ประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการทำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส เพื่อพัฒนาคุณภาพของต้นกล้าสำหรับการผลิตหญ้าหวาน

ณราพรณ์ เปี่ยมสุวรรณวรา

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
พฤษภาคม 2566

ประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการทำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสเพื่อพัฒนาคุณภาพของต้นกล้าสำหรับการผลิตหญ้าหวาน

ณราพรณ์ เปี่ยมสุวรรณวรา

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
พฤษภาคม 2566

APPLYING PLANT TISSUE CULTURE AND SOMATIC EMBRYOGENESIS FOR IMPROVING NURSERY CROPS IN STEVIA CULTIVATION

NARAPORN PIAMSUWANVARA

A Thesis Submitted to University of Phayao

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Agricultural Science

May 2023

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการทำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสเพื่อพัฒนาคุณภาพของต้นกล้าสำหรับการผลิตหญ้าหวาน

ของ ณราพรณ์ เปี่ยมสุวรรณวรา

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ ชิดบุรี)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัลยา ภู่ทอง)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร. ภาวินี จันทร์วิจิตร)

..... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก)

เรื่อง: ประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการทำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสเพื่อพัฒนาคุณภาพของต้นกล้าสำหรับการผลิตหญ้าหวาน

ผู้วิจัย: ณราพรณ์ เปี่ยมสุวรรณวรา, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (วิทยาศาสตร์การเกษตร), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัลยา ภู่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ภาวินี จันทร์วิจิตร

คำสำคัญ: หญ้าหวาน สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ออกซิน ไซโตไคนิน เมล็ดเทียม

บทคัดย่อ

การพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะเป็นการผลิตต้นพันธุ์หรือการผลิตเมล็ดเทียม โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณยอดโดยตรงจากชิ้นส่วนข้อและชักนำการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและปล้อง โดยทั้งสองการทดลองเป็นการศึกษาและทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชไซโตไคนินและออกซิน จากผลการทดลองพบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณยอดของหญ้าหวานจากชิ้นส่วนข้อ แต่อย่างไรก็ตามการใช้สูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม Benzylaminopurine (BAP) และ Kinetin (Kin) ความเข้มข้น 2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม ให้จำนวนใบมากที่สุด และสูตรอาหาร WPM ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชมีความสูงยอดต่อต้นสูงที่สุด (5.17 เซนติเมตร) จากการชักนำการเกิดแคลลัส พบว่า การใช้ชิ้นส่วนใบให้แคลลัสมากที่สุด โดยสูตรอาหารที่เหมาะสม คือ สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมากที่สุด ในส่วนการผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อและยอด พบว่า สูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l โดยใช้โซเดียมแอลจิเนตปริมาณ 0.8 กรัมต่ออาหาร 20 มิลลิลิตร ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ 0.7 กรัมต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร โดยการเก็บรักษาเมล็ดเทียมควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำซึ่งเป็นสภาพการเก็บรักษาที่ดีที่สุด นอกจากนี้การปลูกหญ้าหวานโดยใช้ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นกล้าที่ได้จากการปักชำมีการเจริญเติบโตของต้นพืชไม่แตกกันกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนต้นหญ้าหวานด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ต้นกล้าได้ในปริมาณที่มากในระยะเวลาที่รวดเร็ว

Title: APPLYING PLANT TISSUE CULTURE AND SOMATIC EMBRYOGENESIS FOR IMPROVING NURSERY CROPS IN STEVIA CULTIVATION

Author: Naraporn Piamsuwanvara, Thesis: M.Sc. (Agricultural Science), University of Phayao, 2022

Advisor: Assistant Professor Dr. SUKALYA POOTHONG Co-advisor Dr.PAVINEE CHANVICHIT

Keywords: Stevia plant growth regulators cytokinin auxin artificial seed

ABSTRACT

In vitro culture of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) can produce mass quantity of plants either for plantlets or artificial seeds production. In this study, shoot multiplication was conducted through node culture and callus induction from leaves and internodes. Both experiments were designed to test the effects of plant growth regulators (PGRs); cytokinin and auxin. According to the results, adding PGR had no significant effect on shoot multiplication from node. However, MS basal medium supplemented with 2 mg/L BAP and 0.5 mg/L Kinetin combined with 0.1 mg/L NAA had highest number of leaves. While WPM medium without PGR resulted in highest shoot length per plant (5.17 cm). Leaves were suitable explant for callus induction. MS basal medium supplemented with 0.5 mg/L BAP and 0.1 mg/L 2,4-D provided the highest fresh weight and dry weight of callus. Artificial seeds were produced from node and shoot. The most suitable medium for artificial seeds production was ½ MS supplemented with 1.5% sucrose, and combined with 1 mg/l BAP and 1 mg/l NAA, using 0.8 g of sodium alginate per 20 ml of medium and 0.7 g of calcium chloride per 50 ml of medium. Artificial seeds should be stored at low temperature, which is the optimum storage condition. Plantlet of Stevia obtained from both tissue culture and cuttings were planted to compare plant growth. As a result, it was not significantly different. Nevertheless, mass production of Stevia using *in vitro* culture was able to produce plantlets in large quantity in a short time.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการทุนพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรมระดับปริญญาโท (พวอ.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สัญญาทุนเลขที่ MSD62I0015 ที่ให้ทุนการศึกษา และค่าเล่าเรียนแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัลยา ภู่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยชี้แนะและให้ความรู้เทคนิคต่าง ๆ เกี่ยวกับขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ภายในห้องปฏิบัติการสาขาเกษตรศาสตร์ รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.ภาวินี จันทร์วิจิตร อาจารย์ที่ปรึกษาที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องและชี้แนะแนวทางการแก้ไขของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ ชิดบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ มาเป็นประธานกรรมการสอบในครั้งนี้

ขอขอบคุณ บุคลากรของคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความช่วยเหลือจนเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้กำลังใจ และให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าได้เล่าเรียน และเพื่อน ๆ ที่คอยให้การสนับสนุนมาโดยตลอด

ณราพรณ์ เปี่ยมสุวรรณวรา

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

หน้า

สารบัญภาพ

หน้า

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

หญ้าหวาน (Stevia) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stevia rebaudiana* Bertoni M. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Compositae หรือ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่บราซิล และปารากวัย หญ้าหวานจัดว่าเป็นพืชเศรษฐกิจและพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากใบของหญ้าหวานมีสารให้ความหวานที่สามารถใช้ทดแทนน้ำตาลได้ โดยมีความหวานมากกว่าน้ำตาล 250–300 เท่า แต่ให้พลังงานต่ำกว่าน้ำตาล จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้หญ้าหวานยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุได้ จากความต้องการใช้หญ้าหวานทั้งทางด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มอาหารที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีเกษตรกรสนใจปลูกหญ้าหวานเพื่อการค้า และเพิ่มรายได้ให้แก่ครอบครัวมากขึ้น โดยเกษตรกรนิยมขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยวิธีการเพาะเมล็ดเนื่องจากสะดวก และประหยัดเวลา แต่จะพบปัญหาเรื่องของเปอร์เซ็นต์การงอกที่ค่อนข้างต่ำ การขยายพันธุ์หญ้าหวานอีกหนึ่งวิธี คือ การปักชำ แต่การปักชำหญ้าหวานมักจะพบปัญหาในเรื่องของการติดโรคจากต้นพันธุ์สูง ทำให้เกษตรกรไม่สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดและผู้บริโภค ดังนั้นการขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มจำนวนต้นพืชให้ได้จำนวนมากขึ้นในระยะเวลาอันรวดเร็วจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคการขยายพันธุ์พืชโดยใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ และควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ แสง อุณหภูมิ และความชื้น โดยข้อดีของการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ คือ ได้ต้นพืชในปริมาณมากในระยะเวลาที่รวดเร็ว ปลอดโรค และ คุณภาพสม่ำเสมอ ซึ่งการชักนำการเกิดยอดของหญ้าหวานสามารถทำได้โดยวิธีการชักนำการเกิดยอดผ่านชิ้นส่วนพืชโดยตรง หรือโดยอ้อม คือ ผ่านการเกิดยอดจากแคลลัส รวมทั้งการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส ซึ่งเป็นการชักนำให้เซลล์พืชพัฒนาและเกิดโครงสร้างคล้ายแบบการสร้างคัพภะ แล้วนำไปใช้เพื่อผลิตเมล็ดเทียม ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่เหมาะสมสำหรับการชักนำการเกิดแคลลัส และการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมของหญ้าหวานร่วมด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มปริมาณยอดของหญ้าหวาน

2. เพื่อศึกษาการชักนำการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสในหญ้าหวานเพื่อใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์

3. เพื่อศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมสำหรับใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไป

ขอบเขตการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของหญ้าหวาน ซึ่งมี 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มปริมาณต้นหญ้าหวาน โดยใช้ชิ้นส่วนข้อของต้นหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ สูตร WPM ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ Kin ที่ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/l เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกคะแนนเฉลี่ยค่าสมบูรณ์ของต้น (คะแนน) จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) จำนวนใบ (ใบต่อชิ้นส่วนพืช) และความสูงยอด (เซนติเมตร: cm)

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS และ MS ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 9% เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกจำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) ความสูงยอด (cm) วัดค่าดัชนีความเขียวของใบ จำนวนราก (รากต่อชิ้นส่วนพืช) และความยาวราก (cm)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส ซึ่งมี 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลอง 2.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัส โดยใช้ชิ้นส่วนปล้อง และใบของหญ้าหวาน นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP และ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–Dichlorophenoxy acetic acid (2,4–D) ความเข้มข้น 0.1 และ 2.0 mg/l เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (%) คะแนนการเกิดแคลลัส

(คะแนน) คะแนนสีของแคลลัส (คะแนน) น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม: g) และน้ำหนักแห้งของแคลลัส (g)

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากแคลลัส โดยในการทดลองนี้จะนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 2.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4-D และ NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/l เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการบันทึกผลการเกิดเอ็มบริออยด์ในระยะต่าง ๆ และเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส (%)

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกันต่อการผลิตเมล็ดเทียม ซึ่งมี 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการผลิตเมล็ดเทียม โดยใช้ชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน มาทำเมล็ดเทียมในอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 1.5 และ 3% ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA และ IBA ความเข้มข้น 1.0 mg/l ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการบันทึกผลจากการสังเกตบรรยายลักษณะ และภาพถ่ายลักษณะของเมล็ดเทียม โดยบันทึกการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดเทียม

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาสภาพการเก็บรักษาเมล็ดเทียม นำเมล็ดเทียมที่ได้จากการใช้สูตรอาหาร ½ MS ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 3% โดยมีชิ้นส่วนทั้งข้อและยอด เมื่อได้เมล็ดเทียมแล้วให้นำมาทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ ในสภาพอากาศในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 24±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์ และเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการบันทึกเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดเทียมในแต่ละอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นกล้าที่ได้จากการปักชำ นำต้นพืชที่มียอดและการเกิดรากที่สมบูรณ์ จากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และต้นกล้าอายุประมาณ 5 – 6 เดือน นำมาปักชำโดยตัดยอดให้มีความสูงประมาณ 5 cm ตัดใบส่วนล่างออก ให้เหลือแต่ใบส่วนยอด โดยทำการอนุบาลต้นพืชและปักชำในวัสดุปลูก คือ พีทมอส เพาะปลูกเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอด

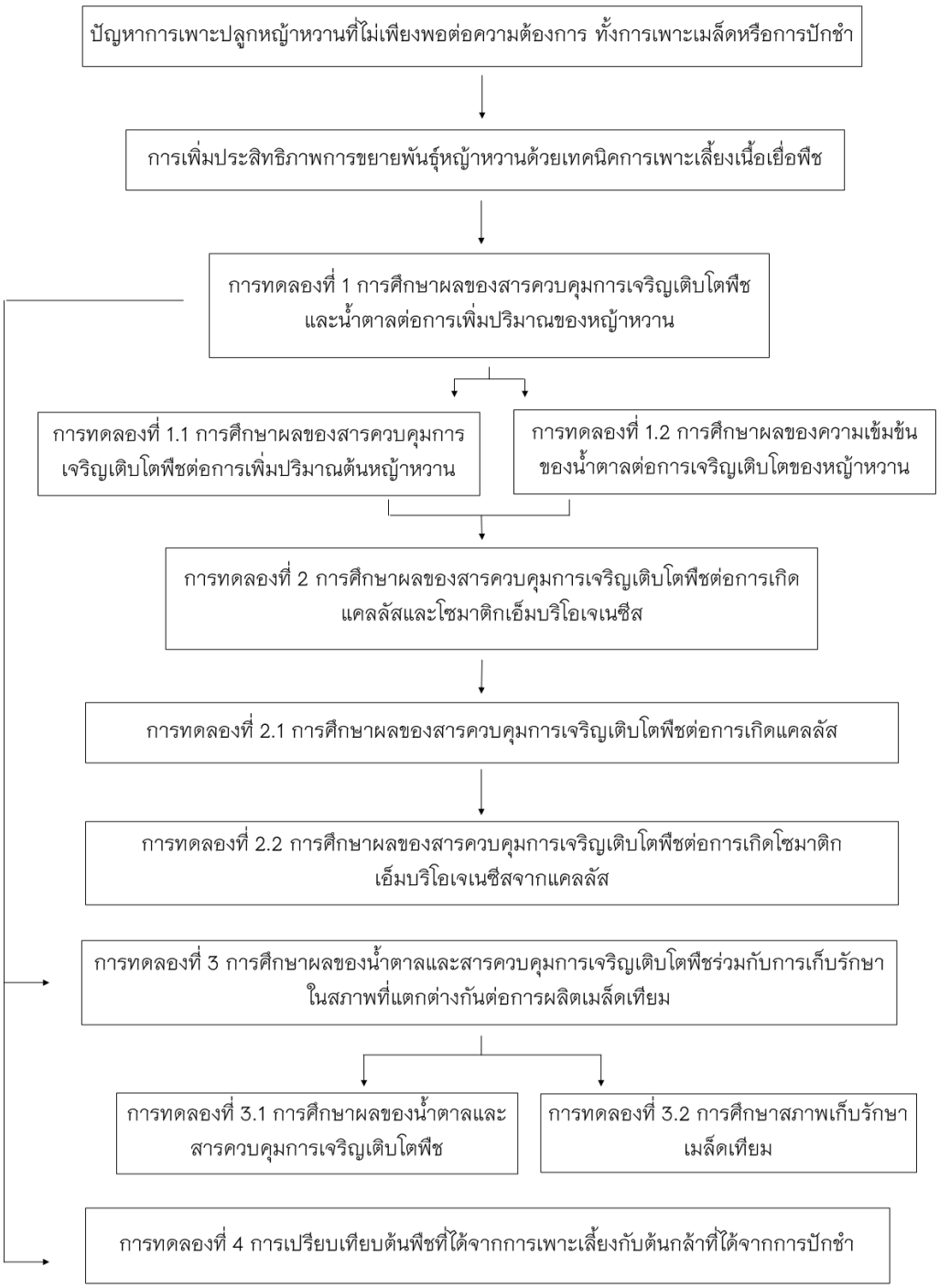
ชีวิตของต้นพืช ความสูงของต้น (cm) จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) และจำนวนใบ (ใบต่อชิ้นส่วนพืช)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ต้นหญ้าหวานด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อเพิ่มปริมาณต้นพืช และผลิตต้นหญ้าหวานที่มีคุณภาพและปริมาณตามความต้องการของเกษตรกร

2. ได้กรรมวิธีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเมล็ดเทียมหญ้าหวานเพื่อเป็นแนวทางการขยายพันธุ์ของหญ้าหวานต่อไป

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย



ภาพ 1 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหญ้าหวาน

หญ้าหวานมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Stevia rebaudiana Bertoni หรือเรียกอีกอย่างว่า Stevia จัดเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae (Compositae) มีถิ่นกำเนิดบริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของอเมริกาใต้ สามารถพบได้ตามธรรมชาติที่ประเทศบราซิล ปารากวัย อุรุกวัย อาเจนตินา จัดเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ทรงพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 30–90 เซนติเมตร เปลือกของลำต้นมีลักษณะบาง สีเขียวอ่อน ลักษณะเนื้อไม้เป็นไม้เนื้ออ่อน เปราะหักง่าย ใบของหญ้าหวานเป็นใบเลี้ยงคู่ แตกใบออกเดี่ยว ๆ เรียงตรงข้ามกันเป็นคู่ตามลำต้นและกิ่ง ใบกว้างประมาณ 1–1.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 3–4 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบขอบใบหยักคล้ายฟันเลื้อย มีสีเขียวเข้ม แผ่นใบเมื่อเคี้ยวหรือนำไปต้มดื่มจะมีรสหวานจัด ดอกของหญ้าหวานมีสีขาว ลักษณะเป็นช่อที่ปลายยอด มีกลีบดอกจำนวน 5 กลีบ เกสรตัวผู้อยู่ด้านในดอกมีสีเหลืองอมน้ำตาล ส่วนเกสรตัวเมียเป็นก้านเกสรสีขาวยื่นออกมาจากตัวดอกคล้ายหนวดปลาดุก หญ้าหวานออกดอกตลอดทั้งปี แต่ในช่วงฤดูฝนดอกของหญ้าหวานจะออกเป็นสีม่วง ส่วนผลของหญ้าหวานเป็นผลแห้งขนาดเล็ก ไม่ปริแตก ภายในมีเมล็ดเดี่ยวจำนวนมาก เมล็ดเป็นสีดำ มีขนปุยปกคลุม สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่มีระดับความสูงจากน้ำทะเลตั้งแต่ 500–3,000 เมตร หญ้าหวานเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้เพื่อให้ความหวาน และใช้เป็นยาสมุนไพรมาตั้งแต่โบราณ หญ้าหวานเป็นพืชที่ชอบอากาศค่อนข้างเย็นจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20–26 องศาเซลเซียส (Pande and Gupta, 2013; พิสมัย กุลกาญจนาธร, 2555)

หญ้าหวานเป็นพืชที่มีสารให้ความหวานเฉพาะที่ไม่มีแคลอรี่ ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารในกลุ่ม Diterpene glycosides หรือที่เรียกกันว่า Steviol glycosides โดย Stevioside และ Rebaudioside เป็นสารหลักที่สำคัญ จากงานวิจัยพบว่า สารชนิดนี้ให้ความหวานสูงกว่าน้ำตาลซูโครสมากกว่าสามร้อยเท่า นอกจากนี้ใบของหญ้าหวานมีการสะสมสร้างออกฤทธิ์ (Phytochemical compounds) อีกหลายกลุ่ม ไม่ว่าจะเป็นสารในกลุ่มฟลาเวนนอยด์ แอลคาลอยด์ น้ำมันหอมระเหย หรือแม้แต่วิตามิน ซึ่งพบการใช้ประโยชน์ทางด้านการเป็นสมุนไพรในด้านอื่น ๆ เช่น การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก และป้องกันฟันผุ นอกจากนี้หญ้าหวานยังมีประโยชน์และสรรพคุณอีกมาก เช่น ลดระดับและควบคุมน้ำตาลใน

เลือดของผู้ป่วยเบาหวาน ยารักษาโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิต โรคไขมันเลือดสูง โรคอ้วน และโรคหัวใจ อีกทั้งยังช่วยบำรุงร่างกาย บำรุงตับ และช่วยสมานแผลภายในและภายนอก

หญ้าหวานเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์กันมาอย่างยาวในประเทศแถบอเมริกาใต้ แต่เพิ่งได้มีการนำมาสกัดสารให้ความหวานเชิงอุตสาหกรรมกันแพร่หลายในแถบประเทศยุโรป และเอเชียไม่เกิน 50 ปี โดยปัจจุบันมีประเทศที่อนุญาตให้มีการสกัดเป็นสารให้ความหวานทดแทนน้ำตาลไม่น้อยกว่าสิบประเทศ ไม่ว่าจะเป็น มาเลเซีย อินโดนีเซีย จีน ญี่ปุ่น และประเทศไทย หญ้าหวานเริ่มเข้าในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2518 โดยทดลองปลูกครั้งแรกในภาคเหนือ คือจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย ปัจจุบันการขยายพันธุ์หญ้าหวานสามารถปลูกได้ทุกพื้นที่ในประเทศไทย โดยประเทศไทยการใช้ประโยชน์จากหญ้าหวานในรูปสารสกัดได้รับการอนุญาตตามประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ในปี 2556 และมีแนวโน้มการใช้สารสกัดจากหญ้าหวานเพิ่มมากขึ้น ทำให้หญ้าหวานมีความสำคัญและน่าสนใจทั้งในด้านเศรษฐกิจและการแพทย์สุขภาพ ซึ่งสารสกัดจากหญ้าหวานสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลได้ จึงนำไปประกอบอาหารได้ทั้งคาว หวาน และเครื่องดื่ม ได้แก่ น้ำชา น้ำอัดลม ขนม เบเกอรี่ ไอศกรีม ซอสปรุงรส เป็นต้น (Gantait, et al. 2015; ไมตรี สุทธจิตต์, และคณะ 2540) ปัจจุบันประเทศไทยมีบริษัทที่เพาะปลูกและผลิตสารสกัดจากหญ้าหวานอยู่หลายที่ เช่น บริษัทซูกาเวีย จำกัด ไร่บริษัท ซูกาเวีย จัดตั้งอยู่ที่ ตำบลหนองสาหร่าย อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (ภาพ 2) โดยซูกาเวียเป็นผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากใบหญ้าหวาน 100% สามารถใช้ทานแทนน้ำตาลได้ ไม่มีแคลอรี่ สามารถประกอบอาหารได้ทั้งคาวและหวาน เนื่องจากทนความร้อนได้สูงถึง 220 องศาเซลเซียส ซึ่งสินค้าของบริษัท ซูกาเวีย มีมากมาย เช่น สารสกัดจากหญ้าหวานรูปแบบเกล็ด ชาสมุนไพรใบหญ้าหวาน (ใบแห้ง) สเปรย์และเจลแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ โดยมีส่วนผสมของหญ้าหวานสกัดช่วยชะลอวัยของผิวพรรณ ต้านอนุมูลอิสระ (ภาพ 3) ซึ่งทางบริษัทมีแปลงเพาะปลูกหญ้าหวาน แต่ปริมาณใบหญ้าหวานที่ปลูกไม่เพียงพอต่อการผลิตสารสกัด และความต้องการของลูกค้า (ภาพ 4) ทำให้บริษัทได้มีการสนับสนุนกลุ่มเกษตรกรในพื้นที่ใกล้เคียงให้เพาะปลูกหญ้าหวาน และทำการรับซื้อผลผลิตจากเกษตรกร เพื่อเพิ่มผลผลิตสารสกัดหญ้าหวานให้เพียงพอต่อความต้องการต่อผู้บริโภค เช่น กลุ่มคนรักษาโรคเบาหวาน และกลุ่มคนที่รักสุขภาพทั้งในและต่างประเทศ (ซูกาเวีย, 2561)

ภาพ 2 ตำแหน่งและสถานที่ของบริษัท ซูกาเวีย จำกัด ที่มีทั้งโรงงานและพื้นที่ปลูก ณ จังหวัดนครราชสีมา (ซูกาเวีย, 2561)

ภาพ 3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของทางบริษัท ซูกาเวีย จำกัด ที่ได้รับมาตรฐานระดับโลก (ซูกาเวีย, 2561)

ภาพ 4 ต้นหญ้าหวานและพื้นที่ปลูกในบริษัท ซูกาเวีย จำกัด (ซูกาเวีย, 2561)

การขยายพันธุ์หญ้าหวาน

การขยายพันธุ์หญ้าหวานสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น การเพาะเมล็ด การปักชำ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งข้อดีของการขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยเมล็ด คือ ลำต้นแตกกิ่งมาก ให้ผลผลิตสูงและนานหลายฤดู แต่ข้อเสีย คือ มีอัตราการงอกที่ค่อนข้างต่ำ และเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ อาจทำให้มีการผลิตใบน้อยลง ปริมาณการผลิตสารหวานก็จะลดลง นอกจากนี้ค่าเมล็ดพันธุ์หญ้าหวานมีราคาค่อยข้างสูง จึงเป็นวิธีการที่ไม่นิยมใช้เพื่อการผลิตต้นพืช ส่วนการปักชำข้อดี คือ ประหยัดค่าเมล็ดพันธุ์ ไม่เสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ แต่ข้อเสียมักมีปัญหาในเรื่องของอายุของต้นพืชที่นำมาปักชำ กล่าวคือ การนำต้นพืชที่มีอายุมากมาปักชำอาจทำให้ต้นพืชที่เกิดใหม่มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าต้นพืชที่มีอายุที่น้อยกว่า ใช้เวลาในการขยายพันธุ์นาน ลำต้นแตกกิ่งน้อย รวมถึงลำต้นอ่อนแอ ไม่ทนต่อโรคและแมลง ซึ่งทั้งสองวิธีอาจทำให้คุณภาพการผลิตสารสกัดหญ้าหวานไม่ได้ตามมาตรฐาน และไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด (Singh and Rao, 2005; Khalil, et al. 2014) ซึ่งการขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอีกหนึ่งวิธีที่สำคัญและน่าสนใจ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถขยายพันธุ์หญ้าหวานได้จำนวนมาก โดยใช้ระยะเวลาสั้น ซึ่งต้นพืชที่ได้ยังปลอดจาก

โรค ได้ต้นพันธุ์ที่ดีสำหรับเกษตรกร สะดวกต่อการขนส่ง และยังสามารถควบคุมการผลิตต้นพันธุ์ได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น ใบ ยอด และเมล็ด โดยมีการควบคุมความชื้น แสงสว่าง และอุณหภูมิอยู่ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ การใช้เทคนิคนี้สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น และไม่กลายพันธุ์จากต้นพ่อแม่พันธุ์ นอกจากนี้สามารถใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช การผลิตพืชปลอดโรค การเก็บรักษาพันธุ์พืช การศึกษาพฤติกรรมของเซลล์พืช การขยายพันธุ์พืช และการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเทคนิคนี้ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Gottlieb Haberlandt เป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1902 ซึ่งได้ทดลองแยกเซลล์พืชจากส่วนใบมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์และตั้งสมมุติฐานว่า เซลล์พืชเพียงเซลล์เดียวสามารถเกิดการแบ่งตัวและเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1934 Philip R. White ได้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายรากของต้นมะเขือเทศ หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1937 Roger J. Gautheret ได้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคมเบียมจากพืชหลายชนิด โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง Knop's solution ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) และกรดอะมิโน (Cysteine hydrochloride) ต่อมาในปี ค.ศ. 1939 Roger J. Gautheret ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และในช่วงปี ค.ศ. 1940 – 1970 ได้มีการค้นพบและพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายเทคนิค อาทิ เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture) และการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Cell suspension culture) เป็นต้น ต่อมามีการศึกษาของ Folke Skoog และ Carlos Miller ในปี ค.ศ. 1957 พบว่าการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นยอดหรือรากขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (Auxins) และไซโทไคนิน (Cytokinins) ต่อมาในปี ค.ศ. 1965 Vimla Vasil และ Gottieb Haberlandt สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นยาสูบให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นพืชได้สำเร็จ ซึ่งเป็นการพิสูจน์สมมุติฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยจะเห็นได้ว่า เทคนิคหลายอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นในยุคนี้ยังคงมีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน นอกเหนือจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในรูปแบบต่าง ๆ แล้ว สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ในปี ค.ศ. 1962 Toshio Murashige และ Folke Skoog ได้พัฒนาสูตรอาหาร Marashige and Skoog (MS) เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ต้นยาสูบ ปัจจุบันสูตรอาหาร MS ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้หลายสายพันธุ์ และหลายชนิด หลังจากนั้นในช่วงปี ค.ศ. 1970 เป็นต้นมา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้รับการพัฒนาและมีความก้าวหน้าขึ้นไปมาก โดยมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (Meristem) จากส่วนยอดเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ การผลิตพืชปลอดไวรัส ตลอดจนการดัดแปลงพันธุ์พืช (Genetically– modifies organism: GMOs) มาประยุกต์ใช้จนถึงปัจจุบันเพื่อช่วยแก้ปัญหาต่อการทำเกษตรกรรมให้ทันสมัย และสามารถผลิตอาหารได้จำนวนมาก เพื่อจะตอบสนองต่อการเพิ่มประชากรมากขึ้นทุกวัน (วราภรณ์ ภูตะลุน, 2557)

การนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ได้ต้องมีองค์ประกอบทั้งหมด 5 อย่าง ได้แก่

1. ธาตุอาหาร (Inorganic compound) เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารหลัก (Macro nutrient) เป็นธาตุอาหารจำเป็นของพืชต้องใช้ในปริมาณมาก และขาดไม่ได้ ได้แก่ Nitrogen (N), Phosphorus (P), Potassium (K), Magnesium (Mg), Calcium (Ca) และ Sulfur (S) ส่วนธาตุอาหารรอง (Micro nutrient) เป็นธาตุอาหารพืชที่ใช้ในปริมาณน้อย แต่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตพืชเหมือนกัน ได้แก่ Zinc (Zn), Iron (Fe), Manganese (Mn), Chlorine (Cl), Boron (B), Copper (Cu), Molybdenum (Mo) และ Nickel (Ni) ซึ่งธาตุอาหารพืชในอาหารสังเคราะห์ที่พืชจะสามารถนำไปใช้ได้ดีเมื่ออาหารสังเคราะห์มีค่ากรดด่างที่เหมาะสม คือ ประมาณ 5.7 – 5.8 (Epstein, 1972; ยงยุทธ โอสถสภา, 2543)

2. วิตามิน (Vitamin) เป็นส่วนประกอบสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทุก ๆ ชนิด รวมทั้งพืช มีหน้าที่ช่วยให้การทำงานของเอนไซน์ต่าง ๆ ให้ทำงานได้ดี โดยปกติพืชสามารถสร้างเองได้ แต่ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองพืชไม่สามารถสร้างเองได้อย่างเพียงพอ จึงต้องมีการเติมวิตามินที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในหลอดทดลองเพื่อเสริมไม่ให้พืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ขาดวิตามิน โดยวิตามินสังเคราะห์ที่นิยมใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ วิตามินบี 1 (Thiamine) มีหน้าที่เป็น Coenzyme ในกระบวนการต่าง ๆ ส่วนกรดโฟลิค (Folic acid) เป็นองค์ประกอบของวิตามินบี 10 และ บี 11 ซึ่งเกี่ยวข้องกระบวนการเมตาบอซึมของสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม ขณะที่วิตามินบี 2 (Riboflavin) เกี่ยวกับการสร้าง FAD ส่วนไบโอติน (Biotin) มีหน้าที่เกี่ยวกับปฏิกิริยา Carboxylation–decarboxylation ขณะที่วิตามินบี 5 (Pantothenic acid) และวิตามินบี 6 (Pyridoxine) เกี่ยวข้องกระบวนการเมตาบอซึมของกรดอะมิโน เป็นต้น (George, et al. 2008)

3. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช หรือฮอร์โมนพืช (Hormone) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเองได้ในปริมาณน้อยมาก แต่มีผลในด้านการส่งเสริมหรือยับยั้งการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาภายในต้นพืชนั้น ๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่า พืชสร้างฮอร์โมนขึ้นน้อยมาก ดังนั้นการสกัดสารฮอร์โมนออกมาจากต้นพืชจึงไม่เป็นที่นิยม ต่อมาได้มีการวิจัย ค้นคว้า และสังเคราะห์สารต่าง ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนตามที่ธรรมชาติสร้างขึ้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์แทนฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้น ดังนั้นจึงมีการเรียกสารกลุ่มนี้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) ซึ่งหมายถึง ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริม ยับยั้ง หรือเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีวิทยาของพืชได้ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแบ่งตามคุณสมบัติที่มีผลต่อพืชออกมาเป็น 5 กลุ่ม คือ 1) ออกซิน (Auxin) สร้างที่ยอดพืช มีหน้าที่ในการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการเกิดตาข้าง และพัฒนารากพืช 2)ไซโตไคนิน (Cytokinin) สร้างที่ปลายราก มีหน้าที่ในการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาความยาวของข้อปล้อง 3) จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) สร้างที่ใบอ่อน เป็นฮอร์โมนที่เร่งการเจริญเติบโตของพืชเหมือนออกซิน แต่คุณสมบัติไม่เหมือนออกซิน ไม่ตอบสนองต่อแสง 4) กรดแอบซิสิค (Abscisic acid) สร้างที่ใบแก่ ทำให้การเติบโตของพืชช้าลงทำให้เกิดการพักตัว (Dormancy) ของเมล็ดพืช กระตุ้นการปิดปากใบขณะที่ขาดน้ำ ลดการสูญเสียน้ำ เร่งการร่วงของใบ ดอก และผล โดยไปเร่งให้ Abscission layer ที่ก้านของใบ ดอก และผลแยกตัวออกจากก้านของต้นเร็วขึ้น ทำให้ใบ ดอก และผลหลุดร่วงในธรรมชาติ ถ้าใบอ่อนและผลยังสร้างออกซินอยู่จะทำให้มันติดอยู่กับก้านของต้น เนื่องจากเนื้อเยื่อที่ตรงก้านใบและก้านผล และ 5) เอททิลิน (Ethylene) มีสถานะเป็นก๊าซและมีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงแพร่กระจายไปในอากาศและละลายน้ำได้ดี Ethylene สามารถแพร่ผ่านเนื้อเยื่อไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ มีหน้าที่ช่วยเร่งการสุกของผลไม้ก่อนที่ผลไม้นั้นจะสุกตามธรรมชาติ แต่ถ้าผลไม้ขาด Ethylene การสุกของผลไม้จะยืดระยะเวลาออกไป นอกจากนี้ Ethylene ยังกระตุ้นให้เกิดรากฝอยและรากแขนงได้ (George, et al. 2008) แต่กลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีอยู่ 2 กลุ่ม ได้แก่ สารกลุ่มออกซิน (Auxin) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการยืดตัวของเซลล์และช่วยกระตุ้นการเกิดราก ในขณะที่กลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin) จะทำหน้าที่ในการขยายขนาดของเซลล์ และช่วยกระตุ้นให้เกิดยอดจำนวนมาก แต่ถ้าใช้ออกซินและไซโตไคนินร่วมกันในประมาณเท่า ๆ กัน จะทำให้เกิดแคลลัส และการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส (อัมพา ว่องวิชชกร, และคณะ 2546)

4. น้ำตาล (Sugar) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อการเจริญเติบโต และการเกิดตาและราก เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการ

สังเคราะห์แสงในสภาพหลอดทดลอง หรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำ เพราะได้รับแสงน้อย และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด โดยน้ำตาลที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (Sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และมีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด โดยปกติมักใช้ในปริมาณน้ำตาล 30 กรัมต่อการทำอาหารสังเคราะห์หนึ่งลิตร (George, et al. 2008)

5. วุ้น (Agar) การเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่มีวุ้น ซึ่งวุ้นจะทำหน้าที่ช่วยพยุงเนื้อเยื่อให้ตั้งอยู่ได้บนอาหาร ในกรณีที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะวางบนเครื่องเขย่าเพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศเพียงพอ วุ้นผลิตจากสาหร่ายทะเลทำให้อาหารแข็งตัว ดังนั้นจึงแบ่งประเภทของอาหารมี 3 ชนิด คือ 1) อาหารแข็ง (Solid medium) การใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ 2) อาหารกึ่งแข็ง (Semi-solid medium) ใช้ผงวุ้น 0.8% ที่ให้ผลดีสำหรับเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ในหลอดทดลองสามารถดึงธาตุอาหารไปใช้ได้ดี และ 3) อาหารเหลว (Liquid medium) ที่ไม่ได้ใช้วุ้นในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งชิ้นส่วนของพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลวมักจะมีการเจริญเติบโตที่ดี และค่อนข้างรวดเร็ว แต่ต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 100-120 รอบต่อนาที ให้ชิ้นส่วนของพืชได้รับออกซิเจน การเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลานานควรระวังพืชอาจจะมีการฉ่ำน้ำ หากพบอาการดังกล่าวนี้ควรหยุดการใช้อาหารเหลวแล้วเปลี่ยนไปใช้อาหารแข็งจะสามารถลดอาการฉ่ำน้ำของพืชลดลงได้ (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541; นพเก้า พุทธรักษ์, 2556)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีรายงานตั้งแต่ ปี 1981 โดย Yang et al. ได้ศึกษาการชักนำการเกิดยอดจากข้อของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน จากผลการศึกษาพบว่า การใช้ Benzyl adenine (BA) ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) มีอัตราการเพิ่มจำนวนยอดสูงที่สุด ในขณะที่การศึกษาการเกิดรากจะทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดลงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ Naphthalene acetic acid (NAA) พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 และ 10 mg/l ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากมากที่สุดถึง 100% โดยสูตร MS ที่มีการเติม NAA ความเข้มข้น 10 mg/l ให้จำนวนรากมากที่สุดคือ 8.0 รากต่อชิ้นส่วนพืช และสูตร MS ที่มีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ให้จำนวนรากรองลงมาคือ 5.4 รากต่อชิ้นส่วนพืช (Yang, et al. 1981) ต่อมาได้มีงานวิจัยอีกมากมายที่ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นสูตรธาตุอาหารพื้นฐาน ซึ่งทำการศึกษา

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนินเพื่อชักนำการเกิดยอด โดยส่วนใหญ่จะพบว่า 6–Benzylaminopurine (BAP) หรือ BA และ Kinetin (Kin) เป็นสารไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการชักนำการเพิ่มจำนวนยอด ในขณะที่การชักนำการเกิดรากจะนิยมใช้สารในกลุ่มออกซิน ไม่ว่าจะเป็น Indole acetic acid (IAA), Indole–3–butyric acid (IBA) และ 1–Naphthaleneacetic acid (NAA) ซึ่งความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้จะขึ้นอยู่กับพันธุ์ของหญ้าหวาน โดยชิ้นส่วนพืชที่นิยมใช้ในการศึกษา ได้แก่ ยอด ปลายยอด เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด ใบ หรือข้อ เป็นต้น (Pande and Gupta, 2013) เช่นเดียวกับงานวิจัยของทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์ และคณะ (2558) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานเพื่อเพิ่มจำนวนต้นพืช โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/l และเติม NAA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 mg/l พบว่า สูตรอาหารที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดสูงที่สุด แต่สูตรอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชนั้นสามารถเกิดความยาวยอดสูงที่สุด และยังกระตุ้นให้เกิดรากและความยาวรากได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้มากที่สุด และสูตรอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 mg/l ชักนำให้มีขนาดของแคลลัสได้มากที่สุดอีกด้วย (ทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์, และคณะ 2558) นอกเหนือไปจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการชักนำให้เกิดยอดใหม่แล้ว เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส และการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส (Somatic embryogenesis) หรือการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายได้ (ทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์, และคณะ 2558)

การเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการชักนำชิ้นส่วนพืชให้ได้เป็นยอด จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดไปชักนำให้เกิดรากภายใต้สภาพปลอดเชื้อ หรืออาจจะไม่ผ่านการชักนำให้เกิดราก แต่เมื่อย้ายปลูกแล้วค่อยทำการกระตุ้นยอดให้เกิดรากในสภาพแปลงปลูก โดยเป็นการชักนำให้พืชเกิดกระบวนการออแกนโนเจเนซีส (Organogenesis) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณต้นพืชที่คล้ายคลึงกับการปักชำ เนื่องจากต้นพืชใหม่ที่ได้จะมีระบบรากที่เกิดจากการที่ลำต้นได้รับการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นรากพิเศษ เรียก Adventitious roots โดยระบบรากที่ได้จะไม่มีรากแก้ว ในขณะที่การชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจะได้เอ็มบริออยด์ที่มีโครงสร้างการพัฒนาของเนื้อเยื่อคล้ายกับเอ็มบริโอที่เจริญอยู่ในเมล็ดที่ได้มาจากการปฏิสนธิ ดังนั้นต้นพืชใหม่ที่ได้จากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจะมีระบบรากแก้ว ซึ่งกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสอาจเกิดได้ทั้งแบบที่มีการชักนำโดยตรงจากชิ้นส่วน

พืชให้ได้เป็นเอ็มบริออยด์ เรียกว่า Direct somatic embryogenesis หรือ แบบที่มีการชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์หรือแคลลัสก่อนจากชิ้นส่วนพืช จากนั้นนำแคลลัสไปชักนำให้ได้เป็นเอ็มบริออยด์ เรียกว่า Indirect somatic embryogenesis โดยการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างไม่ว่าจะเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ธาตุอาหาร สารประกอบอินทรีย์ น้ำตาล หรือแม้แต่แสง เป็นต้น โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนับเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของเซลล์พืชมากที่สุด (Trigiano and Gray, 1999)

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และทางด้านการแพทย์ รวมถึงพืชหายากที่ใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งวัตถุประสงค์หลักของงาน คือ การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินและออกซินต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส และการพัฒนาต่อไปให้ได้เอ็มบริออยด์ โดยในปี 1997 Filho and Hattori (1997) ได้มีการศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากชิ้นส่วนช่อดอกของหญ้าหวาน โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม 2,4–D ความเข้มข้น 9.05 และ 18.10 µM ร่วมกับการเติม Kinetin ความเข้มข้น 0 – 9.29 µM จากการทดลองพบว่า การเติม 2,4–D ความเข้มข้น 9.05 µM อย่างเดียว หรือการเติม 2,4–D ความเข้มข้น 18.10 µM ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 2.32 µM มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด (Bespalhok–Filho and Hattori, 1997) ต่อมา Keshvari et al. (2018) ได้ศึกษาการชักนำการเกิดแคลลัสและการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากใบและตาข้างของหญ้าหวาน พบว่า การเติม BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l และ 2,4–D ความเข้มข้น 2 mg/l สามารถเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสสูงที่สุด (Keshvari, et al. 2018) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการชักนำการเกิดโซมาติกจากพืชชนิดอื่นอีกหลายอย่าง โดย Yang et al. (2011) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายยีนของมันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) ซึ่งทำการชักนำการเกิดแคลลัสที่มีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอ็มบริออยด์ได้ หรือเรียกว่า Embryonic suspension callus โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดมาทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 20 g/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l เพื่อให้เกิดเป็นแคลลัส จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีการเติม VB1 ความเข้มข้น 0.3 mg/l น้ำตาลซูโครส 40 g/l KCl ความเข้มข้น 2.2 g/l 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l และ BAP ความเข้มข้น 0.2 mg/l ซึ่ง Embryonic suspension callus จะให้เซลล์ที่สามารถเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสแล้วพัฒนาไปเป็นเอ็มบริออยด์ได้ (Yang, et al. 2011) ในขณะที่ Verma et al. (2011) ได้ศึกษาการ

ชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสแบบวิธีทางอ้อม ซึ่งต้องทำการชักนำการเกิดแคลลัสก่อน ของพืชสมุนไพรหายากชนิดหนึ่งของประเทศตุรกี ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Digitalis lamarckii* Ivan. พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของต้นอ่อนที่มีอายุ 3 สัปดาห์หลังจากการงอก ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.54 µM ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.2 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้ Embryonic callus ซึ่งต่อมาเมื่อทำการย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส จากผลการศึกษาพบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีผลต่อการเกิดเอ็มบริออยด์มากที่สุด คือ การใช้ NAA ที่ความเข้มข้น 1.34 µM ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้น 8.87 µM โดยได้จำนวนเอ็มบริออยด์ประมาณ 37 เอ็มบริออยด์ต่อชิ้นส่วนพืช และใช้เวลาในการชักนำการเกิดเอ็มบริออยด์นาน 8 สัปดาห์ (Verma, et al. 2011) ส่วนการศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสแบบวิธีทางอ้อมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นจินฮัวชา หรือ *Camellia nitidissima* Chi ในปี 2013 พบว่าการใช้ใบเลี้ยงของต้นอ่อนเป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับการทดลอง และใช้สูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน คือ สูตร Woody Plant Medium (WPM) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเกิดแคลลัส จากผลการทดลองพบว่า แคลลัสที่ได้มีลักษณะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ โดยแคลลัสที่มีลักษณะแน่นสีขาวเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.5 µM และมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงถึง 61.5% ในขณะที่การชักนำให้เกิดแคลลัสแบบที่มีสีแดงและสีเหลืองโดยมีลักษณะที่แตกต่างจากแคลลัสสีขาว ซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่มีการเติม BAP หรือ TDZ ความเข้มข้น 9.0 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 µM และมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงถึง 79.2 – 86.5% จากนั้นทำการชักนำแคลลัสแบบแน่นที่มีสีเหลืองให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส ผลการทดลองพบว่า การเติม Zeatin ความเข้มข้น 9.0 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.3 หรือ 1.0 µM สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสได้ดีที่สุด โดยได้จำนวนเอ็มบริออยด์ประมาณ 8 เอ็มบริออยด์ต่อชิ้นส่วนพืช ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงผลเปรียบเทียบอิทธิพลของสูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐานที่ใช้ระหว่างอาหารสูตร WPM และ MS เมื่อทำการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน ผลการทดลองพบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสได้ดีกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Lü, et al. 2013) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Verma et al. (2016) เมื่อทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน MS กับสูตรอาหาร Gamborg's B-5 Linsmaier and Skoog Chhee and Pool พบว่า สูตรอาหาร MS เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการ

เพาะเลี้ยง Crocus ancyrensis มากที่สุด โดยชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ใบ ลำต้น และหัว ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า การเกิดแคลลัสที่มากที่สุดได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 50 g/l เติม NAA ความเข้มข้น 4 mg/l ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 4 mg/l และเติม IAA ที่ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 2 mg/l และ BAP ที่ความเข้มข้น 2 mg/l จากนั้นทำการชักนำการพัฒนาของแคลลัสให้เป็นเอ็มบริออยด์ โดยการนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม IAA ความเข้มข้น 2 mg/l และ TDZ ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ ABA ความเข้มข้น 100 mg/l ซึ่งจะโดยได้เอ็มบริออยด์ประมาณ 2.9 เอ็มบริออยด์ต่อชิ้นส่วนพืช (Verma, et al. 2016)

จากการศึกษาของ Ouyang et al. (2016) ที่ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้น *Metabriggsia ovalifolia* W.T. Wang ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่หายากของประเทศจีน เพื่อทำการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส และการเกิดยอดจากกระบวนการออร์แกนโนเจเนซีส โดยทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินที่ใช้ในการทดลอง คือ BAP และ TDZ ในขณะที่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินที่ใช้ในการทดลอง คือ IAA, IBA และ NAA จากผลการทดลองพบว่า การใช้ BAP และ TDZ ที่ความเข้มข้น 5–10 μM สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส และเกิดยอดจากกระบวนการออร์แกนโนเจเนซีส แต่การใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นสูงถึง 25 μM จะสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสได้เพียงอย่างเดียว โดยเกิดจำนวนเอ็มบริออยด์สูงถึงประมาณ 40 เอ็มบริออยด์ต่อชิ้นส่วนพืช (Ouyang, et al. 2016) ซึ่งการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสสามารถใช้ชิ้นส่วนพืชได้หลากหลาย เช่น การศึกษาในต้นประคำดีควายของ Asthana et al. (2017) ที่ใช้ชิ้นส่วนกลีบเลี้ยงมาทำการเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 mg/l และ Kinetin ความเข้มข้น 0.1 mg/l จะเกิดแคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริออยด์ได้ (Embryonic callus) (Asthana, et al. 2017)

การผลิตเมล็ดเทียมเป็นอีกรูปแบบหนึ่งของการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อช่วยในการขยายพันธุ์พืชที่ยังมีข้อจำกัดที่ส่งผลต่อการผลิต โดยการผลิตเมล็ดเทียม หมายถึงเมล็ดที่ไม่ได้เกิดจากการปฏิสนธิของไข่และสเปิร์ม แต่เป็นการใช้กระบวนการทางวิทยาศาสตร์มาช่วยเพื่อสร้างเอ็มบริออยด์หรือโครงสร้างที่เหมือนเอ็มบริโอ ในขั้นตอนการผลิตเมล็ดเทียมจะเริ่มต้นจากการนำชิ้นส่วนของพืชมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้เอ็มบริออยด์จำนวนมาก และเพียงพอต่อการผลิตเมล็ดเทียม จากนั้นจะนำเอ็มบริออยด์ไปผสมใน

อาหารเหลวที่มีการเติมธาตุอาหาร สารประกอบอินทรีย์ หรือแม้แต่ฮอร์โมนพืชที่จำเป็นต่อการงอกและการพัฒนาของเอ็มบริออยด์ แล้วทำการเคลือบ และทำให้เอ็มบริออยด์ถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกเมล็ดเทียม โดยผ่านกระบวนการทำให้เกิดเป็นเมล็ด หรือที่เรียกว่า Encapsulation โดยใช้ สารที่ทำให้เกิดเจล เช่น โซเดียมอัลจีเนต เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการทำเมล็ดเทียมไปประยุกต์ใช้เพื่อขยายพันธุ์พืชที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการเพาะเมล็ดตามธรรมชาติ หรือแม้แต่การผลิตเมล็ดเทียมในกลุ่มพืชเศรษฐกิจที่มีความต้องการในการใช้ต้นพันธุ์จำนวนมาก และต้องการลักษณะของต้นใหม่ที่เหมือนต้นพันธุ์เดิมทุกประการ โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการทำเมล็ดเทียมเพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชที่สามารถประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บได้เป็นอย่างดี ซึ่งการวิจัยทางด้านการผลิตเมล็ดเทียมมักทำวิจัยควบคู่มาพร้อมกับการศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสหรือการเกิดยอด จากการศึกษาของ Cangahuala-Inocente et al. (2007) พบว่า สามารถทำการชักนำการเกิดเอ็มบริออยด์ได้โดยทำการเพาะเลี้ยงต้นพืชบนอาหารสูตร LPm ที่มีการเติม Glutamic acid ความเข้มข้น 8 mM ร่วมกับการใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 20 µM โดยการทำให้เกิดเป็นเมล็ดจะใช้ Pregerminated somatic embryos ใส่ลงในอาหารที่มีการเติมโซเดียมอัลจีเนต และ BAP ความเข้มข้น 0.5 µM ร่วมกับ GA3 ความเข้มข้น 1 µM (Cangahuala-Inocente, et al. 2007) ส่วนในปี 2012 Kumar et al. ได้พัฒนาเทคนิคการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสของต้นอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) โดยชักนำการเกิดแคลลัสที่มีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอ็มบริออยด์ได้ ซึ่งมีการใช้ชิ้นส่วนของใบเลี้ยงมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปทำการชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ ซึ่งเป็นเวลา 45 วัน จากผลการทดลองพบว่า การใช้แคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับการใช้ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l มาใช้ในขั้นตอนการทำเมล็ดเทียมซึ่งใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 3% ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับการใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 4% จากนั้นทำการหยดเมล็ดเทียมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 mM อย่างไรก็ตามการผลิตเมล็ดเทียมในพืชต่างชนิดจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อให้ได้เทคนิคหรือวิธีการที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดต่อไป (Krishna and Thomas, 2012)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมชิ้นส่วนพืชของหญ้าหวานสำหรับการทดลอง

ทำการตัดยอดหญ้าหวานจากต้นพันธุ์ที่มีอายุประมาณ 5–6 เดือน โดยตัดชิ้นส่วนยอดให้มีความยาวประมาณ 2–3 เซนติเมตร แล้วนำชิ้นส่วนที่ได้ไปล้างน้ำให้สะอาดโดยการเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที เพื่อชะล้างฝุ่นหรือสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชออก จากนั้นนำชิ้นส่วนหญ้าหวานที่ได้มาฟอกฆ่าเชื้อ โดยใช้ Clorox ที่ความเข้มข้น 10% นาน 10 นาที และใส่สาร Tween 20 จำนวน 2–3 หยด จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนพืชไปวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog 1962) ที่ไม่มีและมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร (g/l) และวุ้นที่ความเข้มข้น 4.5 g/l ร่วมกับเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.5 g/l ปรับค่าความเป็นกรด–ด่าง ให้เป็น 5.7 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 24±2 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงประมาณ 2,000–3,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ต้นพืชที่จะนำไปทำการเพิ่มจำนวนต้นหญ้าหวานสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีการดำเนินการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของหญ้าหวาน

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มปริมาณต้นหญ้าหวาน โดยนำชิ้นส่วนข้อของต้นหญ้าหวานจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ สูตร WPM ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ Kin ที่ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/l (ตาราง 1) โดยชุดการทดลองดังกล่าวใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 g/l และวุ้นที่ความเข้มข้น 4.5 g/l ร่วมกับเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.5 g/l ปรับค่าความเป็น

กรด–ด่าง ให้เป็น 5.7 จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 24±2 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีความเข้มแสงประมาณ 2,000–3,000 ลักซ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกผล มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) มีจำนวน 10 ซ้ำ (10 ขวด) โดยในแต่ละซ้ำมี 4 ซ้ำย่อย (ชิ้นส่วนพืช) จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance: ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี Ducan's multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นที่ 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ตาราง 1 กรรมวิธีที่ใช้ในการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มปริมาณต้นหญ้าหวาน

กรรมวิธี	สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (mg/l)		
		BAP	Kin	NAA
T1	MS	2	0.5	0.1
T2	WPM	0	0	0
T3	MS	0	0	0
T4	MS	0.5	0	0
T5	MS	1	0	0
T6	MS	2	0	0
T7	MS	0.5	0	0.1
T8	MS	1	0	0.1
T9	MS	2	0	0.1
T10	MS	0	0.5	0
T11	MS	0	1	0
T12	MS	0	2	0
T13	MS	0	0.5	0.1
T14	MS	0	1	0.1
T15	MS	0	2	0.1

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน โดยนำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS และ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาลที่แตกต่างกัน คือ 3, 6 และ 9% (ตาราง 2) โดยชุดการทดลองดังกล่าวใช้วุ้นที่ความเข้มข้น 4.5 g/l ร่วมกับเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.5 g/l ปรับค่าความเป็นกรด–ด่าง ให้เป็น 5.7 จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 24±2 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีความเข้มแสงประมาณ 2,000–3,000 ลักซ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกผล มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) มีจำนวน 5 ซ้ำ (5 ขวด) โดยในแต่ละซ้ำมี 4 ซ้ำย่อย (ชิ้นส่วนพืช) จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance: ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี Ducan's multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ตาราง 2 กรรมวิธีที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

กรรมวิธี	สูตรอาหาร	เปอร์เซ็นต์น้ำตาล (%)
T1	1/2 MS	3%
T2	1/2 MS	6%
T3	1/2 MS	9%
T4	MS	3%
T5	MS	6%
T6	MS	9%

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัส โดยนำชิ้นส่วนพืช 2 ชนิดของหญ้าหวาน ได้แก่ แผ่นใบ (ประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร) และปล้อง (ประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร) มาทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 0.5 และ 1 mg/l ร่วมกับ กลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 และ 2 mg/l เพื่อชักนำการเกิดแคลลัส (ตาราง 3) โดยชุดการทดลองดังกล่าวใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นที่ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 5.7 จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 24±2 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกผลการเจริญเติบโต วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) มีจำนวน 10 ซ้ำ (10 ขวด) โดยในแต่ละซ้ำมี 5 ซ้ำย่อย (ชิ้นส่วนพืช) จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance: ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี Ducan's multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นที่ 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ตาราง 3 กรรมวิธีที่ใช้ในการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัส

กรรมวิธี	สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (mg/l)		
	BAP	TDZ	2,4-D
T1	1	0	2
T2	1	0	0.1
T3	0.5	0	2
T4	0.5	0	0.1
T5	0.2	0	2
T6	0.2	0	0.1
T7	0.1	0	2
T8	0.1	0	0.1
T9	0	1	2
T10	0	1	0.1
T11	0	0.5	2
T12	0	0.5	0.1
T13	0	0.2	2
T14	0	0.2	0.1
T15	0	0.1	2
T16	0	0.1	0.1

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากแคลลัส โดยทำการนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 2.1 มาทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 และ 1.0 mg/l ร่วมกับ กลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ 2,4–D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/l เพื่อชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส และได้เอ็มบริออยด์ต่อไป (ตาราง 4) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ (5 ขวด) โดยในแต่ละซ้ำมี 5 ซ้ำย่อย

ตาราง 4 กรรมวิธีที่ใช้ในการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากแคลลัส

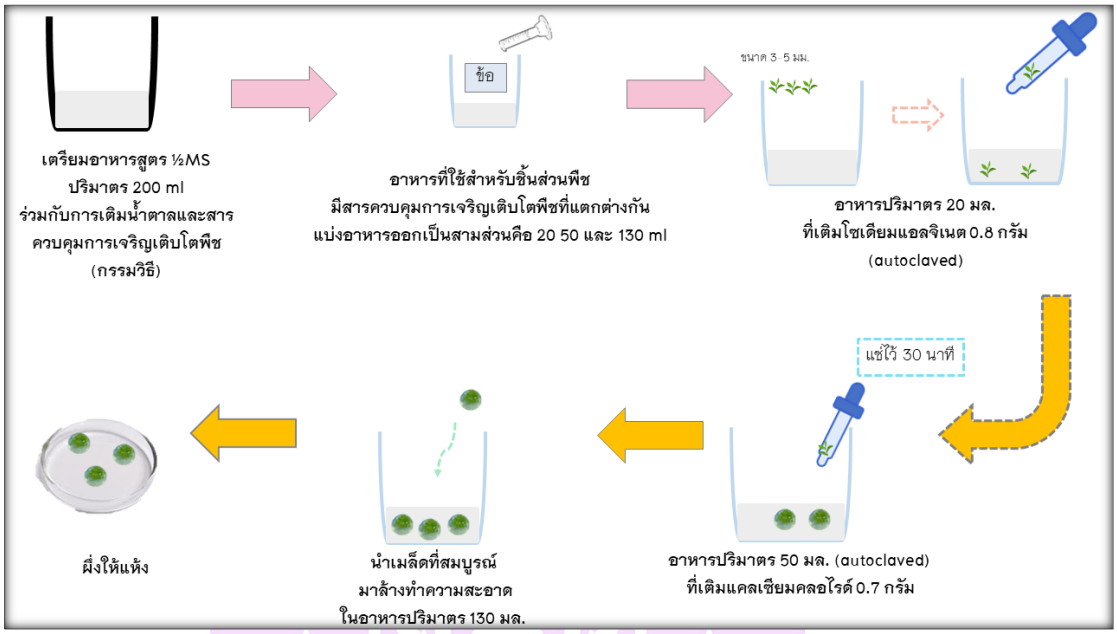
กรรมวิธี	สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (mg/l)			
	BAP	TDZ	2,4–D	NAA
T1	0.5	–	0.1	–
T2	0.5	–	0.5	–
T3	1	–	0.1	–
T4	1	–	0.5	–
T5	0.5	–	–	0.1
T6	0.5	–	–	0.5
T7	1	–	–	0.1
T8	1	–	–	0.5
T9	–	0.5	0.1	–
T10	–	0.5	0.5	–
T11	–	1	0.1	–
T12	–	1	0.5	–
T13	–	0.5	–	0.1
T14	–	0.5	–	0.5
T15	–	1	–	0.1
T16	–	1	–	0.5

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกันต่อการผลิตเมล็ดเทียม

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการผลิตเมล็ดเทียม ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 1 mg/l และทดสอบเปอร์เซ็นต์น้ำตาลที่ 1.5 และ 3% (ตาราง 5) โดยใช้อาหารสังเคราะห์ ½ MS ทั้งหมด 6 กรรมวิธีและชิ้นส่วนพืชที่ใช้ คือ ส่วนของข้อ ในขั้นตอนการทำเมล็ดเทียม โดยขั้นตอนแรกให้นำชิ้นส่วนข้อมาใส่ในอาหารสังเคราะห์ ½ MS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสมโซเดียมแอลจิเนตปริมาณ 0.8 กรัม หลังจากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดชิ้นส่วนข้อพร้อมอาหารที่ผสมโซเดียมแอลจิเนตแล้วนำไปหยดลงในอาหารสังเคราะห์ ½ MS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมแคลเซียมคลอไรด์ 0.7 กรัม ซึ่งชิ้นส่วนข้อและอาหารที่หยดลงไปนั้นจะมีลักษณะเป็นถุงทรงกลมที่มีชิ้นส่วนข้อถูกห่อหุ้มอยู่ภายใน เรียกว่า เมล็ดเทียม ทำการแช่เมล็ดเทียมไว้ประมาณ 30 นาที หรือให้สังเกตว่าเมล็ดแข็งตัว เมื่อเมล็ดแข็งตัวแล้ว นำเมล็ดเทียมไปล้างในอาหารสังเคราะห์ ½ MS ที่เตรียมไว้ให้สะอาด จากนั้นนำเมล็ดเทียมมาพักทิ้งไว้ ซึ่งขั้นตอนสุดท้าย คือ นำเมล็ดเทียมไปเก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน (ภาพ 5) ทำการผลิตเมล็ดเทียมทั้งหมด 6 รอบ ซึ่งแต่ละรอบทำการเปลี่ยนสูตรอาหารทั้งหมด 6 กรรมวิธี

ตาราง 5 กรรมวิธีที่ใช้ในการศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการผลิตเมล็ดเทียม

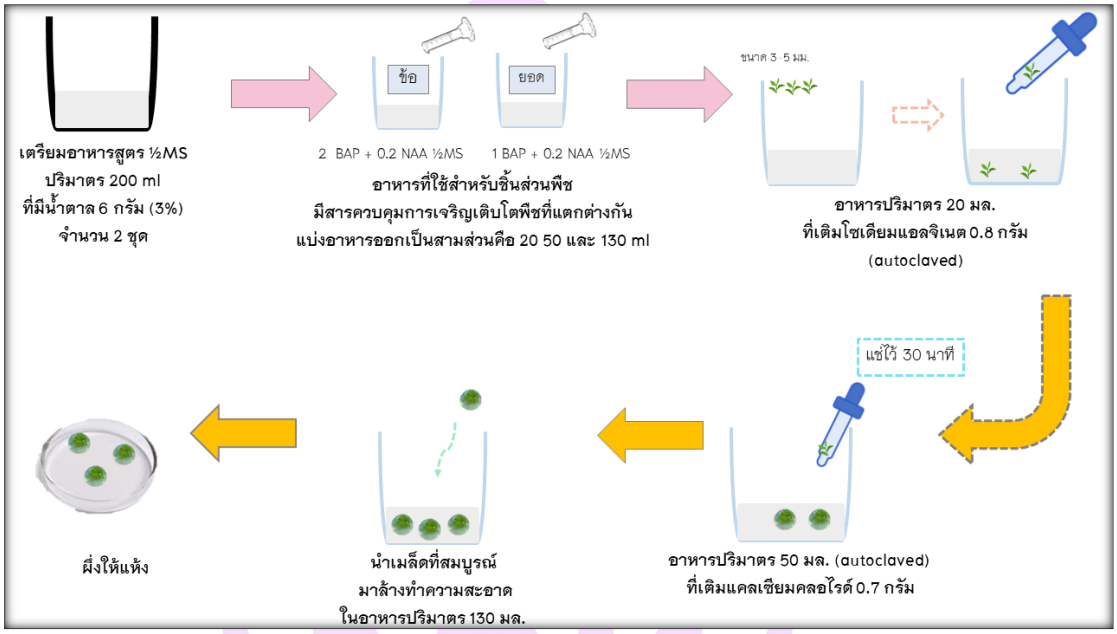
กรรมวิธี	น้ำตาล (%)	สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (mg/l)		
		BAP	NAA	IBA
T1	1.5	0	0	0
T2	3	0	0	0
T3	1.5	1	1	0
T4	3	1	1	0
T5	1.5	1	0	1
T6	3	1	0	1



ภาพ 5 ขั้นตอนการทำเมล็ดเทียมของการศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาสภาพการเก็บรักษาเมล็ดเทียม นำเมล็ดเทียมที่ได้จากชิ้นส่วนทั้งข้อและยอด ซึ่งในการทำเมล็ดเทียมของทั้ง 2 ชิ้นส่วน มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่แตกต่างกัน แต่ใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้น 3% เหมือนกัน โดยการทำเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อ จะใช้อาหาร ½ MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/l ในขณะที่การทำเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนยอด จะใช้อาหาร ½ MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/l ซึ่งในขั้นตอนการทำเมล็ดเทียม ขั้นตอนแรกให้นำชิ้นส่วนพืชมาใส่ในอาหารสังเคราะห์ตามที่กำหนดไว้ข้างต้น คือ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสมโซเดียมแอลจิเนตปริมาณ 0.8 กรัม หลังจากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดชิ้นส่วนพืชพร้อมอาหารที่ผสมโซเดียมแอลจิเนตแล้ว นำไปหยดลงในอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมแคลเซียมคลอไรด์ 0.7 กรัม ซึ่งชิ้นส่วนพืชและอาหารที่หยดลงไปนั้นจะมีลักษณะเป็นถุงทรงกลมที่มีชิ้นส่วนพืชถูกห่อหุ้มอยู่ภายใน เรียกว่า เมล็ดเทียม ทำการแช่เมล็ดเทียมไว้ประมาณ 30 นาที หรือให้สังเกตว่าเมล็ดแข็งตัว เมื่อเมล็ดแข็งตัวแล้ว นำเมล็ดเทียมไปล้างในอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมไว้ให้สะอาด จากนั้นนำเมล็ดเทียมมาพักทิ้งไว้ ซึ่งขั้นตอนสุดท้าย คือ นำเมล็ดเทียมไปเก็บรักษา (ภาพ 6) โดยนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 1) ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 24±2 องศาเซลเซียส

และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 2,000–3,000 ลักซ์ และ 2) เก็บรักษาเมล็ดเทียมในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการบันทึกเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดเทียมในแต่ละอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา



ภาพ 6 ขั้นตอนการทำเมล็ดเทียมของการศึกษาสภาพเก็บรักษาเมล็ดเทียม

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นกล้าที่ได้จากการปักชำ

นำต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโตพร้อมย้ายปลูก โดยมีรากและยอดที่สมบูรณ์ และยอดจากต้นกล้าที่มีอายุประมาณ 5–6 เดือน โดยใช้ยอดที่มีความสูงประมาณ 10 cm หรือมีจำนวนข้อ 2–3 ข้อต่อยอด ซึ่งหลักการอนุบาลต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและยอดที่จะนำมาปักชำ คือ เตรียมกระถางสีดำขนาด 2 นิ้ว ที่ทำการบรรจุพีทมอสให้เต็มกระถาง แล้วรดน้ำพีทมอสพอชุ่ม จากนั้นนำต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและยอดสำหรับการปักชำมาใส่ในกระถาง แล้วนำกระถางที่มีต้นหรือยอดไปอนุบาลไว้ในแก้วพลาสติกที่มีฝาปิดเพื่อรักษาความชื้น โดยมีต้นหญ้าหวานจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่นำมาอนุบาลจำนวน 26 ต้น และยอดที่นำมาทำการปักชำจำนวน 50 ยอด

บันทึกอัตราการรอดชีวิตของต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นกล้าที่ได้จากการปักชำยอด เมื่อทำการอนุบาลเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นหญ้าหวานที่ได้จากการอนุบาล โดยทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นที่ได้จากการปักชำยอด จำนวนอย่างละ 15 ต้น ทำการย้ายกระถางต้นพืชออกจากการอนุบาลในแก้วพลาสติกที่มีฝาปิดออกมาอยู่ในสภาพแวดล้อมระบบเปิดที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ แสง หรือความชื้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการวิเคราะห์สถิติด้วย Independent sample T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยโปรแกรมสำเร็จรูป

การบันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของหญ้าหวาน

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มปริมาณต้นหญ้าหวาน ทำการบันทึกผลการวิจัย ดังนี้

1. คะแนนเฉลี่ยค่าสมบูรณ์ของต้น โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนประเมิน ดังนี้

0 คะแนน หมายถึง ต้นพืชที่ไม่มีการเจริญเติบโตหรือตาย

1 คะแนน หมายถึง ต้นพืชที่มีการเจริญเติบโตเล็กน้อย

2 คะแนน หมายถึง ต้นพืชที่มีการเจริญเติบโตปานกลาง

3 คะแนน หมายถึง ต้นพืชที่มีการเจริญเติบโตสมบูรณ์

2. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ยอดต่อชิ้นส่วน) ใช้การนับยอดต่อต้นพืช โดยนับเฉพาะยอดที่มีความสูงมากกว่า 1 cm ซึ่งเป็นยอดที่เกิดจากตาข้าง

3. จำนวนใบต่อชิ้นส่วนพืช (ใบต่อชิ้นส่วน) ใช้การนับใบที่มีทั้งหมดของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนพืชตั้งแต่โคนจนถึงปลายยอด

4. ความสูงยอดของหญ้าหวาน (เซนติเมตร) วัดโดยใช้เครื่อง Vernier Caliper วัดความสูงของต้น ตั้งแต่โคนต้นไปถึงส่วนปลายยอด

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน การบันทึกผลการวิจัย มีดังนี้

1. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ยอดต่อชิ้นส่วน) ใช้นับยอดต่อต้นพืช โดยนับเฉพาะยอดที่มีความสูงมากกว่า 1 cm ซึ่งเป็นยอดที่เกิดจากตาข้าง

2. ความสูงยอดของหญ้าหวาน (เซนติเมตร) วัดโดยใช้เครื่อง Vernier Caliper โดยทำการวัดความสูงของต้น ตั้งแต่โคนต้นไปถึงส่วนปลายยอด

3. การวัดค่าดัชนีความเขียวของใบ ทำได้โดยใช้ SPAD meter ทำการหนีบที่แผ่นใบเพื่ออ่านค่า เลือกสุ่มวัดตัวอย่างละ 3 ใบ

4. จำนวนรากต่อชิ้นส่วนพืช (รากต่อชิ้นส่วน) ใช้การนับรากต่อต้นพืช โดยนับจำนวนรากเฉพาะรากที่มีความยาวมากกว่า 1 cm

5. ความยาวรากของหญ้าหวาน (เซนติเมตร) ใช้การวัดด้วยเครื่อง Vernier Caliper โดยวัดจากปลายรากถึงโคนต้น ทำการวัดความยาวทีละราก จากนั้นทำการหาค่าเฉลี่ยความยาวรากที่ได้ทั้งหมด

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อ การเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส

การทดลอง 2.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัส การบันทึกผลการวิจัย ดังนี้

1. การเกิดแคลลัสหญ้าหวาน โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนประเมิน ดังนี้

   0 คะแนน หมายถึง ชิ้นส่วนพืชที่ไม่เกิดแคลลัส

   1 คะแนน หมายถึง ชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัส

2. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส คำนวณได้จากสมการด้านล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{ชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัส}}{\text{ชิ้นส่วนพืชทั้งหมด}} \times 100$$

3. คะแนนสีของแคลลัส โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนประเมิน ดังนี้

   0 คะแนน หมายถึง ชิ้นส่วนพืชตายหรือมีสีดำ

   1 คะแนน หมายถึง ชิ้นส่วนพืชมีสีน้ำตาลหรือสีเหลืองอ่อน

   2 คะแนน หมายถึง ชิ้นส่วนพืชมีสีเขียวอ่อน

   3 คะแนน หมายถึง ชิ้นส่วนพืชมีสีเขียวหรือเขียวเข้ม

4. น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) นำตัวอย่างแคลลัสมาซับด้วยกระดาษชำระเพื่อกำจัดวุ้นที่ปนเปื้อน จากนั้นนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากนั้นทำการบันทึกผลน้ำหนักสด

5. น้ำหนักแห้ง (กรัม) นำตัวอย่างแคลลัสที่ผ่านการอบด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 วัน หรือเมื่อน้ำหนักคงที่ ทำการประเมินความคงที่ของน้ำหนักแห้งที่ได้ โดยการนำตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักจากนั้นบันทึกค่าที่ได้ แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวไปอบต่อเป็นเวลา ประมาณ 4 – 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาชั่งน้ำหนักอีกรอบ หากน้ำหนักไม่มีการเปลี่ยนแปลงถือว่าตัวอย่างที่อบแล้วมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นทำการบันทึกผลน้ำหนักแห้ง

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากแคลลัส ทำการบันทึกการเกิดเอ็มบริออยด์ในระยะต่าง ๆ และเปอร์เซ็นต์ที่ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกันต่อการผลิตเมล็ดเทียม

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช

ทำการบันทึกเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดเทียมในแต่ละกรรมวิธี (ตาราง 5) ที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน และสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลง รวมทั้งทำการบันทึกภาพถ่ายของเมล็ดเทียม ที่ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาสภาพการเก็บรักษาเมล็ดเทียม

ทำการบันทึกเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดเทียมในแต่ละอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา และสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลง รวมทั้งทำการบันทึกภาพถ่ายของเมล็ดเทียมที่ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นกล้าที่ได้จากการปักชำ มีการบันทึกผลการวิจัย ดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์การรอด คำนวณได้จากสมการด้านล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดของต้นพืช} = \frac{\text{จำนวนต้นพืชที่เหลือ}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}} \times 100$$

2. ความสูงของหญ้าหวาน (เซนติเมตร) โดยใช้ไม้บรรทัดวัดความสูงของต้น ตั้งแต่โคนต้นไปถึงส่วนปลายยอด

3. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ยอดต่อชิ้นส่วน) ใช้นับยอดต่อต้นพืช ใช้การนับยอดต่อต้นพืช โดยนับเฉพาะยอดที่มีความสูงมากกว่า 1 cm ซึ่งเป็นยอดที่เกิดจากตาข้าง

4. จำนวนใบต่อชิ้นส่วนพืช (ใบต่อชิ้นส่วน) ใช้นับใบต่อต้นพืช โดยทำการนับใบที่มีทั้งหมดของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนพืชตั้งแต่โคนจนถึงปลายยอด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของหญ้าหวาน

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มปริมาณต้นหญ้าหวาน จากผลการทดลองพบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติในด้านความสมบูรณ์ของต้น โดยอาหารสูตร MS ที่เติม Kin ความเข้มข้น 0.5 mg/l มีคะแนนความสมบูรณ์ของต้นสูงที่สุด (3 คะแนน) รองลงมาคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม Kin ความเข้มข้น 1 mg/l (2.88 คะแนน) สูตร WPM ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสูตร MS ที่เติม Kin ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้คะแนนความสมบูรณ์ต้นอยู่ที่ 2.75 คะแนน นอกจากนี้ สูตร MS ที่เติม Kin ความเข้มข้น 2 mg/l ให้คะแนนอยู่ที่ 2.38 ซึ่งทั้ง 5 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ชุดการทดลองควบคุม: Control) มีคะแนนความสมบูรณ์ของต้นต่ำสุดเท่ากับ 1.32 คะแนน (ตาราง 6)

ในด้านจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช พบว่า สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในด้านการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวาน โดยมีจำนวนยอดอยู่ในช่วง 1.00 – 2.13 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ตาราง 6)

ขณะที่จำนวนใบต่อต้น พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติโดย อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l และ Kin ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีจำนวนใบต่อต้นสูงที่สุด คือ 9.07 ใบ รองลงมาคือ อาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (8.94 ใบ) สูตร MS ที่เติม Kin ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l สูตร MS ที่เติม Kin ความเข้มข้น 1 mg/l และ 0.5 mg/l ให้จำนวนใบ 8.75, 8.73 และ 8.69 ใบต่อชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 5 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้จำนวนใบน้อยที่สุด คือ 4.23 ใบต่อชิ้นส่วนพืช (ตาราง 6)

ในด้านความสูงยอด พบว่า อาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีความสูงยอดต่อต้นสูงที่สุด (5.17 เซนติเมตร) ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l มีความสูงของต้นน้อยที่สุด (0.84 เซนติเมตร) (ตาราง 6)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นหญ้าหวานแต่ละชุดการทดลองมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยสูตรอาหาร WPM มีลักษณะต้นที่สมบูรณ์มากที่สุด ให้จำนวนยอดและมีการเกิดรากมากที่สุด นอกจากนี้ สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม Kin ความเข้มข้น 0.5 mg/l และ สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l และ Kin ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับการเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ต้นหญ้าหวานที่ได้มีลักษณะการเจริญเติบโตที่ดีเช่นกัน โดยมีการเกิดจำนวนยอดและเกิดรากเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ จะลักษณะลำต้นสูงเล็กน้อย และเกิดก้อนกลุ่มแคลลัสเล็ก ๆ บริเวณโคนของลำต้น (ภาพ 7)

ตาราง 6 ผลของ BAP, Kin และ NAA ต่อการเจริญเติบโตต่อความสมบูรณ์ของต้น จำนวนยอด จำนวนใบและความสูงยอด

กรรมวิธี	สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (mg/L)			ความสมบูรณ์ของแต่ละต้น (คะแนน)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ยอด)	จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	ความสูงยอดต่อต้น (ซม)
		BAP	Kin	NAA				
1	MS	2	0.5	0.1	$2.25\pm0.31^{b-e}$	1.25 ± 0.16^{ns}	9.07 ± 1.10^{a}	3.13 ± 0.68^{b}
2	WPM	0	0	0	2.75 ± 0.16^{abc}	1.5 ± 0.19	8.94 ± 0.94^{ab}	5.17 ± 1.02^{a}
3*	MS	0	0	0	1.32 ± 0.21^{f}	2.13 ± 0.58	5.13 ± 0.28^{d}	1 ± 0.19^{d}
4	MS	0.5	0	0	1.75 ± 0.25^{def}	1.38 ± 0.26	5.38 ± 1.05^{d}	1.45 ± 0.21^{cd}
5	MS	1	0	0	1.5 ± 0.27^{ef}	1 ± 0	5.75 ± 1.36^{bcd}	1.09 ± 0.18^{d}
6	MS	2	0	0	1.5 ± 0.27^{ef}	1.5 ± 0.33	5.36 ± 1.38^{d}	0.84 ± 0.15^{d}
7	MS	0.5	0	0.1	2 ± 0.27^{cdef}	1.63 ± 0.32	5.75 ± 1.03^{bcd}	1.06 ± 0.23^{d}
8	MS	1	0	0.1	1.86 ± 0.26^{def}	1.71 ± 0.36	4.23 ± 0.79^{d}	1.05 ± 0.15^{d}
9	MS	2	0	0.1	1.625 ± 0.26^{def}	1.63 ± 0.38	$6.1\pm0.75^{b-d}$	1.03 ± 0.16^{d}
10	MS	0	0.5	0	3 ± 0^{a}	1.63 ± 0.18	8.69 ± 0.82^{abc}	2.77 ± 0.44^{bc}
11	MS	0	1	0	2.88 ± 0.13^{ab}	1.88 ± 0.48	8.73 ± 1.02^{abc}	3.03 ± 0.61^{b}
12	MS	0	2	0	$2.38\pm0.26^{b-d}$	1.63 ± 0.18	5.63 ± 0.81^{cd}	1.92 ± 0.43^{bcd}
13	MS	0	0.5	0.1	$2.13\pm0.30^{b-e}$	1.25 ± 0.16	5.44 ± 0.96^{d}	1.38 ± 0.38^{cd}
14	MS	0	1	0.1	$2.25\pm0.31^{b-e}$	1.125 ± 0.13	8.75 ± 1.35^{abc}	2.18 ± 0.71^{bcd}
15	MS	0	2	0.1	2.75 ± 0.16^{abc}	1.5 ± 0.27	$6.04\pm0.64^{b-d}$	1.46 ± 0.28^{cd}

หมายเหตุ: ตัวเลข คือค่าเฉลี่ย ± SE (std. error), อักษรภาษาอังกฤษ คือ ค่าแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ns คือ not significance และ * = ชุดการทดลองควบคุม

ภาพ 7 ลักษณะการเจริญเติบโตและการเกิดยอดของชิ้นส่วนข้อหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ WPM ร่วมกับการเติม BAP, Kin และ NAA เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

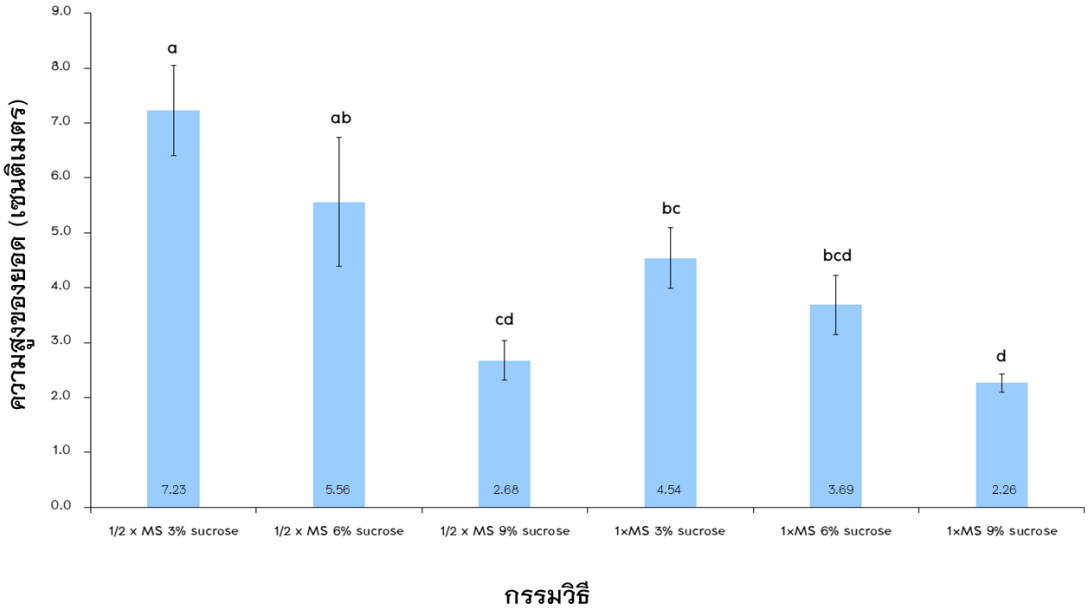
การทดลองที่ 1.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน จากผลการทดลองพบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 3% มีความสูงของยอดมากที่สุด เท่ากับ 7.23 เซนติเมตร รองลงมาคือสูตร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 6% มีความสูงอยู่ที่ 5.56 เซนติเมตร ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหาร ½ MS มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสูตรอาหาร MS และการเติมความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นทำให้ต้นหญ้าหวานที่ได้มีความสูงที่ต่ำลงตามลำดับ (ภาพ 8)

ในด้านการเกิดจำนวนยอด พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 3% ให้จำนวนยอดหญ้าหวานมากที่สุด คือ 2.63 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช รองลงมาคือ สูตรอาหาร ½ MS ที่เติมความเข้มข้นของน้ำตาล 6% และ 3% ให้จำนวนยอดอยู่ที่ 2.25 และ 1.88 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 9) นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสมากขึ้นทำให้มีจำนวนการเกิดยอดที่น้อยลงตามลำดับ

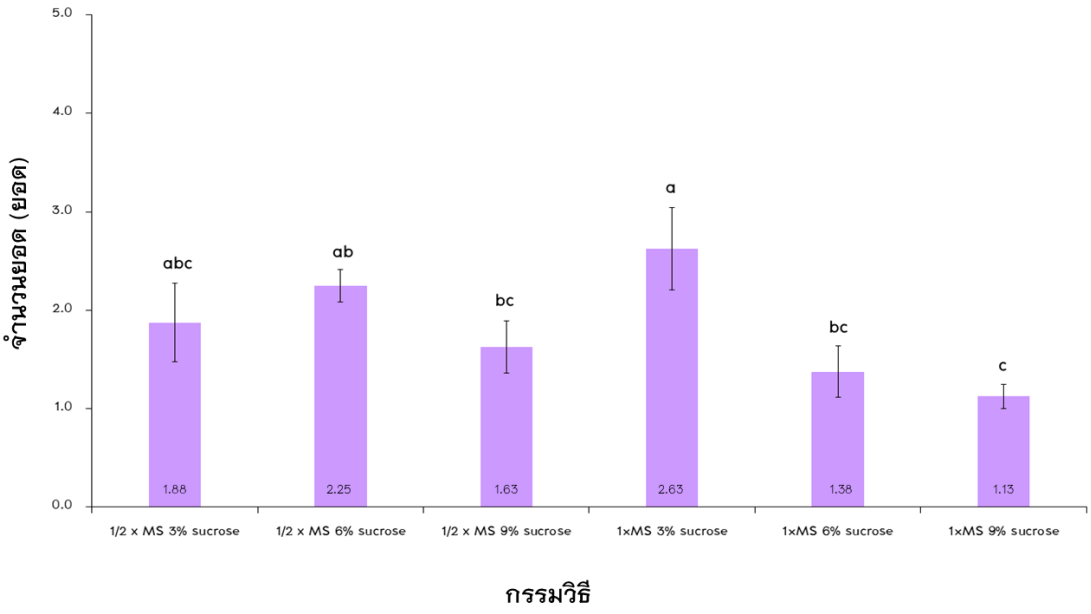
การวัดค่าดัชนีความเขียวของใบ พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดย สูตรอาหาร MS มีค่าดัชนีความเขียวของใบมากกว่าสูตร ½ MS ซึ่งสูตรอาหารที่ให้ค่าดัชนีความเขียวของใบมากที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 6% ในค่าดัชนีความเขียวของใบอยู่ที่ 31.01 รองลงมาคือสูตรอาหาร MS ที่เติมความเข้มข้นของน้ำตาล 3% อยู่ที่ 25.15 และสูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 3% อยู่ที่ 24.76 คะแนน ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 10)

ส่วนการบันทึกผลจำนวนรากและความยาวรากของหญ้าหวาน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทาวสถิติ มีค่าอยู่ในช่วง 2.12–3.62 รากต่อชิ้นส่วนพืช และ 4.71–8.09 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตาราง 7)

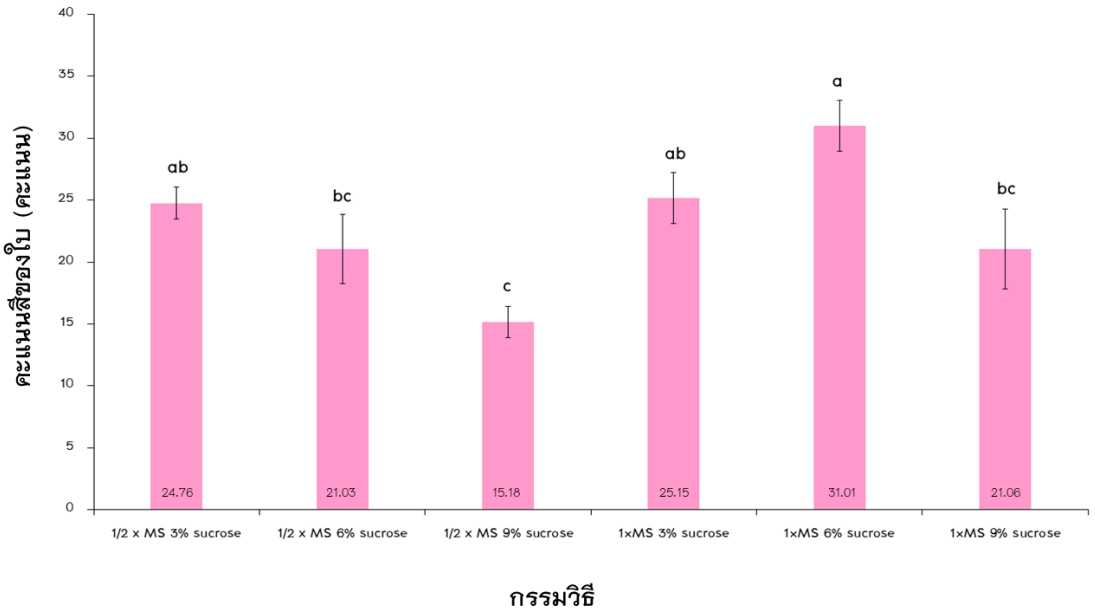
ลักษณะต้นหญ้าหวานแต่ละกรรมวิธีมีลักษณะต้นพืชที่เจริญเติบโตที่แตกต่างกัน สังเกตได้จากสูตรอาหาร ½ MS และสูตร MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 3% มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสูตรอื่น ๆ มีความสูงยอดและจำนวนยอดมากกว่า สีใบมีความเขียวเข้ม เมื่อเทียบกับสูตรอาหาร ½ MS และสูตร MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 9% มีการเจริญเติบโตของต้นหญ้าหวานค่อนข้างต่ำ มีความสูงและจำนวนยอดเล็กน้อย แต่ที่เห็นได้ชัดคือ สีใบของหญ้าหวานมีสีเขียวอ่อนออกเหลือง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า มีการเกิดรากได้ในทุกกรรมวิธี (ภาพ 11)



ภาพ 8 กราฟความสูงยอดของหญ้าหวาน โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพ 9 กราฟจำนวนยอดของหญ้าหวาน โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพ 10 กราฟดัชนีความเขียวของใบหญ้าหวาน โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 7 ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน ต่อจำนวนราก (รากต่อชิ้นส่วนพืช) และความยาวราก (เซนติเมตร) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	เปอร์เซ็นต์น้ำตาล	จำนวนราก (รากต่อชิ้นส่วน) Mean±SE	ความยาวราก (เซนติเมตร) Mean±SE
1/2 MS	3	2.62±0.37 ^{ns}	8.09±0.41 ^{ns}
1/2 MS	6	2.87±0.64 ^{ns}	7.59±0.98 ^{ns}
1/2 MS	9	2.12±0.48 ^{ns}	7.73±1.64 ^{ns}
MS	3	2.12±0.40 ^{ns}	6.35±0.78 ^{ns}
MS	6	3.62±0.38 ^{ns}	6.24±0.72 ^{ns}
MS	9	2.12±0.67 ^{ns}	4.71±1.45 ^{ns}

หมายเหตุ: ตัวเลข คือค่าเฉลี่ย ± SE (std. error) และ ns คือ not significance

ภาพ 11 ลักษณะต้นพืชที่เจริญเติบโตในสูตรอาหาร ½ MS และ MS ที่เติมความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัส จากผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบเกือบทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอยู่ในช่วง 90–100% ยกเว้นกรรมวิธีที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอยู่ที่ 88% (ภาพ 12A) ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง พบว่าเกือบทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอยู่ในช่วง 84–100% ยกเว้นกรรมวิธีที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 และ 2.0 mg/l โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง อยู่ที่ 72% (ภาพ 12B)

ผลของคะแนนการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l ให้คะแนนการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบมากที่สุดถึง 2.50 คะแนน รองลงมาคือ การเติม BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l และ 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l และการเติม BAP ความเข้มข้น 0.1 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l รวมทั้งการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้คะแนนการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอยู่ในช่วง 2.45–2.40 คะแนน นอกจากนี้การเติม BAP ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 และ 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 และ 2.0 mg/l ให้คะแนนการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอยู่ในช่วง 2.10 – 1.80 คะแนน ซึ่งกรรมวิธีที่กล่าวมาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 13A) ส่วนคะแนนการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้คะแนนการเกิดแคลลัสมากที่สุด คือ 2.8 คะแนน (ภาพ 13B)

ผลของคะแนนสีของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 0.1 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 และ 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีคะแนนสีของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบมากที่สุด โดยอยู่ในช่วง 2.3 – 2.2 คะแนน รองลงมาคือ การเติม BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 และ 2.0 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l มีคะแนนสีแคลลัสอยู่ในช่วง 2.1–2.0 คะแนน นอกจากนี้การเติม BAP ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l และการเติม BAP และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l ให้คะแนนสีของแคลลัสชิ้นส่วนใบ อยู่ในช่วง 1.8–1.5 คะแนน ซึ่งกรรมวิธีที่กล่าวมาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 14A) ส่วนคะแนนสีของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม BAP ความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้คะแนนสีแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องมากที่สุด อยู่ในช่วง 2.5–2.4 คะแนน รองลงมาคือ การเติม BAP ความเข้มข้น 0.1 mg/l ร่วมกับ 2,4–D

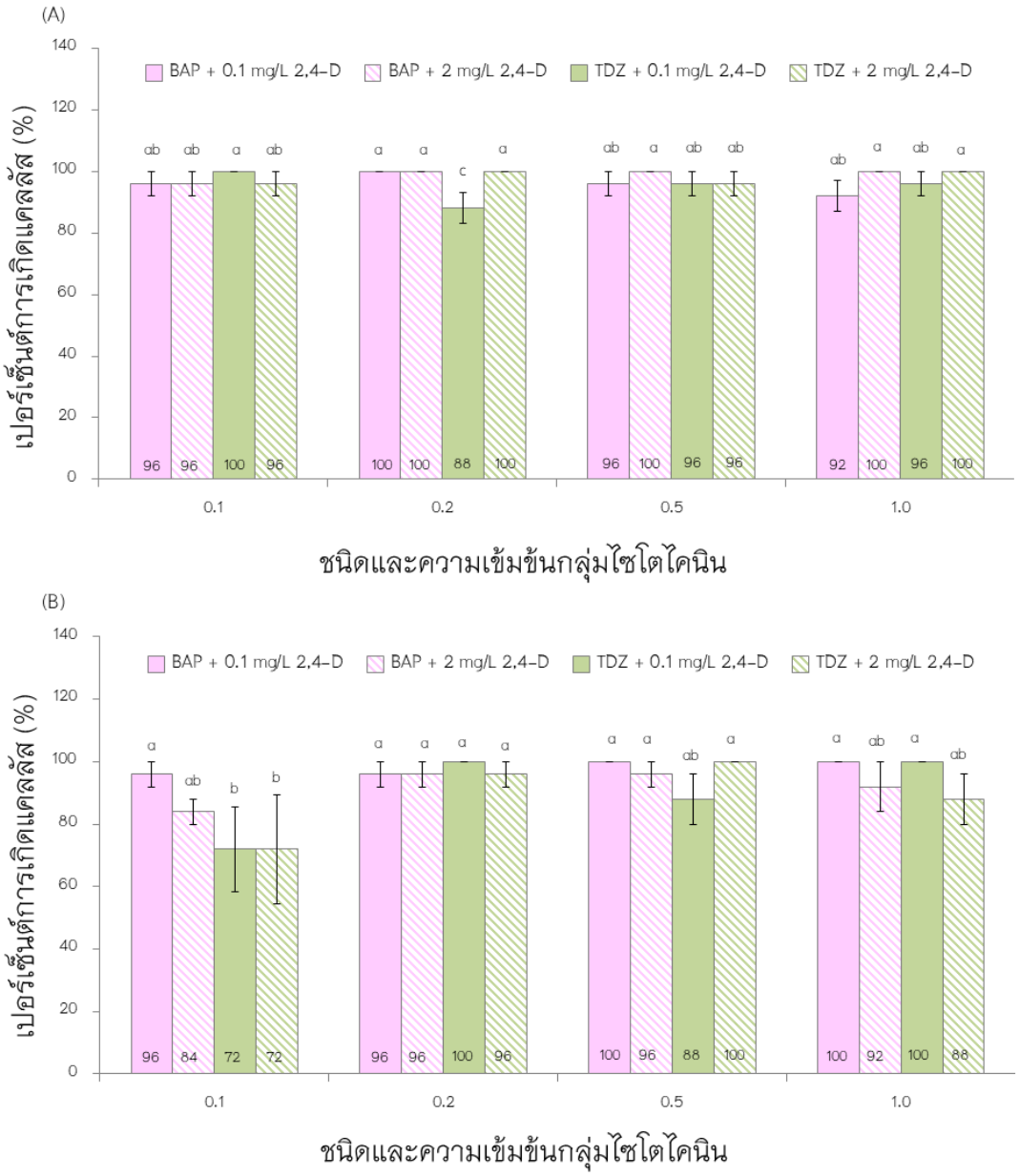
ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้คะแนนสีของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง อยู่ที่ 2.2 คะแนน ซึ่งกรรมวิธีที่กล่าวมาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 14B)

ผลของน้ำหนักสดของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีน้ำหนักสดมากที่สุด เท่ากับ 0.854 กรัม รองลงมาคือ การเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 mg/l ให้น้ำหนักสดอยู่ที่ 0.808 กรัม นอกจากนี้การเติม BAP ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 และ 0.1 mg/l ให้น้ำหนักสดของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ อยู่ที่ 0.698 และ 0.682 กรัม ตามลำดับ ซึ่งกรรมวิธีที่กล่าวมาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 15A) ส่วนผลของน้ำหนักสดของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้น้ำหนักสดของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องมากที่สุด เท่ากับ 0.644 กรัม รองลงมาคือ การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 mg/l มีน้ำหนักสดของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องอยู่ที่ 0.584 กรัม ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 15B)

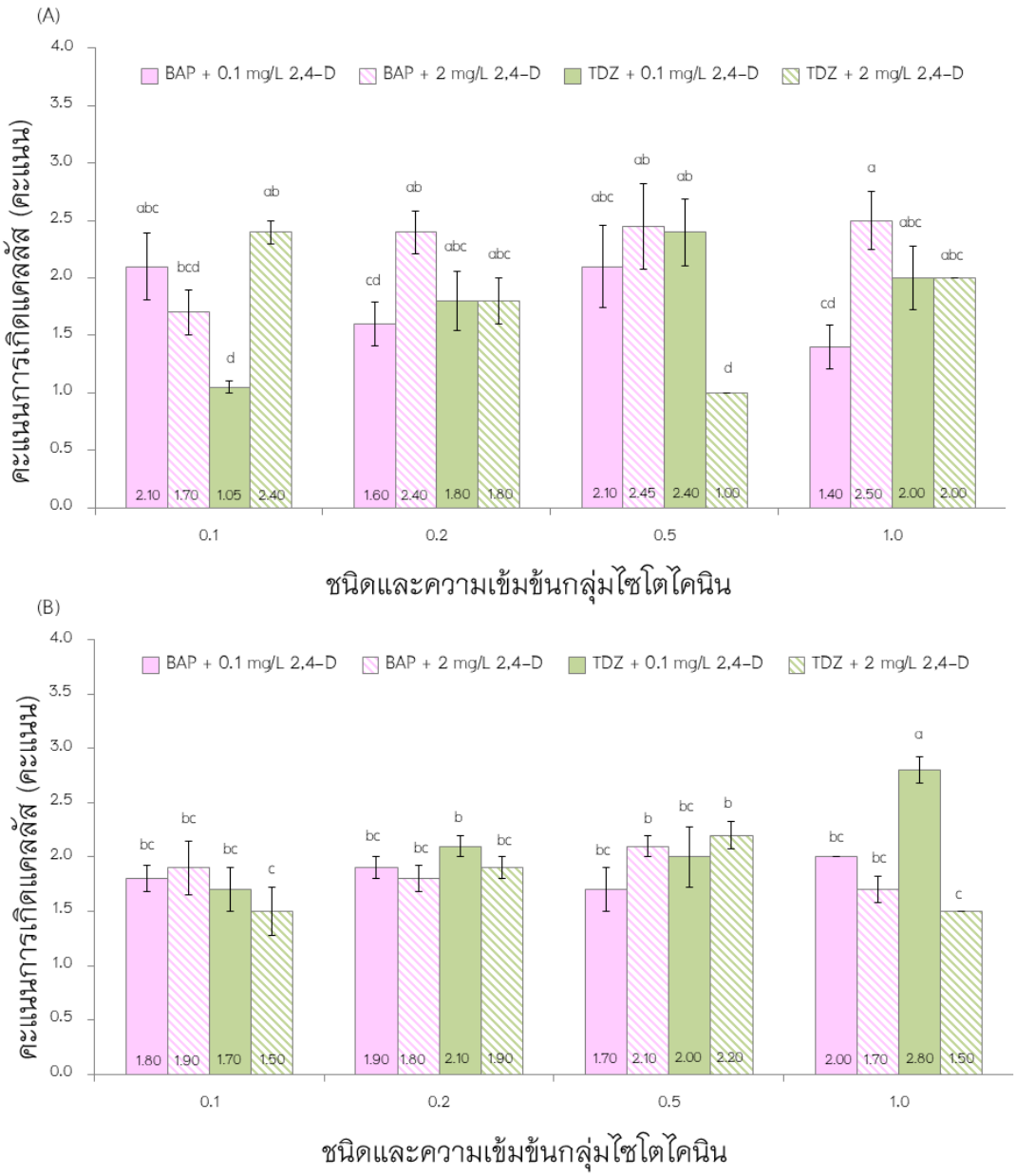
ผลของน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้น้ำหนักแห้งของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบมากที่สุด คือ 0.106 กรัม รองลงมาคือ การเติม BAP ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 และ 0.1 mg/l มีน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ เท่ากับ 0.098 และ 0.86 กรัม ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 16A) ส่วนผลของน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l ให้น้ำหนักแห้งของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องมากที่สุด คือ 0.078 กรัม รองลงมาคือ การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม BAP ความเข้มข้น 1.0, 0.5 และ 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 mg/l และการเติม BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 mg/l มีน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 0.067 – 0.063 กรัม นอกจากนี้ การเติม BAP ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 mg/l และการเติม BAP ความเข้มข้น 0.1 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องอยู่ที่ 0.060 และ 0.058 กรัม ตามลำดับ ซึ่งกรรมวิธีที่กล่าวมาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 16B)

ลักษณะแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นก้อนแคลลัสแน่นทึบเกาะกลุ่มรวมกันทั้งแผ่นใบ มีสีเขียวเข้มและเขียวอ่อน ยกเว้นกรรมวิธีที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีสีของแคลลัสเป็นสีแดงน้ำตาลเข้ม (ภาพ 17)

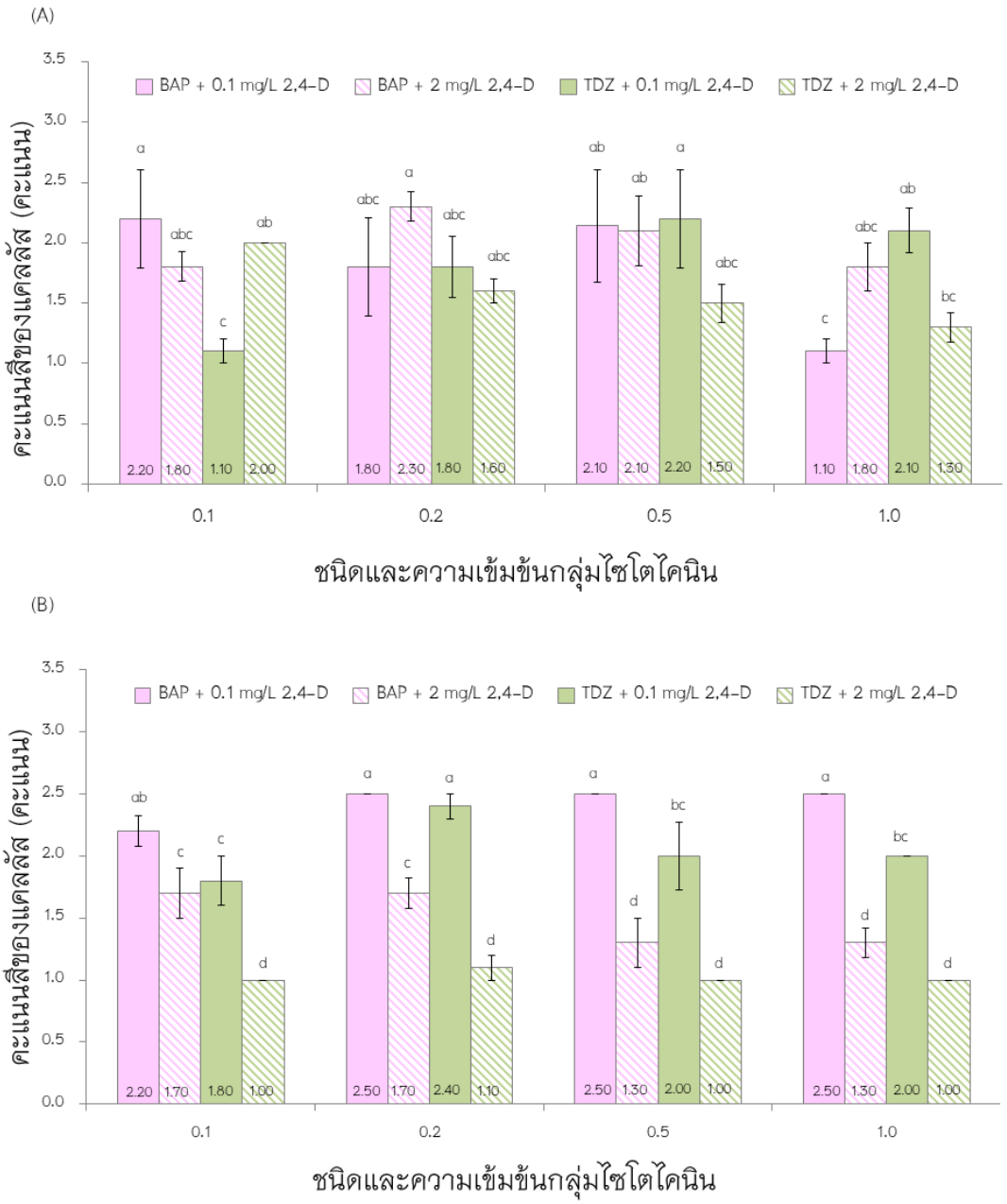
ลักษณะแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนปล้องมีความแตกต่างจากชิ้นส่วนใบ คือ แคลลัสบางส่วนไม่เป็นกลุ่มก้อนเดียวกัน ส่วนมากเกิดแคลลัสขึ้นบริเวณหัวและท้ายของชิ้นส่วน แคลลัสมีลักษณะเป็นเม็ดก้อนเล็ก ๆ เรียงกัน สีของแคลลัสที่ได้มีสีเขียวและเขียวอ่อน ยกเว้นกรรมวิธีที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 2.0 mg/l แคลลัสมีสีขาวซีด นอกจากนี้การเติม BAP ความเข้มข้น 0.2 และ 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l และการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีสีของแคลลัสเป็นสีน้ำตาลเข้มค่อนข้างดำ (ภาพ 18)



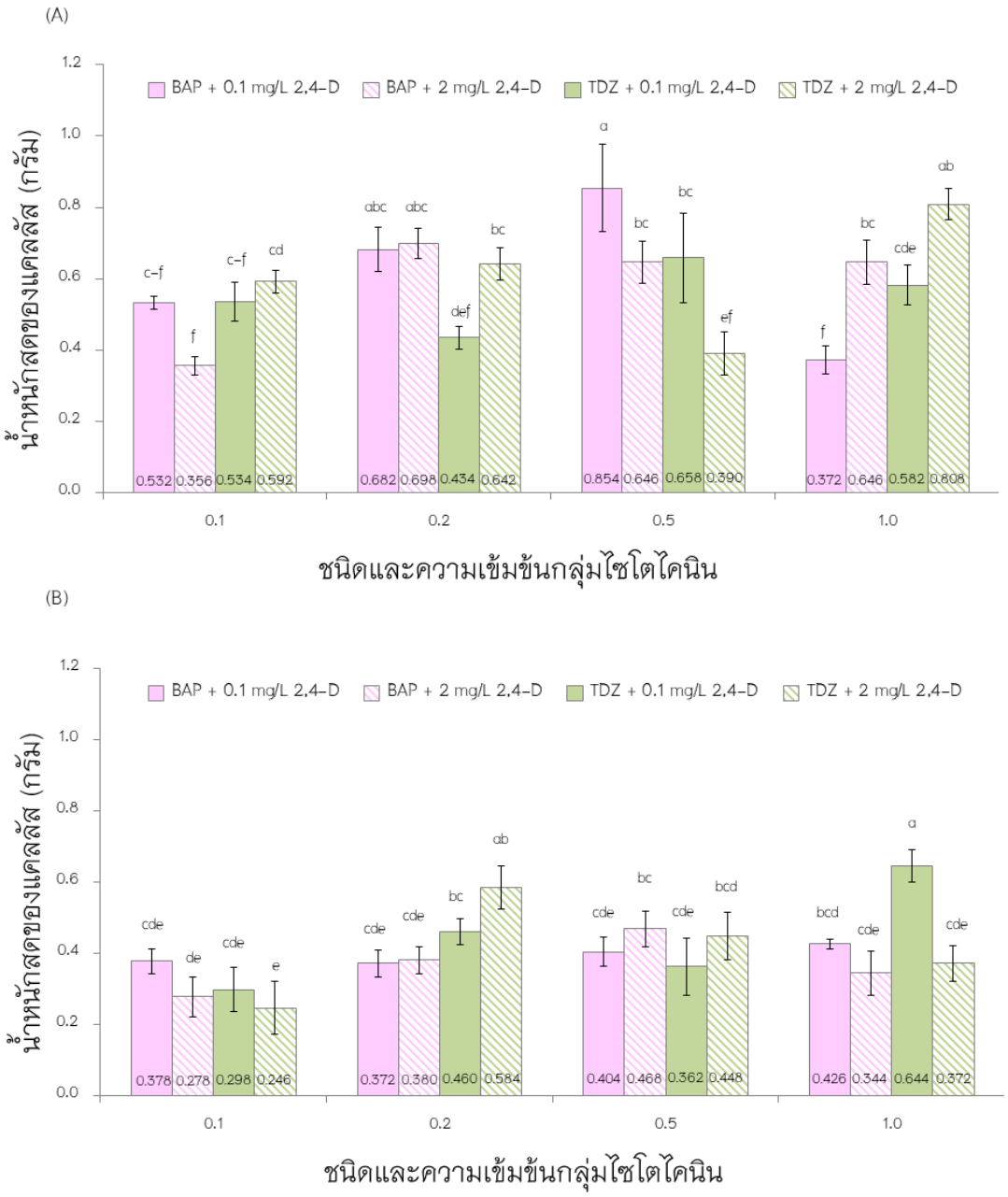
ภาพ 12 ร้อยละของการเกิดแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ (A) และปล้อง (B) ของหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 2 mg/l เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์



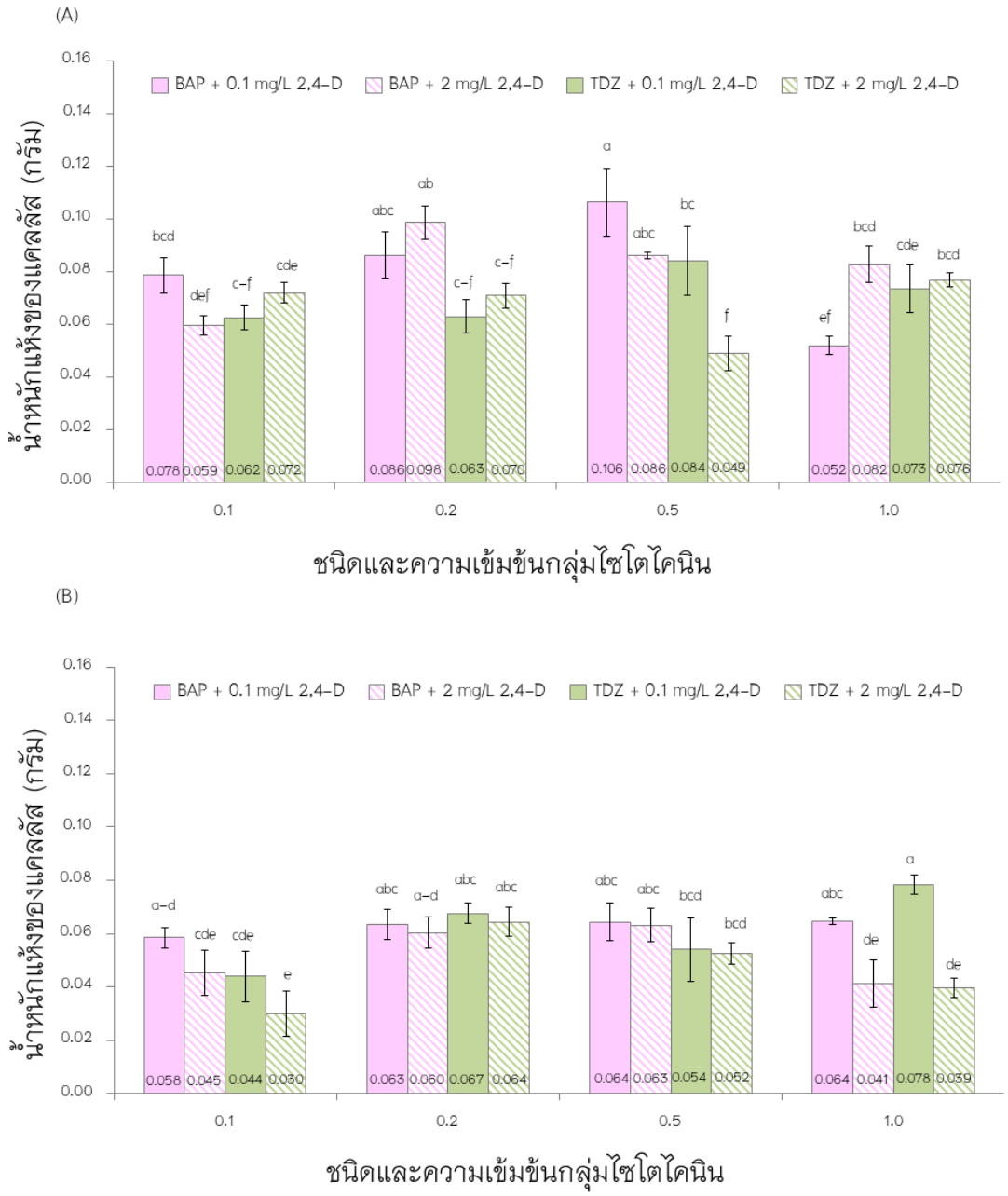
ภาพ 13 คะแนนการเกิดแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ (A) และปล้อง (B) ของหญ้าหวานที่อยู่ ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 2 mg/l เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์



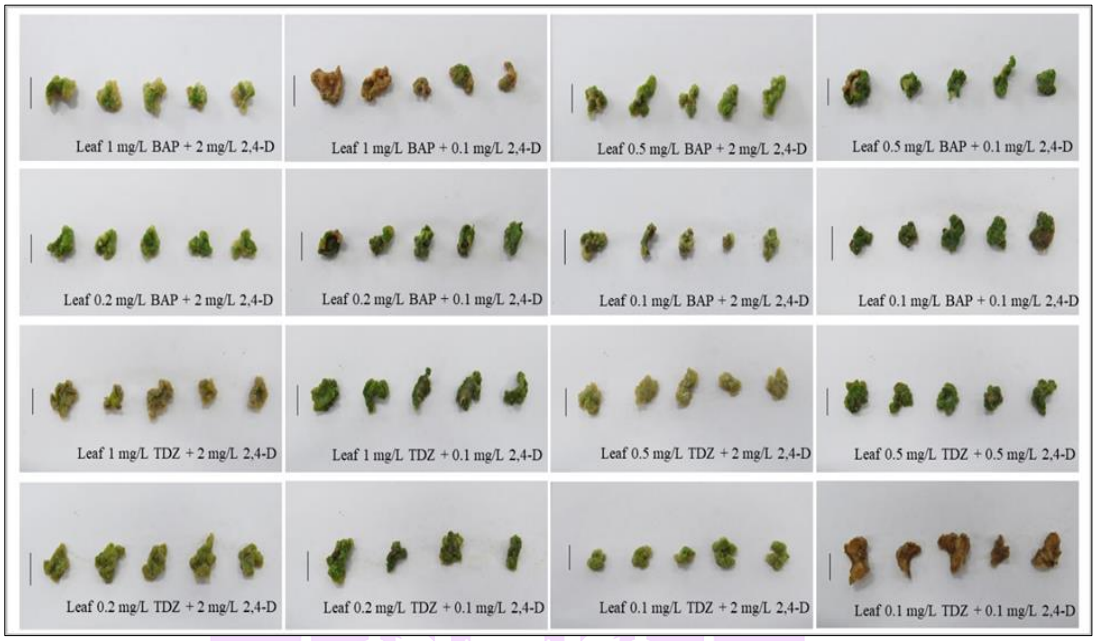
ภาพ 14 คะแนนสีของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ (A) และปล้อง (B) ของหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 2 mg/l เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์



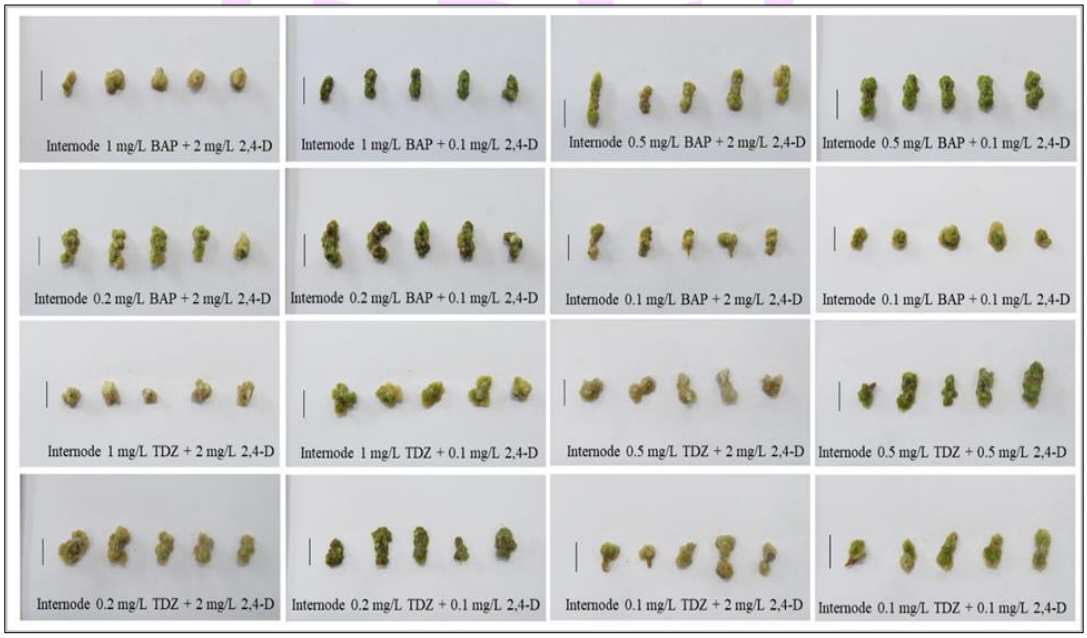
ภาพ 15 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ (A) และปล้อง (B) ของหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 2 mg/l เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพ 16 น้ำหนักแห้งของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ (A) และปล้อง (B) ของหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5และ 1 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 2 mg/l เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์

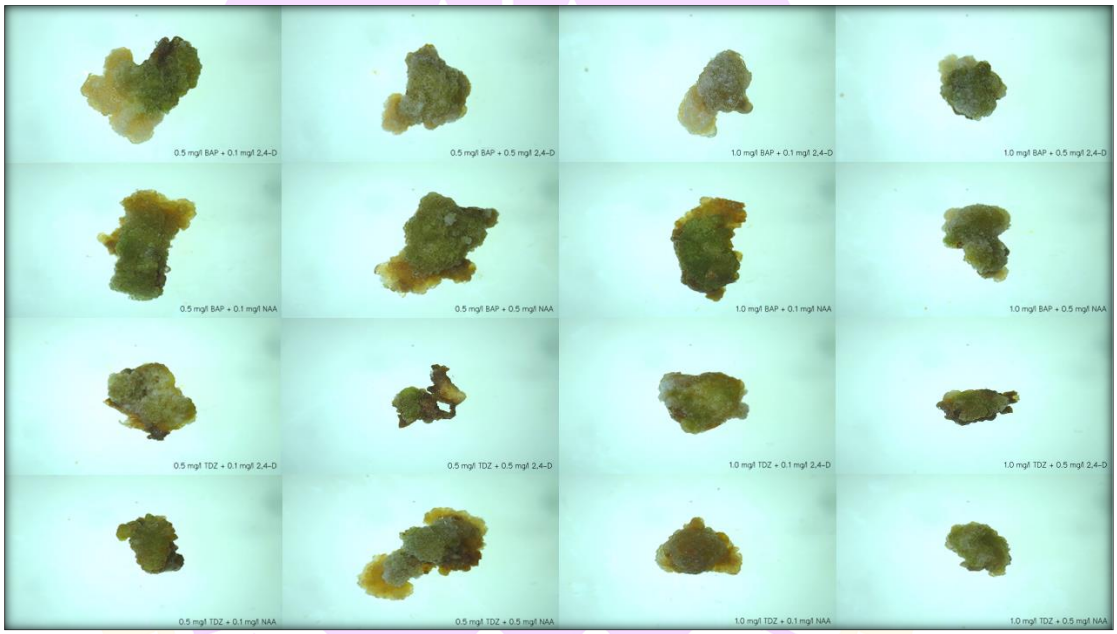


ภาพ 17 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบของหญ้าหวาน โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BAP หรือ TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพ 18 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนปล้องของหญ้าหวาน โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BAP หรือ TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากแคลลัส จากผลการทดลองพบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ 2,4–D ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/l ไม่สามารถชักนำแคลลัสให้การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสได้ โดยลักษณะแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนช่วงกลางแคลลัสมีสีเขียว ลักษณะแน่นทึบ บริเวณขอบรอบก้อนแคลลัสมีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อนออกสีเหลือง และมีลักษณะร่วนเปราะ (ภาพ 19)



ภาพ 19 ลักษณะของแคลลัสจากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากแคลลัส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกันต่อการผลิตเมล็ดเทียม

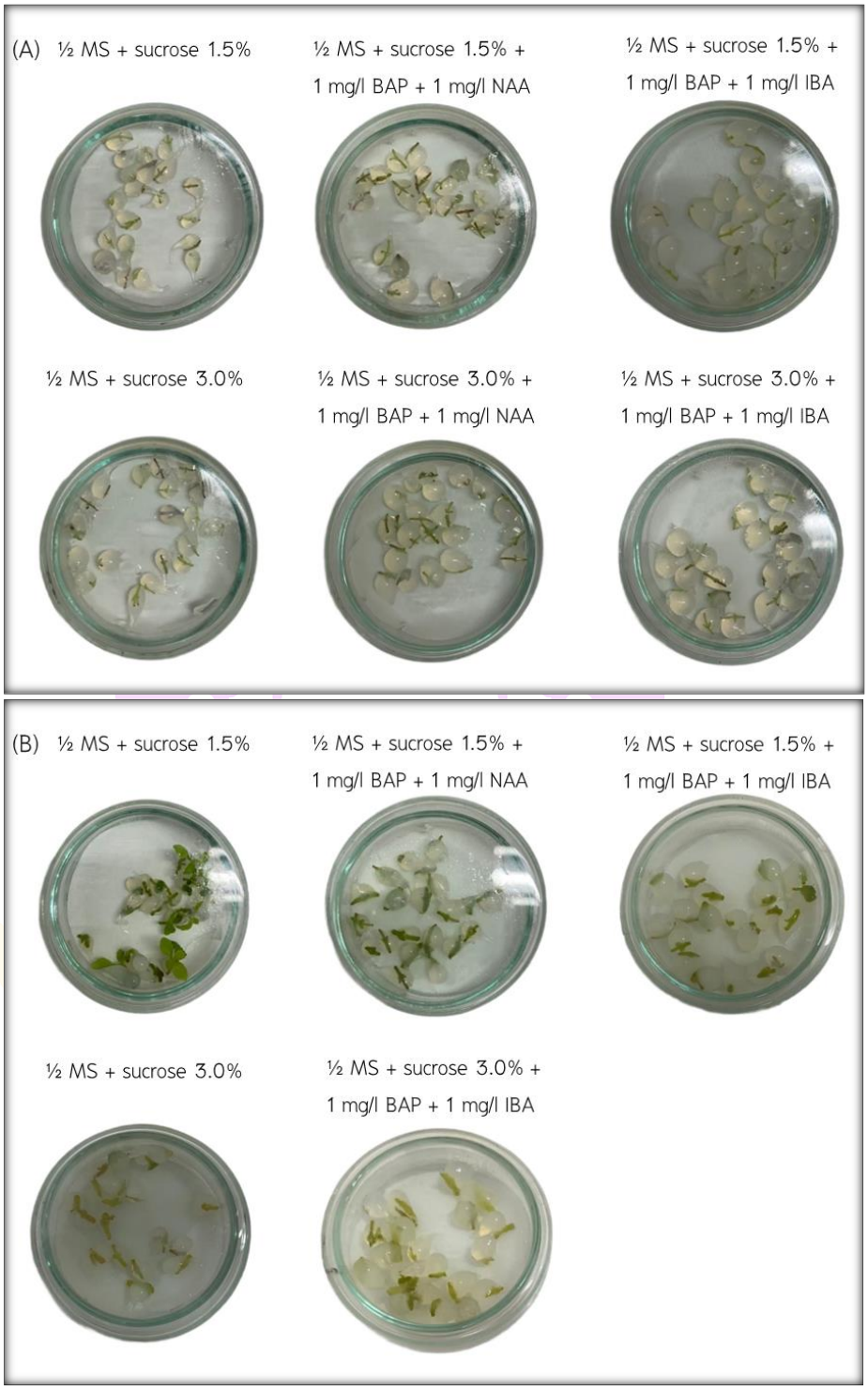
การทดลองที่ 3.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการผลิตเมล็ดเทียม จากผลการทดลองพบว่า ทุกสูตรอาหารสามารถทำให้ได้เมล็ดเทียมที่สมบูรณ์ มีรูปร่างค่อนข้างกลมและขนาดสม่ำเสมอ ยกเว้น สูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 mg/l และสูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% เพียงอย่างเดียว ซึ่งทั้งสองสูตรดังกล่าวมีลักษณะชิ้นส่วนพืชในเมล็ดสีเหลืองซีดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพ 20A) ส่วนเมล็ดเทียมที่ทำการเก็บในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พบว่า สูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% มีลักษณะของเมล็ดเทียมดีที่สุด รองลงมาคือ สูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ได้เมล็ดเทียมที่ดีเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม สูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นน้ำตาล 3.0% และสูตร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5 และ 3.0% ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l และ IBA ความเข้มข้น 1 mg/l มีลักษณะของชิ้นส่วนพืชที่เหลืองซีด (ภาพ 20B)

เมล็ดเทียมที่เก็บรักษาในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการงอกของชิ้นส่วนพืช โดยในสูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% ชิ้นส่วนพืชมีการแตกยอด อาจเนื่องมาจากในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการให้แสงและมีอุณหภูมิที่สูงมากพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการงอกได้ (ภาพ 20B) ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเมล็ดเทียม คือ สูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l และควรเก็บรักษาเมล็ดเทียมไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากจะช่วยชะลอการเปลี่ยนสี ทำให้ชิ้นส่วนพืชมีสีเขียวคงเดิม และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนพืช (ภาพ 20A)

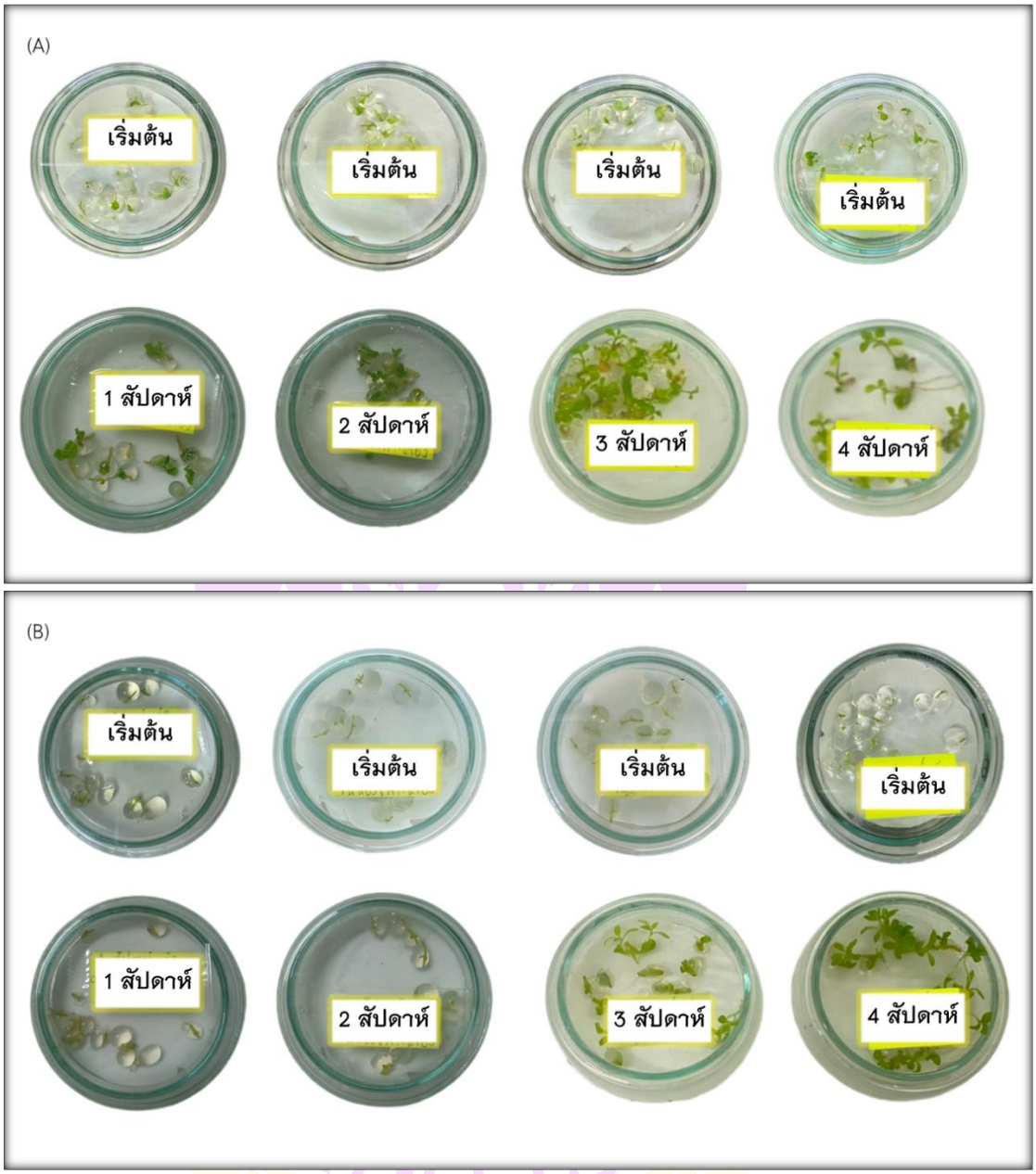
การทดลองที่ 3.2 การศึกษาสภาพการเก็บรักษาเมล็ดเทียม จากผลการทดลองพบว่า เมล็ดเทียมที่ได้จากชิ้นส่วนยอดของหญ้าหวานที่เก็บรักษาในสภาพห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการงอกของชิ้นส่วนพืชในเมล็ดเทียมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึง 4 สัปดาห์ของระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา โดยชิ้นส่วนพืชในเมล็ดเทียมมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นทั้งความสูงยอด และมีการเกิดรากในบางชิ้นส่วนพืช (ภาพ 21A) ส่วนในชิ้นส่วนข้อที่เก็บรักษาในสภาพห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เมล็ดเทียมมี

การเปลี่ยนแปลงในสัปดาห์ที่ 3 ถึง 4 สัปดาห์ของระยะเวลาที่ทำการเก็บบันทึก โดยชิ้นส่วนพืชในเมล็ดเทียมมีการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย และมีการเกิดรากในบางชิ้นส่วนพืช (ภาพ 21B)

การศึกษาสภาพการเก็บรักษาเมล็ดเทียม พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือในตู้เย็นทำให้สภาพของเมล็ดเทียมที่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และไม่เกิดการงอกของชิ้นส่วนพืช โดยการทดลองครั้งนี้พบว่า การใช้ชิ้นส่วนยอดและข้อให้ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งชิ้นส่วนพืชยังคงมีสีเขียว และความสมบูรณ์ของเมล็ดเทียมที่ได้ยังคงเดิมใกล้เคียงกับสัปดาห์ที่ 1 (ภาพ 22A และ 22B)



ภาพ 20 ลักษณะเมล็ดเทียมของหญ้าหวาน จากการศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (A) เก็บรักษาสภาพในตู้เย็น (B) เก็บรักษาสภาพในห้องเพาะเลี้ยง



ภาพ 21 ลักษณะเมล็ดเทียมของหญ้าหวานในแต่ละสัปดาห์ การศึกษาสภาพเก็บรักษาเมล็ดเทียมในอุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) ชิ้นส่วนยอด และ (B) ชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน

ภาพ 22 ลักษณะเมล็ดเทียมของหญ้าหวานในแต่ละสัปดาห์ การศึกษาสภาพเก็บรักษาเมล็ดเทียมในอุณหภูมิตู้เย็น หรือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (A) ชิ้นส่วนยอด และ (B) ชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นกล้าที่ได้จากการปักชำ

จากการนำต้นหญ้าหวานที่ได้จากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและจากการปักชำมาอนุบาล พบว่า ต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 26 ต้น มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตจำนวน 15 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์อัตราการรอด เท่ากับ 57.69% ส่วนต้นหญ้าหวานที่ได้จากการปักชำที่นำมาอนุบาลมี 50 ต้น มีจำนวนต้นพืชที่รอดชีวิตจำนวน 23 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์อัตราการรอด เท่ากับ 46%

จากการทดลองเปรียบเทียบต้นพืชอนุบาลที่ได้จากห้องเพาะเลี้ยงกับต้นพืชที่ได้จากการปักชำ พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งความสูงยอด (เซนติเมตร) จำนวนใบ (ใบ) และจำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) โดยต้นพืชที่อนุบาลจากห้องเพาะเลี้ยงมีค่าเฉลี่ยความสูงอยู่ที่ 6.02 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยจำนวนใบ 8.01 ใบต่อต้น และมีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอยู่ที่ 2.0 ยอดต่อต้น ซึ่งน้อยกว่าต้นพืชที่ได้จากการปักชำ ที่มีค่าเฉลี่ยความสูงยอดอยู่ที่ 7.66 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยจำนวนใบ 9.73 ใบต่อต้น และมีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอยู่ที่ 2.0 ยอดต่อต้น (ตาราง 8)

ต้นหญ้าหวานที่ได้จากการอนุบาลเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นพืชที่ได้มีความสูง จำนวนยอด และจำนวนใบเพิ่มมากขึ้น ส่วนต้นหญ้าหวานที่ได้จากการปักชำเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต้นพืชที่ได้มีความสูงเพิ่มเพียงเล็กน้อย แต่มีการเกิดจำนวนยอดและจำนวนใบเช่นเดียวกัน (ภาพ 23)

ตาราง 8 ผลของการเปรียบเทียบต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับต้นกล้าที่ได้จากการปักชำ

การอนุบาลต้นพืช	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนใบ (ใบต่อชิ้นส่วน)	จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วน)
ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	6.02±1.05 ^{ns}	8.01±0.75 ^{ns}	2.0±0.24 ^{ns}
ต้นพืชที่ได้จากการปักชำ	7.66±0.96 ^{ns}	9.73±0.67 ^{ns}	2.00±0.24 ^{ns}
Sig. (2-tailed)	0.257	0.098	1

หมายเหตุ: ตัวเลข คือค่าเฉลี่ย ± SE (std. error) และ ns คือ not significance

ภาพ 23 การเจริญเติบโตของหญ้าหวานในต้นพืชที่ได้จากห้องเพาะเลี้ยงและต้นที่ได้จากการปักชำ โดยเพาะปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

บทที่ 5

วิจารณ์ผลและสรุปผล

วิจารณ์ผล

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของหญ้าหวาน

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มปริมาณต้นหญ้าหวาน พบว่า การเพิ่มจำนวนยอดบนอาหารทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม Kin เพียงอย่างเดียว ให้ความสูงยอดดีกว่าสูตรอาหาร MS ที่มีการเติม BAP โดยทั่วไปแล้วไซโตไคนินที่สามารถพบได้ในพืช คือ Zeatin และ 6 isopentenyladenine (2iP) ส่วนไซโตไคนินที่เกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมี และมีคุณสมบัติเหมือนไซโตไคนิน เช่น BAP และ Kin แต่อย่างไรก็ตามการที่ BAP และ Kin มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความสูงของยอดที่ได้แตกต่างกันในงานวิจัยครั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ชิ้นส่วนพืชในการทดลองที่มีการเติม BAP ในอาหารเพาะเลี้ยงก่อนที่จะนำพืชมาใช้ ซึ่งอาจจะมีการสะสมปริมาณ BAP ที่มากเกินไปจนทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Arpita et al. (2011) รายงานว่า การใช้ Kin ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของหญ้าหวาน แต่ส่งผลต่อความสูตรยอดได้ดี (Arpita, et al. 2011) เช่นเดียวกับ Yücesan et al. (2016) ได้เพิ่มจำนวนหญ้าหวานโดยศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ Kin ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/l พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม Kin ให้จำนวนยอดไม่ต่างกับ BAP แต่ Kin ให้ความสูงยอดมากกว่า BAP ซึ่งสูตร MS ที่เติม Kin ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/l ให้ความสูงมากที่สุด ถึง 3 เซนติเมตรต่อต้นพืช (Yücesan, et al. 2016) นอกจากนี้ Razak et al. (2014) พบว่า การใช้ Kinetin ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้ความสูงของยอดโดยเฉลี่ยถึง 5.05±0.2 ซม แต่ให้จำนวนยอดเพียง 2.21±0.3 ยอด แต่เมื่ออาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l และ Kin ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีการเจริญเติบโตของหญ้าหวานที่ดี และให้จำนวนใบมากที่สุด อยู่ที่ 9.07 ใบต่อต้น และยังมีความสูงอยู่ที่ 3.13 เซนติเมตร (Razak, et al. 2014) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Sridhar and Aswath (2014) ที่ทำการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานบน

อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l และ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีจำนวนยอดสูงถึง 8.60 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และมีความสูงยอดถึง 5.60 เซนติเมตร (Sridhar and Aswath, 2014) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พบว่า การใช้ BAP และ Kin ร่วมกับ NAA สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้ โดยมีรายงานการใช้ Kinetin ร่วมกับ BAP สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารไซโตไคนินในการช่วยเพิ่มปริมาณการแตกยอดของพืชได้ (Sharuti, et al. 2011) เช่นการศึกษาของ Razak et al. (2014) พบว่าการชักนำการเพิ่มปริมาณยอดของหญ้าหวานที่ใช้สูตรอาหาร MS เป็นสูตรพื้นฐานร่วมกับการเติม BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงถึง 7.82±0.7 ยอด โดยมีความสูงของยอดโดยเฉลี่ย 1.92±0.1 ซม. (Razak, et al. 2014) และ Yesmin (2019) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดของหญ้าหวาน โดยศึกษาอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ได้แก่ BAP และ Kinetin ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 5.0 mg/l และ BAP ที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 mg/l ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 mg/l การทดลองนี้ใช้ชิ้นส่วนยอดและข้อของหญ้าหวาน พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 1.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l เกิดยอดใหม่สูงถึง 96% มีจำนวนยอด 9.28 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และความสูงประมาณ 3.11 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนยอดมีการเกิดยอดใหม่ถึง 73% มีจำนวนยอด 2.21 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และความสูงประมาณ 1.36 เซนติเมตร แต่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม Kinetin ความเข้มข้น 2.0 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ถึง 89% มีจำนวนยอด 6.53 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และความสูงอยู่ที่ 1.27 เซนติเมตร (Yesmin, 2019) นอกจากนี้การศึกษาในพืชชนิดอื่น อย่างเช่น การทดลองของ Jun-Jin et al. (2017) ได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นมะรุม โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 0, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 mg/l และ Kinetin ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.2, 0.4 และ 0.8 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.2mg/l พบว่า การเติม BAP ความเข้มข้น 0.8 mg/l และ Kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การยอดอยู่ที่ 93.33% และมีการเกิดยอดใหม่ 4.40 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (Jun-jie, et al. 2017) และ Fonseka et al. (2019) ได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้น *Celastrus paniculatus* Willd หรือต้นกระทงลาย โดยสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง คือ สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ TDZ ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 mg/l และ BAP ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 mg/l

พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l เกิดยอดมากที่สุด ถึง 97.8% โดยมีจำนวนยอดมากถึง 25.2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช รองลงมาคือ สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l เพียงอย่างเดียว ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากถึง 92.4% และมีจำนวนยอดมากถึง 25.0 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (Fonseka, et al. 2019)

นอกจากนี้ จากการศึกษาครั้งนี้ได้มีการศึกษาสูตรอาหาร MS และ WPM ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของหญ้าหวานบนอาหารสังเคราะห์สูตร WPM มีการเจริญเติบโตดีกว่าสูตร MS ทั้งคะแนนความสมบูรณ์ (2.75 คะแนนต่อต้น) จำนวนใบ (8.94 ใบต่อต้น) และความสูงยอดสูงที่สุด (5.17 เซนติเมตร) อาหารสังเคราะห์สูตร WPM หรือ Woody plant medium เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับพืชกลุ่มไม้เนื้อแข็ง โดยแบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ ไม้พุ่ม ไม้ต้น ไม้เลื้อย และไม้รอเลื้อย (เริ่มอรุณ รักเผือก, 2541) ซึ่งหญ้าหวานเป็นพืชล้มลุกลักษณะเป็นทรงพุ่มเตี้ย อาจทำให้หญ้าหวานเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์สูตร WPM ได้ดีกว่าอาหารสูตร MS แต่อย่างไรก็ตามอาหารสูตร WPM เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ยืนต้น เช่น การเพาะเลี้ยงยอดมะเมาดงบนสูตรอาหาร WPM เติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดจำนวน 2.9 ยอด และความยาวยอดเฉลี่ย 2.76 เซนติเมตร (พรทิพย์ เทิดบารมี, 2557) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman et al. (2018) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณของต้นชำมะเลียง บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 mg/l และอาหารสังเคราะห์สูตร WPM ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 mg/l พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร WPM มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่มากกว่าสูตร MS ถึง 40% มียอด 2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช สูงถึง 3.4 เซนติเมตร (Ab Rahman, et al. 2018)

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน พบว่า สูตรอาหาร ½ MS ให้ความสูงยอดมากกว่าสูตรอาหาร MS ยกเว้น สูตรอาหาร ½ MS และ MS ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 9% ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสูตรอาหารที่มีความสูงมากที่สุด คือ สูตร ½ MS ที่มีการเติมน้ำตาลความเข้มข้น 3% ให้ความสูงถึง 7.2 เซนติเมตร ส่วนการเพิ่มจำนวนยอด พบว่า สูตรอาหาร MS เติมน้ำตาลความเข้มข้น 3% เกิดจำนวนยอดมากที่สุด อยู่ที่ 2.6 ยอดต่อต้นพืช การให้คะแนนสีใบของต้นพืช พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 6% ให้คะแนนสีใบมากที่สุด ถึง 31.0 คะแนน นอกจากนี้พบว่า สูตรอาหาร MS มีคะแนนสีใบโดยรวมดีกว่าสูตรอาหาร ½ MS และสูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีคะแนนสีใบลดน้อยลง

ตามลำดับ ส่วนการเก็บผลการเกิดรากและความยาวของราก พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่สูตรอาหาร ½ MS เกิดความยาวรากมากกว่าสูตรอาหาร MS และสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 9% มีการเกิดรากสั้นที่สุดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ ส่วนการเกิดจำนวนราก พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 6% เกิดจำนวนรากมากที่สุดถึง 3.62 รากต่อต้นพืช ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohamed and Alsadon (2010) ได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นมันฝรั่ง โดยทดสอบระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 10, 20 และ 30 g/l พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 g/l ให้ความสูงของต้นและน้ำหนักสดมากที่สุด แต่สูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 g/l ให้จำนวนปล้องและน้ำหนักแห้งมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเติมน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นทำให้ความสูงยอดและน้ำหนักสดเพิ่มมากขึ้น แต่การเติมน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นทำให้น้ำหนักแห้งน้อยลง ซึ่งการทดลองนี้ได้มีการวัดค่าคลอโรฟิลล์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 g/l ให้ค่าคลอโรฟิลล์สูงที่สุด (24 mg/g) (Mohamed and Alsadon, 2010) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Rahman et al. (2010) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของมันฝรั่งโดยทดสอบชนิดของน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ที่ความเข้มข้น 3% พบว่า น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งความสูงของต้นพืช จำนวน ความยาวของปล้อง จำนวนใบ และน้ำหนักสด แต่น้ำตาลมอลโตสให้ความสูงมากที่สุด ถึง 7.23 เซนติเมตร จำนวนยอดมากที่สุด (4.90 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) ความยอวของปล้องมากสุด อยู่ที่ 1.76 เซนติเมตร จำนวนใบมากสุด (6.15 ใบต่อชิ้นส่วนพืช) และน้ำหนักสดมากที่สุด ถึง 98.80 mg (Rahman, et al. 2010) ต่อมาได้มีงานวิจัยของ Hassankhah et al. (2014) ได้ศึกษาการควบคุมสภาวะและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญเติบโต โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นวอลนัท ซึ่งศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส คือ 0, 15, 30 และ 45 g/l พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 g/l ให้ความสูงยอดมากที่สุด ถึง 5.92 เซนติเมตร น้ำหนักสดมากที่สุด (1.26 g) เปอร์เซ็นต์การเกิดรากอยู่ที่ 56.2% และเกิดจำนวนรากมากถึง 3.4 รากต่อชิ้นส่วนพืช (Hassankhah, et al. 2014) ดังนั้น น้ำตาลซูโครส 3% เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เนื่องจากต้นพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการสังเคราะห์แสงเพียงเล็กน้อย จึงจำเป็นต้องเติมน้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้แก่ต้นพืช แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นมากขึ้นอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทั้งด้านความสูง จำนวนยอด สีของใบ และการเกิดราก รวมถึงความแข็งแรงของต้นพืชเมื่อทำการย้ายปลูกและอนุบาล สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thilakarathne et al. (2019) ที่ได้ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA ที่ความเข้มข้น

0, 1 และ 2 mg/l ร่วมกับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 3, 4 และ 5% เพื่อชักนำการเกิดรากของหญ้าหวาน พบว่า สูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3, 4 และ 5 mg/l ไม่มีการเกิดจำนวนรากและและความยาวราก สูตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการชักนำราก คือ สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม IBA 2 ความเข้มข้น mg/l ร่วมกับน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5% ให้จำนวนรากมากถึง 7.20 ราก และความยาวรากยาวถึง 1.07 เซนติเมตร รองลงมาคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5% ให้จำนวนราก 3.80 ราก และความยาวราก 0.60 เซนติเมตร และการเติมน้ำตาลที่ความเข้มข้น 5% ให้เปอร์เซ็นต์การรอดของต้นหญ้าหวานมากที่สุด ถึง 100% (Thilakarathne, et al. 2019) ก่อนหน้าได้มีการศึกษางานวิจัยของ Nayak and Naik (2006) ได้วิจัยการชักนำเหง้าของขมิ้นชัน โดยศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ความเข้มข้น 4.4, 13.3 และ 22.2 mM ร่วมกับน้ำตาลซูโครสตวามเข้มข้น 30, 60 และ 90 g/l และมีการให้แสง 0, 4, 8 และ 16 ชั่วโมง พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 13.3 mM ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 60 g/l และให้แสงที่ 4 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเหง้า 80% และมีจำนวนเหง้ามากที่สุด (16.0 ชิ้นส่วน) และมีตาข้างมากที่สุด ถึง 2.7 ตาข้างต่อเหง้า (Nayak and Naik, 2006)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัส พบว่า สูตรอาหารทุกกรรมวิธีสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ แต่ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารมีการเกิดแคลลัสมากกว่าชิ้นส่วนปล้อง เนื่องจากใบมีเนื้อเยื่อเจริญรอบแผ่นใบ ส่วนปล้องจะมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่บริเวณท่อลำเลี้ยง จึงอาจทำให้แคลลัสจากชิ้นส่วนใบจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าชิ้นส่วนปล้อง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Janarthanam et al. (2009) พบว่า ชิ้นส่วนใบของหญ้าหวานสามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ชิ้นส่วนปล้อง นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 11.31 µM ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.22 µM ทำให้ได้แคลลัสมากที่สุด (Janarthanam, et al. 2009) ซึ่งการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานในประเทศไทยได้มีการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพิ่มจำนวนการเกิดยอดและการเกิดแคลลัส โดยมีงานวิจัยของทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์ และคณะ (2558) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน โดยใช้ชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีการใช้ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1,

0.3 และ 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 mg/l ต่อการชักนำการเกิดยอดและแคลลัส พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 mg/l ทำให้ได้แคลลัสที่มีขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุด (ทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์, และคณะ 2558) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้ ที่การเติม TDZ สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องได้ดี โดยแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนปล้องมีการเจริญเติบโตได้ดี รวมทั้งได้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุดในสูตรอาหาร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากแคลลัส พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/l ไม่สามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสได้ แต่มีงานวิจัยของ Filho et al. ในปี 1993 ได้ชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสของชิ้นส่วนใบหญ้าหวาน โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ร่วมกับ 2,4-D พบว่า การเติม BAP ความเข้มข้น 1 mM ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 10 และ 25 mM มีการเกิดของโซมาติก (JCB Filho and Vieira, 1993) ต่อมาในปี 1997 Filho et al. ได้ศึกษาการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากชิ้นส่วนดอกของหญ้าหวาน โดยสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Kinetin ความเข้มข้น 0, 0.46, 2.32, 4.65 และ 9.29 µM ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52, 9.05 และ 18.10 µM พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.10 µM ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 2.32 µM มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสสูงถึง 42% รองลงมาคือ สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.05 µM เพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซนต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส 40% นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.05 µM ร่วมกับ Kinetin ที่ความเข้มข้นมากขึ้นตามลำดับ ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสต่ำลงตามลำดับ (Bespalhok-Filho and Hattori, 1997) จากนั้นจากการทดลองของ Malabadi et al. ในปี 2011 ได้ศึกษาการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสของมะละกอ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ Coorg Honey dew, Washing-ton, Honey dew, Pusa delicious, Pusa nanha, Taiwan 786 และ Taiwan 785 โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.45, 2.27,

4.54, 9.08 และ 11.35 µM ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 µM พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 2.27 µM ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 µM มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกมากที่สุดกับทุกสายพันธุ์ และพันธุ์ที่เกิดโซมาติกมาที่สุด คือ พันธุ์ Taiwan 786 (87.0%) รองลงมาคือ พันธุ์ Taiwan 785 (85.0%) และ Coorg Honey dew (81.0%) (Malabadi, et al. 2011) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากพืชอื่นๆ เช่น งานวิจัยของ Kumar and Thomas (2012) ได้ชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากต้นอัญชัน พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอ 61% และมีค่าเฉลี่ยการเกิดเอ็มบริโอประมาณ 22 เอ็มบริโอต่อแคลลัส (Krishna and Thomas 2012) และการทดลองของ กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล ปี 2559 ได้ศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอและยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของแววมยุรา โดยใช้สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.50, 1.00 และ 3.00 mg/l พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม NAA ความเข้มข้นต่ำร่วมกับ BAP ความเข้มข้นสูง จะชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส เช่น สูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 mg/l เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 100% และเกิดจำนวนเอ็มบริโอมากถึง 44.7 และ 59.2 ตามลำดับ นอกจากนี้การเติม BAP เพียงอย่างเดียว เกิดยอดได้มากถึง 100% โดย BAP ความเข้มข้น 5.0 mg/l มีจำนวนการเกิดยอดมากที่สุด ถึง 55.5 ยอด รองลงมาคือ BAP ความเข้มข้น 3.0 mg/l มีจำนวนยอดมากถึง 45.8 ยอด และสุดท้ายคือ BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l เกิดยอด 25.4 ยอด แต่การเติม NAA ความเข้มข้น 0.50 mg/l เพียงอย่างเดียว และร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l เกิดแคลลัส 100% และการเติม NAA ความเข้มข้น 1.00 และ 3.00 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0, 3.0 และ 5.0 mg/l เกิดแคลลัส 100% (กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล, 2559) เช่นเดียวกัน และในปี 2018 ได้มีการศึกษางานวิจัยของ Keshvari et al. (2018) ได้มีการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากหญ้าหวานบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสมากที่สุดถึง 63% (Keshvari, et al. 2018)

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกันต่อการผลิตเมล็ดเทียม

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการผลิตเมล็ดเทียม พบว่า สูตรอาหาร ½ MS และสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ IBA ความเข้มข้น 1 mg/l พบว่า ทุกกรรมวิธีสามารถทำให้ได้เมล็ดเทียมที่สมบูรณ์ นอกจากนี้การใช้สารโซเดียมแอลจิแนตปริมาณ 0.8 กรัมต่ออาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร ร่วมกับการเติมสารแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณ 0.7 กรัมต่ออาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร สามารถผลิตเมล็ดเทียมให้มีลักษณะแข็งตัวของเมล็ดได้ดี และในส่วนของการเก็บรักษาเมล็ดเทียม พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดเทียม คือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควรเก็บเมล็ดเทียมไว้ที่ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิต่ำ สามารถรักษาสภาพเมล็ดเทียมไว้ได้ อาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่ต่ำสามารถทำให้ต้นพืชชะงักการเจริญเติบโต ส่วนการที่เมล็ดเทียมที่เก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรืออุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เมล็ดเทียมมีการเจริญเติบโต โดยมียอดและรากเกิดขึ้น อาจเป็นเพราะต้นพืชได้รับอาหารสังเคราะห์ นอกจากนี้ในห้องเพาะเลี้ยงยังมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบของต้นพืช ทั้งแสงและอุณหภูมิ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Islam and Bari (2012) ที่ได้ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมของต้น *Mentha arvensis* L. 2 ชิ้นส่วน คือ ยอดและข้อ โดยใช้สูตรอาหาร ½ MS + Sucrose 6.0 gm และมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP และ Kin ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ IAA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mg/l นอกจากนี้ยังมีการเติมสารโซเดียมแอลจิเนต 0.8 gm ต่ออาหาร 20 ml ร่วมกับ แคลเซียมคลอไรด์ 0.7 gm ต่ออาหาร 50 ml จากการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนยอดเติบโตได้ดีในสูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/l ให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตมากที่สุด (65%) ส่วนชิ้นส่วนข้อเจริญเติบโตได้ดีบนสูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/l ให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตมากที่สุด (80%) นอกจากนี้ยังมาการทดลองการเก็บรักษเมล็ดเทียม โดยเก็บรักษาไว้ให้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 20±2, 4±1 และ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 90 วัน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทั้ง 2 ชิ้นส่วน ในอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การรอดมากที่สุด ถึง 80% ส่วนใน

อุณหภูมิ 20±2 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนข้อมีเปอร์เซ็นต์การรอดอยู่ที่ 60% และชิ้นส่วนยอดมีเปอร์เซ็นต์การรอดอยู่ที่ 52% ส่วนในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พบว่า ชิ้นส่วนพืชทั้ง 2 ชิ้นส่วน ตาย ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อเก็บรักษาถึง 30 วัน และชิ้นส่วนพืชเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยชิ้นส่วนยอดในอุณหภูมิ 20±2 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การรอดเป็น 0 หรือตาย แต่ชิ้นส่วนข้อ มีเปอร์เซ็นต์การรอดอยู่ที่ 20% ซึ่งเปอร์เซ็นต์การรอดเป็น 0 เมื่อเพาะเลี้ยงถึง 45 วัน ส่วนในอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน ทั้ง 2 ชิ้นส่วน มีเปอร์เซ็นต์การอยู่ที่ประมาณ 60% และเมื่อถึง 90 วัน เปอร์เซ็นต์การรอด คือ 0% (Islam and Bari, 2012) ในปีเดียวกันงานวิจัยของ Ali et al. (2012) ได้ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมด้วยชิ้นส่วนยอดและข้อของหญ้าหวาน โดยศึกษาสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารที่ทำให้เกิดเมล็ดเทียม คือ โซเดียมแอลจิเนต ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4% ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 mM พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 3% ร่วมกับแคลเซียลคลอไรด์ 100 mM ให้ลักษณะรูปทรงของเมล็ดเทียมสมบูรณ์ที่สุด จากนั้นเมื่อได้สูตรอาหารที่ดีที่สุดแล้ว จึงนำเมล็ดเทียมที่ได้มาทดลองการแช่หรือการเซตตัวของเมล็ด โดยใช้เวลาแช่ที่แตกต่างกัน คือ 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที พบว่าการใช้สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมโซเดียมแอลจิเนต ความเข้มข้น 3% ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ 100 mM แช่เมล็ดไว้เป็นเวลา 15 นาที เกิดเมล็ดเทียมที่มีลักษณะแข็งตัวดีที่สุด หลังจากนั้นนำเมล็ดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและความเข้มข้นของวุ้นที่แตกต่างกัน พบว่า สูตรอาหารที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด ถึง 100% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Ali, et al. 2012) และงานวิจัยของ Kumar and Thomas (2012) ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมของต้นอัญชัน โดยสูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/l และน้ำตาลซูโครส 3% โดยเติมความเข้มข้นสารละลายโซเดียมแอลจิเนตที่ 3, 4 และ 5% ร่วมกับแคลเซียสคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 75 และ 100 mM พบว่า สารละลายโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 4% ร่วมกับการแช่แคลเซียสคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 mM มีลักษณะของเมล็ดเทียมที่แข็งตัวดีที่สุด และได้ทดสอบการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า การเก็บรักษาเมล็ดเทียมในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียม เมล็ดเทียมที่ได้มีอัตราการรอดมากกว่าการเก็บรักษาในห้องอุณหภูมิปกติ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเจริญเติบโตของเมล็ดเทียมที่ได้ โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการ

เจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 µM เพียงอย่างเดียว และ BAP ความเข้มข้น 2 µM ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ IBA ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 0.7 µM พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 µM มีเปอร์เซ็นต์การเกิด 92% และมีความสูงของต้นสูงที่สุด (2.1 เซนติเมตร) (Krishna and Thomas, 2012) ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมเหมือนกัน คือ งานวิจัยของ Andlib et al. (2011) ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมของหญ้าหวาน โดยใช้สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA ความเข้มข้น 1.0 mg/l ซึ่งศึกษาระดับความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนต ได้แก่ 1, 2, 3, 4 และ 5% และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ได้แก่ 1, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% พบว่า โซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 3% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5% เหมาะที่สุดสำหรับการทำเมล็ดเทียม เพาะมีลักษณะและการแข็งตัวของเมล็ดที่ดี นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสูตรอาหารสำหรับการเติมสารโซเดียมแอลจิเนต โดยเติมในสูตรอาหาร MS และน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว ทั้งที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/l IBA ความเข้มข้น 1.0 mg/l พบว่า การเติมโซเดียมแอลจิเนตร่วมกับสูตร MS มีการเจริญเติบโตของเมล็ดเทียมได้ดีกว่าการที่ใช้น้ำกลั่น โดยสูตรอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตดีที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/l ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 mg/l (70.0%) (Andlib, et al. 2011) ต่อมางานวิจัยของ Banu et al. (2014) ได้ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมและการเจริญเติบโตของต้น *Mimosa pudica* L. หรือต้นไมยราบ โดยการผลิตเมล็ดเทียมด้วยสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารละลายโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่ออาหาร 20 ml ร่วมกับการแช่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.7 กรัมต่ออาหาร 50 ml จากนั้นเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.5 mg/l พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.2 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิด 100% ทั้งชิ้นส่วนยอดและข้อ โดยชิ้นส่วนยอดมีจำนวนยอดมากที่สุด ถึง 14.93 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูงมากที่สุด (9.74 เซนติเมตร) ส่วนชิ้นส่วนข้อมีจำนวนยอดมากถึง 14.53 ยอดต่อเมล็ด และความสูงอยู่ที่ 8.33 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังศึกษาการเก็บรักษาโดยอุณหภูมิที่เก็บรักษา คือ 0 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่า การเก็บรักษาในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีอัตราการ

รอดเป็น 0 เมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอด 100% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน (Banu, et al. 2014) งานวิจัยของ กิตติศักดิ์ โซติกเดชาณรงค์ (2562) ได้ทำการผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน โดยศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสและอุณหภูมิในการเก็บเมล็ดเทียมต่อการเจริญเติบโตของยอดหญ้าหวาน โดยนำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานมาแช่ในสารละลายโซเดียมแอลจิเนต ความเข้มข้น 2% ในสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4% และดูดชิ้นส่วนพืชมาหยดใส่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 mM โดยแช่ชิ้นส่วนพืชไว้เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำไปเก็บรักษาเมล็ดไว้ในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 2% มีอัตราการงอกมากที่สุด ถึง 93.33% แต่สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% มีอัตราการงอกเพียง 91.11% แต่ให้จำนวนยอดมากที่สุด ถึง 2.36 ยอดต่อเมล็ด จำนวนใบมากที่สุด (8.76 ใบต่อยอด) และให้ความสูงมากที่สุดถึง 12.14 มิลลิเมตร หลังจากนั้นทำการทดลองสูตรอาหารที่ดีมาผลิตเมล็ดเทียมเพื่อศึกษาการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 0, 4, 10 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำเมล็ดเทียมไปทดสอบการงอก โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS พบว่าเมล็ดเทียมที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีอัตราการงอกสูงที่สุด (80%) มีจำนวนยอด 2.03 ยอดต่อเมล็ด จำนวนใบ 6.46 ใบต่อยอด และความสูงอยู่ที่ 7.25 มิลลิเมตร (กิตติศักดิ์ โซติกเดชาณรงค์, 2562) ส่วนงานวิจัยของ Fonseka et al. (2019) ทำการศึกษาการทำเมล็ดเทียมของต้น *Celastrus paniculatus* Willd หรือต้นกระทงลาย โดยศึกษาสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมโซเดียมแอลจิเนต ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5% ร่วมกับการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 100 mmol/L พบว่า สูตร ½ MS ที่เติมโซเดียมแอลจิเนต ความเข้มข้น 4 % ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 mmol/L เกิดลักษณะของเมล็ดเทียมที่สมบูรณ์ที่สุด หลังจากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 5, 15 และ 25±1 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราการรอดของเมล็ดเทียมที่ดีที่สุด คือ อุณหภูมิที่ 5±1 องศาเซลเซียส และอัตราการรอดลดต่ำลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังศึกษาการงอกของเมล็ดเทียมโดยศึกษาสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 mg/l ร่วมกับกลุ่มออกซินได้แก่ NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 mg/l พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/l ร่วมกับ

NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีเปอร์เซ็นต์การงอก 94.43% และมีจำนวนยอดมากที่สุด ถึง 2.38 ยอด (Fonseka, et al. 2019)

สรุปผล

อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 2 mg/L และ kin ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l รวมทั้งอาหารสังเคราะห์ WPM ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เหมาะสำหรับการเพิ่มจำนวนต้นของหญ้าหวาน โดยสูตรอาหาร ½ MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 3% เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองนี้ทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และการใช้ชิ้นส่วนใบให้แคลลัสมากที่สุด โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมากที่สุด

การทำเมล็ดเทียม สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเมล็ดเทียม คือ สูตรอาหาร ½ MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของน้ำตาล 1.5% ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l โดยใช้โซเดียมแอลจิเนตปริมาณ 0.8 กรัมต่ออาหาร 20 มิลลิลิตร ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ 0.7 กรัมต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร ในขณะที่การเก็บรักษาเมล็ดเทียมควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งจะเป็นสภาพการเก็บรักษาที่ดีที่สุด

นอกจากนี้การเพาะปลูกต้นหญ้าหวานโดยใช้ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นกล้าที่ได้จากการปักชำมีการเจริญเติบโตของต้นพืชไม่แตกกันกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มจำนวนต้นหญ้าหวานด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ต้นกล้าได้ในปริมาณที่มากในระยะเวลาที่รวดเร็ว

บรรณานุกรม

Ab Rahman, Z., Ali, M. S. M., Ghazalli, M. N., Awang, K., & Othman, A. N. (2018). Optimization of culture media formulations for micropropagation of Lepisanthes fruticosa. **Biosciences Biotechnology Research Asia** 11(1): 51–58.

Ali, A., Gull, I., Majid, A., Saleem, A., Naz, S., & Naveed, N. H. (2012). In vitro conservation and production of vigorous and desiccate tolerant synthetic seeds in *Stevia rebaudiana*. **Journal of Medicinal Plants Research** 6(7): 1327–1333.

Andlib, A., Verma, R. N., and Batra, A. (2011). Synthetic seeds an alternative source for quick regeneration of a zero calorie herb–*Stevia rebaudiana* Bertoni. **J Pharm Res** 4(7): 2007–2009.

Arpita, D., Saikat, G.,and Nirmal, M. (2011). Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. **International Journal of Agricultural Research** 6(1): 40–48.

Asthana, P., Rai, M. K., and Jaiswal, U. (2017). Somatic embryogenesis from sepal explants in Sapindus trifoliatus, a plant valuable in herbal soap industry. **Industrial Crops and Products** 100: 228–235.

Banu, L. A., Rashid, M. H. O., and Miah, M. B. (2014). Development of artificial seed and preservation in Mimosa pudica L., an important medicinal plant in Bangladesh. **Journal of Bio–Science.** 22: 89–99.

Bespalhok–Filho, J. C. and K. Hattori (1997). Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 9(3): 185–188.

Cangahuala–Inocente, G. C., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D., Torres, A. C., & Guerra, M. P. (2007). Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (Acca sellowiana (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae** 111(3): 228–234.

Epstein, E. (1972). **Mineral Nutrition of Plants: Principals and perspectives.** Jonh wiley and sons Inc., London.

Fonseka, D., L. C. K., Wickramaarachchi, W. W. U. I., & Madushani, R. P. S. (2019). Synthetic seed production as a tool for the conservation and domestication of Celastrus paniculatus: a rare medicinal plant. **Annual Research & Review in Biology** 1–8.

Gantait, S., Das, A., and Mandal, N. (2015). Stevia: a comprehensive review on ethnopharmacological properties and in vitro regeneration. **Sugar Tech** 17: 95–106.

George, E. F., Hall, M. A., and Klerk, G. J. D. (2008). Micro propagation: use and method, In:George E. F., Hall M. A., De klerk G. J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. Springer, New York**: PP.29–113.

Hassankhah, A., Vahdati, K., Lotfi, M., Mirmasoumi, M., Preece, J., and Assareh, M. H. (2014). Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated Persian walnut plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**. 1(2): 111–120.

Islam, M. and M. J. J. o. B.–S. Bari (2012). *In vitro* regeneration protocol for artificial seed production in an important medicinal plant Mentha arvensis L. **Journal of Bio–Science**. 20: 99–108.

Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., Sai, G. L., and Sekar, T. (2009). Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Tissue Culture and Biotechnology** 19(2): 133–141.

JCB Filho, H. J. and L. J. B. J. P. P. Vieira (1993). Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana.* **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 5: 51–53.

Jun–jie, Z., Yue–sheng, Y., Meng–fei, L., Shu–qi, L., Yi, T., Han–bin, C., and Xiao–yang, C. (2017). An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (Moringa oleifera Lam.). **Industrial Crops and Products** 103: 59–63.

Keshvari, T., Najaphy, A., Kahrizi, D., and Zebarjadi, A. (2018). Callus induction and somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni as a medicinal plant. **Cellular and Molecular Biology** 64(2): 46–49.

Khalil, S. A., Zamir, R., and Ahmad, N. (2014). Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Saudi Journal of Biological Sciences** 21(6): 566–573.

Krishna Kumar, G. and T. D. Thomas (2012). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in Clitoria ternatea Linn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)** 110(1): 141–151.

Lü, J., Chen, R., Zhang, M., da Silva, J. A. T., and Ma, G. (2013). Plant regeneration via somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature cotyledons of Camellia nitidissima Chi. **Journal of plant physiology** 170(13): 1202–1211.

Malabadi, R. B., Kumar, S. V., Mulgund, G. S., and Nataraja, K. (2011). Induction of somatic embryogenesis in papaya (Carica papaya). **Research in Biotechnology** 2(5): 40–55.

Mohamed, M.–H. and A. J. S. H. Alsadon (2010). "Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets." **Scientia Horticulturae** 123(3): 295–300.

Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum** 15(3): 473–497.

Nayak, S. and P. K. J. S. A. Naik (2006). Factors effecting in vitro microrhizome formation and growth in Curcuma longa L. and improved field performance of micropropagated plants. **Science Asia** 32(1): 31–37.

Ouyang, Y., Chen, Y., Lü, J., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, X., and Ma, G.. (2016). Somatic embryogenesis and enhanced shoot organogenesis in Metabriggsia ovalifolia WT Wang. **Scientific Reports** 6(1): 1–9.

Pande, S. and P. Gupta (2013). Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy** 5(1): 26–33.

Rahman, M., Islam, R., Hossain, M., and Islam, M. S. (2010). Role of sucrose, glucose and maltose on conventional potato micropropagation. **Journal of Agricultural Technology** 6(4): 733–739.

Razak, U. N. A. A., Ong, C. B., Yu, T. S., and Lau, L. K. (2014). *In vitro* micropropagation of

Stevia rebaudiana Bertoni in Malaysia. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 57: 23–28.

Sharuti, V., Kuldeep, Y., and Narender, S. (2011). Optimization of the protocols for surface sterilization, regeneration and acclimatization of Stevia rebaudiana Bertoni. **Journal of Agricultural & Environmental Sciences** 11(2): 221–227.

Singh, S. and G. J. S. t. Rao (2005). Stevia: The herbal sugar of 21st century. **Sugar tech 7**(1): 17–24.

Sridhar, T. M. and C. R. Aswath (2014). Influence of additives on enhanced in vitro shoot multiplication of *Stevia rebaudiana* (Bert.)—An important anti diabetic medicinal plant. **American Journal of Plant Sciences** 2014.

Thilakarathne, P. L., Peiris, S. E., and Lankika, P. C. (2019). Efficient low cost seesap (CSUP) technique for micropropagation of newly introduced sweetener plant, *Stevia rebaudiana* Bertoni. **African Journal of Biotechnology** 18(25): 540–547.

Trigiano, R. N. and D. J. Gray (1999). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**, CRC press.

Verma, S. K., Das, A. K., Cingoz, G. S., Uslu, E., and Gurel, E. (2016). Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. **Biotechnology Reports** 10: 66–74.

Verma, S. K., Yücesan, B. B., Gürel, S., and Gürel, E (2011). Indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis from cotyledonary leaf segments of Digitalis lamarckii Ivan., an endemic medicinal species. **Turkish Journal of Biology** 35(6): 743–750.

Yang, J., Bi, H. P., Fan, W. J., Zhang, M., Wang, H. X., and Zhang, P. (2011). Efficient embryogenic suspension culturing and rapid transformation of a range of elite genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.). **Plant Science** 181(6): 701–711.

Yang, Y.–W., Hsing, Y. I., and Chang, W. C.. (1981). Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. through axillary shoot proliferation in vitro. **Bot. Bull. Acad. Sin** 22: 57–62.

Yesmin, S. (2019). *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Tissue Culture and Biotechnology** 29(2): 277–284.

Yücesan, B., Mohammed, A., Büyükgöçmen, R., Altuğ, C., Kavas, Ö., Gürel, S., and Gürel, E. (2016). *In vitro* and ex vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni with high Rebaudioside–A content—A commercial scale application. **Scientia Horticulturae** 203: 20–28.

กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล (2559). การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอและยอดจากการเพาะเลี้ยงใบโตเต็มที่ของแววมยุรา. **Thai Science and Technology Journal** 942–951.

กิตติศักดิ์ โซติกเดชาณรงค์ (2562). การผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน. **วารสารวิทยาศาสตร์ บูรพา** 23(1): 247–254.

ซูกาเวีย (2561).สืบค้นจาก https://www.sugavia.com/th

ทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์, et al. (2558). การขยายพันธุ์หญ้าหวาน (Stevia rebaudiana Bertoni.) ในสภาพปลอดเชื้อ. **Interdisciplinary Research Review** 10(1): 8–16.

นพเก้า พุทธรักษ์ (2556). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** บริษัทนพบุรีการพิมพ์จำกัด, เชียงใหม่.

พรทิพย์ เทิดบารมี (2557). ผลของ6–เบนซิลอะมิโนพิวรีนและสูตรอาหารที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเม่าดง(Antidesma bunius (L.) Spreng. var. bunius). **KKU Science Journal** 42(1): 191–202.

พิสมัย กุลกาญจนาธร (2555). **บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน.** สืบค้นจาก https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/107/%E0%B8%AB%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%98%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%A1%E0%B8%8A%E0%B8%B2%E0%B8%95%E0%B8%B4–%E0%B9%80%E0%B8%9E%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%AA%E0%B8%B8%E0%B8%82%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%9E/

ไมตรี สุทธจิตต์, อัมพวัน อภิสริยกุล, รวิวรรณ พัวพนาโชค, ศุภนิมิต ซีฆชุณหเถียร, อรัญญา มโนสร้อย, จีรเดช มโนสร้อย, ศิริวรรณ สุทธจิตต์, ด้วง พุธศุกร์ และ อุษณีย์ วินิตเขตคำนวณ,. (2540). **ความปลอดภัยของหญ้าหวาน และผลิตภัณฑ์จากหญ้าหวาน**. สืบค้นจาก http://puechkaset.com/%E0%B8%AB%E0%B8%8D%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B8%AB%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%99/.

ยงยุทธ โอสถสภา (2543). **ธาตุอาหารพืช**. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ (2541). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เริ่มอรุณ รักเผือก (2541). ผลของ ความเข้มข้นของสูตรอาหารระยะเวลาการเติมและไซโตไคนินต่อการพัฒนาของตายอดใหม่การสร้างใบสีม่วงแดงและแคลลัส. **วารสารเกษตร** 14(3): 279-289.

วราภรณ์ ภูตะลุน (2557). **เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ทางเภสัชศาสตร์**. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, กรุงเทพฯ.

อัมพา ว่องวิชชกร, ปรีญญารัตน์ ภูศิริ และ วรนัฐ ศรีพาเพลิน (2546). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับงานขยายพันธุ์พืช**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. สืบค้นจาก https://ebook.lib.ku.ac.th/ebook27/ebook/2011-005-0106/#p=185

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ตารางแสดงสารที่ใช้ในอาหารสังเคราะห์ MS และ WPM

ตาราง 9 ตารางสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารสูตร MS

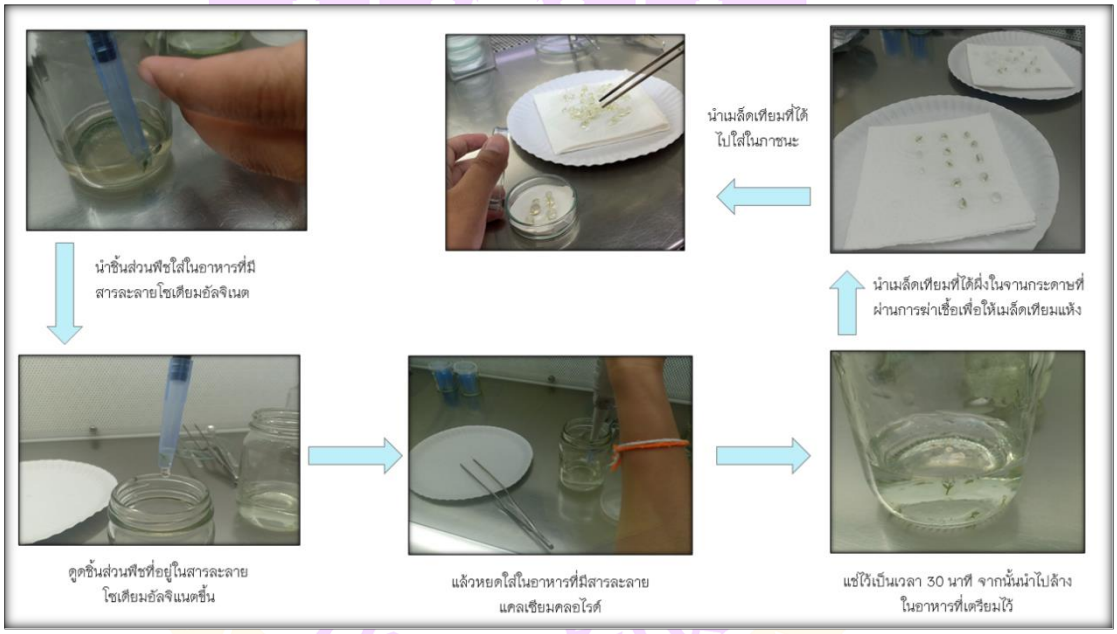
Stock	สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณที่ใช้ในอาหารสูตร MS ต่อ 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
Stock A	NH_4NO_3	82.5 g	20 ml
Stock B	KNO_3	95.0 g	20 ml
Stock C	$CaCl_2.2H_2O$	44.0 g	10 ml
Stock D	KH_2PO_4	17.0 g	10 ml
Stock E	$MgSO_4.7H_2O$	37.0 g	10 ml
Stock F	$MnSO_4.H_2O$ $CuSO_4.5H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$	1.66 g 0.0025 g 0.860 g	10 ml
Stock G	KI $CoCl_2.6H_2O$ H_3BO_3 $Na_2MoO_4.2H_2O$	0.083 g 0.0025 g 0.620 g 0.025 g	10 ml
Stock H	$FeSO_4.7H_2O$ EDTA Na2	2.78 g 3.724 g	10 ml
MS Vitamin	Thiamine HCL Glycine Myo-inositol Nicotinic acid Pyridoxine	0.04 0.2 0.01 0.05 0.05	10
BAP	6-Benzylaminopurine	0.1	ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ต้องการในอาหารสังเคราะห์
TDZ	Thidiazuron	0.1	
Kinetin	Kinetin	0.1	
NAA	1-Naphthaleneacetic acid	0.1	
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	0.1	

ตาราง 10 องค์ประกอบของธาตุอาหารพืชและสารประกอบอินทรีย์ที่มีในสูตรอาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

องค์ประกอบ	Murashige & Skoog	Woody Plant Medium (WPM)
NH_4NO_3	1650 (20.6)	400 (5.0)
$NH_4H_2PO_4$	–	–
NH_4SO_4	–	–
$CaCl_2 \cdot 2H2O$	440 (3.0)	96 (0.7)
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	–	556 (2.4)
$MgSO_4 \cdot 7H2O$	370 (1.5)	370 (1.5)
KCl	–	–
KNO_3	1900 (18.8)	–
K_2SO_4	–	990
KH_2PO_4	170 (1.25)	170 (1.3)
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	–	–
$NaSO_4$	–	–
H_3BO_3	6.2 (100)	6.2 (100)
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025 (0.1)	–
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025 (0.1)	0.25 (1)
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2 (100)	37.2 (100)
$Fe_2(SO_4)_3$	–	–
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8 (100)	27.8 (100)
$MnSO_4 \cdot H_2O$	–	–
$MnSO_4.4H2O$	22.3 (100)	22.3 (100)
KI	0.83 (5)	–
$NaMoO_3$	–	–
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25 (1)	0.25 (1)
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6 (30)	8.6 (30)
Myo-inositol	100 (550)	100 (550)
Glycine	2.0 (26.6)	2.0 (26.6)
Nicotinic acid	0.5 (4.1)	0.5 (4.1)
Pyridoxine HCl	0.5 (2.4)	0.5 (2.4)
Thiamine HCl	0.1 (0.3)	0.1 (0.3)
Biotin	–	–

ภาคผนวก ข ขั้นตอนการผลิตเมล็ดเทียม

ภาพ 24 การตัดชิ้นส่วนยอดและข้อของหญ้าหวาน –



ภาพ 25 ขั้นตอนการทำเมล็ดเทียม

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ณราพรณ์ เปี่ยมสุวรรณวรา
วัน เดือน ปี เกิด	17 สิงหาคม 2538
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2560 วท.บ. (เกษตรศาสตร์), มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	674 ถนนหมู่บ้านเศรษฐกิจ แขวงบางไผ่ เขตบางแค กรุงเทพฯ 10160
ผลงานตีพิมพ์	ณราพรณ์ เปี่ยมสุวรรณวรา และ สุกัลยา ภู่ทอง. (2565). สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่มีผลการเพิ่มจำนวนและการเกิดแคลลัสของหญ้าหวานภายใต้สภาพปลอดเชื้อ. วารสารประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. ครั้งที่ 1. 967-979.