งแคลลัสออกเป็น 2 ประเภทคือ แคลลัสที่มีโครงสร้างแน่นทึบ (compact callus) และแคลลัสที่มีโครงสร้างร่วนเปราะ (friable callus) (สมปอง เตชะไต, 2536)

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หมายถึง แคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีความตื่นตัวสูง ภายในเซลล์ประกอบด้วยนิวเครียสที่มีขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมมีความเข้มข้นสูง มีเม็ดแป้ง (starch grains) จำนวนมาก และแวคคิวโอลมีขนาดเล็ก (Cheema, 1989)

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสคือ ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต

Orunstrup และคณะ (1993) รายงานว่าโดยปกติแล้วเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมักถูกชักนำจากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ยังอ่อนอยู่ และมีความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ได้แก่ ไซโกติคเอ็มบริโอ ใบเลี้ยง ใบอ่อน ช่อดอกอ่อน และก้านดอก จากการทดลองของ Son และ Hall (1990) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ลำต้น และรากของ *Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx. สามารถชักนำแคลลัสได้แตกต่างกันโดยชิ้นส่วนใบสามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด Vargas-Zamora (1992) รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนที่มีเส้นกลางใบ ชิ้นส่วนใบอ่อนที่ไม่มีเส้นกลางใบ ชิ้นส่วนฐานใบ และชิ้นส่วนจากลำต้นของ Petroleum nut tree (*Pittosporum resiniferum* Hemsl.) พบว่าชิ้นส่วนที่มีและไม่มีเส้นกลางใบนั้น สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้มากกว่าชิ้นส่วนอื่น ๆ Robacker (1993) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบอ่อน และก้านใบขององุ่นมัสคาดีน พบว่าชิ้นส่วนก้านใบสามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนแผ่นใบ Subbaiah และ Minocha (1990) รายงานว่าชิ้นส่วนใบและลำต้นของ *Eucalyptus camaldulensis* สามารถชักนำแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน

สูตรอาหารมีผลต่อความสำเร็จในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้แตกต่างกัน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดใดนั้นมีความจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสม สำหรับสูตรอาหารชักนำแคลลัสนั้นต้องการธาตุอาหารที่เพียงพอ โดยเฉพาะธาตุอาหารในรูปของแอมโมเนียมอิออนและไนเตรทอิออน ซึ่งเนื้อเยื่อพืชต้องการใช้

ในการชักนำแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัส (Sinha and Mallick, 1991 อ้างโดย Yan-Xiu *et al*, 1993) จากการทดลองชักนำโซมาติคเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนคัพภะของ *Ocotea catharinensis* ในอาหาร 3 สูตรคือ woody plant mediun (WPM), Murashige และ Skoog (MS) และ Gamborg (B5) อาหารแต่ละสูตรเติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 362 ไมโครโมลาร์ และผงถ่านเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัสได้แตกต่างกัน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสคือสูตร MS ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอคือสูตร WPM (Moura-Costa *et al.*, 1993) ความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS มีรายงานในพืชหลายชนิด ได้แก่ การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากรังไข่ของ Eastern white pine (*Pinus strobus* L.) (Finer *et al.*, 1989) การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากคัพภะอ่อนของ *Eucalyptus citriodora* (Muralidharan and Mascarenhas, 1987) การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของ *Populus ciliata* (Cheema, 1989) และการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนของ Petroleum nut tree (*Pittosporum resiniferum* Hemsl.) (Vargas-Zamora, 1992) โดยทั่วไปแล้วสูตร MS เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสเนื่องจากมีองค์ประกอบของธาตุไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมอิออนและไนเตรทอิออนในระดับสูง ซึ่งเนื้อเยื่อพืชต้องการใช้ในการชักนำแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัส (Sinha and Mallick, 1991 อ้างโดย Yan-Xiu *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตามมีพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสในอาหารสูตรอื่น ๆ ดังเช่น การทดลองของ Gautam และคณะ (1993) ชักนำแคลลัสจากอับละอองเกสรของสะเดาอินเดียในอาหาร 2 สูตร คือสูตร MS และ Nitsch และ Nitsch (NN) พบว่าสูตร NN เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสมากกว่าสูตร MS

สารควบคุมการเจริญเติบโตมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำแคลลัส โดยเฉพาะสารในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งต้องมีอัตราส่วนที่สมดุลต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัส (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) นอกจากนี้แล้วชนิดของไซโตไคนินที่ใช้ร่วมกับออกซินก็มีผลต่อความสามารถในการชักนำหรือการเพิ่มปริมาณแคลลัส และลักษณะทางสัณฐานของโซมาติคเอ็มบริโอที่ได้ (Bhansali *et al.*, 1990) จากการทดลองของ Gautam และคณะ (1993) พบว่า การชักนำแคลลัสจากอับละอองเกสรของสะเดาอินเดีย

ประสบความสำเร็จในอาหารเติม indole-3-acetic acid (IAA) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 6-benzyladenine (6-BA) เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือ 1-naphthalene acetic acid (NAA) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin (KN) เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ polyvinylpyrroridone (PVP) เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ การเติมออกซินเพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ หรือชักนำแคลลัสได้น้อยมาก ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับการใช้ไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ 2,4-D ให้ผลในการชักนำแคลลัสต่ำมาก อย่างไรก็ตามมีพืชหลายชนิดที่ประสบผลสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากการใช้ 2,4-D จากการทดลองของ Bhansali และคณะ (1990) พบว่าการชักนำแคลลัสจากใบเลี้ยงของ *Prunus persica* L. ในอาหารเติม 2,4-D ให้ปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมากกว่าการวางเลี้ยงในอาหารเติม NAA การใช้ 2,4-D สามารถเพิ่มปริมาณและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้นานกว่า 10 เดือน เมื่อย้ายเลี้ยงทุก 20 วัน อย่างไรก็ตามการใช้ NAA ให้พัฒนาการของโซมาติคเอ็มบริโอที่เป็นปกติมากกว่าการใช้ 2,4-D Kumar (1992a) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของ *Bauhinia purpurea* ประสบผลสำเร็จเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำแคลลัส และแคลลัสบางส่วนมีรากเกิดขึ้น การย้ายเลี้ยงแคลลัสในอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.5-10 ไมโครโมลาร์ กระตุ้นให้เกิดรากเพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของแคลลัสสูงสุดเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติม NAA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่อาหารเติม KN เข้มข้น 0.5-40 ไมโครโมลาร์ กระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอเจนีซีสที่ผิวของแคลลัส Kumar (1992b) รายงานการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของ *Thevetia peruviana* ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 4.6 ไมโครโมลาร์ การใช้ 2,4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 4.6 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้การเพิ่มปริมาณของแคลลัสและการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 22.5 ไมโครโมลาร์ ทำให้แคลลัสไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ โซมาติคเอ็มบริโอมีการพัฒนาดีเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารที่มีไซโตไคนินความเข้มข้นสูง (KN เข้มข้น 9.26 ไมโครโมลาร์ หรือ 2-isopentenyl adenine (2-iP) เข้มข้น 5.55 ไมโครโมลาร์) และความเข้มข้นของออกซินต่ำ (2,4-D เข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์)

2. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเป็นการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเหลวภายใต้การเขย่าเลี้ยงเพื่อให้เซลล์มีการกระจายตัวในอาหารเหลว เซลล์ในอาหารเหลวได้รับธาตุอาหารและอากาศเพียงพอในปริมาณที่เท่ากัน ดังนั้นเซลล์ทุกเซลล์มีการพัฒนาที่เหมือนกันพัฒนาการไปในทิศทางเดียวกัน (สมปอง เตชะโต, 2536) สามารถผลิตโซมาติคเอ็มบริโอได้อย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา โซมาติคเอ็มบริโอที่ได้มีความแข็งแรงและเจริญเติบโตเร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง นอกจากนี้แล้วยังสามารถรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน (Finer and Nagasawa, 1988)

สิรนุช ลามศรีจันทร์ และคณะ (2536) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของถั่วเหลืองในอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม 2,4-D เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลูตามีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณและขนาดของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้ บางส่วนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลุดออกได้โซมาติคเอ็มบริโอเดี่ยว ๆ การเพิ่มปริมาณและขนาดของเอ็มบริโอกระทำโดยการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ สามารถเลี้ยงติดต่อกันในอาหารเหลวได้นาน 5-6 เดือน Finer และ Nagasawa (1988) พบว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของถั่วเหลืองประสบผลสำเร็จเมื่อวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 20-50 มิลลิกรัม ในอาหารเหลวปริมาตร 35 มิลลิลิตร เติม 2,4-D เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลูตามีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ หรือแอสพาราจีนเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ สามารถชักนำกลุ่มเซลล์ขนาด 4 มิลลิเมตร และโซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปกลม (globular stage) จำนวนมาก จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอได้ 35 เท่า ให้โซมาติคเอ็มบริโอที่แข็งแรงและเจริญเติบโตรวดเร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง Arias-Castro และคณะ (1993) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Glycyrrhiza glaber* ในอาหารสูตร B5 เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกันไม่ว่าเลี้ยงในสภาพที่มีแสงหรือในที่มืด และระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงคือ 2 สัปดาห์ เพราะเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด

Langezaal และ Scheffer (1992) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ Hop (*Humulus lupulus* L.) ได้ผลดีในอาหารสูตร B5 และ MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร SH มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง Orunstrup และคณะ (1993) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Exacum affine* ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.089 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถชักนำโซมาติคเอ็มบริโอได้ ในขณะที่อาหารปราศจาก 2,4-D สามารถชักนำโซมาติคเอ็มบริโอได้ Sharma และคณะ (1993) รายงานการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Datura innoxia* Mill. ว่าได้ผลดีในอาหารสูตร Linsmaier และ Skoog (LS) เติม 2,4-D เข้มข้น 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติคเอ็มบริโอได้หลังจากเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โซมาติคเอ็มบริโอที่ได้อยู่ในระยะรูปกลม รูปหัวใจ และรูปตอร์ปิโด และพบว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันสูญเสียศักยภาพในการผลิตโซมาติคเอ็มบริโอหลังจากย้ายเลี้ยงได้ 7 ครั้ง Taylor และคณะ (1992) ได้เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของอ้อยในอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมามาก จึงควรเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3-4 วัน เพื่อลดการสะสมสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์และเพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการปรับตัวในอาหารเหลวดีขึ้น de Touchet และคณะ (1991) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 80 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 4-6 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้ 4 เท่า ภายในระยะเวลา 1 เดือน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่พัฒนามีขนาดเล็กกว่า 0.1-2.5 มิลลิเมตร Subbaiah และ Minocha (1990) รายงานการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Eucalyptus tereticornis* ในอาหารสูตรดัดแปลง WPM หรือ B5 เติม NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ว่าไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่ประสบผลสำเร็จในอาหารสูตร B5 เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มืดหรือให้แสง ย้ายเลี้ยงทุก 15 วัน เพื่อลดอันตรายที่เกิดจากการสะสมสารประกอบฟีนอล

Vieitez และคณะ (1992) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Fagus sylvatica* L. ในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้นสูง (2.26 ไมโครโมลาร์) ได้เซลล์เดี่ยวๆ สูง โซมาติคเอ็มบริโอที่มีขนาดเล็ก และไม่เกิดกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ แต่ถ้าหากเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ (0.22-0.45 ไมโครโมลาร์) ได้โซมาติคเอ็มบริโอที่มีขนาดใหญ่และเกิดกลุ่มเซลล์ที่มีโครงสร้างแน่นทึบจำนวนมาก Cheema (1989) รายงานการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Populus ciliata* ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.2 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ประกอบด้วยเซลล์เดี่ยว ๆ และ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก ส่วนการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ (0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ การดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันกระทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร การลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงส่งเสริมให้โซมาติคเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาจากระยะรูปกลมเข้าสู่ระยะรูปตอร์ปิโดได้เป็นผลสำเร็จ

ระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงมีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน โดยปกติแล้วการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันแบ่งออกได้ 3 ช่วงคือ ช่วงแรกเป็นระยะที่เซลล์เตรียมดูดธาตุอาหารเพื่อกิจกรรมการแบ่งเซลล์ เรียกระยะนี้ว่า แลคเฟส หลังจากนั้นเป็นระยะที่เซลล์แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เรียกระยะนี้ว่า ล็อคเฟส เลยระยะนี้ไปการแบ่งเซลล์หยุดลงเพราะมีธาตุอาหารจำกัด เรียกระยะนี้ว่า สเตชันนารีเฟส มาถึงระยะนี้ต้องมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ (สมปอง เตชะโต, 2536) ในทำนองเดียวกันนี้ Taylor และคณะ (1992) พบว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของอ้อยสามารถแบ่งการเจริญเติบโตออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะแรกเป็นช่วงที่แคลลัสมีการปรับสภาพเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งใช้เวลา 2-3 สัปดาห์ ระยะที่ 2 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5-8 สัปดาห์ เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเมื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10-14 สัปดาห์ เป็นช่วงที่การเจริญเติบโตของเซลล์คงที่และเริ่มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป ดังนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 จึงควรเปลี่ยนอาหารใหม่

3. การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสไปเป็นต้นอ่อนหรือยอดต้องการธาตุอาหารลดลง ในบางครั้งต้องเปลี่ยนรูปธาตุอาหารที่ใช้ เช่น เปลี่ยนรูปของแอมโมเนียมไนเตรทเป็นโปแตสเซียมไนเตรท นอกจากนี้ต้องลดความเข้มข้นของออกซินลงหรือไม่ใช้เลย ร่วมด้วยการเติมไซโตไคนินและสารประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต เช่น น้ำมะพร้าว เคซีนไฮโดรไลเสท กรดแคสอะมิโน และอะดีนีนซัลเฟต เป็นต้น

Gautam และคณะ (1993) ชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของสะเดาอินเดียในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.53 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ การเติม PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ ลงในอาหารสูตรดังกล่าว ประสบผลสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่ได้ในสัปดาห์ที่ 7-8 หลังจากวางเลี้ยง อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนยอดที่ได้ต่ำ (13 เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่วางเลี้ยง) และยอดมีลักษณะแคระแกร็น การย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม GA_3 เข้มข้น 0.34 ไมโครโมลาร์ ช่วยให้ยอดมีการเจริญมากกว่า 1.5 เซ็นติเมตร Cheema (1989) ชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Populus ciliata* ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร Son และ Hall (1990) พบว่าการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น และรากของ *Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx. ในอาหารเติม BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ หรือ IBA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2-iP และ zeatin เข้มข้นอย่างละ 22.5 ไมโครโมลาร์ แคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นมีอัตราการสร้างยอดรวมเฉลี่ย 7 ยอดต่อชิ้นส่วน แคลลัสจากชิ้นส่วนใบมีอัตราการสร้างยอดรวมเฉลี่ย 11 ยอดต่อชิ้นส่วน และแคลลัสชิ้นส่วนรากมีอัตราการสร้างยอดรวมเฉลี่ย 8 ยอดต่อชิ้นส่วน

ในบางครั้งพบว่าการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสในอาหารเติมออกซินร่วมกับไซโตไคนินให้ผลในการชักนำพืชต้นใหม่ต่ำแต่ได้ผลดีเมื่อวางเลี้ยงในอาหารที่เติมไซโตไคนินพียงอย่างเดียว Kumar (1992a) ชักนำพืชต้นใหม่ของ *Bauhinia purpurea* โดยการวางเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 0.5-10 ไมโครโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุดเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติม KN เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดได้ 4-6 ยอดต่อแคลลัส การใช้ KN เข้มข้น

มากกว่า 5 ไมโครโมลาร์ ยับยั้งการพัฒนาของยอดจากแคลลัส การใช้ NAA ร่วมกับ KN ทำให้ความสามารถในการชักนำต้นลดลง ส่งเสริมการสร้างแคลลัส Bhansali และคณะ (1990) ประสบผลสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของ *Prunus persica* L. โดยการวางเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Kyung-Hwan และคณะ (1993) รายงานการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของ *Robinia pseudocacia* L. ได้ผล 6.03 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติม BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ Wakhlu และคณะ (1990) พบว่าการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของ *Bunium persicum* Boiss. ได้ผลดีในอาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเติมสารอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต เช่น น้ำมะพร้าว และเคซีนไฮโดรไลเสท มีผลส่งเสริมความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่ Muralidharan และคณะ (1989) ชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Eucalyptus tereticornis* ในอาหารสูตรดัดแปลง WPM เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 15 ยอดต่อแคลลัส Sinha และ Mallick (1991) ชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของ *Sesbania bispinosa* ในอาหารสูตร MS เติม BAP หรือ KN และน้ำมะพร้าวระดับความเข้มข้นต่าง ๆ การชักนำยอดได้ผลดีที่สุดในอาหารเติม BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ชักนำตายอดได้ 14 ยอดต่อแคลลัส และชักนำยอดที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร ได้ 6 ยอดต่อแคลลัส สำหรับการส่งเสริมความยาวของยอดทำได้โดยการย้ายเลี้ยงในอาหารที่ลดความ เข้มข้นของ BAP ลงเป็น 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหารดังกล่าวยังช่วยเพิ่มปริมาณยอดจากแคลลัสได้ด้วย การใช้ KN เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ชักนำยอดรวมได้ 5 ยอดต่อแคลลัส และชักนำยอดที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตรได้ 2.44 ยอดต่อแคลลัสเท่านั้น

อย่างไรก็ตามมีพืชหลายพืชที่ประสบความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต Muralidharan และคณะ (1989) พบว่าการชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Eucalyptus citriodora* ได้ผลดีในอาหารสูตร Bs ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต Bourgkard และ Favre (1988) ประสบความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ของ *Sequoia sempervirens* ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โซมาติคเอ็มบริโอที่ได้มีการพัฒนาเหมือนกับต้นที่ได้จากคัพภะซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ Gingas (1991) พบว่า การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของ *Quercus bicolor* Willd. และ *Q. rubra* L. ได้ผล 20 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต Merkle และ Watson-Pauley (1993) พบว่า การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของ Bigleaf magnolia (*Magnolia macrophylla* Michx.) ได้ผลดีในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

4. การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

การชักนำการสุกแก่และการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันขึ้นกับประเภทของอาหารเลี้ยงว่าเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว องค์ประกอบของธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และสารเติมอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำตาล เคซีนไฮโดรไลเสท และโพรลีน (Dalton and Thomas, 1992) นอกจากนี้แล้วยังขึ้นกับขนาดของโซมาติคเอ็มบริโอ (Orunstrup *et al.*, 1993)

สิรนุช ลามศรีจันทร์ และคณะ (2535) รายงานการชักนำการสุกแก่และการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของถั่วเหลืองในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซมาติคเอ็มบริโอมีการเพิ่มขนาดและพัฒนาเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ การชักนำการงอกเป็นไปได้ดีในอาหารเติม NAA Finer และ Nagasawa (1988) พบว่าการชักนำการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของถั่วเหลืองได้ผลในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่โซมาติคเอ็มบริโอที่งอกไม่มีใบเลี้ยงเหมือนกับการงอกของคัพภะ คงมีการเจริญของไฮโปคอทิลต้น และรากได้ดี Chee และ Cantliffe (1988) รายงานว่า การชักนำการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของมันเทศประสบผลสำเร็จในอาหารที่ปราศจากออกซินในสูตรอาหารดังกล่าวส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอจากระยะรูปกลม เข้าสู่ระยะที่มีการขยายไฮโปคอทิล และเกิดรากขึ้น Hakman และ Fowke (1987) รายงานการชักนำการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ White spruce (*Picea glauca*) ว่าเป็นไปได้ง่ายในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โซมาติคเอ็มบริโอมีการสร้างซัสเพนเซอร์เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งไม่เหมือนกับการงอกของคัพภะ

แต่ลักษณะการงอกเหมือนกับการงอกของสนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่ปกติได้

Orunstrup และคณะ (1993) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Exacum affine* ในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D แต่ไม่สามารถชักนำการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปราศจาก 2,4-D สามารถชักนำการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอได้ และพบว่าโซมาติคเอ็มบริโอขนาดใหญ่ที่กรองผ่านตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร สามารถชักนำการงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โซมาติคเอ็มบริโอที่กรองผ่านตะแกรงขนาด 40 และ 60 ไมโครเมตร งอกได้เพียง 1 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Sharma และคณะ (1993) ชักนำการสุกแก่ของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Datura innoxia* Mill. ในอาหารสูตร LS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.22 ไมโครโมลาร์ และชักนำการงอกโดยการวางเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต de Touchet และคณะ (1991) พบว่าการชักนำการสุกแก่และงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของปาล์มน้ำมันได้ผล 1.8-18.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวางเลี้ยงในอาหารแข็งหรืออาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

Subbaiah และ Minocha (1990) ชักนำการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Eucalyptus tereticornis* ในอาหารสูตรดัดแปลง WPM เติม BA เพียงอย่างเดียว หรือเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำพืชต้นใหม่ภายในเวลา 2 สัปดาห์ Vieitez และคณะ (1992) ชักนำการสุกแก่และการงอกโซมาติคเอ็มบริโอของ *Fagus sylvatica* L. ในอาหารเติมออกซินและไซโตไคนินความเข้มข้นต่ำ ๆ และชักนำการสุกแก่ของโซมาติคเอ็มบริโอได้ โดยภายหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โซมาติคเอ็มบริโอทุกระยะสามารถงอกได้เป็นผลสำเร็จ แต่โซมาติคเอ็มบริโอที่งอกนั้นมีบางเอ็มบริโอที่มีโครงสร้างผิดปกติ การแยกโซมาติคเอ็มบริโอที่สุกแก่จากแคลลัสไปวางเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS และ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่ำ ๆ ชักนำให้โซมาติคเอ็มบริโอพัฒนาใบเลี้ยงขึ้นได้ เมื่อย้ายโซมาติคเอ็มบริโอที่สร้างใบเลี้ยงไปวางเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งเสริมให้โซมาติคเอ็มบริโองอกรากได้ การย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2.2-4.4 ไมโครโมลาร์ และ GA_3 เข้มข้น 0.29 ไมโครโมลาร์ ให้โซมาติคเอ็มบริโอมีการแผ่ขยายใบเลี้ยง มีสีเขียว และงอกได้

40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม พบว่ามักเกิดแคลลัสและโซมาติคเอ็มบริโอใหม่เกิดขึ้นจากบริเวณใบเลี้ยงของโซมาติคเอ็มบริโอเดิม Cheema (1989) ชักนำการสุกแก่และการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Populus ciliata* โดยการเทวางเลี้ยงในอาหารแข็งที่ปราศจาก 2,4-D แต่ไม่สามารถชักนำการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอได้ เนื่องจากโซมาติคเอ็มบริโอบางส่วนที่เกิดรากแล้วตายไปในที่สุด การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D มีผลทำให้เกิดแคลลัสจากโซมาติคเอ็มบริโอ การย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันลงในอาหารแข็งเติม NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอ ให้โซมาติคเอ็มบริโอที่มีรูปแบบแตกต่างกัน ได้แก่ โซมาติคเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาเป็นปกติ (มีทั้งจุดกำเนิดรากและยอด มีการเจริญของไฮโปคอทิล ราก และมีใบเลี้ยง 2 ใบ) โซมาติคเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาเฉพาะส่วนยอด และโซมาติคเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาเฉพาะส่วนราก

5. การชักนำราก

การชักนำรากในขั้นตอนสุดท้ายของการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การชักนำรากนอกหลอดทดลอง และในหลอดทดลอง แต่โดยทั่วไปแล้วการชักนำรากในหลอดทดลองมีอัตราการสร้างรากสูงกว่า และเปอร์เซ็นต์การตั้งตัวเมื่อย้ายปลูกลงดินก็สูงกว่าด้วย (สมปอง เตชะโต, 2536)

Kovac (1993) ชักนำรากนอกหลอดทดลองของ *Actinidia kolomikta* โดยการจุ่มแช่โคนยอดในสารละลาย IBA หรือ NAA แล้วนำไปปลูกลงในวัสดุปลูกระหว่างทรายกับเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 2:1 สามารถชักนำรากได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าการชักนำรากได้ผลดีเมื่อใช้ยอดที่มีความสูง 30-35 มิลลิเมตร และมีใบติด 5-6 ใบ ซึ่งเป็นระยะที่มีความสมบูรณ์สูงจุ่มลงในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วปลูกลงในวัสดุผสมระหว่างทรายกับเพอร์ไลท์ให้ผลสำเร็จ 84-95 เปอร์เซ็นต์ Bennett และ Davies (1986) ชักนำรากของ *Quercus shumardii* โดยจุ่มในสารละลาย IBA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที สามารถชักนำรากนอกหลอดทดลองได้ การจุ่มในสารละลายข้างต้นเป็นเวลา 30 นาที มีผลทำให้ยอดกลายเป็นสีน้ำตาล

อย่างไรก็ตาม Mohammed และ Vidaver (1988) พบว่าการชักนำรากนอกหลอดทดลองของสนไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากการควบคุมความชื้น และสภาพความสมบูรณ์ของต้น

สำหรับการชักนำรากในหลอดทดลองพบว่าได้ผลดีในพืชหลายชนิด ดังเช่นการทดลองของ Gautam และคณะ (1993) ชักนำรากของสะเดาอินเดีย พบว่าได้ผลดีในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ และ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ รากที่เกิดขึ้นบางส่วนผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส และมีรากที่เกิดจากแกนของต้นโดยตรงด้วยเช่นกัน Manzanera และ Pardos (1990) ชักนำรากของ *Quercus suber* L. ในอาหารเติม NAA หรือ IBA พบว่า การใช้ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากและจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นสูงกว่าการใช้ NAA Muralidharan และ Mascarenhas (1987) รายงานการชักนำรากของ *Eucalyptus camaldulensis* และ *E. citriocornis* Sm. โดยวางเลี้ยงในที่มืดว่าได้ผลดีในอาหารเหลวเติม NAA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร Subbaiah และ Minocha (1990) รายงานว่า การชักนำรากของ *E. tereticornis* ได้ผล 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตรดัดแปลง WPM เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Rao (1988) ชักนำรากของ *E. citriocornis* Sm. ในอาหารเหลวสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ IAA เข้มข้น 5.5 ไมโครโมลาร์ และ NAA เข้มข้น 5.3 ไมโครโมลาร์ หรือในอาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต การใช้ IBA อย่างเดียวไม่เหมาะสมในการชักนำรากเนื่องจากเกิดแคลลัสขึ้นบริเวณฐานของยอด Sinha และ Mallick (1991) ชักนำรากของ *Sesbania bispinosa* พบว่าได้ผล 90 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็งสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมหรือไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ Dewan และคณะ (1992) ชักนำรากของ *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brenan. ในอาหารเติม IAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรดังกล่าวมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณโคนต้นเล็กน้อย แต่การเติมผงถ่านเข้มข้น 0.5-3 เปอร์เซ็นต์ทำให้ลักษณะดังกล่าวหายไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบสะเดาเทียมอายุต่างกัน
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน
3. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเพื่อรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน
4. เพื่อศึกษาสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำพืชต้นใหม่

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้ต้นกล้าสะเดาเทียมที่เพาะจากเมล็ดในวัสดุผสมระหว่างทราย ถ่านแกลบ ขุยมะพร้าว และดินร่วน ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ดูแลรักษาในเรือนระแนงที่มีการพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากต้นกล้าอายุได้ 12 สัปดาห์ คัดเลือกใบอ่อนอายุ 7 10 และ 14 วัน ที่มีความสมบูรณ์ปราศจากการทำลายจากโรคและแมลง นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำใบจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง นำใบที่ได้ตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. ชิ้นส่วนแผ่นใบ ขนาด 5x5 มิลลิเมตร
2. ชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ ขนาด 5x5 มิลลิเมตร
3. ชิ้นส่วนก้านใบความยาว 10 มิลลิเมตร

2. วัสดุสารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร MS MH NN SH และ WPM (รายละเอียดในภาคผนวก)

2.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช กลุ่มออกซิน คือ IAA IBA NAA และ 2,4-D กลุ่มไซโตไคนิน คือ BA และ KN และกลุ่มจิบเบอเรลลิน คือ GA_3

2.1.3 สารอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ น้ำมะพร้าว และเคซีนไฮโดรไลเสท

2.2 วัสดุอื่น ๆ

2.2.1 เครื่องมือตัดและย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย มีดผ่าตัด ด้ามมีด ปากคีบ

2.2.2 เครื่องแก้ว ประกอบด้วย จานเพาะเลี้ยง ไปเปตต์ หลอดเซนตริฟิวจ์ ฟลาสค์ ไมโครไปเปต และหลอดทดลอง

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.3 หม้อนึ่งไฟฟ้าอัตโนมัติ

1.4 ตู้ไมโครเวฟ

1.5 เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ และแท่งแม่เหล็ก

2. อุปกรณ์ในการเลี้ยง

2.1 ตู้ย้ายเลี้ยง

2.2 ชั้นเลี้ยง

2.3 เครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที

2.4 เครื่องเซ็นตริฟิวจ์

<u>สูตรอาหารและวิธีการเตรียม</u>

1 สูตรอาหารชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนของสะเดาเทียม

สูตรอาหารชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ประกอบด้วยอาหาร 5 สูตร คือ สูตรอาหาร NN MS MH SH และ WPM อาหารแต่ละสูตรเติมออกซิน และไซโตไคนิน ร่วมกันในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 ด้วย KOH เติมผงวุ้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลอมวุ้นให้ละลายจากนั้นแบ่งใส่ขวดทดลองขนาด 5x8.5 เซ็นติเมตร ขวดละ 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซ็นติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ในกรณีการเพิ่มปริมาณและรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตรข้างต้น เติม polyvinylpyrroridone (PVP 390) เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์

2 สูตรอาหารชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

สูตรอาหารที่ชักนำโซมาติคเอ็มบริโอเป็นอาหารเหลว ประกอบด้วยอาหาร 4 สูตรคือ MS MH SH และ WPM เติมออกซินและไซโตไคนินในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกัน อาหารแต่ละสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.8 แบ่งใส่ฟลาสค์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1

3 สูตรอาหารชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

สูตรอาหารชักนำพืชต้นใหม่ ประกอบด้วยอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM เติมออกซินและไซโตไคนินในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกัน อาหารแต่ละสูตรเติม น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ และผงวุ้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.8 และนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1

4 สูตรอาหารชักนำราก

สูตรอาหารชักนำรากประกอบด้วยอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM อาหารแต่ละสูตรเติมออกซินในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ และ ผงวุ้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.8 และนึ่งฆ่าเชื้อตามวิธีการในข้อ 1

<u>การกรองแยกเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน</u>

ใช้ไปเปตขนาดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปลายตัดออกเพื่อดูดเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวก์ จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ จากนั้นเขย่าหลอดเซนตริฟิวจ์แล้วกรองเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันผ่านตะแกรงขนาด 250 และ 1,000 ไมโครเมตร นับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอที่มีขนาด 250-1,000 ไมโครเมตร

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่เหลือในฟลาสจ์ทั้งหมด กรองแยกขนาด 250 500 และ 1,000 ไมโครเมตร แยกแต่ละขนาดไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอและ การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิค ซัสเพนชันต่อไป

วิธีการ

1. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน

นำชิ้นส่วนใบอ่อนอายุ 10 วัน มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ชิ้นส่วนแผ่นใบ ชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบติด และชิ้นส่วนก้านใบ วางเลี้ยงแต่ละชิ้นส่วนในอาหารสูตร MS และ NN แต่ละสูตรเติม IAA เข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้น ใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ หรือ NAA เข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ นำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนไปเป็นแคลลัสในแต่ละสูตรอาหาร และแต่ละความเข้มข้นของ IAA ร่วมกับ BA หรือ NAA ร่วมกับ KN โดยการให้คะแนนเฉลี่ยแต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเฉลี่ยจาก 5 ชิ้นส่วน

2. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากแผ่นใบและแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ

2.1 การศึกษาอายุของใบสะเดาเทียม

นำชิ้นส่วนแผ่นใบ และแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบของใบสะเดาเทียมอายุ 7 10 และ 14 วัน วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ นำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ นับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากชิ้นส่วน จากการเลี้ยงเปรียบเทียบกันในแต่ละอายุของใบอ่อน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเฉลี่ยจาก 5 ชิ้นส่วน

2.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

วางเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบ และแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบจากใบอ่อนอายุ 10 วัน ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 3 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นของ NAA ใช้ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ นำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ นับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ และชั่งน้ำหนักแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ KN หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเฉลี่ยจาก 5 ชิ้นส่วน

2.3 การศึกษาสูตรอาหาร

นำแผ่นใบและแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบจากใบอ่อนของสะเดาเทียมอายุ 10 วัน วางเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ นำไปเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ นับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ และชั่งน้ำหนักของแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเฉลี่ยจาก 5 ชิ้นส่วน

2.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

วางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจำนวน 4 แคลลัสในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ นำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย้ายเลี้ยงที่ศึกษาคือทำการย้ายเลี้ยงทุก 1 2 3 4 และ 5 สัปดาห์ แต่ละระยะเวลาการย้ายเลี้ยงทำการย้ายเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ นับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ KN หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ

3. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

3.1 การศึกษาสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

คัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวม ๆ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.5-1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วคงที่คือ 80 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ทำการย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นกรองเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันผ่านตะแกรงขนาด 250 500 และ 1,000 ไมโครเมตร นับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอที่มีขนาด 250-1,000 ไมโครเมตร เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตวิเคราะห์แยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

3.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วคงที่คือ 80 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย้ายเลี้ยงที่ศึกษาคือ ทำการย้ายเลี้ยงทุก 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ แต่ละระยะเวลาการย้ายเลี้ยงทำการย้ายเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นกรองเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันผ่านตะแกรงขนาด 250 500 และ 1,000 ไมโครเมตร นับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอที่มีขนาด 250-1,000 ไมโครเมตร เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

4. การศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่

4.1 การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

4.1.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำยอดรวม

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.53 และ 1 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 4.4 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ และ NAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 3 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ เติม PVP เข้มข้น 18.75 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ศึกษาจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ และจำนวนยอดรวม เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA และ NAA ร่วมกับ KN โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเฉลี่ยจาก 2 ชิ้นส่วน

4.1.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดรวม และการเจริญของยอด

นำยอดรวมที่ชักนำได้จากวิธีการในข้อ 4.1.1 วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0 0.1 0.5 0.53 และ 1 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 0 2 3 4 4.4 และ 5 ไมโครโมลาร์ และเติม PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ เติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 50-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 0.34 ไมโครโมลาร์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ศึกษาจำนวนยอดรวม จำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร และความสูงเฉลี่ยของยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ NAA และ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเฉลี่ยจาก 2 ชิ้นส่วน

4.1.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดรวม และการเจริญของยอด

นำยอดรวมที่ชักนำได้จากวิธีการในข้อ 4.1.1 วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 และ 0.5

ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 และ 3 ไมโครโมลาร์ และเติม PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ เติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ศึกษาจำนวนยอดรวม จำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร และความสูงเฉลี่ยของยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร และความเข้มข้นของ NAA และ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเฉลี่ยจาก 2 ชิ้นส่วน

4.2 การศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

กรองเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันผ่านตะแกรงขนาด 250 500 และ 1,000 ไมโครเมตร จากนั้นนำโซมาติคเอ็มบริโอที่มีขนาด 250 500 และ 1,000 ไมโครเมตร วางเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0 0.1 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 0 2 3 และ 4 ไมโครโมลาร์ และเติม PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ เติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 50-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางเลี้ยงในอาหารขณะที่ยังอุ่นเพื่อให้โซมาติคเอ็มบริโอถูกหุ้มด้วยอาหารวุ้น และวางเลี้ยงบนผิวของอาหารในขณะที่อาหารวุ้นแข็งตัวแล้ว วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ศึกษาการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารและแต่ละความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 6 ซ้ำ โดยใช้ 1 ขวดทดลอง คิดเป็น 1 ซ้ำ

5. การศึกษาการชักนำราก

5.1 การศึกษาการชักนำรากนอกหลอดทดลอง

ชักนำรากโดยการทำแผลที่โคนต้นที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร แล้วจุ่มแช่โคนต้นในสารละลาย IBA หรือ NAA ความเข้มข้นแต่ละอย่าง 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 15 30 และ 60 นาที แล้วย้ายไปปักชำในวัสดุปลูกในถุงพลาสติคบรรจุ ขุยมะพร้าว ถ่านแกลบ และวัสดุผสมระหว่าง ขุยมะพร้าว ถ่านแกลบ ทราย และดิน ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ครอบปากถุงให้ด้วยแก้วพลาสติค

เจาะรู รดน้ำทุกวัน วันละ 3 ครั้ง หลังจาก 6 สัปดาห์ ศึกษาจำนวนราก และความยาวราก เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารที่เลี้ยงก่อนการอนุบาล และความเข้มข้นของ NAA และ IBA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ โดยใช้ 3 ต้น คิดเป็น 1 ซ้ำ

5.2 ศึกษาการชักนำรากในหลอดทดลอง

5.2.1 การชักนำรากโดยการจุ่มแช่ในสารละลาย IBA และ NAA

ชักนำรากโดยการกรีดโคนต้นแล้วจุ่มแช่สารละลาย IBA และ NAA เข้มข้น 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 5 30 และ 60 นาที แล้ววางเลี้ยงในอาหารสูตร MS MH SH และ WPM ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ เติมผงถ่านเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเลี้ยงในสภาพที่มีการให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร และความเข้มข้นของ NAA และ IBA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ โดยใช้ 3 ต้น คิดเป็น 1 ซ้ำ

5.2.2 การชักนำรากโดยการวางเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA หรือ NAA โดยตรง

ชักนำรากโดยการกรีดโคนต้นแล้ววางเลี้ยงในอาหารสูตร MS MH SH และ WPM ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ แต่ละสูตรเติม IBA หรือ NAA เข้มข้นอย่างละ 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ หรือ IBA ร่วมกับ NAA เข้มข้นอย่างละ 5 ไมโครโมลาร์ เติมผงถ่านเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเลี้ยงในสภาพที่มีการให้แสง 14 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร และความเข้มข้นของ NAA และ IBA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ โดยใช้ 3 ต้น คิดเป็น 1 ซ้ำ

6. การวัดผลการเปลี่ยนแปลงในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

วัดผลการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงเปรียบเทียบต่อพื้นที่ของชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงโดยการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนอายุ 10 วัน โดยแบ่งชิ้นส่วนออกเป็น 3 ส่วน คือ ชิ้นส่วนแผ่นใบ ชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ และชิ้นส่วนก้านใบ ในอาหารสังเคราะห์ 2 สูตร คือ สูตร MS และ NN เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีและไม่มีเส้นกลางใบที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ NN เติม IAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดยอดโดยตรง (direct shoot organogenesis) 1-25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารเติม IAA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น ส่วนการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ NN แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้จากชิ้นส่วนแผ่นใบ ชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ และชิ้นส่วนก้านใบ แต่สูตรที่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุดคือ สูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีโครงสร้างเกาะกันอย่างหลวม ๆ 76-100 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารที่ให้ผลดีรองลงมาคือ สูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ หรือ NAA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และสูตร NN เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ โดยสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 51-75 เปอร์เซ็นต์ จากชิ้นส่วนแผ่นใบ และชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ ซึ่งให้ผลในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ผลของสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน

สูตรอาหาร	ออกซิน (ไมโครโมลาร์)	ไซโตไคนิน	การสร้างแคลลัส			ลักษณะการเปลี่ยนแปลง
			แผ่นใบ	แผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ	ก้านใบ	
	IAA	BA				
MS	5	1	0	0	0	-
	10	1	0	0	0	S
	10	2	0	0	0	S
NN	5	1	0	0	0	-
	10	1	0	0	0	S
	10	2	0	0	0	S
	NAA	KN				
MS	5	1	+++	+++	+	C, FEC, S
	10	1	++++	++++	++	FEC
	10	2	+++	+++	+	FEC
NN	5	1	+	+	+	C, FEC, S
	10	1	+++	+++	+	FEC
	10	2	+++	+++	+	FEC

0 = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

\+ = เกิดการเปลี่ยนแปลง 1-25 เปอร์เซ็นต์

++ = เกิดการเปลี่ยนแปลง 26-50 เปอร์เซ็นต์

+++ = เกิดการเปลี่ยนแปลง 51-75 เปอร์เซ็นต์

++++ = เกิดการเปลี่ยนแปลง 76-100 เปอร์เซ็นต์

S = shoot

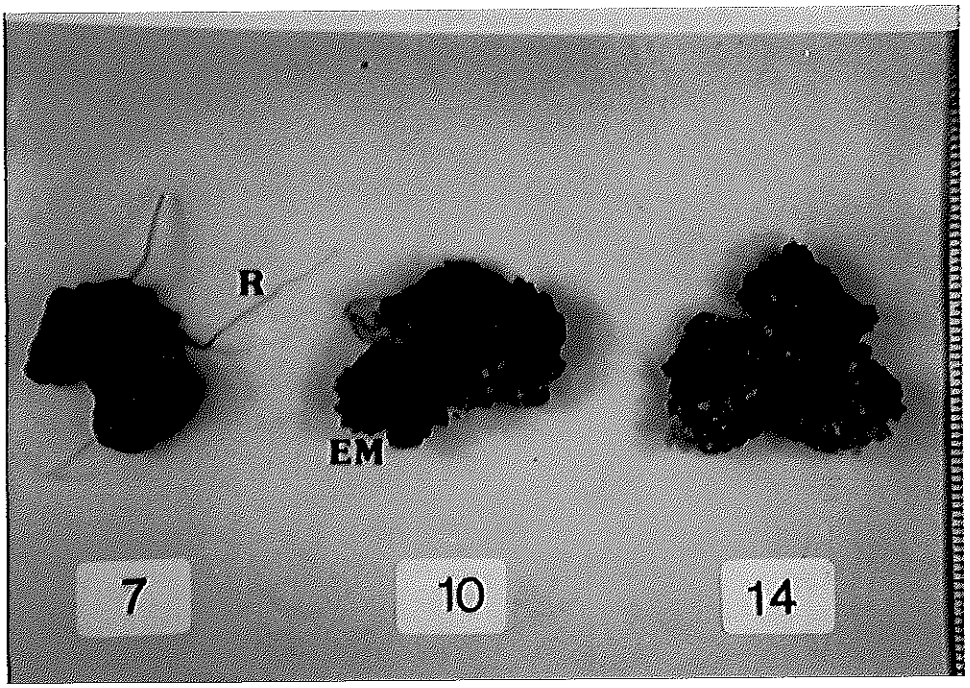
FEC = friable embryogenic callus

C = compact callus

2. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากแผ่นใบและแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ

2.1 การศึกษาอายุของใบสะเดาเทียม

การศึกษาถึงอายุของใบอ่อนที่เหมาะสมต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสพบว่า การใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนอายุ 7 วัน ไม่ประสบความสำเร็จในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ แต่มีรากเกิดขึ้นจากชิ้นส่วนโดยตรงถึง 78 เปอร์เซ็นต์ โดยชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเขียวแก่จนกระทั่งเกิดรากในที่สุด (ภาพที่ 1) สำหรับชิ้นส่วนใบอ่อนที่มีอายุ 10 และ 14 วัน สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ ชิ้นส่วนใบอ่อนอายุ 10 วัน ให้โซมาติคเอ็มบริโอ 31 เอ็มบริโอ และ ชิ้นส่วนใบอ่อนอายุ 14 วัน ให้โซมาติคเอ็มบริโอ 37 เอ็มบริโอ และพบว่ามีรากเกิดจากแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอายุ 10 วัน และ 14 วัน 29.5 เปอร์เซ็นต์ และ 28.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อย้ายเลี้ยงครั้งแรกพบว่าการเกิดรากลดลงเหลือเพียง 5.6 เปอร์เซ็นต์ และการเกิดรากหมดไปเมื่อทำการย้ายเลี้ยงอีกครั้ง



ภาพที่ 1 ชิ้นส่วนใบอ่อนอายุ 7 10 และ 14 วัน ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโลาร์

R : ราก EM : เอ็มบริออยด์

ตารางที่ 2 ความสามารถในการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบอายุ 7 10 และ 14 วัน ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

อายุของใบ	จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
7	0.3 [b]	78.0
10	31 [a]	29.5
14	37 [a]	28.0
F-test	**	nd
C.V. (%)	70.01	nd

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

2.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

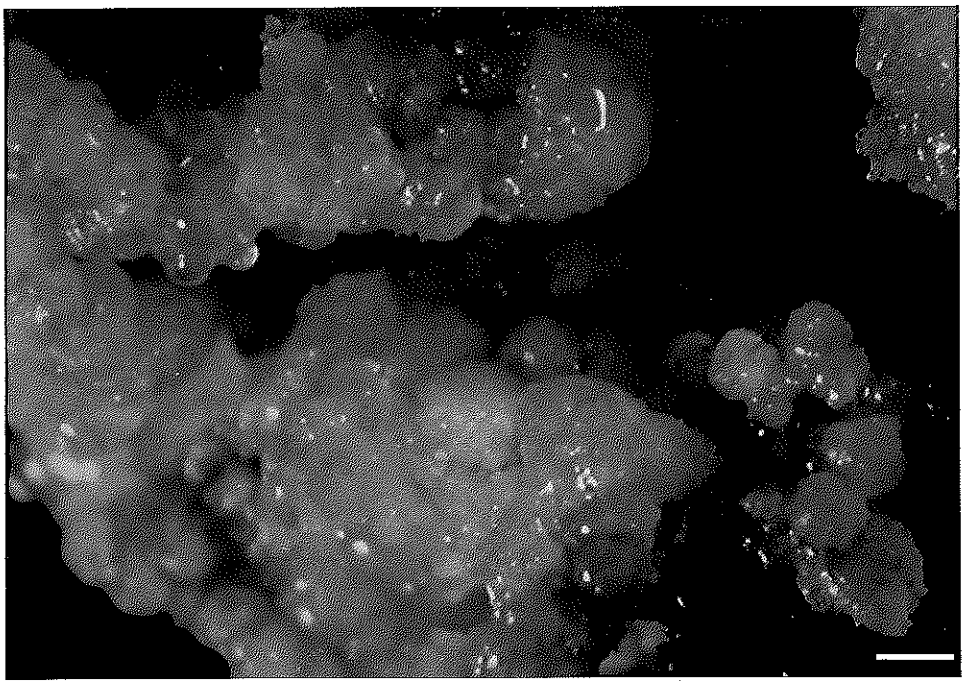
จากการทดลองเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบในอาหารสูตร MS พบว่าชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงในอาหารเติม NAA เข้มข้น 5-10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ย 81 เอ็มบริโอ รองลงมาคือสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ย 57 เอ็มบริโอ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 2) แตกต่างกันทางสถิติกับการวางเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D เข้มข้น 0.5-1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ซึ่งให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ย 14.5 29.0 และ 20.1 เอ็มบริโอตามลำดับ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3) โดยชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงในอาหารเติม NAA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ มักชักนำยอดโดยตรง สำหรับชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5-1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สามารถเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้เร็วกว่าการใช้ NAA ร่วมกับ KN คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากวางเลี้ยง และจากการสังเกตพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเติม NAA เข้มข้น 3-5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ มีสีเขียวและพัฒนาจากระยะรูปกลมเข้าสู่ระยะรูปตอร์ปิโดได้รวดเร็วกว่าการใช้ NAA ความเข้มข้นสูง

ตารางที่ 3 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากชิ้นส่วนแผ่นใบในอาหารสูตร MS

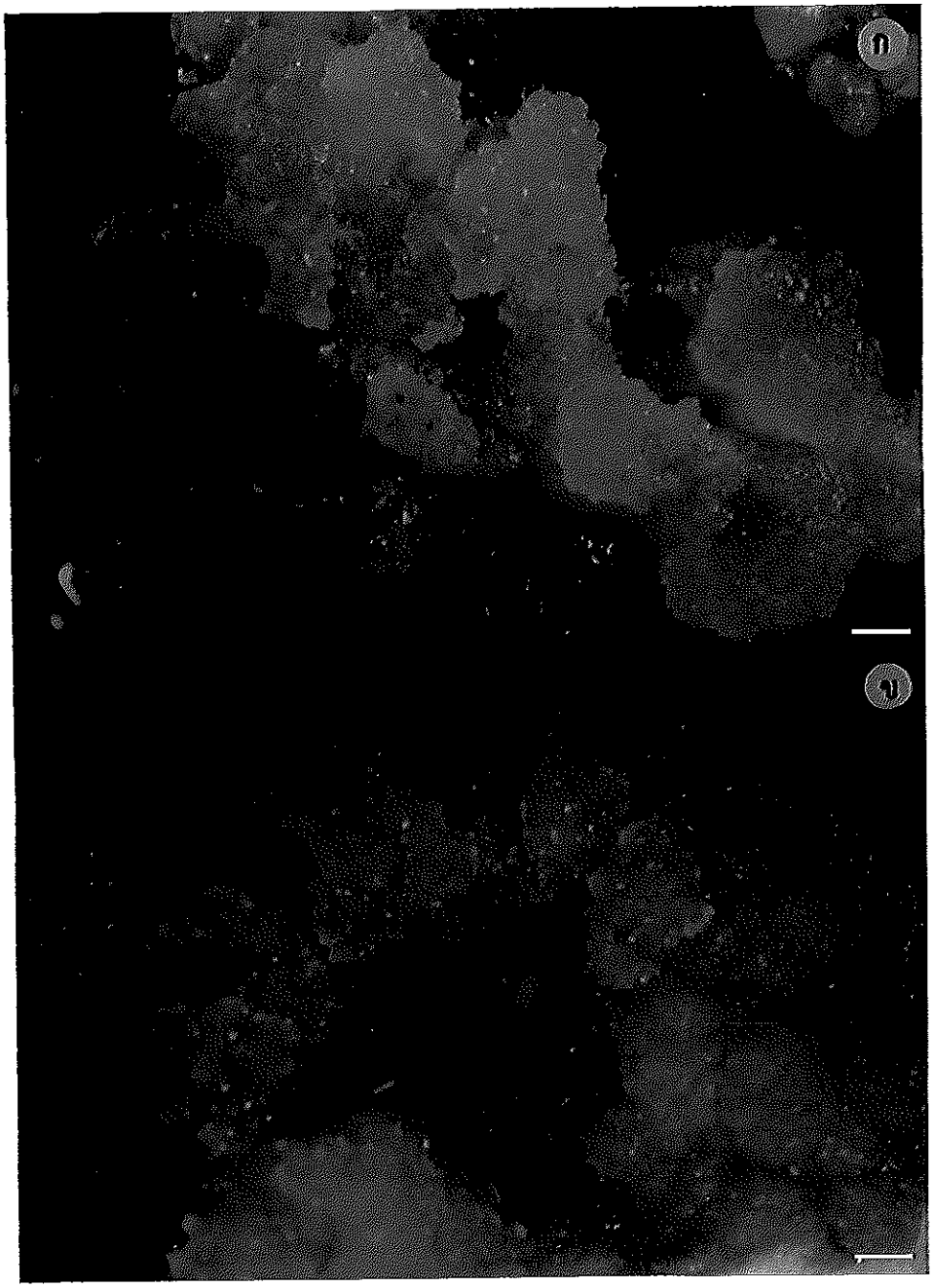
ออกซิน (ไมโครโมลาร์)	ไซโตไคนิน	น้ำหนักแคลลัส (มิลลิกรัม)	จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ
NAA	KN		
3	1	124.5 [c]	14.5 [b]
5	1	269.5 [b]	57.0 [a]
10	1	453.7 [a]	81.0 [a]
2,4-D	BA		
0.5	2	445.1 [a]	29.0 [b]
1	2	414.6 [a]	20.1 [b]
F-test		**	**
C.V. (%)		32.82	76.44

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 2 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบอ่อนซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ บาร์ = 1 มิลลิเมตร



ภาพที่ 3 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 2 ระดับความเข้มข้น ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

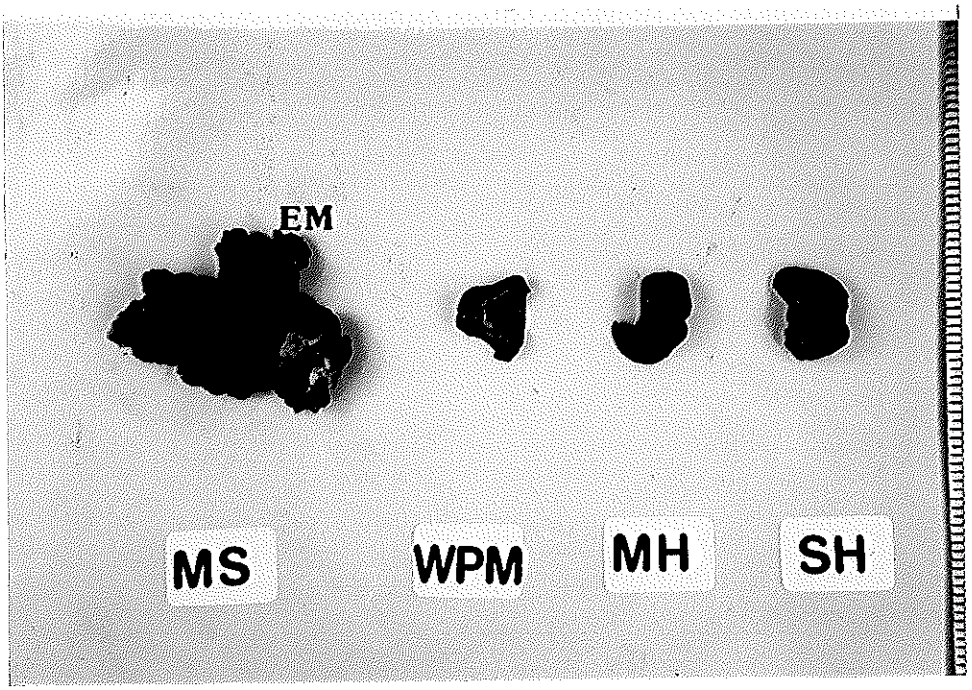
ก. 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

ข. 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

บาร์ = 1 มิลลิเมตร

2.3 การศึกษาสูตรอาหาร

จากการเปรียบเทียบอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พบว่าสูตร MS เพียงสูตรเดียวให้ผลสำเร็จในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ส่วนสูตร MH SH และ WPM นั้นไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ (ภาพที่ 4) ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเขียวแก่และบางชิ้นส่วนเกิดยอดและราก

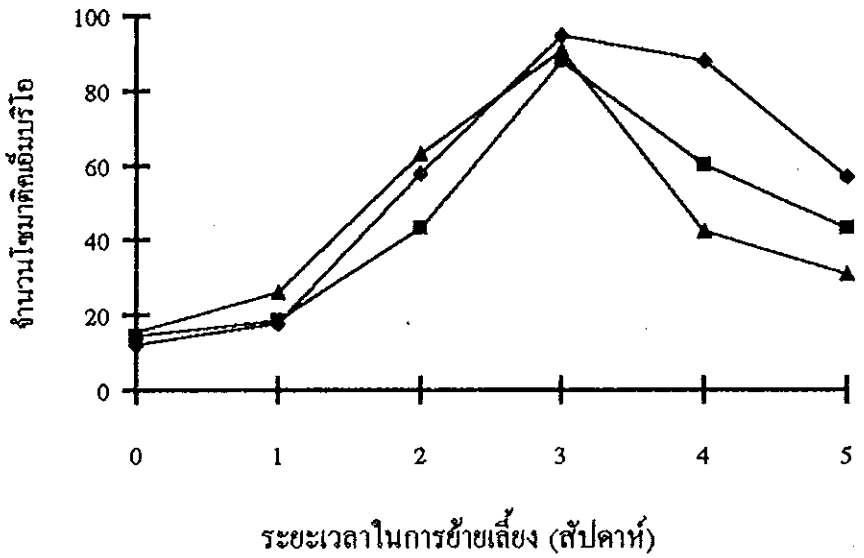


ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนใบอ่อนที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS WPM MH และ SH แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

EM : เอ็มบริออยด์

2.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

จากการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพื่อเพิ่มปริมาณ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในอาหารเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะรูปกลมจำนวน 103 เอ็มบริโอ ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับการใช้ 2,4-D เข้มข้น 0.5-1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้โซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ย 96.33 และ 99.78 เอ็มบริโอ ตามลำดับ แต่พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA นั้นมักกลายเป็นสีน้ำตาลและเสียสภาพของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ ถ้าวางเลี้ยงไว้นานเกิน 4 สัปดาห์โดยไม่มีการย้ายเลี้ยง แต่สามารถรักษาสภาพและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้เมื่อย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ สำหรับระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเติม NAA ร่วมกับ KN ทุกระดับความเข้มข้น คือ 3 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอสูงสุดเป็นไปในทำนองเดียวกัน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจากเลี้ยงเป็นเวลาต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ

—◆— NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

—■— 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

—▲— 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

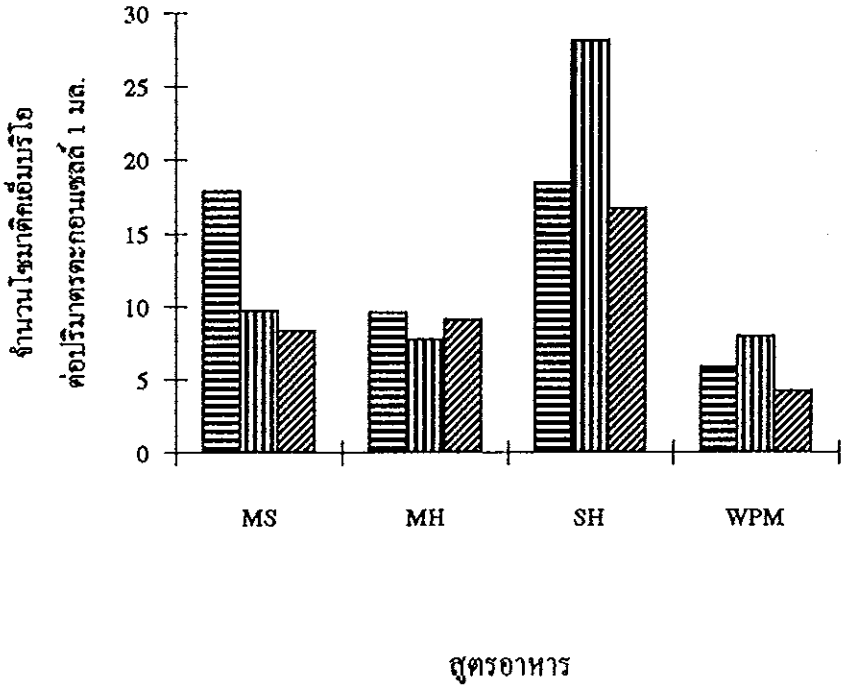
3. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

3.1 การศึกษาสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

จากการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารเหลว 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และมีการย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตรแตกต่างกัน (ภาพที่ 6) สูตรที่ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอมากที่สุดคือสูตร SH ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ 18.38 เอ็มบริโอ สูตรที่เหมาะสมรองลงมาคือสูตร MS ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ 17.85 เอ็มบริโอ ส่วนสูตร MH และ WPM ให้ผลไม่แตกต่างกันคือ สูตร MH ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ 9.5 เอ็มบริโอ และสูตร WPM ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอต่ำสุด 5.83 เอ็มบริโอ

การใช้ 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ทดสอบ พบว่าสูตรอาหารที่ให้ผลดีที่สุดคือสูตร SH ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ย 28.1 เอ็มบริโอ ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ได้ประกอบด้วยก้อนแคลลัสที่มีขนาดเล็กและโซมาติคเอ็มบริโอที่มีโครงสร้างเดี่ยว ๆ จำนวนมาก และมีขนาดตั้งแต่ 250-1,000 ไมโครเมตร (ภาพที่ 7) สูตรที่ได้ผลรองลงมาคือสูตร MS ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ย 9.71 เอ็มบริโอ ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ได้จากสูตร MS ส่วนใหญ่ประกอบด้วยก้อนแคลลัสขนาดใหญ่ ส่วนสูตร MH และสูตร WPM ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอต่ำสุด (ภาพที่ 8)

การใช้ 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ในอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าสูตรที่ได้ผลดีที่สุดคือสูตร SH ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ย 16.67 เอ็มบริโอ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสูตร MS และ MH ส่วนสูตร WPM ให้ผลในการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอต่ำสุดคือ 4.21 เอ็มบริโอ

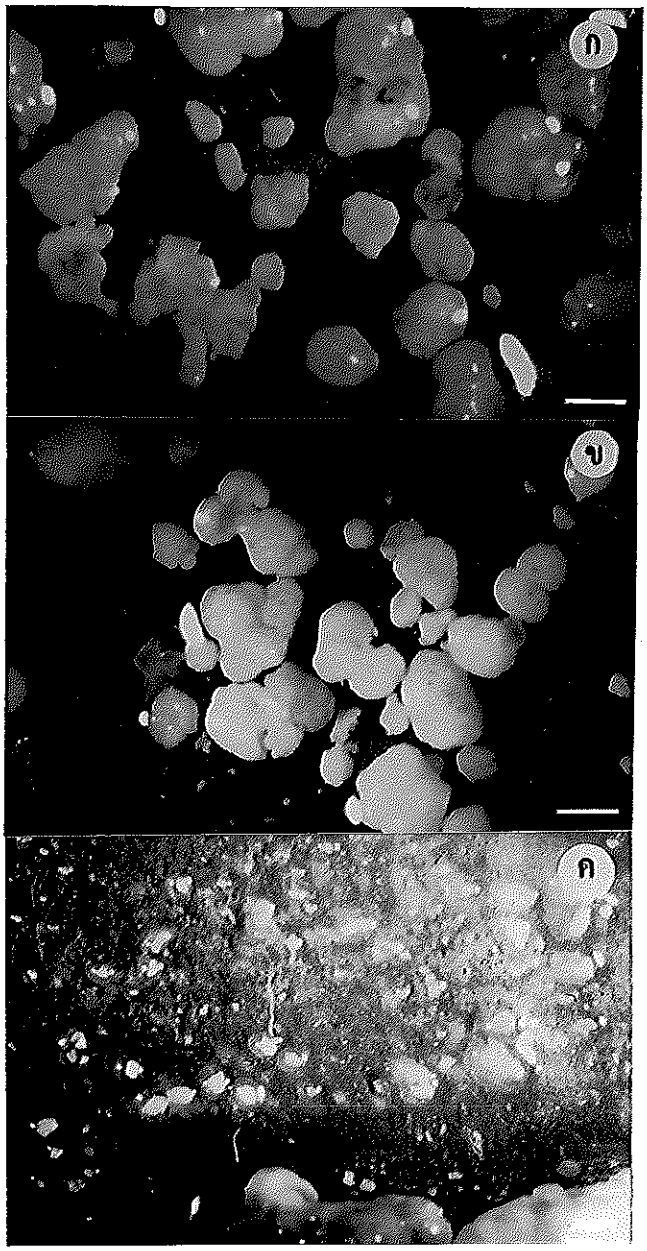


ภาพที่ 6 ผลของสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มีต่อจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ

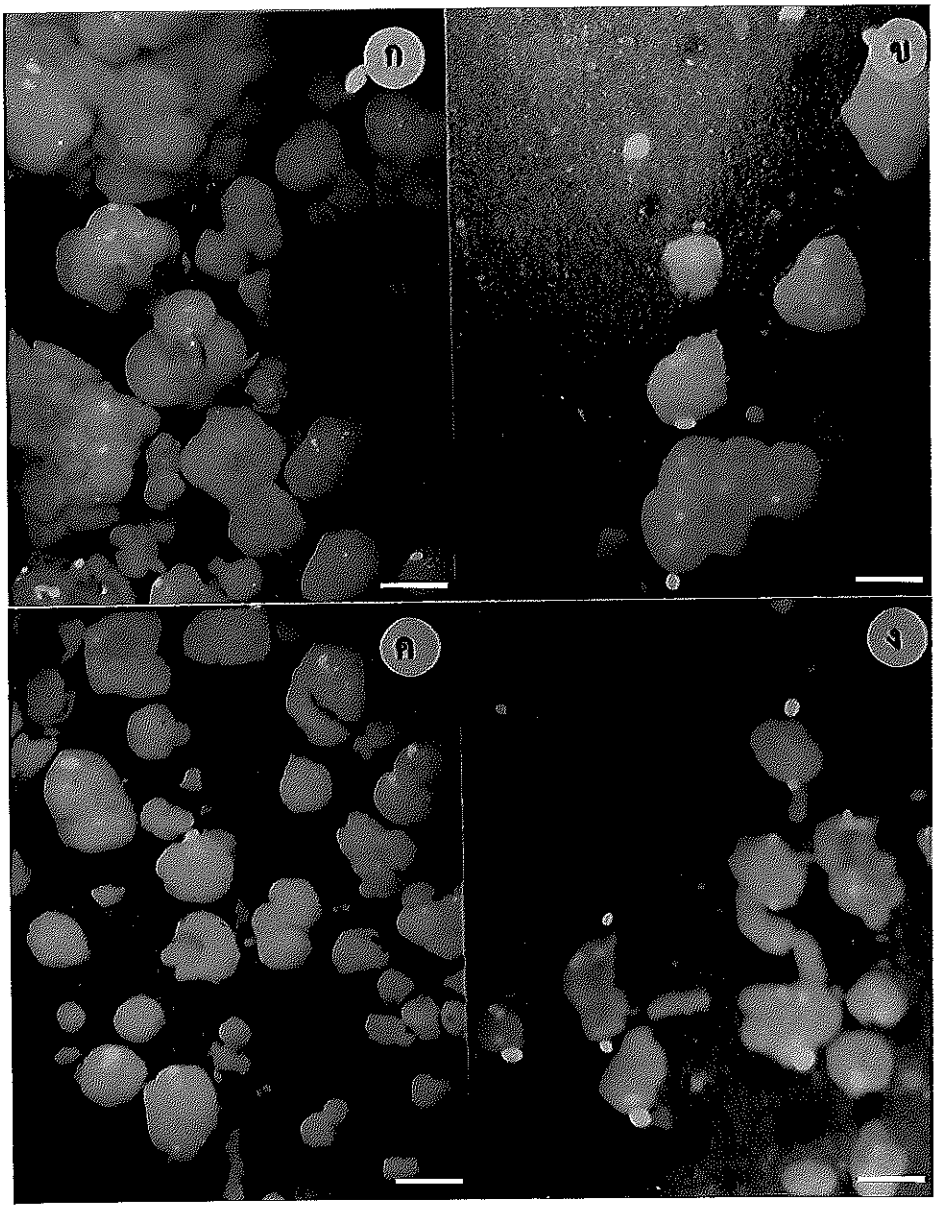
▤ NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

▥ 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

▨ 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 7 ลักษณะเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำในอาหารเหลวสูตร SH เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กัน
ก. NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์
ข. 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
ค. 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
บาร์ = 500 ไมโครเมตร



ภาพที่ 8 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

ก. MS

ข. MH

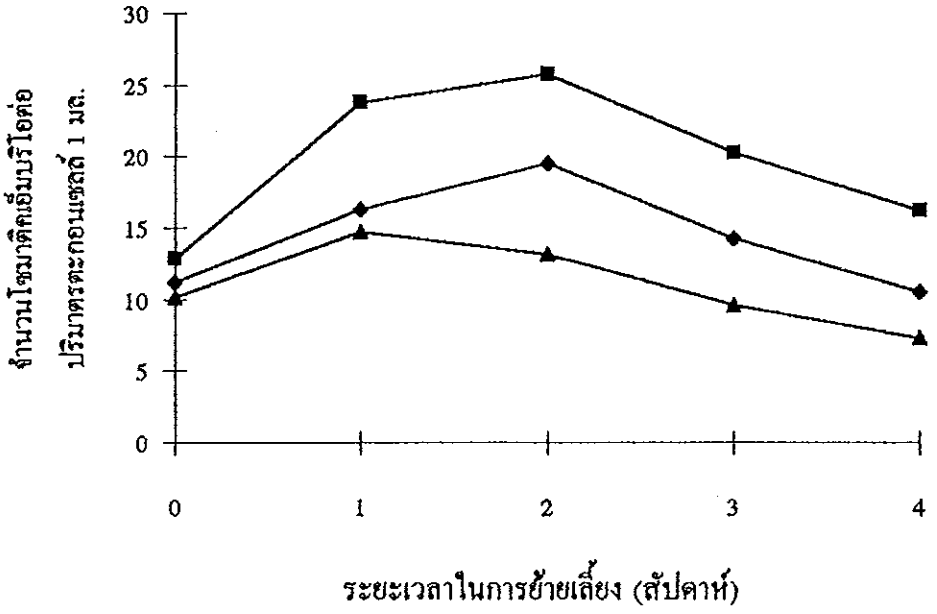
ค. SH

ง. WPM

บาร์ = 500 ไมโครเมตร

3.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

สำหรับการศึกษาระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงที่เหมาะสมในการชักนำและรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน พบว่าการย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอสูงสุดคือ 25.71 เอ็มบริโอ จากปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร รองลงมาคือการใช้ NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ 19.53 เอ็มบริโอจากปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร การเลี้ยงเป็นเวลา 3 และ 4 สัปดาห์แล้วจึงย้ายเลี้ยงไปในอาหารใหม่ มีผลทำให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอที่ได้ลดลง และไม่สามารถชักนำโซมาติคเอ็มบริโอได้หากระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงเกินกว่า 4 สัปดาห์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอต่ำสุด และต้องทำการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก 1 สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องจากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมาอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ผลของระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงต่อจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ

—◆— NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

—■— 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

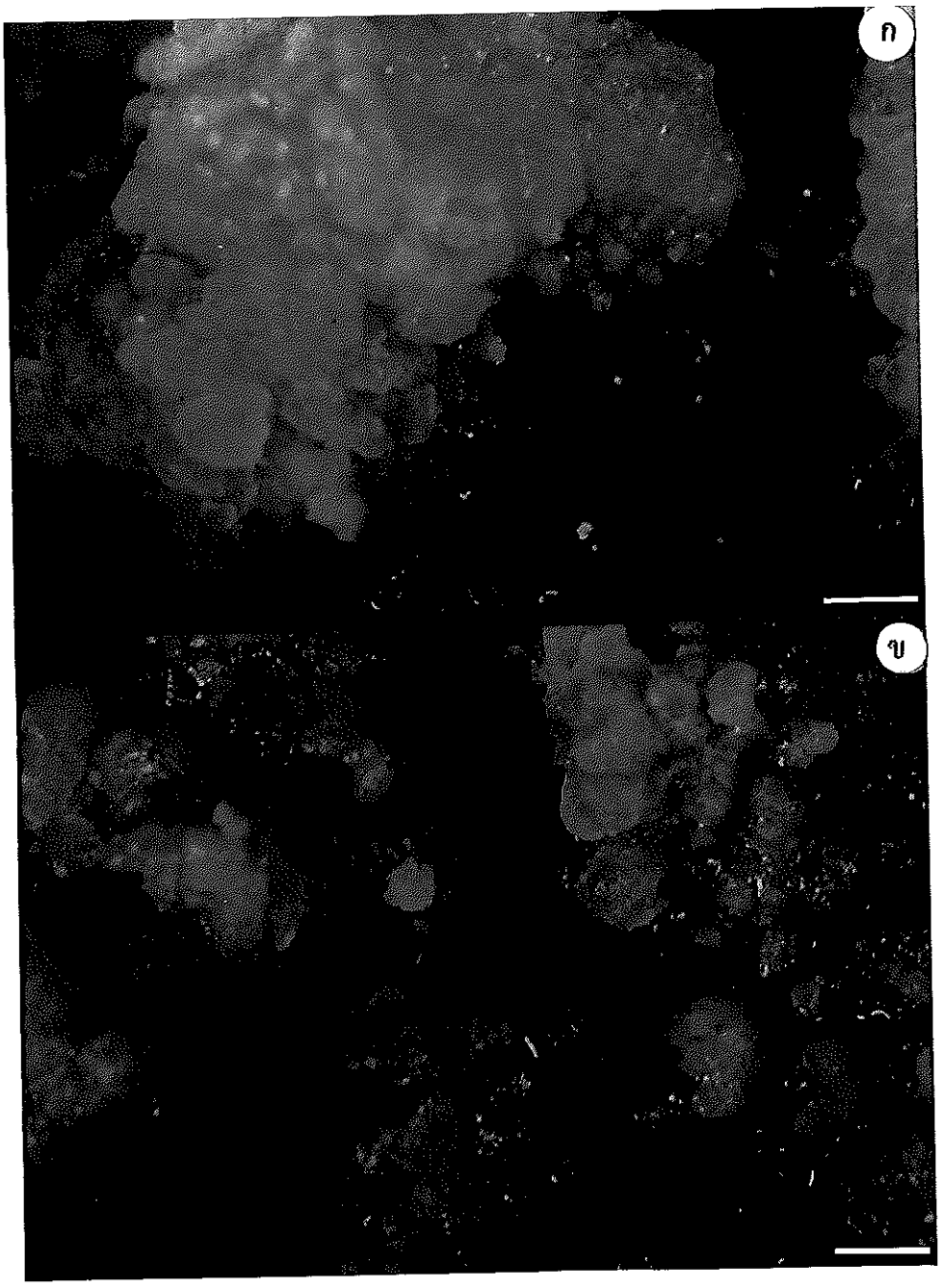
—▲— 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

4. การศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่

4.1 การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

4.1.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำยอดรวม

การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA ร่วมกับ BA หรือ KN ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าการใช้ NAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 3-10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้เฉลี่ย 1.1-1.6 ยอดต่อชิ้นส่วนเท่านั้น สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 3 ของการวางเลี้ยง ซึ่งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อนเหมือนกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากการใช้ 2,4-D แต่โครงสร้างเสียอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 5-6 (ภาพที่ 10ก) สำหรับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA มีการพัฒนาจากโซมาติคเอ็มบริโอที่มีสีเหลืองอ่อนเป็นสีเขียว (ภาพที่ 10ข) และหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เกิดยอดรวมขึ้นในอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.53 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ เฉลี่ย 16.7 ยอดต่อชิ้นส่วน ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ NAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน 15.8 และ 15.6 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 10 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารเพื่อชักนำพืชต้นใหม่ในอาหารเติมไซโตไคนินต่างกัน

ก. KN

ข. BA

บาร์ = 5 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตร MS

ออกซิน (μM)	ไซโตไคนิน (μM)	% การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ (เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน)	จำนวนยอดรวม (เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน)
NAA	BA			
0.53	4.44	0.0	21.6 [b]	16.7 [a]
1	3	0.0	15.9 [b]	15.8 [a]
1	5	0.0	21.1 [b]	15.6 [a]
1	10	0.0	42.5 [b]	11.4 [a]
NAA	KN			
1	3	85.5	68.4 [ab]	1.6 [b]
1	5	87.5	87.1 [a]	1.2 [b]
1	10	95.4	88.0 [a]	1.1 [b]
F-test		nd	**	**
C. V. (%)		nd	51.87	78.05

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

4.1.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดรวมและการเจริญของยอด

การศึกษาถึงประสิทธิภาพในการชักนำยอดรวมและการเจริญของยอด โดยการเปรียบเทียบระหว่างการเติมหรือไม่เติมน้ำมะพร้าวลงไปในสูตรอาหาร MS เติม NAA เข้มข้น 0.53-1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3-5 ไมโครโมลาร์ พบว่าการเติมน้ำมะพร้าวไม่มีผลทางสถิติต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมและความสูงของยอด ในทางตรงกันข้ามทำให้จำนวนยอดรวมลดลง ทั้งนี้เพราะมีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 5)

การลดความเข้มข้นของ NAA จาก 1 ไมโครโมลาร์ เป็น 0.1-0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2-5 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อต่อความสามารถในการเพิ่มจำนวนยอดรวมมากนัก แต่มีผลต่อการเจริญของยอดรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองพบว่า ระดับความเข้มข้นของ NAA 0.1 ไมโครโมลาร์ และ BA 2 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมในการเจริญของยอดรวมคือ ให้จำนวนยอดที่สูงมากกว่า 10. มิลลิเมตร 3.1 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีความสูงของยอดเฉลี่ย 14.5 มิลลิเมตร การใช้ NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมในการชักนำการเจริญของยอดรวมที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร เนื่องจากให้จำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร 3.4 ยอดต่อชิ้นส่วน และความสูงของยอดเฉลี่ย 13.8 มิลลิเมตร (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลของน้ำมะพร้าวต่อการชักนำยอดรวมและการเจริญของยอดในอาหารสูตร MS

NAA (ไมโครโมลาร์)	BA	น้ำมะพร้าว (%)	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอดรวม	จำนวนยอดที่สูง > 10 มม.	ความสูงยอดเฉลี่ย (มม.)
0.53	4.44	0	92.5	28.33	1.40	13.5
1	3	0	90.7	27.33	2.00	12.7
1	5	0	87.5	17.67	1.80	13.7
0.53	4.44	5	89.1	15.00	1.18	12.9
1	3	5	91.8	18.92	1.34	13.3
1	5	5	85.3	17.58	1.15	13.4
F-test			nd	ns	ns	ns
C. V. (%)			nd	49.21	27.03	21.15

nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

ตารางที่ 6 อิทธิพลของความเข้มข้นของ NAA และ BA ต่อความสามารถในการชักนำยอดรวมและการเจริญของยอดในอาหารสูตร MS

NAA (ไมโครโมลาร์)	BA	การเกิดยอดรวม (%)	จำนวนยอดรวม	จำนวนยอดที่สูง >10 มม.	ความสูงยอด (มม.)
0.1	2	93.2	25.4	3.1 [ab]	14.5
0.5	3	95.4	31.6	3.4 [a]	13.8
0.5	4	96.3	24.6	1.4 [b]	13.3
0.5	5	89.9	26.2	1.1 [b]	13.6
F-test		nd	ns	**	ns
C. V. (%)		nd	72.81	72.80	28.42

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

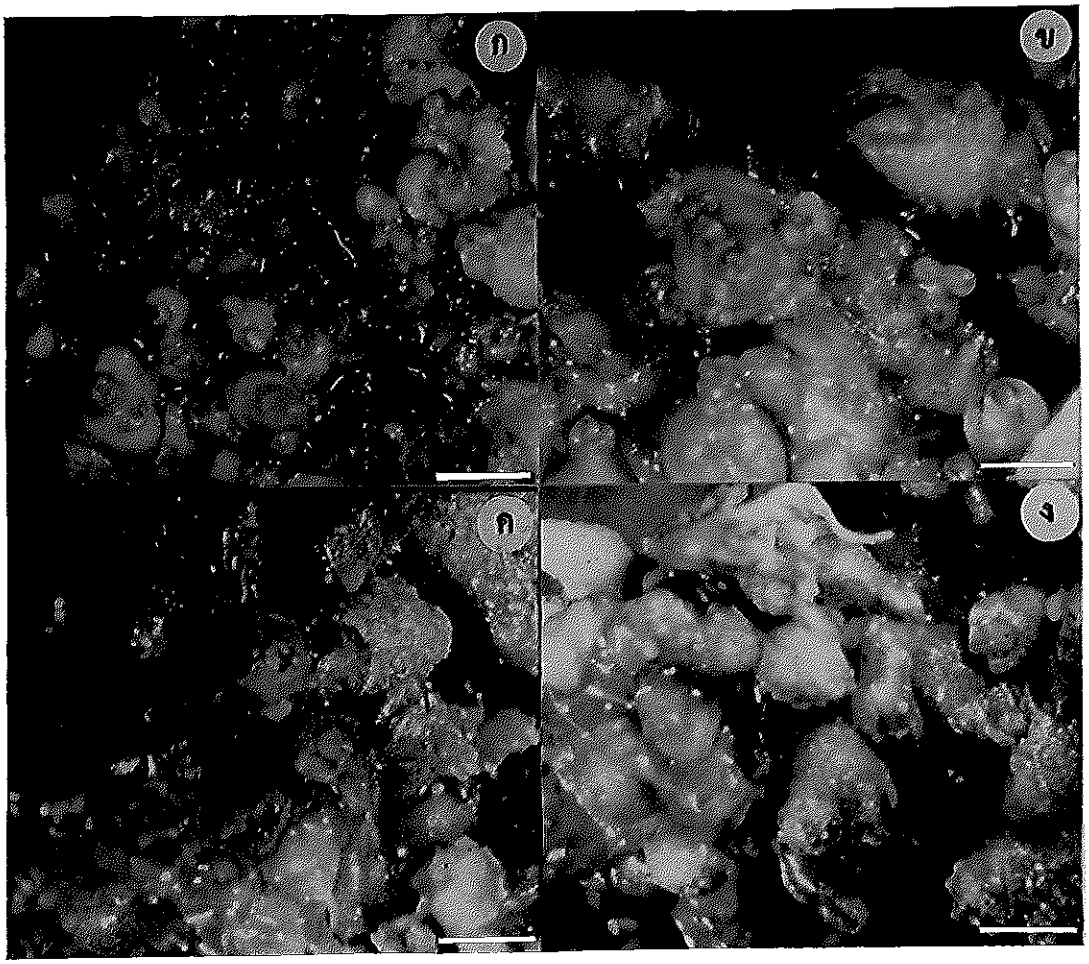
nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

4.1.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดรวมและการเจริญของยอด

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมและการเจริญของยอดในอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 และ 3 ไมโครโมลาร์ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมคืออาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดรวม 34.75 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตร MH SH และ WPM ซึ่งให้ยอดรวมเฉลี่ย 10.5-13.75 ยอดต่อชิ้นส่วน (ภาพที่ 11) สูตร MS ให้จำนวนยอดที่สูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร จำนวน 2.75 ยอดต่อชิ้นส่วน ไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตร MH และ WPM ส่วนสูตรอาหาร SH ให้จำนวนยอดที่สูงมากกว่า 10 มิลลิเมตรต่ำสุด คือ 1.25 ยอดต่อชิ้นส่วนเท่านั้น (ภาพที่ 12) สำหรับความสูงเฉลี่ยของยอดนั้นพบว่าสูตรอาหาร SH ให้ความสูงของยอดสูงสุดคือ 1.66 เซ็นติเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตร MS MH และ WPM และเมื่อศึกษาการเจริญของยอดโดยวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถเพิ่มความสูงของยอดเป็น 22.4 มิลลิเมตร ในอาหารสูตร SH สำหรับจำนวนยอดรวมและจำนวนยอดรวมที่สูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติทุกสูตรอาหารที่ทดสอบ (ตารางที่ 7, ภาพที่ 13)



ภาพที่ 11 พืชต้นใหม่จากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตรต่าง ๆ เติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์

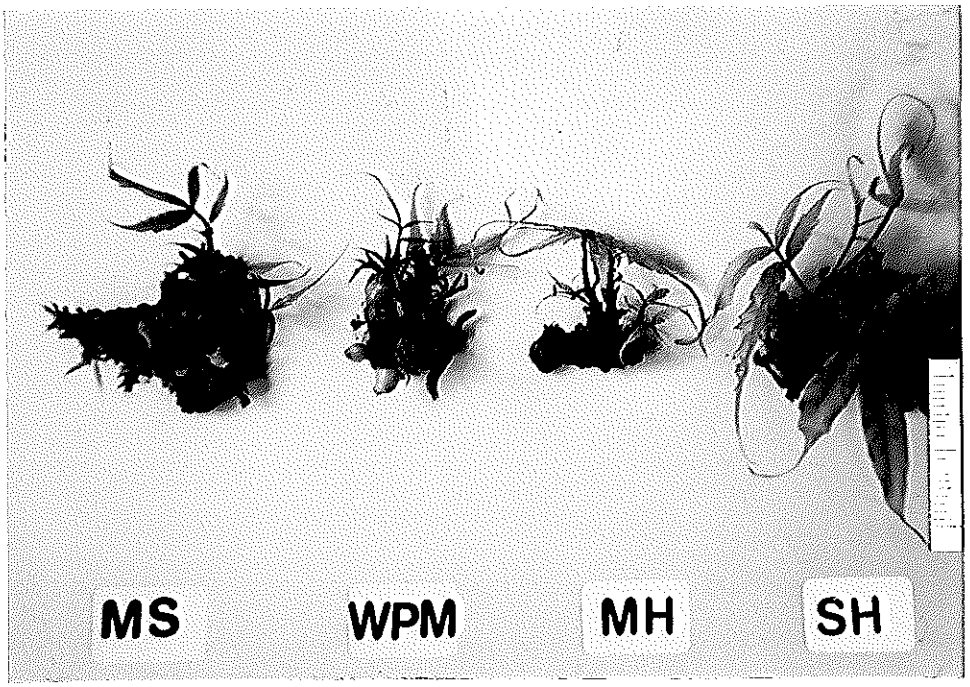
ก. MS

ข. MH

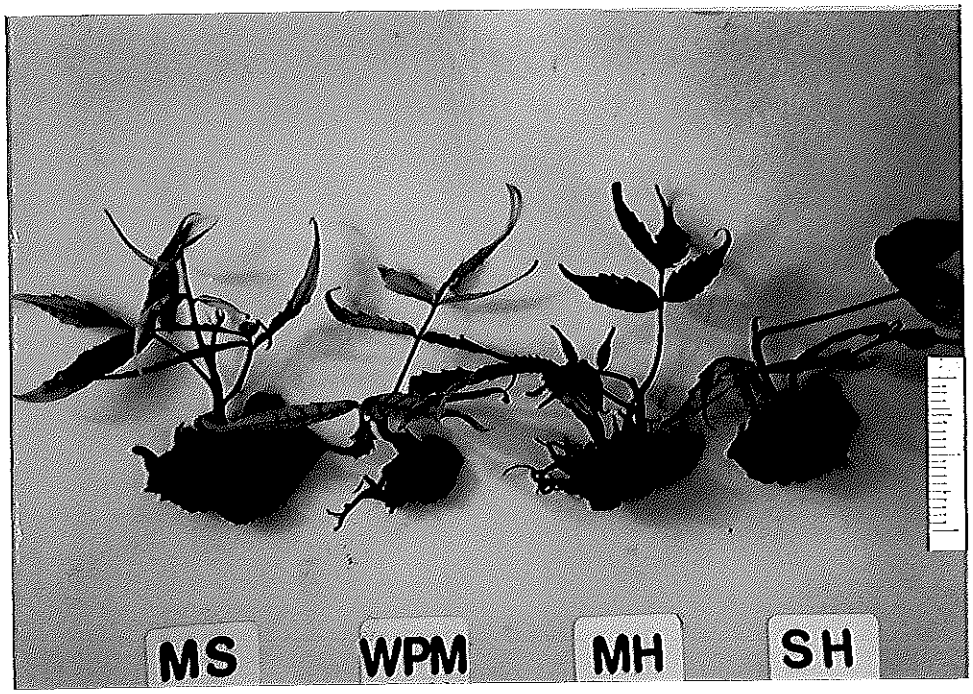
ค. SH

ง. WPM

บาร์ = 5 มิลลิเมตร



ภาพที่ 12 ลักษณะของยอดในอาหารสูตร MS WPM MH และ SH แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 13 ลักษณะของยอดในอาหารสูตร MS WPM MH และ SH แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ 7 ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มยอดรวม และการเจริญของยอด (อาหารแต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 และ 3 ไมโครโมลาร์)

สูตรอาหาร	การเกิดยอดรวม (%)	จำนวนยอดรวม	จำนวนยอดที่สูง > 10 มม.	ความสูงยอดเฉลี่ย (มม.)
NAA 0.1 µM ร่วมกับ BA 2 µM				
MS	100.0	19.00 [b]	3.32 [b]	14.8 [b]
MH	87.2	13.63 [b]	2.00 [b]	14.9 [b]
SH	85.7	18.50 [b]	2.28 [b]	22.4 [a]
WPM	80.5	9.85 [b]	2.00 [b]	14.5 [b]
NAA 0.5 µM ร่วมกับ BA 3 µM				
MS	92.7	34.75 [a]	2.75 [b]	14.6 [b]
MH	84.2	13.75 [b]	2.13 [b]	12.5 [b]
SH	85.9	13.18 [b]	1.25 [a]	16.6 [b]
WPM	72.5	10.50 [b]	2.15 [b]	12.6 [b]
F-test	nd	*	*	*
C. V. (%)	nd	45.12	38.64	47.52

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

การศึกษาถึงสารเติมอื่น ๆ เช่น เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ พบว่าการใช้เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมในทุกสูตรอาหารคือให้จำนวนยอดรวมสูงสุด 52.15 ยอดต่อชิ้นส่วนในอาหารสูตร MS แตกต่างทางสถิติกับสูตร MH SH และ WPM สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมความสูงของยอดคือสูตร SH พบว่าให้ยอดที่มีความสูงมากกว่า 10 มิลลิเมตร เฉลี่ย 8 ยอดต่อชิ้นส่วน อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับสูตร MS MH และ WPM สำหรับความสูงของยอดเฉลี่ยนั้นไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตร MS MH และ SH แต่แตกต่างกันทางสถิติกับสูตร WPM (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของสูตรอาหารต่อการเกิดยอดรวม และการเจริญของยอด (อาหารแต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และ เคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร)

สูตรอาหาร	การสร้างยอดรวม (%)	จำนวนยอดรวม	จำนวนยอดที่สูง > 10 มม.	ความสูงยอดเฉลี่ย (มม.)
MS	98.5	52.15 [a]	5.50	14.8 [a]
MH	82.4	21.13 [b]	4.63	13.4 [a]
SH	85.1	22.00 [b]	8.00	15.0 [a]
WPM	83.6	18.38 [b]	3.88	11.4 [b]
F-test	nd	*	ns	*
C. V. (%)	nd	56.75	84.29	43.65

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

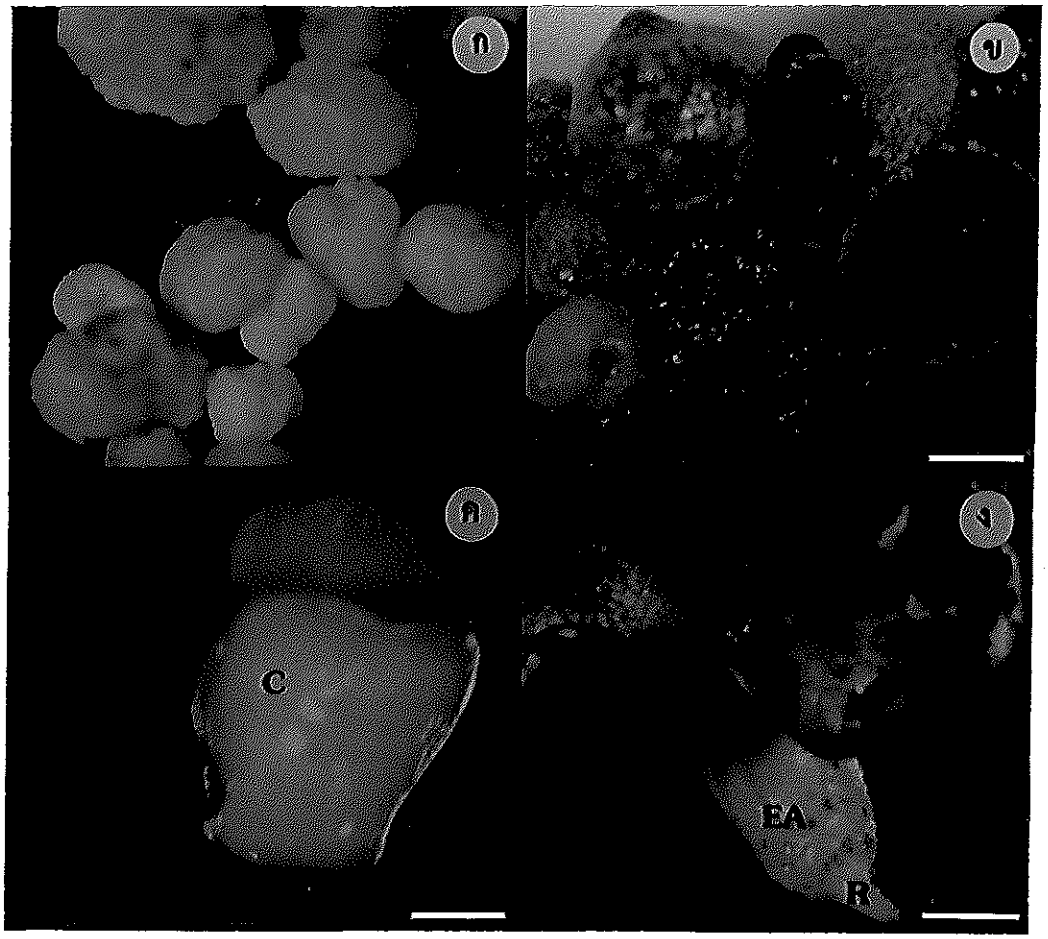
nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

4.2 การศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

จากการทดลองชักนำการสุกแก่และการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน โดยการวางเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอ (ภาพที่ 14 ก) ลงในอาหารแข็ง 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM แต่ละสูตรเติม NAA เข้มข้น 0-0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0-4 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่สามารถชักนำการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารสูตรดังกล่าวโดยตรงได้ แต่มีการพัฒนาของเอ็มบริโอขึ้นใหม่จากเอ็มบริโอเดิมแล้วพัฒนาให้ยอดได้ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 10-12 สัปดาห์ ในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 14 ข) โซมาติคเอ็มบริโอมีการพัฒนาจากระยะรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และใบเลี้ยง การย้ายเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาในระยะใบเลี้ยง (ภาพที่ 14 ค) ลงในอาหารสูตร SH ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำการงอกของรากและยอดได้ (ภาพที่ 14 ง) อย่างไรก็ตามเมื่อวางเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ การย้ายโซมาติคเอ็มบริโอไปเลี้ยงในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และระยะใบเลี้ยงเฉลี่ย 72 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำรากของโซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปหัวใจ (ภาพที่ 15 ก) ระยะใบเลี้ยง (ภาพที่ 15 ข) แต่พบว่าเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เกิดมีการพัฒนาเอ็มบริโอใหม่ (additive embryo) บริเวณใบเลี้ยงขึ้น (ภาพที่ 15 ค) แล้วพัฒนาเป็นยอดที่มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ (ภาพที่ 15 ง) และสามารถนำไปชักนำรากได้ในอาหารเติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 14 โซมาติคเอ็มบริโอในเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเมื่อวางเลี้ยงในอาหารแข็ง

ก. โซมาติคเอ็มบริโอรูปกลม

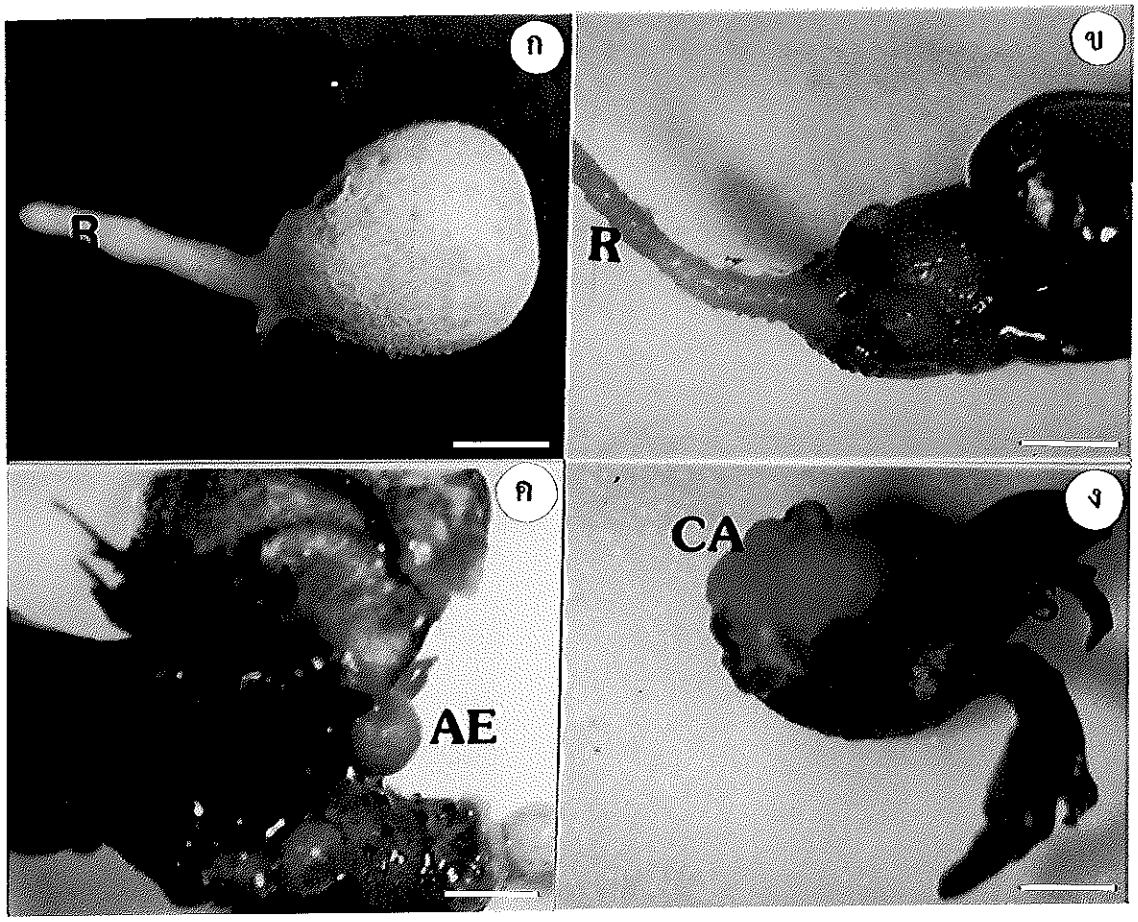
ข. เอ็มบริโอที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ (additive embryo) ในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

ค. โซมาติคเอ็มบริโอในระยะใบเลี้ยง

ง. ยอด ราก และแกนต้นอ่อนของโซมาติคเอ็มบริโอที่งอกในอาหารสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

C : ใบเลี้ยง S : ยอด R : ราก EA : แกนต้นอ่อน

บาร์ = 2 มิลลิเมตร



ภาพที่ 15 โซมาติคเอ็มบริโอในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. โซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปหัวใจพร้อมราก

ข. โซมาติคเอ็มบริโอในระยะสร้างใบเลี้ยง

ค. โซมาติคเอ็มบริโอใหม่พัฒนาบนโซมาติคเอ็มบริโอเดิม

ง. โซมาติคเอ็มบริโอที่มียอดและใบเลี้ยงสามารถนำไปชักนำรากได้

AE : โซมาติคเอ็มบริโอที่พัฒนาขึ้นใหม่ C : ใบเลี้ยง CA : แคลลัส

R : ราก S : ยอด

บาร์ = 2 มิลลิเมตร

5 การศึกษาการชักนำราก

5.1 การศึกษาการชักนำรากนอกหลอดทดลอง

การชักนำรากนอกหลอดทดลองโดยการกรีดโคนยอดแล้วจุ่มในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้นอย่างละ 5-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 5 30 และ 60 นาที พบว่าไม่สามารถชักนำรากได้

5.2 การศึกษาการชักนำรากในหลอดทดลอง

5.2.1 การชักนำรากโดยการจุ่มแช่ในสารละลาย IBA หรือ NAA

การชักนำรากในหลอดทดลองโดยการการจุ่มแช่โคนยอดในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้นอย่างละ 5-20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 5 30 และ 60 นาที วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS MH SH และ WPM ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าไม่สามารถชักนำรากได้

5.2.2 การชักนำรากโดยการวางเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA หรือ NAA

ชักนำรากโดยการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ เติม IBA เข้มข้น 10 และ 15 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ ในที่มืด 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปวางเลี้ยงในที่มีแสงสามารถชักนำรากที่มีความแข็งแรงและเกิดจากโคนต้นโดยตรงไม่ผ่านการสร้างแคลลัส การใช้ IBA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ชักนำรากได้ 1.63 รากต่อต้น และรากมีความยาวเฉลี่ย 30.0 มิลลิเมตร ส่วนการใช้ IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ ชักนำรากได้ 1.5 รากต่อต้น มีความยาวเฉลี่ย 36.4 มิลลิเมตร (ตารางที่ 9, ภาพที่ 16) การใช้ IBA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ให้รากที่มีขนาดเล็กและเปราะหักง่าย ส่วนการใช้ IBA ความเข้มข้นสูงคือ 20 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากได้ 4.75 รากต่อต้น แต่เป็นรากที่ผ่านการสร้างแคลลัส การใช้ IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับผงถ่านสามารถชักนำรากได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น แต่รากที่ได้เกิดจากโคนต้นโดยตรง

การทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก โดยในแต่ละสูตรลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ และเติม IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำรากได้ สูตรที่สามารถชักนำรากได้ดีที่สุดคือสูตร 1/2 MS ชักนำรากได้ 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสูตร 1/2 SH และ 1/2 WPM ชักนำรากได้ 50 เปอร์เซ็นต์

จำนวนรากเฉลี่ย 1.38-1.5 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 35.5-36.6 มิลลิเมตร (ตารางที่ 10, ภาพที่ 16)

การชักนำรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้ผลในอาหารสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และ PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11, ภาพที่ 17)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการชักนำรากจากการวางเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เติม IBA เข้มข้น 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์

IBA (ไมโครโมลาร์)	% การเกิดราก	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (มม.)
5	10	1.38 ^{b}	26.0 ^{b}
10	50	1.63 ^{b}	30.0 ^{ab}
15	60	1.50 ^{b}	36.4 ^{a}
20	60	4.75 ^{a}	32.8 ^{ab}
F-test	nd	*	*
C. V. (%)	nd	39.96	34.03

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 10 ผลของสูตรอาหารต่อความสามารถในการเกิดรากจากต้นที่ได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหาร 4 สูตร แต่ละสูตรเติม IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์

สูตรอาหาร	% การเกิดราก	จำนวนราก	ความยาวราก (มม.)
1/2 MS	60	1.50	36.4
1/2 MH	40	1.38	35.7
1/2 SH	50	1.44	36.6
1/2 WPM	50	1.41	35.5
F-test	nd	ns	ns
C.V.(%)	nd	35.33	41.22

nd ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

ตารางที่ 11 การชักนำรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอในอาหารสูตร 1/2 MS

สารควบคุมการเจริญเติบโต	% การเกิดราก	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (มม.)
IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์	10	2.0 (0-3)	15.7 (0-34.0)
NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์	100	3.1 (1-5)	24.2 (5.0-67.0)

ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุด

ภาพที่ 16 รากจากต้นที่ชักนำจากยอดที่พัฒนาจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารสูตร 1/2 MS เติม IBA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์

ภาพที่ 17 รากจากต้นที่ชักนำจากโซมาติคเอ็มบริโอในอาหารสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์

บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบที่ไม่มีเส้นกลางใบ แผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ และชิ้นส่วนก้านใบจากใบอ่อนอายุ 10 วันของสะเดาเทียม พบว่าชิ้นส่วนแผ่นใบที่ไม่มีเส้นกลางใบและแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนก้านใบ และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสนั้นเกิดบริเวณผิวใบ เนื่องจากบริเวณผิวใบมีเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้แก่ เซลล์ผิว (epidermal cell) ซึ่งมีทั้งเซลล์ผิวด้านบนและด้านล่าง และเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่เป็นจำนวนมาก (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณรอบรอยตัดของผิวใบเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้เร็วกว่าบริเวณผิวใบ ทั้งนี้เนื่องจากมีการตอบสนองของบริเวณรอบรอยตัดต่อฮอร์โมนที่พืชปล่อยออกมา และเซลล์บริเวณดังกล่าวสามารถรับสารอาหารจากอาหารได้ดีกว่าเซลล์ที่อยู่ภายใน (มาลี กาญจนภูมิ, 2532) สำหรับส่วนชิ้นส่วนก้านใบสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้น้อยเนื่องจากก้านใบมีเนื้อเยื่อ vascular cambium ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีกิจกรรมในการแบ่งเซลล์สูงประกอบอยู่ในเนื้อเยื่อน้อย (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบของสะเดาเทียมให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในไม้ยืนต้นหลายชนิด ได้แก่ Petroleum nut tree (Vargas-Zamora, 1992) *Robinia pseudocacia* L. (Kyung-Hwan *et al.*, 1993) และ *Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx. (Park and Son, 1988)

2. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากแผ่นใบและแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ

2.1 การศึกษาอายุของใบสะเดาเทียม

ใบอ่อนของสะเดาเทียมอายุ 7 10 และ 14 วัน สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้แตกต่างกัน พบว่า ใบอ่อนที่มีอายุ 7 วัน ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ แต่มีรากจำนวนมากเกิดขึ้นจากชิ้นส่วน ในขณะที่ใบอ่อนอายุ 10 และ

14 วัน สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน การเกิดรากจากชิ้นส่วนใบอ่อนสะเดาเทียมอายุ 7 วัน อาจเกิดขึ้นเนื่องจากมีปริมาณออกซิน (IAA) ภายในใบสูง จึงเหมาะสมต่อการชักนำรากมากกว่าการชักนำแคลลัส เนื่องจาก IAA มีประสิทธิภาพและมีปริมาณมากที่สุดในเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ดังนั้นจึงมีผลทำให้ใบอ่อนของสะเดาเทียมอายุ 7 วัน ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ เพราะปริมาณของออกซินภายในกระตุ้นการเกิดรากมากกว่า นอกจากนี้แล้วชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินในอาหารอาจไม่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนอายุ 7 วัน ในอาหารเติม NAA เข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ ส่วนในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5-2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ โดยชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงไม่มีรากเกิดขึ้น ให้ผลสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของ *Aconitum heterophyllum* Wall. พบว่าการวางเลี้ยงในอาหารเติม NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำรากและแคลลัสจากชิ้นส่วน ในขณะที่การใช้ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA ให้สูงขึ้นสามารถชักนำแคลลัสที่ปราศจากรากได้ (Giri *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตามการศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของสะเดาเทียมในครั้งนี้ไม่ได้ทดลองในอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA ซึ่งอาจให้ผลดีกว่าการใช้ NAA ร่วมกับ KN

2.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้แตกต่างกัน การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนของสะเดาเทียมได้ผลดีในอาหารเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่การใช้ 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้ผลต่ำกว่า อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ ซึ่งการที่สะเดาเทียมตอบสนองต่อ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจาก 2,4-D เป็นออกซินที่มีกิจกรรมสูงกว่า NAA มาก ดังนั้นจึงควรใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ การใช้ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงตายได้เนื่องจากเซลล์ของพืชถูกทำลาย

(สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2536) ผลข้างต้นเป็นไปในทำนองเดียวกับการชักนำแคลลัสจากอับละอองเกสรของสะเดาอินเดีย ซึ่งพบว่าได้ผลดีในอาหารเติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ การใช้ NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้ความสามารถในการชักนำแคลลัสลดลงเช่นเดียวกับการใช้ 2,4-D เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (Gautam *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตามมีพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากการใช้ 2,4-D ดังเช่น การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Quercus serata* ได้ผลดีเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ (Sasamoto and Hoisi, 1992) และการชักนำแคลลัสจากใบของ *Sesbania bispinosa* (Jaiq) W.F. Wight. ประสบผลสำเร็จเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Sinha and Mallick, 1991) ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *Bunium persicum* Boiss. ในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำแคลลัสที่มีสีขาวและมีโครงสร้างอ่อนนุ่ม แต่เมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ (Wakhlu *et al.*, 1990)

การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของสะเดาเทียมในอาหารเติม NAA ร่วมกับ KN หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่การใช้ 2,4-D ควรใช้ความเข้มข้นต่ำ เพราะ 2,4-D เป็นออกซินที่มีกิจกรรมสูงมาก สามารถชักนำให้มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ทำให้วงจรการแบ่งเซลล์ (cell cycle) ถูกเร่งให้สั้นกว่าปกติ เมื่อเป็นเช่นนี้สารที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์ และโปรตีน จึงถูกสร้างอย่างรวดเร็วเช่นกัน จึงทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้างสารที่จำเป็นบางตัว เซลล์ลูกที่ได้หลังกระบวนการแบ่งเซลล์จึงผิดปกติ ทำให้เกิดความแปรปรวนภายในเซลล์สูง (สมปอง เตชะโต, 2536) อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสควรใช้ NAA เนื่องจาก NAA เป็นออกซินที่มีกิจกรรมต่ำกว่า 2,4-D จึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์มากนัก

2.3 การศึกษาสูตรอาหาร

สูตรอาหารมีผลต่อความสำเร็จในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้แตกต่างกัน การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนของสะเดาเทียมโดยการ

วางเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร คือ MS MH SH และ WPM พบว่าได้ผลดีในอาหารสูตร MS ในขณะที่สูตรอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ การที่อาหารสูตร MS สามารถชักนำแคลลัสได้ดีเนื่องจากมีองค์ประกอบของธาตุไนโตรเจนโดยเฉพาะไนเตรทอิออนในระดับสูง ซึ่งเนื้อเยื่อพืชต้องการใช้ในการชักนำแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัส (Sinha and Mallick, 1991 อ้างโดย Yan-Xiu *et al.*, 1993) คือ ประกอบด้วยแอมโมเนียมอิออน 4.65 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 27.47 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่สูตร MH มีแอมโมเนียมอิออน 4.56 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 15.46 มิลลิโมลาร์ สูตร SH มีแอมโมเนียมอิออน 0.41 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 15.18 มิลลิโมลาร์ และสูตร WPM มีแอมโมเนียมอิออน 1.13 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 3.86 มิลลิโมลาร์ ให้ผลในทำนองเดียวกับการทดลองของ Moura-Costa และคณะ (1993) พบว่าการชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Ocotia catharinensis* ได้ผลดีเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS อย่างไรก็ตาม Shirley และ Steven (1989) พบว่าอาหารสูตร MS และ MH สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Picea abies* ได้ผลดี แต่อาหารสูตร MH ไม่สามารถเพิ่มปริมาณและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้

2.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงมีผลต่อความสามารถในการดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของสะเดาเทียม การย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทุก 3 สัปดาห์ (21 วัน) เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) มีค่าไมโทติกอินเดกซ์ (mitotic index) สูง ในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สามารถดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้เป็นเวลา 3 เดือน แต่หากเพิ่มระยะเวลาการย้ายเลี้ยงเป็น 4 สัปดาห์ (28 วัน) ซึ่งเป็นระยะที่อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง (stationary phase) มีผลทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเสียสภาพภายในเวลา 2 เดือน นอกจากนี้ยังเกิดจากพิษของสารประกอบฟีนอลที่ถูกขับออกจากแคลลัสแล้วสะสมอยู่ในอาหารมีผลทำให้เซลล์บางเซลล์ตายได้หรือเซลล์ดังกล่าวไม่มีกิจกรรมอีกต่อไป เมื่อนำไปย้ายเลี้ยงทำให้การรักษาสภาพของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูญเสียไปได้ ในขณะที่การลดระยะเวลาย้ายเลี้ยงเป็น 2 สัปดาห์ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้น้อยมาก เพราะระยะเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เซลล์เตรียมดูดน้ำธาตุอาหารเพื่อกิจกรรมการแบ่งเซลล์ (lag phase) ผลดังกล่าว

เป็นไปในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยง *Sesbania* spp. พบว่าการย้ายเลี้ยงแคลลัสทุก 3 สัปดาห์ ในอาหารเติม 2,4-D สามารถดูแลรักษาแคลลัสนาน 6 เดือน (Yan-Xiu *et al.*, 1993) และการเพาะเลี้ยง Peach และ Nectarine พบว่าระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การย้ายเลี้ยงทุก 30 วัน สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้มากที่สุด แต่โซมาติคเอ็มบริโอที่ได้มีความผิดปกติสูงเพราะเกิดการแข่งขันในการแย่งอาหารสูงทำให้เอ็มบริโอที่ไม่ได้รับอาหารแสดงความผิดปกติ การย้ายเลี้ยงทุก 20 วัน ทำให้ความผิดปกติของเอ็มบริโอลดลง นอกจากนี้แล้วยังสามารถดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้นาน 10 เดือน แต่หากย้ายเลี้ยงเร็วขึ้นเป็น 10 วัน อัตราการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลดลงอย่างรวดเร็วและโซมาติคเอ็มบริโอมีการพัฒนาได้น้อยมาก (Bhansali *et al.*, 1990) และพบว่าการย้ายเลี้ยงอย่างสม่ำเสมอทำให้สามารถรักษาคุณสมบัติของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ได้ดี (Muralidharan *et al.*, 1989)

ปัญหาที่พบในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของสะเดาเทียมคือการที่เซลล์มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมามาก ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส การเปลี่ยนแปลงไปเป็นโซมาติคเอ็มบริโอ และมีผลทำให้แคลลัสที่วางเลี้ยงกลายเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากพิษของสารประกอบฟีนอลที่เซลล์ปลดปล่อยออกมา การเติม PVP ลงในสูตรอาหารเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของสะเดาเทียมมีผลทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี PVP ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และมีผลทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสกลายเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเซลล์ขับสารประกอบฟีนอลออกมาในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงทำให้เป็นพิษต่อแคลลัสได้จึงต้องทำการย้ายเลี้ยงทุกสัปดาห์ ซึ่งมีผลทำให้การเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลดลงเพราะการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของเซลล์เกิดน้อยมาก การเติม PVP ลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลยับยั้งการสร้างสารประกอบฟีนอลทำให้สามารถวางเลี้ยงได้นานกว่า 3 สัปดาห์ การใช้ผงถ่านเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แทน PVP เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงกลายเป็นสีน้ำตาล จากการสังเกตพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารเติมผงถ่านมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมามาก ทำให้เกิดการเป็นพิษต่อแคลลัสที่วางเลี้ยงได้ ซึ่งผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะใช้ผงถ่านความเข้มข้นน้อยเกินไป (0.5 เปอร์เซ็นต์) จึงไม่สามารถยับยั้ง

หรือดูดซับสารประกอบฟีนอลที่แคลลัสขับออกมาได้หมดจึงเกิดการสะสมและเกิดการเป็นพิษต่อแคลลัสได้ ผลดังกล่าวแตกต่างจากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสในพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จจากการวางเลี้ยงในอาหารเติมผงถ่าน ได้แก่ *Carina stipulata* (Litz and Conover, 1980) ปาล์มน้ำมัน (de Touchet *et al.*, 1991) และอินทผลัม (พรทิพย์ วงศ์แก้ว และคณะ, 2534)

3. การศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

3.1 การศึกษาสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของสะเดาเทียมพบว่าได้ผลดีในอาหารสูตร SH เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอที่มีขนาดใหญ่ (500-1,000 ไมโครเมตร) และมีการพัฒนาจากระยะรูปกลมเข้าสู่ระยะรูปหัวใจได้ การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 1 ไมโครโมลาร์ ให้โซมาติคเอ็มบริโอขนาดเล็ก (250-500 ไมโครเมตร) และมีการพัฒนาในระยะรูปกลม ในขณะที่การใช้ NAA ให้ผลในการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอต่ำกว่าการใช้ 2,4-D โซมาติคเอ็มบริโอกลายเป็นสีน้ำตาลไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ นอกจากนี้ยังมีการสร้างแคลลัสขึ้นใหม่ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารเติม 2,4-D มักชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนิคเซลล์และเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอใหม่จำนวนมาก ดังนั้นเพื่อชักนำให้มีการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอต่อไปจึงควรย้ายเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าโซมาติคเอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของสะเดาเทียมในอาหารเติม 2,4-D ให้ผลในทำนองเดียวกับการทดลองของ Chee และ Cantliffe (1988) พบว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของมันเทศได้ผลดีในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D สูงขึ้น ทำให้การพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอลดลงและทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสพัฒนาไปเป็นแคลลัสที่มีโครงสร้างอ่อนนุ่ม (mucilage callus) และการทดลองของ Vieitez และคณะ (1992) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Fagus sylvatica* L. ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นสูงได้เซลล์เดี่ยวขนาดเล็กและไม่มีการพัฒนาของกลุ่มแคลลัสขนาดใหญ่

ในขณะที่การใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำได้โซมาติคเอ็มบริโอและกลุ่มแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ และพบว่า 2,4-D มีความจำเป็นสำหรับการชักนำและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน ในการศึกษานี้พบว่าการดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของสะเดาเทียมในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สามารถดูแลรักษาได้นาน 8 เดือน ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้เพียง 3 เดือน ดังนั้นการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ (0.5 ไมโครโมลาร์) จึงเหมาะสมต่อการดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและชักนำโซมาติคเอ็มบริโอ เพราะโดยคุณสมบัติของ 2,4-D เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ แล้วส่งเสริมการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอ (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของมันเทศในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโออย่างเดียวเท่านั้น และพัฒนาการของโซมาติคเอ็มบริโอลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D ให้สูงขึ้น (Chee and Cantliffe, 1988)

3.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

ระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของสะเดาเทียมมีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงสูงมาก เนื่องจากในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการผลิตสารชีวเคมีที่สร้างจากเซลล์แล้วปลดปล่อยในอาหาร และมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้รวดเร็ว โดยเฉพาะสารประกอบโพลีฟีนอล ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการย้ายเลี้ยงให้เร็วขึ้น คือทำการย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอสูงสุด หากระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงนานขึ้นมีผลทำให้ได้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอลดลงเนื่องจากการตายของเซลล์ สอดคล้องกับการทดลองของ Taylor และคณะ (1992) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของอ้อยในระยะแรกมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมามากจึงควรมีการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่อย่างสม่ำเสมอ เพื่อช่วยลดอัตราการสะสมสารประกอบฟีนอล และกระตุ้นให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวได้ดีขึ้น และจากการทดลองของ Subbaiah และ Minocha (1990) พบว่าเป็นการยากมากที่จะดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ *Eucalyptus tereticornis* เนื่องจากปัญหาที่สำคัญคือการที่เซลล์สร้างสารประกอบฟีนอลออกมาสะสมในอาหารเหลวมาก ทำให้ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงต่ำ แต่การย้ายเลี้ยง

ทุก 2 สัปดาห์ สามารถลดปัญหาดังกล่าวได้

4. การศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่

4.1 การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

4.1.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำยอดรวม

การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของสะเดาเทียมได้ผลดีในอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.5-1 ไมโครโมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 3-10 ไมโครโมลาร์ การใช้ NAA ร่วมกับ KN ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำยอดรวมได้น้อยมากแต่ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับการทดลองของ Kovac (1993) ซึ่งรายงานว่าการชักนำพืชต้นใหม่ของ *Actinidia kolomikta* ในอาหารเติม NAA ร่วมกับ KN มักกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณของแคลลัสมากกว่าการชักนำพืชต้นใหม่ การเปลี่ยนรูปของไซโตไคนินที่ใช้ร่วมกับออกซิน (NAA) จาก KN เป็น BA มีผลทำให้สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้เป็นผลสำเร็จ ในทำนองเดียวกันนี้ Kumar (1992a) รายงานว่าการใช้ NAA ร่วมกับ KN มีผลทำให้ความสามารถในการชักนำต้นของ *Bauhinia purpurea* ลดลง แต่ส่งเสริมการสร้างแคลลัสแทน ในขณะที่ Son และ Hall (1990) รายงานว่า KN ให้ผลเหมือนกับการใช้ BA แต่ต้องใช้ในช่วงความเข้มข้นสูงกว่า และเมื่อเปลี่ยนรูปของออกซินที่ใช้คือจาก NAA เป็น 2,4-D ร่วมกับไซโตไคนินมักส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ *Populus ciliata* ในอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ แต่เมื่อย้ายเลี้ยงลงในอาหารเติม NAA ร่วมกับ BAP สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้เป็นผลสำเร็จ (Cheema, 1989) ทั้งนี้เพราะว่า 2,4-D เป็นออกซินที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการสร้างแคลลัส ในขณะที่ NAA มีผลเช่นเดียวกันแต่ส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (organogenesis) ความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของสะเดาเทียมในอาหารเติม NAA (เข้มข้น 0.5-1 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ BA (เข้มข้น 3-5 ไมโครโมลาร์) ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Gautam และคณะ (1993) ซึ่งรายงานว่าการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสจากอับละอองเกสรของสะเดาอินเดียได้ผลดีในอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA

4.1.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดรวมและการเจริญของยอด

การเพิ่มจำนวนยอดรวมของสะเดาเทียมได้ผลดีในอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ การลดหรือเพิ่มความเข้มข้นของ NAA (สูงกว่า 1 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ BA (สูงกว่า 4 ไมโครโมลาร์) มีผลทำให้การเจริญเติบโตของยอดรวมและจำนวนยอดรวมของสะเดาเทียมลดลง ยอดที่ได้มีลักษณะอวบน้ำและมีการชักนำแคลลัสเกิดขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Sinha และ Mallick (1991) ซึ่งรายงานว่า การเกิดยอดรวมของ *Sesbania bispinosa* (Jacq.) ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA สูงขึ้น และการทดลองของ Budimir และ Vujicic (1992) พบว่า การใช้ BA ความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำตายอดและการเจริญเป็นพืชต้นใหม่ของ *Picea omorika* (Pancic) Puek. ได้เป็นผลสำเร็จ แต่การใช้ BA ความเข้มข้นสูงชักนำโครงสร้างของตายอดและใบผิดปกติและชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสใหม่ขึ้นได้

โดยทั่วไปแล้วการชักนำความสูงของยอดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยืนต้นหลายชนิดประสบความสำเร็จในอาหารเติม GA3 เนื่องจาก GA3 มีคุณสมบัติในการชักนำการยืดยาวของลำต้นได้ จากการทดลองของ Geneve และคณะ (1990) พบว่าการชักนำความสูงของยอด *Gymnocladus dioicus* L. ได้ผลดีในอาหารเติม GA3 เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ และจากการทดลองของ Gautam และคณะ (1993) พบว่าการชักนำการยืดยาวของยอดสะเดาอินเดียประสบผลสำเร็จในอาหารเติม GA3 เข้มข้น 0.34 ไมโครโมลาร์ ผลดังกล่าวแตกต่างจากการทดลองในสะเดาเทียมในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าการวางเลี้ยงชิ้นส่วนยอดรวมในอาหารเติม GA3 เข้มข้น 0.34 ไมโครโมลาร์ ทำให้ยอดที่วางเลี้ยงอ้วนขึ้นมากกว่าสองเท่าของยอดปกติ ยอดมีสีขาวและตายในเวลาต่อมา ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากภายในใบอ่อนและต้นอ่อนของสะเดาเทียมสามารถสร้างจิบเบอเรลลินได้เพียงพอกับความต้องการ คนัย บุณยเกียรติ (2533) รายงานว่าการให้จิบเบอเรลลินกับพืชที่สมบูรณ์ทั้งต้นมีผลเร่งให้เกิดการขยายขนาดของลำต้นและใบผิดปกติได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการที่พืชบางชนิดไม่ตอบสนองต่อจิบเบอเรลลินอาจเป็นเพราะว่าในพืชชนิดนั้นมีปริมาณของจิบเบอเรลลินเพียงพอแล้ว ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Chesick และคณะ (1990) รายงานว่า การใช้ GA4 หรือ GA4+7 ไม่มีผลในการกระตุ้นยอดให้สูงขึ้น แต่มีผลทำให้มีการขยายขนาดของ

ยอดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร และตายภายในเวลา 6 สัปดาห์

4.1.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดรวมและการเจริญของยอด

สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำยอดรวม และความสูงของยอดให้ผลแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละสูตรอาหารมีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่เหมาะสมในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของต้นพืชแตกต่างกัน ในการศึกษานี้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดรวมของสะเดาเทียมคือ สูตร MS ซึ่งให้จำนวนยอดรวมสูงที่สุด เนื่องจากสูตร MS มีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์ คือประกอบด้วยแอมโมเนียมอิออน 4.65 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 27.47 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีผลในการส่งเสริมเกิดตายอดจำนวนมากจากแคลลัส ในขณะที่สูตร MH มีแอมโมเนียมอิออน 4.56 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 15.46 มิลลิโมลาร์ สูตร SH มีแอมโมเนียมอิออน 0.41 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 15.18 มิลลิโมลาร์ และสูตร WPM มีแอมโมเนียมอิออน 1.13 มิลลิโมลาร์ และไนเตรทอิออน 3.86 มิลลิโมลาร์ ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยอดคือ สูตร SH เนื่องจากมีองค์ประกอบของธาตุดังกล่าวต่ำกว่าสูตร MS ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Chesick และคณะ (1990) รายงานว่าการชักนำพืชต้นใหม่ของ Western larch ได้ผลดีในอาหารสูตร SH มากกว่าสูตร MS เนื่องจากสูตร SH มีระดับของแอมโมเนียมและไนเตรทต่ำกว่าสูตร MS จึงส่งเสริมการพัฒนาของยอดได้มากกว่า

4.2 การศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

การสุกแก่และการงอกของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของสะเดาเทียมไม่สามารถชักนำได้โดยตรง โซมาติคเอ็มบริโอผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสใหม่อีกในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ โซมาติคเอ็มบริโอที่ได้มีการพัฒนาอยู่ในระยะรูปกลม รูปหัวใจ และระยะใบเลี้ยง เมื่อเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอระยะใบเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าคงมีเพียงการพัฒนายอดและรากขนาดเล็ก ๆ ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ การย้ายเลี้ยงลงในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเจริญของยอดและรากต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เกิดโซมาติคเอ็มบริโอใหม่

ที่บริเวณใบเลี้ยงของโซมาติคเอ็มบริโอเดิม ให้ผลทำนองเดียวกับการทดลองของ Vieitez และคณะ (1992) ซึ่งรายงานการชักนำการสุกแก่และการงอกโซมาติคเอ็มบริโอของ *Fagus sylvatica* L. ว่าภายหลังจากวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารแข็งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของโซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปกลม เมื่อเลี้ยงต่อมาเป็นเวลา 1 เดือน โซมาติคเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ได้เป็นผลสำเร็จ แต่มีโครงสร้างผิดปกติ การแยกโซมาติคเอ็มบริโอที่มีระยะการพัฒนาต่าง ๆ ไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS และ WPM ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำการเจริญของยอดได้เนื่องจากขาดสารควบคุมการเจริญเติบโตในการพัฒนายอดต่อไป การย้ายเลี้ยงในอาหารเติมออกซินร่วมกับไซโตไคนินความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถชักนำการแผ่ขยายใบเลี้ยง ยอดและรากได้ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลของการเกิดเอ็มบริโอใหม่นั้นเกิดเนื่องจากชนิดและความเข้มข้นของออกซินที่ใช้ และยังมีผลต่อลักษณะของโซมาติคเอ็มบริโอด้วย การใช้ NAA หรือ 2,4-D มักมีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอใหม่ (Bhansali *et al.*, 1990) ซึ่งโซมาติคเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นใหม่อาจทำให้ได้พืชต้นใหม่ที่มีความแปรปรวนมากขึ้น ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการเลี้ยงเพื่อให้สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากโซมาติคเอ็มบริโอโดยตรง โดยการเปลี่ยนรูปของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ เช่นใช้ ABA (abscisic acid) แทน เนื่องจาก ABA ประสบความสำเร็จในการชักนำการสุกแก่และการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอได้ในพืชหลายชนิด ได้แก่ ยางพารา (Veisseire and Coudret, 1994) และ *Larix* x *heptoeuropaea* (Lelu *et al.*, 1994) นอกจากนี้แล้วการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสก็จำเป็นสำหรับการชักนำการสุกแก่และการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอ จากการชักนำการสุกแก่และการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอถั่วเหลืองได้ผลดีเมื่อวางเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 30 กรัมต่อลิตร เป็น 50 กรัมต่อลิตร (สิรนุช ลามศรีจันทร์ และคณะ, 2535)

5. การศึกษาการชักนำราก

การชักนำรากของสะเดาเทียมนอกหลอดทดลองโดยการกรีดโคนต้นแล้วจุ่มในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้น 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 5 30 และ 60 นาที แล้วปักชำในวัสดุปลูก พบว่าไม่สามารถชักนำรากได้ ให้ผลแตกต่างจากการทดลองของ Kovac (1993) ซึ่งพบว่าการชักนำรากของ

Actinidia kolomikta โดยการจุ่มแช่โคนยอดในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปปลูกลงในวัสดุปลูกระหว่างทรายกับเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 2:1 สามารถชักนำรากได้ดี นอกจากนี้เขายังรายงานว่าการชักนำรากได้ผลดีเมื่อใช้ยอดที่มีความสูง 30-35 มิลลิเมตร และมีใบติด 5-6 ใบ ซึ่งเป็นระยะที่มีความสมบูรณ์สูง จุ่มลงในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลสำเร็จ 84-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการศึกษาการชักนำรากของสะเดาเทียมใช้ยอดที่มีความสูง 20-30 มิลลิเมตร และมีใบประกอบติด 3-4 ใบ ซึ่งสะเดาเทียมเป็นพืชที่มีใบเป็นใบประกอบ แต่ละใบประกอบด้วยใบย่อย 3-5 ใบ ดังนั้นเมื่อนำไปชักนำรากนอกหลอดทดลอง อาจเกิดอัตราการคายน้ำสูงจึงเป็นผลทำให้ใบเหี่ยวและตายไปในที่สุด นอกจากนี้แล้ว ยังอาจเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ การสะสมของอาหารและออกซินภายในยอด อาจไม่เพียงพอในการกระตุ้นให้เกิดปุ่มราก ตลอดจนการที่พืชสร้างสารประกอบฟีนอลบริเวณบาดแผลโคนยอดอาจเป็นผลยับยั้งการสร้างรากได้ ซึ่งสารต่าง ๆ เหล่านี้จะมีปฏิกิริยาร่วมกันในการชักนำราก (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2536) อย่างไรก็ตาม Mohammed และ Vidaver (1988) พบว่าปัญหาสำคัญที่ทำให้การชักนำรากนอกหลอดทดลองของสนไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากการควบคุมความชื้นและสภาพความสมบูรณ์ของต้น การใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนช่วยในการเก็บความชื้นและธาตุอาหารสำหรับกระตุ้นการเจริญของราก เช่น พีท เพอร์ไลท์ หรือเวอร์มิคิวไลท์ อาจช่วยส่งเสริมการชักนำรากได้ ส่วนในการศึกษานี้ใช้วัสดุปลูก ได้แก่ ขุยมะพร้าว ถ่านแกลบ และวัสดุผสมระหว่าง ขุยมะพร้าว ถ่านแกลบ ทราย และดิน ในอัตราส่วน 1:1:1:1 พบว่าไม่สามารถชักนำรากได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของออกซินต่ำหรือระยะเวลาที่จุ่มแช่โคนยอดสะเดาเทียมในสารละลายออกซินไม่เพียงพอสำหรับการชักนำราก หรืออาจเกิดเนื่องจากความชื้นตลอดจนสภาพของต้นไม่เหมาะสมต่อการชักนำราก

การชักนำรากในหลอดทดลองโดยการจุ่มแช่โคนต้นของสะเดาเทียมในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้นอย่างละ 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 5 30 และ 60 นาที แล้ววางเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำรากได้ แต่เกิดแคลลัสขึ้นบริเวณโคนต้น การใช้ NAA หรือ IBA ความเข้มข้นสูงในพืชบางชนิดเช่น *Quercus suber* L. โดยการจุ่มแช่โคนยอดในสารละลาย IBA หรือ NAA ความเข้มข้นสูง (1 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 30 วินาที

แล้ววางเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น ไม่สามารถชักนำรากได้ แต่ไม่เกิดแคลลัสบริเวณโคนยอด (Manzanera and Pardos, 1990) ในขณะที่มีรายงานใน *Eucalyptus tereticornis* Smith. ว่าการจุ่มแช่โคนยอดในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำรากได้แต่รากเจริญได้เพียงระยะหนึ่งเท่านั้น (Das and Mitra, 1990) เนื่องจากการใช้ออกซินในปริมาณมากเกินไปเมื่อพืชนำไปใช้ไม่หมดทำให้เกิดการกระตุ้นการสังเคราะห์เอทธีลีนในเนื้อเยื่อของรากได้ (Wareing and Phillips, 1981 อ้างโดย Vargas-Zamora, 1992) แต่มีพืชบางชนิดประสบความสำเร็จในการจุ่มแช่โคนยอดในสารละลายออกซินเช่น การชักนำรากของ *Pyrus calleryana* Dcne. *P. betulifolia* และ *P. communis* โดยการจุ่มแช่ในสารละลาย IBA หรือ NAA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 วินาที แล้ววางเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Yeo and Reed, 1995) ดังนั้นในการศึกษาการชักนำรากของสะเดาเทียมจึงควรใช้ออกซินในระดับความเข้มข้นสูงขึ้นและเพิ่มระยะเวลาในการจุ่มแช่โคนยอดให้นานขึ้นเพื่อให้เกิดการกระตุ้นการสร้างรากได้ นอกจากนี้อาจเปลี่ยนรูปของออกซินที่ใช้เป็น IAA เนื่องจาก IAA มีประสิทธิภาพในการเกิดรากสูงในเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย (นพคล จรัสสัมฤทธิ์, 2537) เพื่อให้ IAA ที่เติมในอาหารนั้นมีปฏิกิริยาต่อเนื่องกับ IAA ภายในต้นแล้วกระตุ้นให้เกิดรากได้

การชักนำรากของต้นสะเดาเทียมที่ชักนำจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเติม IBA ร่วมกับ NAA เข้มข้นอย่างละ 5 ไมโครโมลาร์ หรือ NAA เข้มข้น 5-20 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากได้ แต่เป็นรากที่เกิดผ่านแคลลัส ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการย้ายปลูก ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบบท่อลำเลียงน้ำและอาหารของรากกับต้นไม่เชื่อมต่อกัน ทำให้ต้นไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ในขณะที่ IBA เข้มข้น 10-15 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากจากต้นโดยตรง การที่ NAA และ IBA ให้ผลในการชักนำรากต่างกัน เนื่องจาก NAA เป็นออกซินที่มีกิจกรรมสูงกว่า IBA ในระดับความเข้มข้นเท่ากัน สามารถเคลื่อนที่ภายในลำต้นได้ดีและสลายตัวช้า ดังนั้นการชักนำรากจึงควรใช้ NAA ในระดับความเข้มข้นต่ำ เพราะความเข้มข้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเกิดรากได้และส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วจนเกิดแคลลัสขึ้นได้ ในขณะที่ IBA เป็นออกซินที่มีกิจกรรมค่อนข้างต่ำ เคลื่อนย้ายภายในลำต้นได้ช้ามาก และสลายตัวเร็วพอประมาณจึงมีคุณสมบัติเหมาะสมในการชักนำรากมากกว่า (สมบุญ

เตชะภิญญาวัฒน์, 2536) สอดคล้องกับการชักนำรากของสะเดาอินเดีย (Gautam *et al.*, 1993) และ *Eucalyptus sideroxylon* (Burger, 1987) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าเมื่อนำต้นกล้าสะเดาเทียมที่ผ่านการชักนำรากในหลอดทดลองไปย้ายปลูกไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากรากเปราะหักขาดง่าย จึงไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ทำให้รากและต้นเหี่ยวตาย สอดคล้องกับรายงานของ Mohammed และ Vidaver (1988) ซึ่งพบว่าการย้ายต้นกล้าของ White spurce ที่ผ่านการชักนำรากในหลอดทดลองไปปลูกไม่สามารถมีชีวิตรอดได้

การชักนำรากของต้นสะเดาเทียมจากโซมาติคเอ็มบริโอที่เกิดใหม่ได้ผลดีในอาหารเติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่ IBA ความเข้มข้นดังกล่าวให้ผลในการชักนำรากได้ต่ำมาก ให้ผลแตกต่างจากการชักนำรากของต้นสะเดาเทียมจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดขึ้นเนื่องจากสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เพราะว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร SH ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดังนั้นเมื่อนำมาชักนำรากปฏิกิริยาของออกซินภายในต้นกับอาหารที่เพาะเลี้ยงจึงแตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วอายุของต้นที่นำมาชักนำรากแตกต่างกัน คือต้นที่ชักนำจากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันมีอายุ 2-3 สัปดาห์ ในขณะที่ต้นที่ชักนำจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีอายุ 6-8 สัปดาห์ ดังนั้นจึงตอบสนองต่อชนิดของออกซินได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Mohammed และ Vidaver (1988) พบว่าอายุของต้นที่นำมาชักนำรากตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่างกัน

บทที่ 5

บทสรุป

1. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนแผ่นใบที่มีเส้นกลางใบ และแผ่นใบที่ไม่มีเส้นกลางใบจากใบอ่อนอายุ 10 และ 14 วัน ของต้นกล้าสะเดาเทียม ได้ผลดีที่สุดในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และสามารถดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไว้ได้ โดยทำการย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ ในอาหารใหม่สูตรเดิม หรือในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันคือ สูตร SH เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเลี้ยงคือ 2 สัปดาห์ สามารถให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอสูงสุด

3. การชักนำพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ผลดีในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.53-1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 3-5 ไมโครโมลาร์ การเพิ่มจำนวนยอดรวมได้สูงสุดในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และการชักนำการเจริญเติบโตของยอดได้ผลดีในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

4. การชักนำการสุกแก่ของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันทำโดยการวางเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอในอาหารสูตร SH เติม NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และชักนำการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอได้ในอาหารสูตรเดียวกันเติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. การชักนำรากจากต้นที่ชักนำจากเอ็มริโอเจนิคแคลลัสโดยการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีธาตุอาหารครึ่งความเข้มข้นของสูตรปกติ เติม IBA เข้มข้น 10-15 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงในที่มืด 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปวางเลี้ยงในที่มีแสง สามารถชักนำรากจากโคนต้นโดยตรงภายในเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนการชักนำราก

จากต้นที่ชักนำจากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้ผลดีในอาหารสูตรเดียวกันเติม NAA เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์

เอกสารอ้างอิง

กรมป่าไม้. 2536 ก. ไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซีส. ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน สำนักส่งเสริมการปลูกป่า.

กรมป่าไม้. 2536 ข. สะเดาเทียม. ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน สำนักส่งเสริมการปลูกป่า.

คนัย บุณยเกียรติ. 2533. สรีรวิทยาของพืชสวน. เชียงใหม่. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2532. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. กรุงเทพฯ: สหมิตรออฟเซท.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, บุญเรือน เพียรงาน และ ฐิติพร ผลธรรมพิทักษ์. 2534. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออินทผลัม. แก่นเกษตร 19:191-200.

มาลี กาญจนภูมิ. 2532. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สงขลา. ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรรณลาภ โพธิชัย. 2536. สะเดาช้าง. สุราษฎร์ธานี: บีแอนด์กราฟฟิค.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2536. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมปอง เตชะโต. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. (พิมพ์ครั้งที่ 2). สงขลา. ภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง ทองดีแท้. 2536. แนะนำวิธีการใช้เมล็ดสะเดาป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช แบบง่ายและปลอดภัย. ข่าวเกษตร 13:12-13.

สิรนุช ลามศรีจันทร์, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, กุลวดี ไชยประสิทธิ์, ฉันทนา คงนคร, พีรนุช การีรส และศศิธร เชื้อกุณะ. 2536. ความก้าวหน้าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทย. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 26:151-157.

สิรนุช ลามศรีจันทร์, อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ และสุมินทร์ สมุทคุปติ์. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองในสภาพแขวนลอย. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 27 : 453-462.

สุทัศน์ จูงพงศ์ และไววิทย์ บูรณธรรม. 2536. สะเดาเทียม. ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ สงขลา กรมป่าไม้.

Arias-Castro, C., Scragg, A. H., Stafford, A. and Rodriguez-Mendiola, M. 1993. Growth characteristics of *Glycyrrhiza glaber* cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33:49-55.

Bennett, K. L. and Davies, J. F. T. 1986. *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings. HortScience 21:1045-1047.

Bhansali, R. R., Driver, J. A. and Durzan, D. J. 1990 Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. Plant Cell Reports 9 : 280-284.

Bourgkard, F. and Favre, J. M. 1988. Somatic embryos from callus of *Sequoia sempervirens*. Plant Cell Reports 7 : 445-448.

Budimir, S. and Vujecic, R. 1992. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pancic) Purk. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31:89-94.

Burger, D. E. 1987. Micropropagation of *Eucalyptus sideroxylon*. HortScience 22:496-497.

Chee, R. P. and Cantliffe, D. J. 1988. Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir. embryogenic and non embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15:149-159.

Cheema, S. G. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue cultures of mature himalayan poplar (*Populus ciliata*). Plant Cell Reports 8:124-127.

Chesick, E. E., Bilderbach, D. E. and Blake, G. M. 1990. *In vitro* multiple bud formation by 20-year-old western larch buds and stems. HortScience 25:114-116.

Dalton, S. J. and Thomas, I. D. 1992. A statistical comparison of various factors on embryogenic proliferation, morphogenesis and regeneration in *Lolium temutentum* cell suspension colonies. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30:15-29.

Das, T. and Mitra, G. C. 1990. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22:95-103.

de Touchet, B. D., Duval, Y. and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from

embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Plant Cell Reports 9:529-532.

Dewan, A., Nanda, K and Gupta, C. S. 1992. *In vitro* micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brenan *via* cotyledonary nodes. Plant Cell Reports 12:18-21.

Finer, J. J., Kriebel, B. H. and Becwar, R. M. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L). Plant Cell Reports 8:203-206.

Finer, J. J. and Nagasawa, A. 1988. Development of embryogenic culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15:125-136.

Gautam, V. K., Nanda, K. and Gupta, S. C. 1993. Development of shoots and roots in anther-derived of *Azadirachta indica* A. Juss. a medicinal tree. Plant Cell Reports 34:13-18.

Geneve, R. L., Kester, S. T. and El-Shall, S. 1990. *In vitro* shoot initiation in kentucky coffee tree. HortScience 25:578.

Gingas, V. M. 1991. Asexual embryogenesis and plant regeneration from male catkins of *Quercus*. HortScience 26:1217-1218.

Giri, A., Ahuja, P. S. and Ajay-Kumar, P. V. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32:213-218.

Hakman, J. and Fowke, L. C. 1987. An embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (White spruce). Plant Cell Reports 6:20-22.

Kovac, J. 1993. Micropropagation of *Actinidia kolomikta*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35:301-303.

Kumar, A. 1992 a. Micropropagation of a mature leguminous tree, *Bauhinia purpurea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31 : 257-259.

Kumar, A. 1992 b. Somatic embryogenesis and high frequency plantlet regeneration in cultures of *Thevetia peruviana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31 : 47-50.

Kyung-Hwan, H., Daniel, K. E. and Mitton, G. P. 1993. Cambial tissue culture and subsequent shoot regeneration from mature black locus (*Robinia pseudocacia* L). Plant Cell Reports 12:185-188.

Langezaal, R. C. and Scheffer, J. C. J. 1992. Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30:159-164.

Lelu, M. A., Bastien, C., Klimasqewska, K. and Charest, P. J. 1994. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix teptoeurpaea*) : Part I : Somatic embryos maturation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 : 117-127.

Litz, R. E. and Conover, R. A. 1980. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carina stipulata*. HortScience 15:733-735.

Manzanera, J. A. and Pardos, J. A. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Qurcus suber* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21:1-8.

Merkle, S. A. and Watson-Pauley, B. A. 1993. Regeneration of Bigleaf magnolia by somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35 : 279-241.

Mohammed, H. G. and Vidaver, E. W. 1988. Root induction and plantlet development in tissue-cultured conifers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14:137-160.

Moura-Costa, P.H., Viana, A. M. and mantell, S.H. 1993. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35 : 279-286.

Muralidharan, E. M., Gupta, P.K. and Mascarenhas, A. F. 1989. Plantlet Production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. Plant Cell Reports 8 : 41-43.

Muralidharan, E. M. and Mascarenhas, A. F. 1987. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. Plant Cell Reports 6:256-259.

Orunstrup, H., Molgaard, J. P. and Farestveit, B. 1993. Somatic emgryogenesis and plant regeneration from cell suspension of *Exacum affine*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35:37-41.

Park, Y. G. and Son, S. H. 1988. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15:95-105.

Rao, K. S. 1988. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Plant Cell Reports 7:546-549.

Robacker, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadin grape leaf explant. HortScience 28:51-55.

Sasamoto, H. and Hoisi, Y. 1992. Callus proliferation from the embryogenic cells of *Quercus serrata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29:241-245.

Sharma, K. V., Jethwani, V. and Kothari, S. L. 1993. Embryogenesis in suspension cultures of *Datura innoxia* Mill. Plant Cell Reports 12:581-584.

Shirley, V. A. and Steven, W. R. 1989. Norway spruce somatic embryogenesis high frequency initiation from light cultured mature embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16:103-111.

Sinha, R. K. and Mallick, R. 1991. Plantlets from somatic callus tissue of the woody legume *Sesbania bispinosa* (Jacq.) W. F.Wight. Plant Cell Reports 10:247-250.

Son, H. S. and Hall, R. B. 1990. Plant regeneration capacity of callus derived from leaf, stem and root segments of *Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx. Plant Cell Reports 9:344-347.

Subbaiah, M. M. and Minocha, S. C. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis.* Plant Cell Reports 9:370-373.

Taylor, P. W. J., Hian-Lien, K., Adkins, S. W., Rathus, C. and Birch, R. 1992. Establishment of embryogenic callus and high protoplasts yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29:241-245.

Vargas-Zamora, C. 1992. Tissue culture of petroleum nut tree *(Pittosporum resiniferum.* Hemsl). *In* Biotechnology for Forest Tree Improvement. (eds. R. C. Umaly., I. Umboh., S. S. Fjitrosomo and N. M. Noor) Vol. 49, pp. 27-34, Bogor: Seameo Biotrop.

Veisseire, P. and Coudret, A. 1994. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryo in *Hevea brasiliensis.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:219-223.

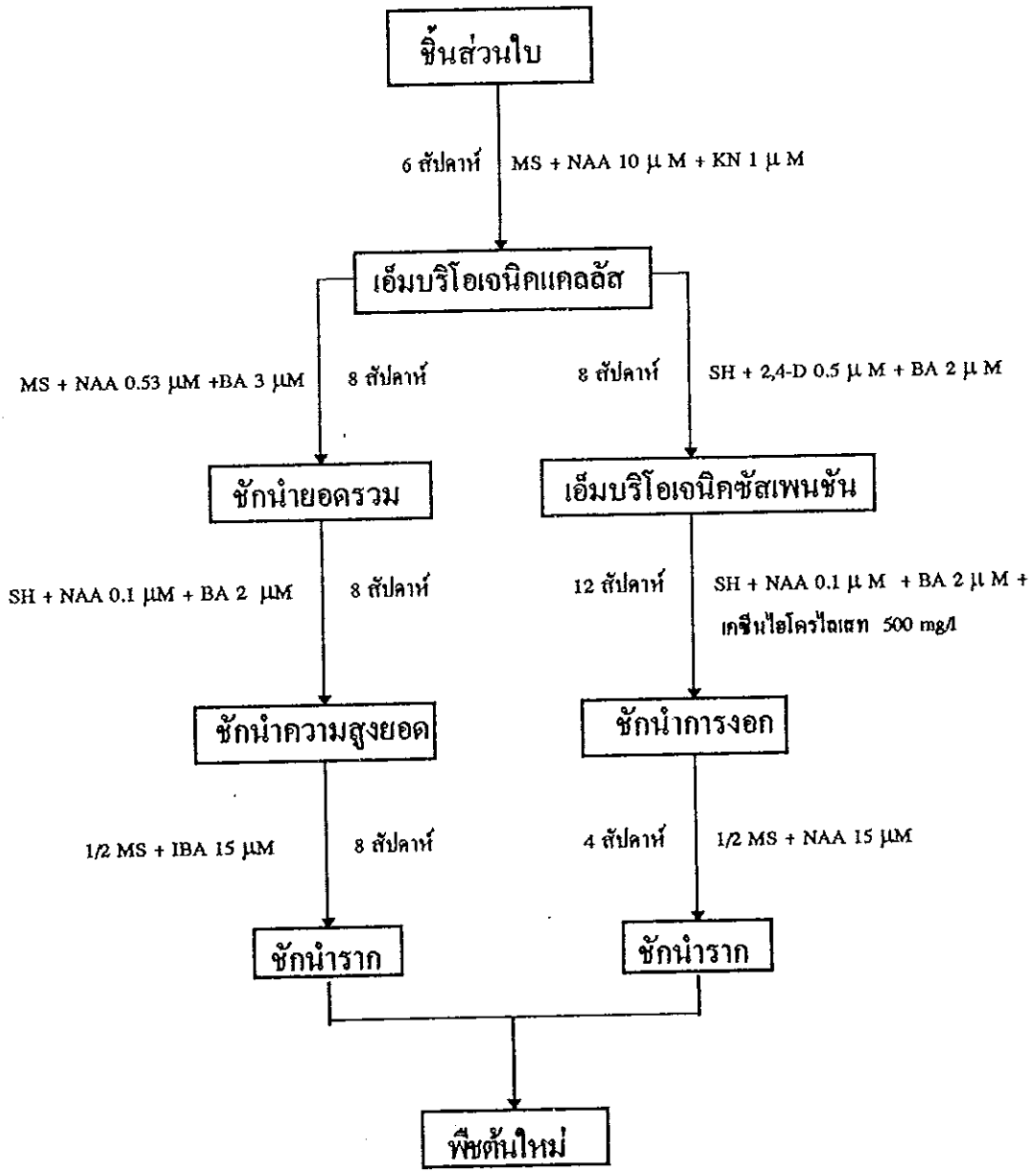
Vieitez, F. J., Ballester, A and Ana, M. 1992. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension culture of *Fagus sylvatica* L. Plant Cell Reports 11:609-613.

Wakhlu, A. K., Nagari, S and Barna, K. S. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Bunium persicum* Boiss. Plant Cell Reports 9:137-138.

Yan-Xiu, Z., Dua-Yi, Y. and Harris, J. C. P. 1993. Plant regeneration from callus and explant of *Sesbania* spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:253-260.

Yeo, D. Y. and Reed, B. M. 1995. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. HortScience 30:620-623.

ภาคผนวกที่ 1



ขั้นตอนการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของสะเดาเทียม

ภาคผนวกที่ 2

องค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige and Skoog

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$MnSO_4$ $1H_2O$	16.90
$ZnSO_4$ $7H_2O$	10.60
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.025
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0.25
$CoCl_2$ $6H_2O$	0.025
$CaCl_2$ $2H_2O$	440.00
$MgSO_4$ $7H_2O$	370.00
$FeSO_4$ $7H_2O$	27.80
Na_2 EDTA	37.30
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
PyridoxineHCl	0.50
ThiamineHCl	0.10
Glycine	2.00
pH 5.7-5.8	

ภาคผนวกที่ 3

องค์ประกอบของอาหารสูตร Medium for Hevea

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,601.00
KNO_3	2,022.00
$NaH_2PO_4\ 1H_2O$	276.00
H_3BO_3	9.82
KI	0.83
$MnSO_4\ 1H_2O$	16.90
$ZnSO_4\ 7H_2O$	11.50
$CuSO_4\ 5H_2O$	0.37
$Na_2MoO_4\ 2H_2O$	0.24
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.24
$CaCl_2\ 2H_2O$	333.00
Na_2SO_4	92.37
$MgSO_4\ 7H_2O$	739.00
$FeSO_4\ 7H_2O$	27.80
Na_2 EDTA	37.30
Myo-inositol	5.40
Nicotinic acid	0.46
PyridoxineHCl	0.62
ThiamineHCl	0.67
Biotin	0.048
Ca.panthothenate	0.48
Ascorbic acid	0.17
Choline chloride	0.14
CysteineHCl	0.46

ภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Glycine	0.37
Riboflavin	0.37
pH 5.7-5.8	

ภาคผนวกที่ 4

องค์ประกอบของอาหารสูตร Schenk and Hildebrandt

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$NH_4 H_2 PO_4$	300.00
KNO_3	2,500.00
$H_3 BO_3$	5.00
KI	1.00
$MnSO_4$ $1H_2O$	10.00
$ZnSO_4$ $7H_2O$	1.00
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.20
$Na_2 MoO_4$ $2H_2O$	0.10
$CoCl_2$ $6H_2O$	0.10
$CaCl_2$ $2H_2O$	200.00
$MgSO_4$ $7H_2O$	400.00
$FeSO_4$ $7H_2O$	15.00
Na_2 EDTA	20.00
Nicotinic acid	5.00
PyridoxineHCl	0.50
ThiamineHCl	5.00
pH 5.9	

ภาคผนวกที่ 5

องค์ประกอบของอาหารสูตร Woody Plant Medium

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	400.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4$ $1H_2O$	16.90
$ZnSO_4$ $7H_2O$	8.60
$CuSO_4$ $5H_2O$	6.25
Na_2MoO4 $2H_2O$	0.25
$CaCl_2$ $2H_2O$	96.00
$Ca(NO_3)_2$ 4 H_2O	556.00
K_2 SO_4	990.00
$FeSO_4$ $7H_2O$	27.80
Na_2 EDTA	37.30
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
PyridoxineHCl	0.50
ThiamineHCl	1.00
Glycine	2.00
pH 5.8	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวอรอุมา รุ่งน้อย

วัน เดือน ปี เกิด 4 มกราคม 2512

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง	2535

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ทุนสนับสนุนจากโครงการทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีการศึกษา 2536-2537