



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การขยายพันธุ์ดาวน้อย (*Pogostemon helferi* Hook f.) ในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Propagation of Little Star *Pogostemon helferi* Hook f.

นามผู้วิจัย นางสาวทิพวรรณ มหาวรรณ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ชัชรี แก้วสุรลิขิต, M.S.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์กาญจนรี พงษ์ฉวี, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อนงค์ จีระภัทร์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การขยายพันธุ์ดาวน้อย (*Pogostemon helferi* Hook f.) ในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Propagation of Little Star *Pogostemon helferi* Hook f.

โดย

นางสาวทิพวรรณ มหาวรรณ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทิพวรรณ มหาวรรณ 2556: การขยายพันธุ์คาวน้อย (*Pogostemon helferi* Hook f.) ในสภาพ
ปลอดเชื้อ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์
ชัชวีร์ แก้วสุรลิขิต, วท.ม. 59 หน้า

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนคาวน้อย *Pogostemon helferi* Hook f. ได้แก่ ตายอด ตาข้าง และใบ
ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่มีอัตราความเข้มข้นต่างกัน แล้วเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 4
สัปดาห์ จากนั้นนำไปทดลองเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
ได้แก่ BA ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 0 และ
0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสของคาว
น้อยไปชักนำให้เจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อน โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆกัน 4 สูตร
ได้แก่ MS, ½ MS, MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ½ MS + BA 2
มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อคาวน้อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์คือ ตายอด
สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีผลในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของชิ้นส่วนคาวน้อยอย่างมี
นัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์
6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน
10 นาที ต้นอ่อนมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 88.89 เปอร์เซ็นต์ และมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์เพียง
10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้ BA เพียง
อย่างเดียวระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนคาวน้อยเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด
ซึ่งมีอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอด 85 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดของแคลลัสเฉลี่ย
มากที่สุด 10.67 ± 2.54 มิลลิเมตร ภายใน 6 สัปดาห์ เมื่อนำแคลลัสไปชักนำให้เจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อน
พบว่าอาหารสูตร ½ MS ทำให้แคลลัสมีอัตราการเกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยอด $15.25 \pm$
 3.83 ยอดต่อต้น จำนวนใบ 3.13 ± 0.82 ใบต่อยอด จำนวนราก 26.00 ± 6.72 รากต่อต้น และความสูงต้น
 1.57 ± 0.43 เซนติเมตร ภายใน 6 สัปดาห์

Tippawan Mahawan 2013: *In Vitro* Propagation of Little Star *Pogostemon helferi* Hook f. Master of Science (Fishery Science), Major Field: Fishery Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chatcharee Kacwsuralikhit, M.S. 59 pages.

Shoot buds , axillary buds and young leaves of Little Star *Pogostemon helferi* Hook f. were surface sterilized using various concentration of NaOCl. The cleaned explants were cultured for 4 weeks on semi-solid MS medium. Then shoots were cultured for 6 weeks on semi-solid MS medium supplemented with 6-Benzyladenine (BA) at 0, 1 and 2 mg/l combination with α -Naphthalene acetic acid (NAA) at 0 and 0.25 mg/l to induced callus. The callus were cultured for 6 weeks on 4 different concentrations of MS medium which were MS, $\frac{1}{2}$ MS , MS + 2 mg/l BA + 0.25 mg/l NAA and $\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BA + 0.25 mg/l NAA to induced plantlets.

The appropriate part of Little Star for surface sterilization in NaOCl was the shoot buds. The shoot buds which were surface sterilized with 15 minutes of 6% NaOCl followed by 10 minutes of 3% NaOCl shown 10% contamination and 88.89 % regenerated rate. The appropriate media for induced callus was semi-solid MS medium supplemented with 1 mg/l BA. The media induced 100% of callus regenerated rate, 85% survival rate. The callus which were cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium shown 100% shoot regenerated rate. The average size of callus was 10.67 ± 2.54 mm within 6 weeks. One hundred percent of callus can regenerate to plantlets in $\frac{1}{2}$ MS medium. The number of shoots, leaves and roots developed from pieces of callus were 15.25 ± 3.83 shoots/piece, 3.13 ± 0.82 leaves/piece, 26.00 ± 6.72 roots/piece, respectively and the plantlets height was 1.57 ± 0.43 cm within 6 weeks.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาในการให้คำแนะนำและให้คำปรึกษา ตลอดจนการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ชัชรี แก้วสุริยจิต ประธานกรรมการที่ปรึกษา ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กาญจนรี พงษ์ฉวี กรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และคอยให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์จนสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้คำแนะนำ และความกรุณาตลอดมา

ขอขอบพระคุณ คุณสุจินต์ หนูขวัญ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ ที่ให้ความสนับสนุนในการเรียน ตลอดจนข้าราชการและเจ้าหน้าที่ทุกท่านในกลุ่มงานวิจัยพรรณไม้น้ำ กรมประมง ที่เป็นกำลังใจและได้ให้ความช่วยเหลือทางด้านต่างๆ ตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษาชี้แนะ ตลอดจนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

ทิพวรรณ มหาวรรณ
มีนาคม 2556

สารบัญ

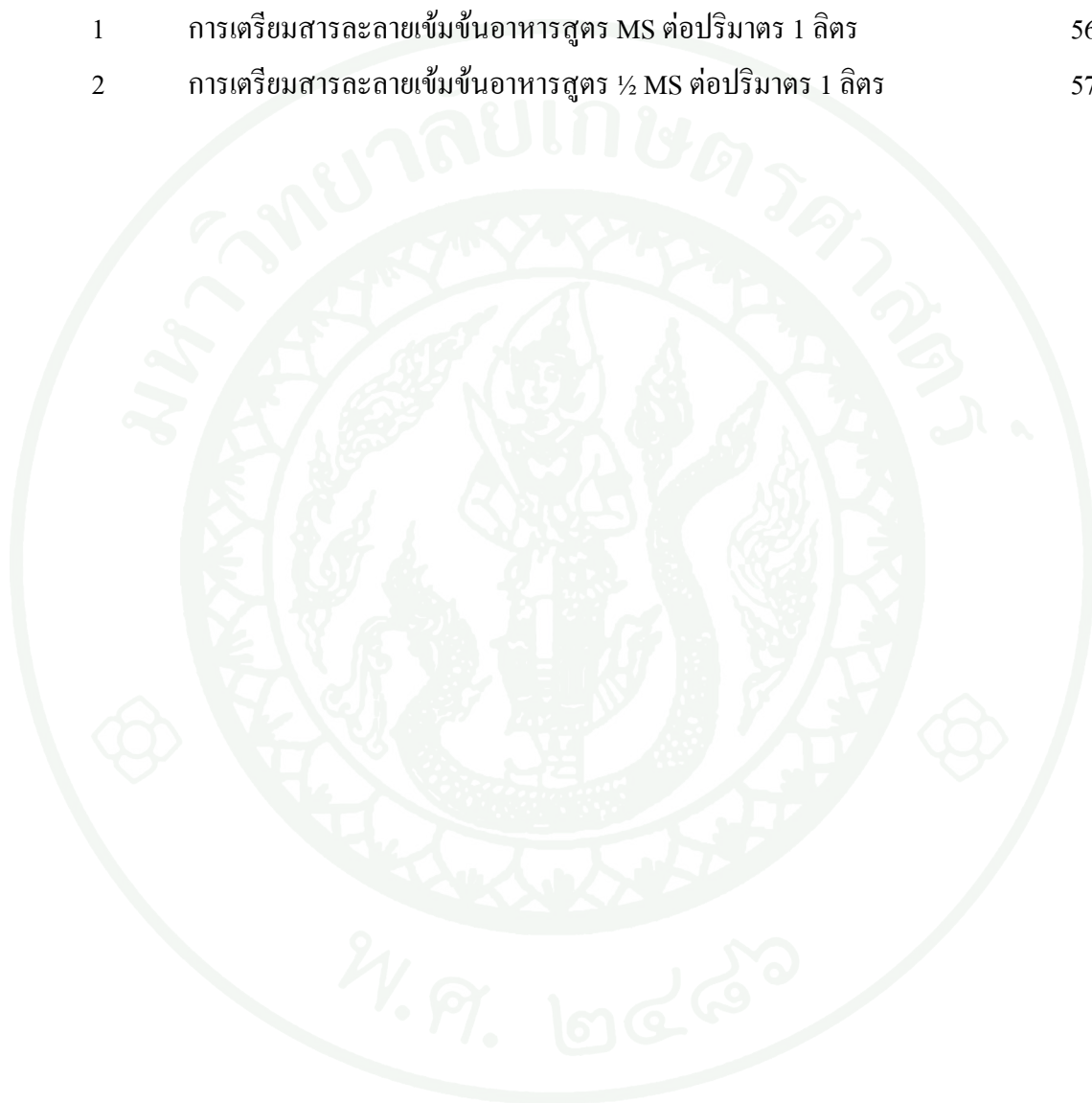
	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	12
อุปกรณ์	12
วิธีการ	13
ผลและวิจารณ์	20
สรุปและข้อเสนอแนะ	48
สรุป	48
ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	55
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	59

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตายอดโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์อัตราความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	22
2	ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์อัตราความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	24
3	ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์อัตราความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	27
4	อัตราการเกิดแคลลัส อัตราการเจริญพัฒนา อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์) และขนาดของแคลลัสดาวน้อย (ค่าเฉลี่ย±SD) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	34
5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสดาวน้อย (ค่าเฉลี่ย±SD) เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	36
6	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสดาวน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละช่วงสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	37
7	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และจำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความสูงต้นดาวน้อย (ค่าเฉลี่ย±SD) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	41
8	จำนวนยอด (ค่าเฉลี่ย±SD) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, และ 6	44
9	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสดาวน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4 และ 6	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	การเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร	56
2	การเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร ½ MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร	57



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นคาวน้อย <i>Pogostemon helferi</i> Hook f.	4
2	ต้นพันธุ์คาวน้อย (ต้นเหนื่อน้ำ) ที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบด้วย ตายอด ตาข้าง และใบอ่อน นำมาล้างน้ำไหลผ่านให้สะอาด	13
3	ลักษณะของตายอดที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ	14
4	ลักษณะของตาข้างที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ	14
5	ลักษณะใบอ่อนที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ นำมาตัดแต่งและล้างน้ำไหลผ่านให้สะอาด	15
6	ชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง	21
7	ชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	22
8	ชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง	25
9	ชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	25

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง	27
11	ชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่มีการเจริญพัฒนาเกิดขึ้นใหม่ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	28
12	การเกิดแคลลัสในอาหาร 6 สูตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	32
13	ขนาดของแคลลัสวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	35
14	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสคาวน้อย (ค่าเฉลี่ย) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	37
15	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสคาวน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละช่วงสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	38
16	การเกิดแคลลัสในอาหาร 4 สูตร ในช่วงสัปดาห์ที่แต่ละสูตรอาหารมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสสูงที่สุด	39
17	ต้นอ่อนของคาวน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	42
18	ต้นอ่อนของคาวน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ต้นอ่อนของคาวน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร สูตร MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยง เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	43
20	ต้นอ่อนของคาวน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร สูตร $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยง เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	43
21	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนยอดคาวน้อย (ค่าเฉลี่ย) ที่เลี้ยงในอาหาร สังเคราะห์สูตร MS และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, และ 6	45
22	อัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะของคาวน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ สูตร MS และ $\frac{1}{2}$ MS salt ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4 และ 6	46
23	ต้นพันธุ์คาวน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาปลูกเลี้ยงในระบบไร้ ดิน เลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน ในโรงเรือนระบบปิด	47
ภาพผนวกที่		
1	ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS ปริมาตร 1 ลิตร	58

การขยายพันธุ์ดาวน้อย (*Pogostemon helferi* Hook f.) ในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Propagation of Little Star *Pogostemon helferi* Hook f.

คำนำ

ดาวน้อย (Little Star) *Pogostemon helferi* Hook f. เป็นพรรณไม้น้ำสวยงามพื้นเมืองของไทยซึ่งมีการนำมาประดับตกแต่งตู้ปลาหรือจัดสวนพรรณไม้น้ำ เป็นพรรณไม้น้ำเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมมากทั้งตลาดต่างประเทศและในประเทศ เนื่องจากมีลักษณะแปลกใหม่ และสวยงามจัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae มีใบที่เจริญใต้น้ำหยักเป็นคลื่นสีเขียวสด แตกกอกจากลำต้นเป็นกอ มีความสูง 2-10 เซนติเมตร กว้าง 5-10 เซนติเมตร ปัจจุบันประเทศไทยมีปัญหาในการผลิตต้นดาวน้อยเพื่อรองรับความต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ เนื่องจากขาดแคลนต้นพันธุ์และผลผลิตส่วนใหญ่ได้จากการเก็บรวบรวมจากธรรมชาติ นอกจากนี้ยังขาดข้อมูลสำหรับการพัฒนาการผลิตอย่างครบวงจรเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพมาตรฐานส่งออก ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการขยายการส่งออกพรรณไม้น้ำชนิดนี้ ทั้งที่ตลาดมีความต้องการและมีราคาสูง

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาใช้ในการขยายพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมาก ในเวลาอันรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจัดเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศโดยใช้ชิ้นส่วนของพืชขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่างๆ ได้แก่ ยอด ใบ ราก ดอก ผล อับละอองเกสร หัว เซลล์เพียงเซลล์เดียวจากใบหรือละอองเกสร และเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ นำมาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิและแสง ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตเกิดเป็นต้นใหม่ได้มากมาย ต้นพันธุ์ที่ได้มีคุณภาพสูง แข็งแรง ช่วยลดปัญหาเรื่องโรคและศัตรูพืช ปัจจุบันต้นดาวน้อยเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ โดยประเทศไทยมีการส่งออกไปขายหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น เกาหลี เยอรมัน เป็นต้น แต่เนื่องจากต้นดาวน้อย เป็นพรรณไม้น้ำเฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทยเท่านั้น การรวบรวมต้นพันธุ์จากธรรมชาติมาขยายด้วยวิธีปกติอาจก่อให้เกิดการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาการขยายพันธุ์ต้นดาวน้อยในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้สามารถผลิตต้นพันธุ์ดาวน้อยให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของตลาด ตลอดจนเป็นการเก็บรักษา และรวบรวมพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์พรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการพอกฆ่าเชื้อ และชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำคาวน้อย *Pogostemon helferi* Hook f.
2. เพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ในสภาพปลอดเชื้อ
3. เพื่อศึกษาการชักนำให้แคลลัสของคาวน้อยเจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อน ในสภาพปลอดเชื้อ

การตรวจเอกสาร

พรรณไม้น้ำไทยมีหลายชนิดที่มีความสวยงาม จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการส่งออกและได้รับความนิยมในการนำมาใช้จัดตู้ปลา เช่น หมอม คาวน้อย ไบพายเขาใหญ่ ไล่ปลาไหล ว่านน้ำ รากดำใบยาว บอนแดง และหมอน้ำ เป็นต้น คาวน้อยเป็นพรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทยชนิดหนึ่งที่ได้รับคามนิยมเนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการจัดตู้ปลา คือ ต้นมีขนาดเล็ก ลักษณะใบหยักสวยงาม มีสีเขียวสด โตช้า ดูแลง่าย นิยมนำมาประดับเป็นไม้น้ำตู้ อย่างไรก็ตามต้นพันธุ์ส่วนใหญ่ได้จากการเก็บรวบรวมจากธรรมชาติ จึงมีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์จากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ และเป็นพรรณไม้น้ำเฉพาะถิ่นไม่มีการกระจายพันธุ์ในที่อื่น จึงมีความต้องการทางด้านการตลาดสูง แต่ปริมาณที่ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

ลักษณะทั่วไปของคาวน้อย

คาวน้อย (Little Star) *Pogostemon helferi* Hook f. เป็นพรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทย จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae เป็นพืชมีดอก ใบเลี้ยงคู่ เป็นพืชครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibian plants) สามารถเจริญได้ทั้งในบริเวณที่ชื้นและ หรือใกล้ฝั่ง มีรากยึดดิน ส่วนล่างของต้นอยู่ใต้น้ำ ลำต้นที่อยู่เหนือน้ำมีลักษณะเป็นข้อ ใบรูปหอก อยู่บริเวณรอบข้อ 4 - 5 ใบ ดอกมีขนาดเล็กสีม่วง เป็นดอกรวม มีดอกย่อย ช่อดอกยาวประมาณ 3 - 5 เซนติเมตร ดอกย่อยประกอบด้วยกลีบ 4-5 กลีบ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรเพศผู้ 4 อัน อับเรณูมี 2 ช่อง เกสรเพศเมียมีรังไข่ 2 ช่อง รังไข่แต่ละช่องมีไข่อ่อน 2 ใบ ผลเป็นผลย่อยเปลือกแข็งเมล็ดล่อน (nutlets) (Cook, 1996; Thomas, 2004) ส่วนต้นที่เจริญเติบโตใต้น้ำ ลักษณะลำต้นเป็นกอ มีใบหยักเป็นคลื่นสีเขียวสด แดกออกจากลำต้น มีความสูง 2-10 เซนติเมตร กว้าง 5-10 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) แหล่งอาศัยในธรรมชาติพบบริเวณลำธาร โดยเจริญอยู่ตามซอกหิน หรือบริเวณที่น้ำท่วมถึง คุณภาพน้ำในบริเวณที่พบคาวน้อยมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 8.3 ค่าความนำไฟฟ้า (Electric Conductivity) 182 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร อุณหภูมิของน้ำ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งอุดมสมบูรณ์ด้วยธาตุเหล็ก และแคลเซียมคาร์บอเนต เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นคาวน้อย ในธรรมชาติขยายพันธุ์ได้โดยการแตกต้นใหม่จากไหล และเมล็ด ออกดอกประมาณเดือนธันวาคม และในช่วงเวลาที่น้ำเริ่มลดระดับลง คาวน้อยที่ได้รับแสงในปริมาณมาก ใบจะมีสีเขียวแดงสวยงาม (Christensen *et al.*, 2008) จึงมีการนำไปใช้ประดับตู้ปลา เนื่องจากกอดต้นมีขนาดเล็ก ใบหยักงอสวยงามแปลกตา มีความทนทาน เจริญได้ดีในตู้ปลา เป็นพรรณไม้น้ำส่งออกขายต่างประเทศ ในธรรมชาติพบน้อยจึงเป็นที่ต้องการของตลาด พบที่ภาคตะวันตกของประเทศไทย บริเวณชายแดนของประเทศไทยและพม่า การขยายพันธุ์ทำได้น้อย (อรุณี และคณะ,

2552; Prasartkul, 2004) ในประเทศไทยยังไม่มีการพัฒนาการขยายพันธุ์ดาวน้อย ซึ่งมีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำมาใช้ในการขยายพันธุ์และเพิ่มผลผลิต เพื่อแก้ปัญหาคขาดแคลนต้นพันธุ์ในการส่งออก และสามารถผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด



ภาพที่ 1 ต้นดาวน้อย *Pogostemon helferi* Hook f.

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสวยงาม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสวยงาม เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก โดยรบกวนแหล่งต้นพันธุ์ในธรรมชาติในน้อยที่สุด การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชที่สะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ วิตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ และมีการควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง (ไพบูลย์, 2524; อร์ดี, 2526) ได้มีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งนับว่าเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยใช้ชิ้นส่วนของพืชขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่างๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนยอด ปลายยอด ใบ ราก ดอก หรือเซลล์ นอกจากนี้ต้นที่ได้ยังปราศจากโรค เมื่อนำไปปลูกจึงได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี สม่าเสมอ มีปริมาณที่มากพอตามความต้องการของตลาดทั้งใน และต่างประเทศได้ตลอดปี ตลอดจนใช้เป็นวิธีการเก็บรักษา และรวบรวมพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช การคัดเลือกพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ต้านทานและทนทาน การพัฒนาพันธุ์ใหม่ๆ (Gould *et al.*, 1991; Kyte and Kleyn, 1999) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตั้งแต่การคัดเลือกชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงจนกระทั่งนำต้นอ่อนปลอดเชื้อออกปลูกในแปลงปลูกหรือเรือนเพาะชำ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน (Kyte and Kleyn, 1999) คือ

1. การคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนต่างๆของพืช เช่น ปลายยอด ลำต้น ใบ ดอก หรือเซลล์ร่างกายและโปรโตพลาสต์ของพืช สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ โดยส่วนที่นำมาใช้ต้องสะอาดปราศจากเชื้อโรค และชิ้นส่วนต้นอ่อนสามารถชักนำให้เกิดการเจริญพัฒนาได้ดีกว่าชิ้นส่วนที่แก่ (สุกัญญา, 2548) การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงเซลล์ของพืชภายหลังจากการแบ่งตัว จะมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะซึ่งทำหน้าที่เฉพาะอย่าง และเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด โดยทั่วไปนิยมนำยอดหรือข้อ มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้างให้อัตราการเพิ่มปริมาณอย่างสม่ำเสมอ และเกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย (ปิยะดา และอารีย์, 2551) โดยชิ้นส่วนต่างๆของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ 3 แบบ (กาญจนรี และคณะ, 2552) คือ

1. พัฒนาเป็นแคลลัส (callus formation) เซลล์บริเวณรอยตัดจะมีการแบ่งตัวพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ เจริญเติบโตขยายจำนวนและขนาดเพิ่มมากขึ้น เซลล์เหล่านี้เรียกว่า แคลลัส ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ยังไม่มีการพัฒนา (undifferentiated) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นเนื้อเยื่อเจริญ และพัฒนาเป็นต้นพืชได้

2. พัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) ชิ้นส่วนพืชที่มีการพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่างๆ เช่น ยอด ราก ดอก หัว และเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

3. พัฒนาเป็นเอ็มบริโอ (embryogenesis) การเลี้ยงเซลล์พืชสามารถชักนำให้เซลล์พืชเซลล์เดียว มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์รูปร่างต่างๆ จนกระทั่งเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

2. การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนจำนวนมากในห้องปฏิบัติการ เมื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการนำชิ้นส่วนมาฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อนำมาเป็นต้นพันธุ์ในการเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวชิ้นส่วนของพืช เป็นการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ที่ผิวภายนอกของชิ้นส่วนพืช จุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง เนื่องจากมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และไปเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อความเป็นกรดและด่าง (pH) ของอาหาร การเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และมีการปลดปล่อยสารต่างๆ ที่เกิดจากกระบวนการทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ (สุกัญญา, 2548) สารฟอกกำจัดเชื้อที่ผิวภายนอกของชิ้นเนื้อเยื่อมีหลายชนิด เช่น แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ (calcium hypochlorite: CaOCl_2), โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite: NaOCl), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: H_2O_2) และ เมอคิวริกคลอไรต์ (mercuric chlorite: HgCl_2) เป็นต้น โดยสารฟอกกำจัดเชื้อที่นิยมใช้มาก

ที่สุดคือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีชื่อทางการค้าคือ คลอโรกซ์ (clorox) โดยควรหยดสารจับใบ (surfactant) เช่น tween-20 (poly-oxyethylene sorbitan monolaurate) ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 1-2 หยด เพื่อช่วยให้สารฟอกกำจัดเชื้อเข้าไปที่ผิวของเนื้อเยื่อที่ไม่เรียบหรือมีขนได้ดีขึ้น (รังสฤษดิ์, 2540) ในประเทศไทยมีพรรณไม้น้ำสวยงามหลายชนิดนำมาเพาะขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จ เช่น

ผสมหอม *Cryptocoryne tonkinensis* Gagnepain โดยนำส่วนยอดมาฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยคลอโรกซ์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที และตามด้วยเมอคิวริกคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อผสมหอมมีอัตราการรอด 90 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ (กาญจนรี และคณะ, 2542)

ขาไก่ค่าง *Hygrophila polysperma* T. And. โดยนำส่วนยอดและข้อมาฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และตามด้วยคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (สุริยา และคณะ, 2545)

ใบพาย *Cryptocoryne cordata* Griff. โดยนำตายอดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที แล้วตามด้วยเมอคิวริกคลอไรท์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า มีอัตราการปนเปื้อน 15 เปอร์เซ็นต์ (รสา และคณะ, 2548)

ใบพาย *Cryptocoryne affinis* Hook f. โดยนำยอดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยเมอคิวริกคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เพียง 15 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ที่ปลอดเชื้อได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนต้นอ่อนที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 1.59 ± 0.71 ต้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (กาญจนรี และคณะ, 2554)

อนูเบียส *Anubias barteri* var. *barteri* Engler โดยนำชิ้นส่วน ยอดอ่อน ใบอ่อน และตาข้างมาฟอกฆ่าเชื้อ พบว่า ยอดอ่อนมีอัตราการรอดสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อนเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และตามด้วยเมอคิวริกคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อน ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แล้วตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4

เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการพอกตาข้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แล้วตามด้วยเมอคิวริกคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 0 เปอร์เซ็นต์ (อารดา, 2548)

บัวจกกลนี *Nymphaea* sp. โดยนำห้วย่อยมาพอกฆ่าเชื้อด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที และตามด้วยเมอคิวริกคลอไรท์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า ชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิต 56.5 และ 53.9 เปอร์เซ็นต์ และมีการปลอดเชื้อ 84.8 และ 83.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภัณฑิลา, 2551)

3. การชักนำให้เกิดต้นอ่อนและราก โดยทั่วไปนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตมาใช้ในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนและราก การเจริญเติบโตของพืช เป็นการเปลี่ยนแปลงของพืชทางด้านปริมาณ เช่น การเปลี่ยนแปลงด้านขนาด ปริมาตร พื้นที่ น้ำหนัก และจำนวน เป็นต้น การเจริญเติบโตของพืชเกี่ยวข้องกับปัจจัยสำคัญ 3 ประการ คือ

- พันธุกรรมของพืช การแบ่งเซลล์ของพืชเป็นผลทำให้เซลล์ทุกเซลล์มีพันธุกรรมเหมือนกัน เพียงแต่เซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง จึงทำให้เซลล์แต่ละชนิดมีการทำงานได้ไม่เหมือนกัน

- สิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น น้ำ ธาตุอาหาร อุณหภูมิ แสง เป็นต้น

- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Regulators) แม้พืชได้รับในปริมาณน้อยก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ (ภาคภูมิ, 2550) ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน (auxins) สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) และสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ กลุ่มที่สำคัญซึ่งนิยมนำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน (รังสฤษฎี, 2540; Brock and Kaufman, 1991)

ออกซิน ที่พบในธรรมชาติเป็นสารที่พืชสังเคราะห์จากส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ใบอ่อน ดอก ผล ปลายราก และปลายโคลิออปไทล์ ซึ่งออกซินจะถูกทำลายโดยแสง หรืออาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ได้ สำหรับออกซินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้ น้ำสวายนาม แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid) มีคุณสมบัติถูกทำลายโดยแสงและ

เอนไซม์ ซึ่งพบสูงในเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ดังนั้นการเติม IAA ในอาหารสังเคราะห์ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1-30 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น NAA (Naphthalene acetic acid) หรือ IBA (indole-3-butyric acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) มีฤทธิ์ค่อนข้างสูง ปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.001-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของออกซินต่อสรีระวิทยาของพืชคือ ช่วยในการยึดตัวของเซลล์ ส่งเสริมหรือชักนำการแบ่งเซลล์ และชักนำให้พืชเกิดราก (สุกัญญา, 2548) ส่วนการใช้ 2,4-D ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดแคลลัส สามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง และช่วยให้เซลล์ที่กลายพันธุ์ (mutated cells) เพิ่มปริมาณได้รวดเร็ว การใช้ 2,4-D จะต้องระมัดระวัง เพราะมีฤทธิ์รุนแรงและสลายตัวยาก (Zaerr and Mapes, 1982)

ไซโตไคนิน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่กระตุ้นการเกิดยอด เมื่อใช้ร่วมกับออกซินในอัตราที่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์และการเจริญพัฒนาเกิดเป็นลำต้น ไซโตไคนินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ Zeatin และ 2-ip กลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น kinetin , BAP หรือ BA (6- Benzyladenine) ผลของไซโตไคนินต่อสรีระวิทยาของพืชคือ เร่งการแบ่งเซลล์ ช่วยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ ชักนำให้เกิดยอดและช่วยการขยายตัวของเซลล์ (สุกัญญา, 2548)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำของไทย มีรายงานการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสหรือยอด ดังนี้

กาญจนรีและคณะ (2542) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหมหอม (*Cryptocoryne tonkinensis*) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และกาญจนรี (2543) รายงานว่าสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดของโลบีเลีย (*Lobellia cardinalis*) เกิดยอดและมีการเจริญเติบโตสูงที่ NAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารสูตร MS โดยมียอดเฉลี่ย 45 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอนุเบียส *Anubias nana* พบว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียวมีผลชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้มากที่สุด โดยการใส่ BA 8.0 ไมโครโมลลาร์ สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนเฉลี่ย 6.80 ± 0.79 ต้น ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่การเติม NAA มีผลลดประสิทธิภาพของ BA ในการกระตุ้นให้อนุเบียสเกิดยอด (กาญจนรี และณัฐกร, 2547) เช่นเดียวกับการทดลองของอารดา (2548) พบว่า การใช้ BA เพียงอย่างเดียวที่ระดับความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Anubias barteri* var. *barteri* Engler สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 10.00 ± 1.87 ยอดต่อต้น ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่า เลี้ยงในอาหารที่

มี BA และ 2,4 - D จะเกิดแคลลัสขึ้นและแคลลัสเริ่มพัฒนาเป็นยอดเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เนื่องจาก 2,4 - D สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดการขยายตัวของเซลล์ โดยเพิ่มการยึดตัวของผนังเซลล์ ซึ่งชักนำทำให้เกิดเป็นแคลลัสได้

นงนุชและมัลลิกา (2548) ทดลองขยายพันธุ์อะโกลนีมาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และชักนำให้เกิด ต้นอ่อน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ NAA ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชี้นเนื้อเยื่อส่วนยอดของอะโกลนีมาที่นำมาเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้ชี้นเนื้อเยื่อเกิดต้นอ่อนได้เร็วในปริมาณมากที่สุด

กาญจนา และคณะ (2554) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne affinis* Hook. f., 1893. พบว่า BA และ NAA มีอิทธิพลร่วมกันในการชักนำให้ชี้นเนื้อเยื่อของใบพาย *C. affinis* เจริญพัฒนาเกิดยอดจำนวนมาก โดยระดับความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจำนวนมากของใบพาย *C. affinis* คือการใช้ BA ในอัตรา 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 7.90 ± 2.41 ยอด/ชี้นเนื้อเยื่อ ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับผลของการชักนำให้เกิดราก พบว่าไม่มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ BA และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดราก อย่างไรก็ตามแต่ละปัจจัย ได้แก่ BA และ NAA มีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณราก โดย NAA มีอิทธิพลส่งเสริมให้เกิดรากการใช้ NAA อัตราความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลชักนำให้เกิดรากได้สูงที่สุด ใกล้เคียงกับการใช้ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่การเกิดรากลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้นโดยเมื่อใช้ BA ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าแทบไม่มีรากเกิดขึ้นเลย

Lakshmanan (1994) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวลูกผสม *Nymphaea* hybrid "James Brydon" พบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 11.1 ไมโครโมล , 2-IP ความเข้มข้น 32 ไมโครโมล และ NAA ความเข้มข้น 4.0 ไมโครโมล ร่วมกันทำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 2.8 ยอด ภายในเวลา 45 วัน

ในประเทศไทยและในต่างประเทศไม่มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาวน้อย แต่มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุลเดียวกันกับคาวน้อย ดังนี้

Hembrom *et al.* (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Pogostemon heynermus* Benth. โดยนำชิ้นส่วนตาข้างมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 17.1 ยอด ภายในเวลา 40 วัน

Kumaraswamy and Anuradha (2010) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Pogostemon cablin* Benth. โดยนำชิ้นส่วนตาข้างมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 45.66 ยอด ภายในเวลา 30 วัน

4. การเตรียมต้นพันธุ์ก่อนนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก การเตรียมต้นอ่อนพรรณไม้น้ำและการปรับสภาพ โดยการนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเหมือนต้นปกติ และมีรากเพื่อใช้ดูดสารอาหาร ปรับสภาพเนื้อเยื่อพืช เป็นระยะเวลา 3 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติ การปรับสภาพโดยการเพิ่มความเข้มแสงแต่ไม่ควรให้เนื้อเยื่อพืชได้รับแสงโดยตรง และลดความชื้นภายในภาชนะลง เนื่องจากต้นพืชยังมีการสร้างสารคิวติน (cutin) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสูญเสียน้ำจากใบน้อย ในขณะที่ปากใบยังเปิดกว้าง เมื่อนำออกสัมผัสกับอากาศที่มีสภาพแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้น ไม่สม่ำเสมอ ตลอดเวลา พืชจะคายน้ำมากขึ้น ทำให้เหี่ยวเฉาและตายได้ง่าย จากนั้นนำต้นอ่อนที่ผ่านการปรับสภาพแล้วออกจากภาชนะและล้างอาหารวุ้นที่ติดอยู่บริเวณรากออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด นำมาปลูกในแปลงเพาะพันธุ์ สำหรับวิธีการเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำสวยงามในแปลงเพาะพันธุ์มีหลายวิธีขึ้นกับประเภทหรือชนิดของพรรณไม้น้ำ เนื่องจากพรรณไม้น้ำแต่ละชนิดมีการแพร่กระจายในธรรมชาติซึ่งมีสภาพนิเวศน์ที่แตกต่างกัน บางประเภทจมอยู่ใต้น้ำตลอดชีวิต หรือบางประเภทดำรงชีวิตแบบครึ่งบกครึ่งน้ำ ดังนั้นวิธีการปลูกจึงต้องแตกต่างกัน ดังนี้ (รัฐภัทร์, 2550)

1. การปลูกแบบครึ่งบกครึ่งน้ำ วิธีนี้เหมาะสำหรับพรรณไม้น้ำประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำ และประเภทชายน้ำ ซึ่งโดยส่วนใหญ่พรรณไม้น้ำสวยงามมักพบว่าอยู่ในประเภทนี้ในธรรมชาติจะเจริญเติบโตได้ดีบริเวณที่ลุ่มน้ำขังขึ้นและ เมื่อนำมาขยายพันธุ์ สามารถปลูกในแปลงที่มีวัสดุปลูกเป็นดินหรือกรวดขนาดเล็กที่มีน้ำแฉะ หรือน้ำท่วมแค่โคนต้น บ่อปลูกอาจเป็นบ่อซีเมนต์หรือก่อด้วยอิฐบล็อกเตี้ยๆที่เก็บกักน้ำได้ หรืออาจจัดทำเป็นกระบะปลูกด้วยแผ่นพลาสติกยกสูงขึ้นจากพื้น ซึ่งจะสะดวกกับการทำงานมากขึ้น ด้านบนควรมีตาข่ายพรางแสง ประมาณ 40-60% ซึ่งขึ้นกับ

ชนิดพรรณไม้น้ำที่ต้องการแสงมากน้อยแตกต่างกันและมีระบบน้ำหยดหรือติดตั้ง timer สเปร์ย์น้ำเป็นเวลา หรือใช้ฝักบัวรดน้ำเป็นระยะๆ ช่วยให้ความชุ่มชื้นแก่พรรณไม้น้ำ

2. การปลูกพรรณไม้น้ำแบบไร้ดิน ได้แก่ การปลูกในกระถางคล้ายตะกร้าพลาสติกขนาดเล็ก โดยใช้วัสดุปลูกเป็นแร่ใยหิน (Rock wool) ซึ่งมีคุณสมบัติอมน้ำ นุ่ม ไม่เปื่อยง่าย ไม่เกาะกันเป็นก้อน พรรณไม้น้ำที่ปลูกในกระถางจะแช่ไว้ในบ่อหรือกระบะที่มีน้ำมีการให้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์โดยเติมลงไปใต้น้ำ และสเปร์ย์น้ำด้านบนเป็นระยะเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ต้นพืช มีระบบหมุนเวียนน้ำเพื่อไม่ให้รากที่แช่อยู่ในน้ำนานๆเน่า

3. การปลูกพรรณไม้น้ำแบบได้น้ำ วิธีนี้จะใช้ในการเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำที่เป็นประเภทพืชใต้น้ำ เช่น สาหร่าย และเทป สาหร่ายที่นิยมปลูก ได้แก่ สาหร่ายจักร สาหร่ายคา บอม บ้า และสาหร่ายเคนซ่า ทำได้โดยการตัดลำต้นมาปักชำในบ่อดิน หรือในบ่อซีเมนต์ที่มีวัสดุปลูกเป็นกรวดโดยเติมน้ำสูง 30 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ชนิดละลายน้ำเช่นเดียวกับวิธีการปลูกพรรณไม้น้ำชนิดอื่นๆ โดยละลายปุ๋ยในถังก่อนแล้วจึงเติมลงไปใต้น้ำในอัตรา 5-15 กรัม/น้ำในบ่อ 1,000 ลิตร เมื่อพรรณไม้น้ำเจริญเติบโตแล้วจึงตัดยอดไปจำหน่าย ส่วนการปลูกต้นเทปชนิดต่างๆ ในบ่อซีเมนต์ที่มีพื้นเป็นกรวดเทปจะขยายออกทางด้านข้าง แยกออกเป็นไหลเกิดต้นใหม่เมื่อเจริญเติบโตแล้วจึงตัดออกไปจำหน่าย

ปัจจุบันการปลูกพรรณไม้น้ำเพื่อการค้าแบบพัฒนาส่วนใหญ่นิยม เพาะเลี้ยงกันในโรงเรือน (Green house) ซึ่งสามารถควบคุมความชื้น แสงสว่าง และปุ๋ยได้โดยอัตโนมัติ สามารถป้องกันแมลงศัตรูพืชได้ดี การปลูกในโรงเรือนแบบนี้มักนิยมใช้วิธีการปลูกแบบไร้ดิน โดยปลูกพรรณไม้น้ำในกระถางขนาดเล็กคล้ายตะกร้าใช้ Rock wool เป็นวัสดุปลูกต้นอ่อนพรรณไม้น้ำส่วนใหญ่นิยมใช้ต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสะดวกต่อการทำงาน ซึ่งสามารถกำหนดปริมาณได้แน่นอน และมีความสะอาดปราศจากโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

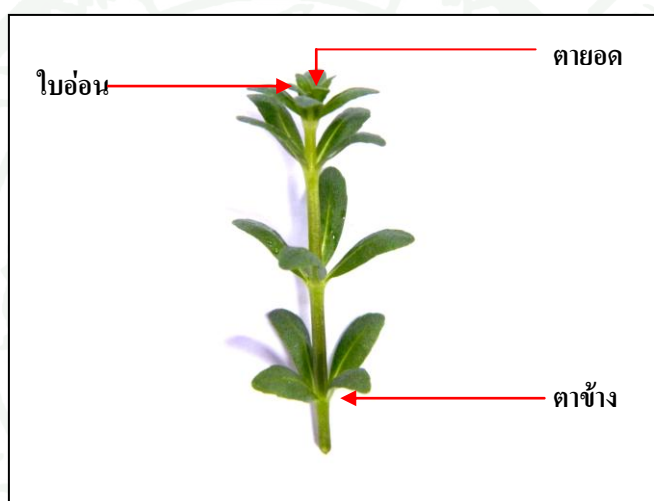
อุปกรณ์

1. ชิ้นส่วนของพืชทดลอง ได้แก่ ตายอด ตาข้าง และใบอ่อน ของดาวน้อย (*Pogostemon helferi*)
2. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ไมโครเวฟ บีกเกอร์ ปิเปต กระจกบดวง ซ้อน ตักสาร แท่งแก้วคน ทัพพี และขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์พร้อมฝาปิด ฯลฯ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารและฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่
 - 3.1 สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
 - 3.2 น้ำตาลซูโครส และวุ้น
 - 3.3 สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ได้แก่ NaOH 1 N และ HCl 1 N
 - 3.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารลดแรงตึงผิว (tween 20)
 - 3.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต
 - NAA (Naphthaleneacetic acid)
 - BA (6 - Benzyladenine)
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ ในการขยายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ขยายเนื้อเยื่อ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ตะเกียง แอลกอฮอล์ และขวดใสแอลกอฮอล์สำหรับแช่เครื่องมือ ฯลฯ
5. หองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางที่ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อวัน
6. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาวิธีการพอกมาเชื้อ และชิ้นส่วนของต้นคาวน้อยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาวน้อย

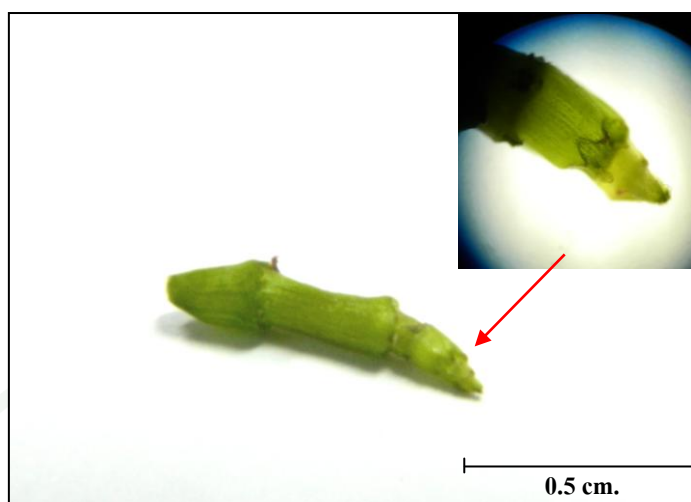
วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยเก็บตัวอย่างคาวน้อยจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เลือกต้นพันธุ์ที่สมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรคพืช จากนั้นนำมาคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อ 3 ส่วนของคาวน้อย (*Pogostemon helferi*) ได้แก่ ตายอด ตาข้าง และใบอ่อน (ภาพที่ 2)



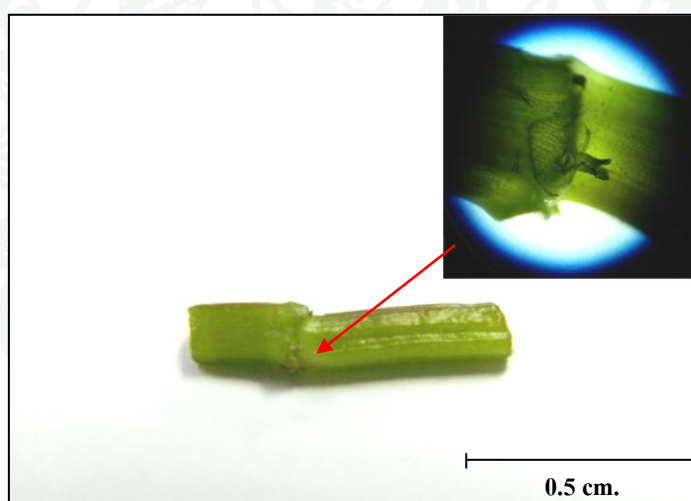
ภาพที่ 2 ต้นพันธุ์คาวน้อย(ต้นเหนื่อน้ำ) ที่นำมาพอกมาเชื้อ ประกอบด้วย ตายอด ตาข้าง และใบอ่อน นำมาล้างน้ำไหลผ่านให้สะอาด

ลักษณะของตายอดอยู่บริเวณยอดของต้นคาวน้อยมีใบอ่อนหุ้มตายอดอยู่ จึงต้องตัดแต่งใบอ่อนออก ตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาล้างน้ำไหลผ่านให้สะอาด (ภาพที่ 3)

ลักษณะของตาข้างที่นำมาพอกมาเชื้ออยู่บริเวณข้อของคาวน้อย ก่อนนำมาพอกมาเชื้อจะต้องตัดใบที่บริเวณรอบข้อออกให้หมด เพื่อที่สารพอกมาเชื้อจะเข้าไปมาเชื้อในบริเวณตาข้างได้ดี ตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาล้างน้ำไหลผ่านให้สะอาด (ภาพที่ 4)

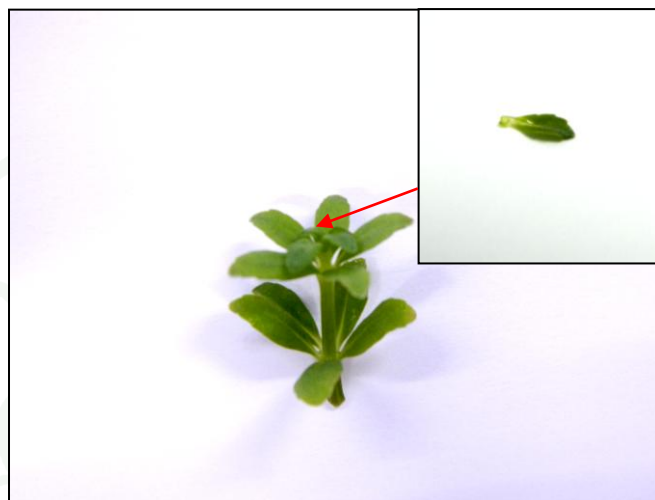


ภาพที่ 3 ลักษณะของตาขอดที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 4 ลักษณะของตาข้างที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ

ใบอ่อน ที่จะนำมาฟอกฆ่าเชื้อเป็นใบอ่อนที่อยู่บริเวณยอดของควาน้อย โดยเลือกใบที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีรอยชำ และมีขนาด 0.3 เซนติเมตร นำมาตัดแต่งล้างน้ำไหลให้สะอาด (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลักษณะใบอ่อนที่จะนำมาฟอกฆ่าเชื้อ นำมาตัดแต่งและล้างน้ำไหลผ่านให้สะอาด

จากนั้นนำชิ้นส่วนทั้ง 3 ส่วนของควาน้อย นำมาทดลองใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนควาน้อย ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 สูตร (Treatment) สูตรละ 10 ซ้ำ ดังนี้

- สูตรที่ 1 (T1) = ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2% นาน 15 นาที
 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1% นาน 10 นาที
- สูตรที่ 2 (T2) = ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4% นาน 15 นาที
 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2% นาน 10 นาที
- สูตรที่ 3 (T3) = ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6% นาน 15 นาที
 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3% นาน 10 นาที
- สูตรที่ 4 (T4) = ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 8% นาน 15 นาที
 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4% นาน 10 นาที
- สูตรที่ 5 (T5) = ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% นาน 15 นาที
 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5% นาน 10 นาที

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

1. ฟอกฆ่าเชื้อตายอด ตาข้าง และใบอ่อนของดาวน้อย (*Pogostemon helferi*) ด้วยการแช่ และ เขย่าใน เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ อัตราความเข้มข้นตามแผนที่วางไว้ เติม Tween 20 จำนวน 1-2 หยด ต่อ สารละลาย 100 มิลลิลิตร แช่นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2. ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ อัตราความเข้มข้นตามแผนที่วางไว้ เติม Tween 20 จำนวน 1-2 หยด ต่อ สารละลาย 100 มิลลิลิตร แช่นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ขั้นตอนตั้งแต่การฟอกฆ่าเชื้อทำในตู้ปลอดเชื้อ และใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทั้งหมด

3. หลังจากฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 2 ครั้งแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบและวัดผล ทุกสัปดาห์ บันทึกผลเพื่อหา อัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ อัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ และ บันทึกภาพ

4. นับอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยนับจำนวนขวดเนื้อเยื่อที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ การนับอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่โดยนับจากจำนวนขวดเนื้อเยื่อที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และมีการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (เช่น ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 9 ขวด และมีการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 8 ขวด อัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่คิดเป็น 88.9 %)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการใช้ NAA (Naphthalene acetic acid) และ BA (6-benzyladenine) ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของดาวน้อย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนดาวน้อยในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆกัน 6 สูตร (Treatment) สูตรละ 20 ซ้ำ (Replication) ดังนี้

สูตรที่ 1	MS
สูตรที่ 2	MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตรที่ 3	MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตรที่ 4	MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตรที่ 5	MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตรที่ 6	MS + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำชิ้นส่วนคาวน้อยที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามผลการทดลองที่ 1 ไปฟอกฆ่าเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ กันตามแผนการทดลอง โดยเติม น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองทุก 1 สัปดาห์ ดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาเกิดเป็นต้นใหม่
2. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
3. ขนาดของแคลลัส
4. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
5. บันทึกภาพ

จากนั้นนำขนาดของแคลลัสเฉลี่ยมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ในแต่ละสัปดาห์ ตามสูตร ดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัส} = \frac{\ln \text{ขนาดสุดท้าย} - \ln \text{ขนาดเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลา (สัปดาห์)}}$$

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การชักนำให้แคลลัสของดาวน้อยเจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสดาวน้อยในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆกัน 4 สูตร (Treatment) สูตรละ 20 ซ้ำ (Replication) ดังนี้

สูตรที่ 1	MS
สูตรที่ 2	½ MS
สูตรที่ 3	MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตรที่ 4	½ MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร+NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำชิ้นส่วนแคลลัสดาวน้อยที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาตัดให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ กันตามแผนการทดลอง โดยเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรนำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองทุกๆ 1 สัปดาห์ ดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
2. นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น
3. นับจำนวนใบต่อยอด
4. นับจำนวนรากที่เกิดขึ้น
5. วัดความสูงของต้น
6. บันทึกภาพ

จากนั้นนำจำนวนยอดเฉลี่ยมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ในแต่ละสัปดาห์ ตามสูตร ดังนี้

$$\text{อัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะ} = \frac{\ln \text{จำนวนยอดสุดท้าย} - \ln \text{จำนวนยอดเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลา (สัปดาห์)}}$$

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ และขึ้นส่วนของต้นคาวน้อยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาวน้อย

1. ผลการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อย

การทดลองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อย โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ อัตราความเข้มข้นต่างๆกัน 5 วิธี แล้วเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (ภาพที่ 6) เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏผลการทดลอง ตามตารางที่ 1 ดังนี้

วิธีที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 40 เปอร์เซ็นต์ และขึ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 66.67 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 10 เปอร์เซ็นต์ และขึ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 88.89 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 8 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตายอดของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 10 เปอร์เซ็นต์ และขึ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 44.44 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 5 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนของคาวน้อยไม่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดขึ้นใหม่ได้และทยอยตายหมดภายใน 2 สัปดาห์

จากผลการทดลองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนตายของคาวน้อย ทั้ง 5 วิธีพบว่าวิธีที่เหมาะสมคือวิธีที่ 3 ได้แก่ การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาทีโดยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดขึ้นใหม่ 88.89 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 ชิ้นส่วนตายของคาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 ชิ้นส่วนตายอดของควาน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตายอดโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ อัตราความเข้มข้น ต่างๆกันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

	ความเข้มข้นของ NaOCl/ระยะเวลาที่ใช้		อัตราการปนเปื้อน เชื้อจุลินทรีย์ (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญพัฒนา เกิดต้นใหม่ (เปอร์เซ็นต์)
	ครั้งที่ 1 เปอร์เซ็นต์/นาที	ครั้งที่ 2 เปอร์เซ็นต์/นาที		
วิธีที่ 1	2/15	1/10	100	0
วิธีที่ 2	4/15	2/10	40	66.7
วิธีที่ 3	6/15	3/10	10	88.9
วิธีที่ 4	8/15	4/10	10	44.4
วิธีที่ 5	10/15	5/10	0	0

2. ผลการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อย

ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ อัตราความเข้มข้นต่างกัน 5 วิธี แล้วเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (ภาพที่ 8) เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏผลการทดลองตามตารางที่ 2 ดังนี้

วิธีที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วย ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ได้

วิธีที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วย ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 50 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 80 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วย ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 40 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 66.67 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 8 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วย ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 40 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 33.3 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ 5 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วย ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อยไม่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ได้และทยอยตายหมดภายใน 3 สัปดาห์

จากผลการทดลองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนตาข้างของคาวน้อย ทั้ง 5 วิธีพบว่าวิธีที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างคือวิธีที่ 2 ได้แก่การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮ

โปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาทีโดยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 50 เปอร์เซ็นต์ และขึ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดภัยมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดขึ้นใหม่ 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในวิธีการฟอกฆ่าเชื้อวิธีที่ 3 และ 4 อัตราการปนเปื้อนจุลินทรีย์น้อยกว่าวิธีที่ 2 แต่อัตราการเจริญพัฒนาเกิดขึ้นใหม่น้อยกว่าวิธีที่ 2 (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 2 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ อัตราความเข้มข้นต่างๆกันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

	ความเข้มข้นของ NaOCl/ระยะเวลาที่ใช้		อัตราการปนเปื้อน เชื้อจุลินทรีย์ (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญพัฒนา เกิดขึ้นใหม่ (เปอร์เซ็นต์)
	ครั้งที่ 1 เปอร์เซ็นต์/นาที	ครั้งที่ 2 เปอร์เซ็นต์/นาที		
วิธีที่ 1	2/15	1/10	100	0
วิธีที่ 2	4/15	2/10	50	80
วิธีที่ 3	6/15	3/10	40	66.7
วิธีที่ 4	8/15	4/10	40	33.3
วิธีที่ 5	10/15	5/10	0	0



ภาพที่ 8 ชิ้นส่วนตาข้างของดาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ชิ้นส่วนตาข้างของดาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3. ผลการศึกษาการพอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อย

การทดลองพอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อย โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ อัตราความเข้มข้นต่างๆกัน 5 วิธี แล้วเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (ภาพที่ 10) เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏผลการทดลอง ดังนี้

วิธีที่ 1 พอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยพอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนยอดของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 80 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ได้

วิธีที่ 2 พอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยพอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ได้

วิธีที่ 3 พอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยพอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ได้

วิธีที่ 4 และวิธีที่ 5 คือพอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 8 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยพอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และ พอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยพอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ตามลำดับ พบว่าชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 0 เปอร์เซ็นต์ แต่ชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ได้ และลักษณะใบมีสีน้ำตาล และทยอยตายลงจนหมด (ตารางที่ 3 และภาพที่ 11)

จากผลการทดลองพอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อย ทั้ง 5 วิธีพบว่า ไม่มีวิธีที่เหมาะสมในการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนไบ เนื่องจากการนำไบอ่อนของคาวน้อยมาพอกไม่สามารถทำให้เกิดการเจริญพัฒนาเป็นต้นได้ จึงไม่เหมาะที่จะนำชิ้นส่วนไบอ่อนของคาวน้อยมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิดสามารถนำไบอ่อนมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ เช่น

การทดลองของ รัฐภัทร์ และคณะ (2553) นำชิ้นส่วนใบอ่อนของรากคำใบยาวมาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายคลอโรกซ์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่ามีอัตราการปนเปื้อน 10 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเจริญพัฒนา 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ อัตราความเข้มข้นต่าง ๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

	ความเข้มข้นของ NaOCl/ระยะเวลาที่ใช้		อัตราการปนเปื้อน เชื้อจุลินทรีย์ (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญพัฒนา เกิดขึ้นใหม่ (เปอร์เซ็นต์)
	ครั้งที่ 1 เปอร์เซ็นต์/นาที	ครั้งที่ 2 เปอร์เซ็นต์/นาที		
วิธีที่ 1	2/15	1/10	80	0
วิธีที่ 2	4/15	2/10	10	0
วิธีที่ 3	6/15	3/10	10	0
วิธีที่ 4	8/15	4/10	0	0
วิธีที่ 5	10/15	5/10	0	0



ภาพที่ 10 ชิ้นส่วนใบอ่อนของดาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีความเข้มแสงประมาณ 2,500-3,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 11 ชิ้นส่วนใบอ่อนของดาวน้อย ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่มีการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตายอด ตาข้าง และใบของดาวน้อย โดยการฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้งด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในอัตรา 1-10 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่าแต่ละชิ้นส่วนใช้อัตราความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมแตกต่างกัน ดังนี้

วิธีที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในชิ้นส่วนตายอดและตาข้างได้เลย มีอัตราการปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นต่ำเกินไป ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของกาญจนรี และณัฐกร (2547) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Anubias nana* Engler ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที พบว่า ได้ชิ้นเนื้อเยื่อรอดตายและไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 78 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากต้นพันธุ์อูเบียสที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อมาจากการปลูกเลี้ยงระบบไร้ดิน ในโรงเรือนระบบปิด จะมีความสะอาด ปราศจากเชื้อโรค สามารถควบคุมคุณภาพของต้นพันธุ์ได้ ต้นพันธุ์จึงมีความสมบูรณ์และแข็งแรง แต่ต้นพันธุ์อูเบียสในธรรมชาติมีลักษณะเป็นพืชล้มลุก มีต้นเป็นแท่งใต้ดิน และแทงขึ้นมาบนดิน ชอบขึ้นในที่ร่ม ชื้น และที่มีความชื้นสูง หรืออยู่ในสภาพครึ่งบกครึ่งน้ำ ดังนั้น ต้นพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิด จึงมีความสะอาดกว่าต้นพันธุ์อูเบียสที่เก็บจากธรรมชาติ จึงสามารถใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นต่ำได้

วิธีที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า ไบออนของคาวน้อยมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำที่สุดมีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากลักษณะของไบออนเป็นแผ่นไม่มีซอกใบจึงทำให้สารฟอกฆ่าเชื้อสามารถทำความสะอาดไบออนได้ดีกว่าตายอดและตาข้าง แต่ไบออนไม่สามารถเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ได้ ในขณะที่ตายอดและตาข้างมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน แต่ตาข้างมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่สูงกว่าตายอดเนื่องจากตาข้างมีความแข็งแรงและทนทานต่อสารฟอกฆ่าเชื้อได้ดีกว่าตายอด ดังนั้นวิธีที่ 2 จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อตาข้าง

วิธีที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า ตายอดและไบออนมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เท่ากันคือ 10 เปอร์เซ็นต์ และตาข้างมีอัตราการปนเปื้อนมากที่สุดเนื่องจากตายอดและไบออนอยู่บริเวณปลายยอดของคาวน้อยซึ่งมีความสะอาดมากกว่าตาข้างทำให้มีอัตราการปนเปื้อนต่ำ ส่วนอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่พบว่า ตายอดมีอัตราการเจริญพัฒนาสูงสุด รองลงมาคือ ตาข้าง ส่วนไบออนไม่มีการเจริญพัฒนาเลย การที่ตายอดมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่สูง เนื่องจากเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดมีเนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell differentiation) เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นแล้วจะมีการขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement) ไปเป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่าง เช่น ใบ (ภาควิชา, 2550) ดังนั้น วิธีที่ 3 จึงเหมาะที่จะนำมาฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตายอด อย่างไรก็ตาม ตายอดก็มีข้อจำกัดในการนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากใน 1 ต้น คาวน้อยจะมียอดเพียง 4-5 ยอด แต่ว่าตาข้างมีปริมาณมากกว่าตายอดหลายเท่าหากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาวน้อยมีต้นพันธุ์จำนวนจำกัดควรนำชิ้นส่วนตาข้างมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาวน้อยแทนตายอดได้

ส่วนวิธีที่ 4 และวิธีที่ 5 ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ แต่ชิ้นส่วนมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ต่ำ และมีบางชิ้นส่วนต้นพันธุ์ไม่สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อสูงเกินไปทำให้ไปทำลายส่วนของเนื้อเยื่อเจริญจึงทำให้ชิ้นส่วนพืชทั้ง 3 ชิ้นส่วนคือ ตายอด ตาข้าง และไบออน ไม่สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ดังนั้น วิธีที่ 4 และวิธีที่ 5 จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อคาวน้อย

การใช้ความเข้มข้นของสารฟอกที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของต้นพันธุ์และชิ้นส่วนที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ และแหล่งต้นพันธุ์ เนื่องจากต้นพันธุ์แต่ละชนิดมีความทนทานต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ

แตกต่างกัน และชิ้นส่วนที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ แหล่งที่มาของต้นพันธุ์ก็มีผลต่อการฟอกฆ่าเชื้อเนื่องจากต้นพันธุ์ที่มาจากธรรมชาติจะมีความสกปรกมากกว่าต้นพันธุ์ที่มาจากการเพาะเลี้ยงในระบบไร้ดิน ถ้าชิ้นส่วนพืชมีความสกปรกน้อย ความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ใช้จะมีความเข้มข้นต่ำ แต่ถ้ามีความสกปรกมากจะใช้ความเข้มข้นสูง เช่น การฟอกฆ่าเชื้อยอดอ่อนอนุเบียด *Anubias barteri* var. *barteri* Engler ด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แล้วตามด้วยเมทิลริกคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 30 เปอร์เซ็นต์ (อารดา, 2548) การทดลองในครั้งนี้ใช้ต้นพันธุ์ดาวน้อยที่รวบรวมจากธรรมชาติ จึงต้องใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง สำหรับต้นพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และมีจำนวนต้นพันธุ์ในปริมาณจำกัด หากมีการปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยและต้นพันธุ์ยังแข็งแรง สามารถนำต้นพันธุ์นั้นมาฟอกฆ่าเชื้อใหม่ได้

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการใช้ NAA (Naphthalene acetic acid) และ BA (6-benzyladenine) ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของดาวน้อย

ผลการศึกษาการใช้ NAA (Naphthalene acetic acid) และ BA (6-benzyladenine) ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของดาวน้อย โดยเฉพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนตายอดตามผลการทดลองที่ 1 คือ การนำชิ้นส่วนตายอดดาวน้อยนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ต่างๆกัน 6 สูตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ปรากฏผลการทดลอง ตามตารางที่ 4 ดังนี้

การศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 6 สูตร พบว่า อาหารสูตรที่ 1 (MS) และอาหารสูตรที่ 6 (MS + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของดาวน้อยเกิดแคลลัสได้ แต่เกิดเป็นต้นอ่อน ส่วนในอาหารสูตรที่ 2 (MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร), อาหารสูตรที่ 3 (MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร), อาหารสูตรที่ 4 (MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) และอาหารสูตรที่ 5 (MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของดาวน้อยเกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12)

ชิ้นส่วนตายอดที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 6 สูตร มีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดแคลลัสหรือเกิดต้นอ่อน 100 เปอร์เซ็นต์ และ สูตรที่ 2, 3, 4 และ 6 มีอัตราการรอดสูงสุด คือ 85 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สูตรที่ 1 และสูตรที่ 5 มีอัตราการรอด 80 เปอร์เซ็นต์

ขนาดของแคลลัสวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เกิดแคลลัสคือ สูตรที่ 2, 3, 4 และ 5 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ สูตรอาหารสูตรที่ 2 และ 3 มีขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุดเฉลี่ย 10.67 ± 2.54 และ 9.96 ± 2.29 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ สูตรอาหารสูตรที่ 4 และ 5 มีขนาดของแคลลัสเฉลี่ย 9.25 ± 2.01 และ 9.17 ± 1.80 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 13) และเมื่อนำขนาดของแคลลัสเฉลี่ยเปรียบเทียบกันแต่ละสัปดาห์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 14) ของอาหารทั้ง 4 สูตร คือ อาหารสูตรที่ 2, 3, 4 และ 5 พบว่า ทั้ง 4 สูตร มีแนวโน้มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ยเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 6 และในอาหารสูตรที่ 2 มีการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดทั้ง 6 สัปดาห์ รองลงมาคือสูตร 3, 4 และ 5 ตามลำดับ



ภาพที่ 12 การเกิดแคลลัสในอาหาร 6 สูตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

สูตรที่ 1 MS

สูตรที่ 2 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 MS + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นนำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัส มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัส (Specific growth rate) ในแต่ละช่วงสัปดาห์ พบว่า ในอาหารสูตรที่ 2 และ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 0.15 และ 0.14 ต่อสัปดาห์ ตามลำดับ และในสัปดาห์ถัดไปอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสจะค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ส่วนในอาหารสูตรที่ 4 และ 5 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสในช่วงสัปดาห์แรกค่อนข้างต่ำและสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.14 ต่อสัปดาห์ หลังจากนั้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสจะค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 6 และภาพที่ 15)

จากผลการทดลองพบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้ BA เพียงอย่างเดียว หรือ เติม NAA ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้ชิ้นเนื้อเยื่อคาวน้อยเกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการ ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักชีฝรั่ง พบว่าเนื้อเยื่อใบอ่อนและข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ (ปิยะพรและนุชมะณี, 2547) แต่การใช้ NAA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (สมบูรณ์, 2538)

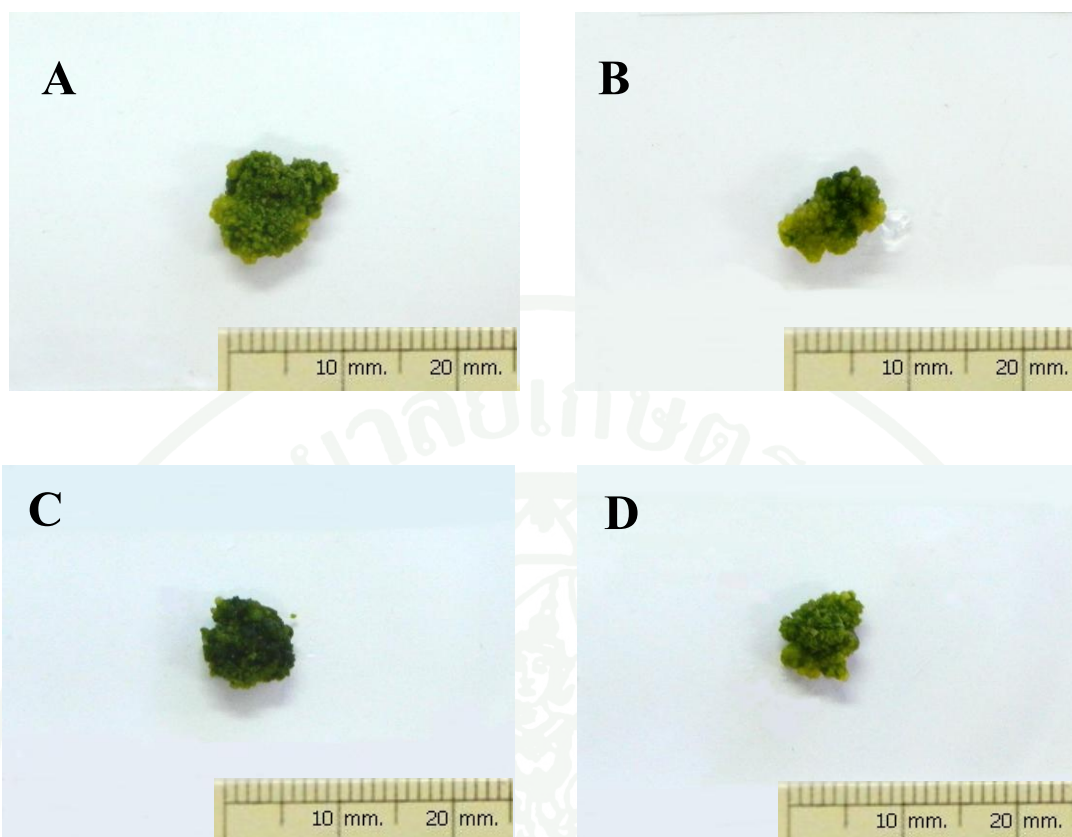
ผลของไซโตไคนินทำให้เซลล์พืชมีการแบ่งเซลล์ เนื้อเยื่อสามารถแบ่งเซลล์ได้ดีในอาหารที่มีไซโตไคนินและออกซิน ทั้งนี้หากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีออกซินเพียงอย่างเดียวจะทำให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) แต่จะไม่เกิดการแบ่งเซลล์ แต่ถ้าใส่ไซโตไคนินลงไปด้วยจะทำให้เซลล์นั้นเข้าสู่ขั้นตอนของไมโทซิสได้ ซึ่งสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินมีผลต่อการพัฒนาอวัยวะของพืชด้วย โดยหากนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่มีสัดส่วนของฮอร์โมนออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสนั้นจะมีการพัฒนาของเซลล์และมีการสร้างราก แต่หากนำแคลลัสนั้นไปเลี้ยงในอาหารที่มีสัดส่วนของฮอร์โมนออกซินต่อไซโตไคนินต่ำ แคลลัสจะมีการพัฒนาและสร้างยอดขึ้น (ภาคภูมิ, 2550) นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ BA 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่เติม NAA มีผลชักนำให้ชิ้นเนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA ดังนั้นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้คาวน้อยเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ สูตรที่ 2 คือ เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองที่ได้ในระยะเวลาการเลี้ยง 6 สัปดาห์ทำให้ได้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามจากภาพที่ 14 พบว่า ขนาดแคลลัสเพิ่มสูงขึ้นมากในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 จากนั้นการเพิ่มขนาดของแคลลัสจะลดลงเมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 เมื่อนำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมาหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสในแต่ละสัปดาห์ทำให้ทราบอัตราการเพิ่มขนาดของแคลลัสในแต่ละช่วงเวลาซึ่งแตกต่างกัน โดยมีช่วงที่อัตราการ

เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและลดลง ซึ่งในอาหารสูตรที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัส ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลลัสจะค่อยๆ ลดลงมาเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น แต่เนื่องจากในสัปดาห์ที่ 3 ขนาดของแคลลัสที่ได้มีขนาดเล็กมากหากนำแคลลัสในช่วงดังกล่าวมาตัดขยาย จะขยายได้ในปริมาณน้อยกว่าการนำ แคลลัสที่มีขนาดใหญ่มาตัดขยาย ดังนั้น จึงควรเลี้ยงแคลลัสต่อไปอีกจนถึงสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งขนาดของแคลลัสจะขยายเพิ่มมากขึ้น เหมาะต่อการตัดขยายแคลลัส (ภาพที่ 16) เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโต เซลล์ของแคลลัสมีการแบ่งเซลล์ และมีการขยายขนาดของแคลลัส เซลล์ใหม่ที่ได้ก็ จะมีความสามารถในการขยายเซลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดระยะเวลาและต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม่ต้องคอยจนครบ 6 สัปดาห์อีกด้วย

ตารางที่ 4 อัตราการเกิดแคลลัส อัตราการเจริญพัฒนา อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์) และ ขนาดของ แคลลัสควาน้อย (ค่าเฉลี่ย±SD) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ทริตเมนต์	NAA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	BA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	อัตราการเกิด แคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการ เจริญพัฒนา (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการ รอด (เปอร์เซ็นต์)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ของแคลลัส (มิลลิเมตร)
สูตรที่ 1	0	0	0	100	80	0
สูตรที่ 2	0	1	100	100	85	10.67 ± 2.54 ^a
สูตรที่ 3	0	2	100	100	85	9.96 ± 2.29 ^a
สูตรที่ 4	0.25	1	100	100	85	9.25 ± 2.01 ^b
สูตรที่ 5	0.25	2	100	100	80	9.17 ± 1.80 ^b
สูตรที่ 6	0.25	0	0	100	85	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

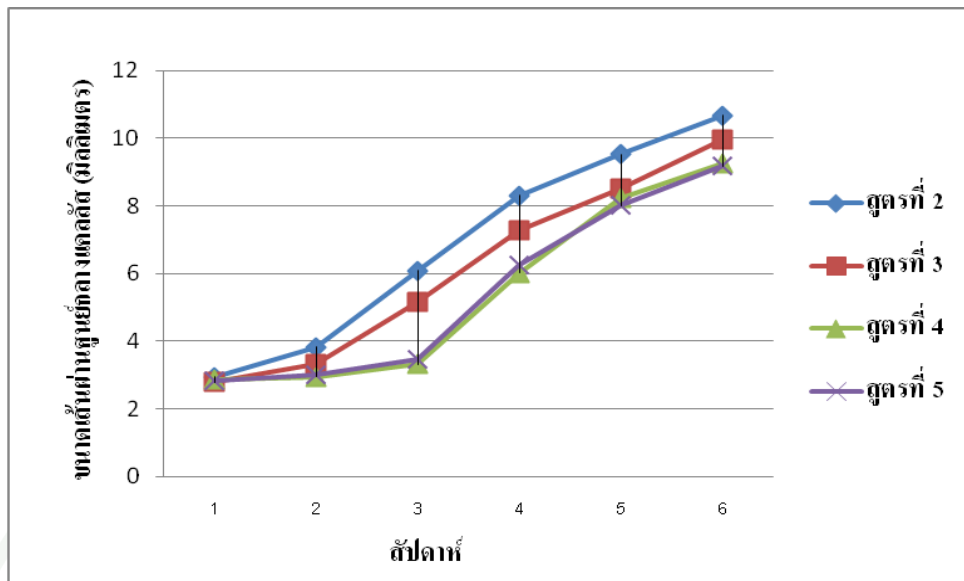


ภาพที่ 13 ขนาดของแคลลัสวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

- A สูตรที่ 2 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- B สูตรที่ 3 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- C สูตรที่ 4 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
- D สูตรที่ 5 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสดาวน์น้อย (ค่าเฉลี่ย±SD) เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 6 สัปดาห์

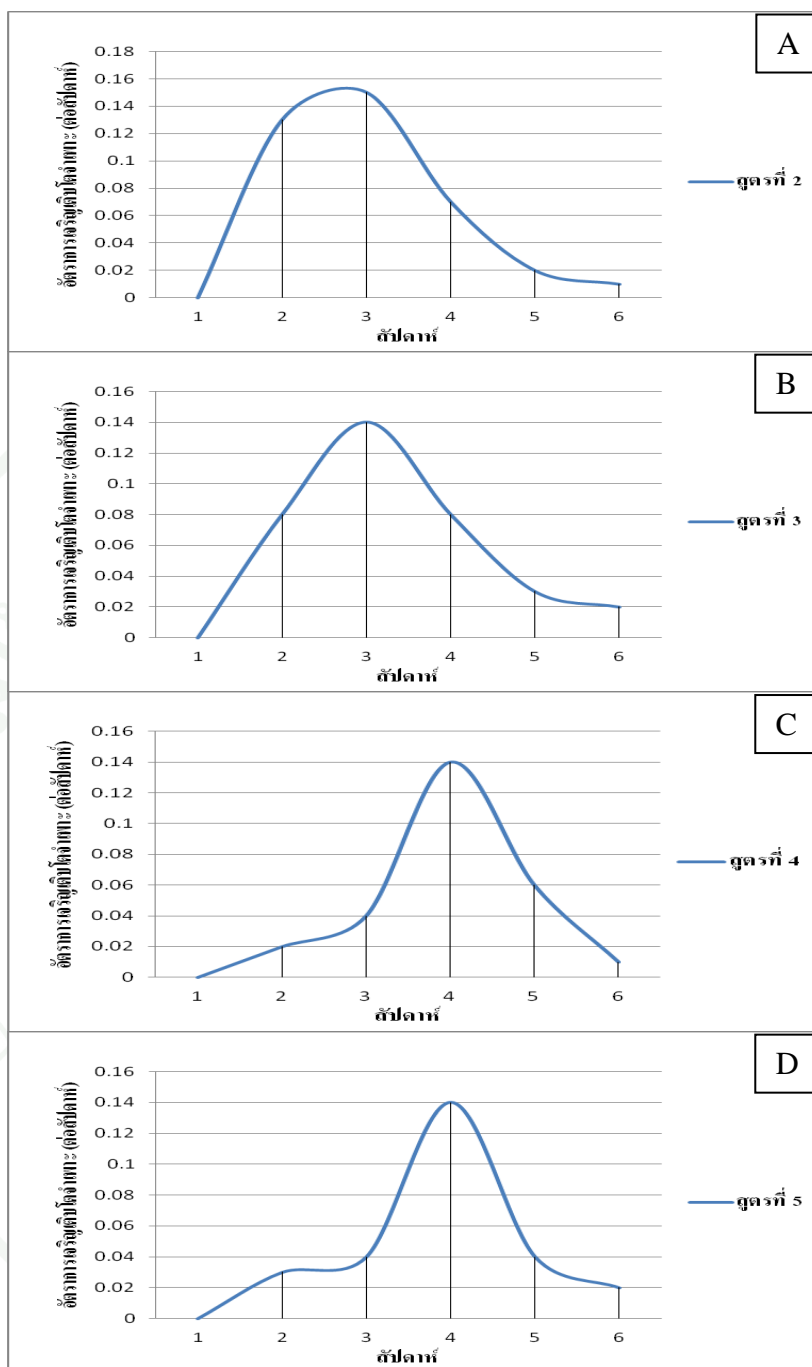
ทรีตเมนต์	NAA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	BA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)					
			สัปดาห์					
			1	2	3	4	5	6
สูตรที่ 2	0	1	2.95 ± 0.15	3.83 ± 1.28	6.09 ± 1.23	8.31 ± 0.63	9.53 ± 1.21	10.67 ± 2.54
สูตรที่ 3	0	2	2.78 ± 0.23	3.32 ± 0.83	5.15 ± 1.29	7.29 ± 0.88	8.50 ± 1.25	9.96 ± 2.29
สูตรที่ 4	0.25	1	2.87 ± 0.18	2.95 ± 0.44	3.32 ± 0.69	6.01 ± 0.61	8.23 ± 0.48	9.25 ± 2.11
สูตรที่ 5	0.25	2	2.82 ± 0.21	3.01 ± 0.86	3.46 ± 1.31	6.27 ± 1.82	8.01 ± 1.69	9.17 ± 1.80



ภาพที่ 14 ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์สควมน้อย (ค่าเฉลี่ย) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

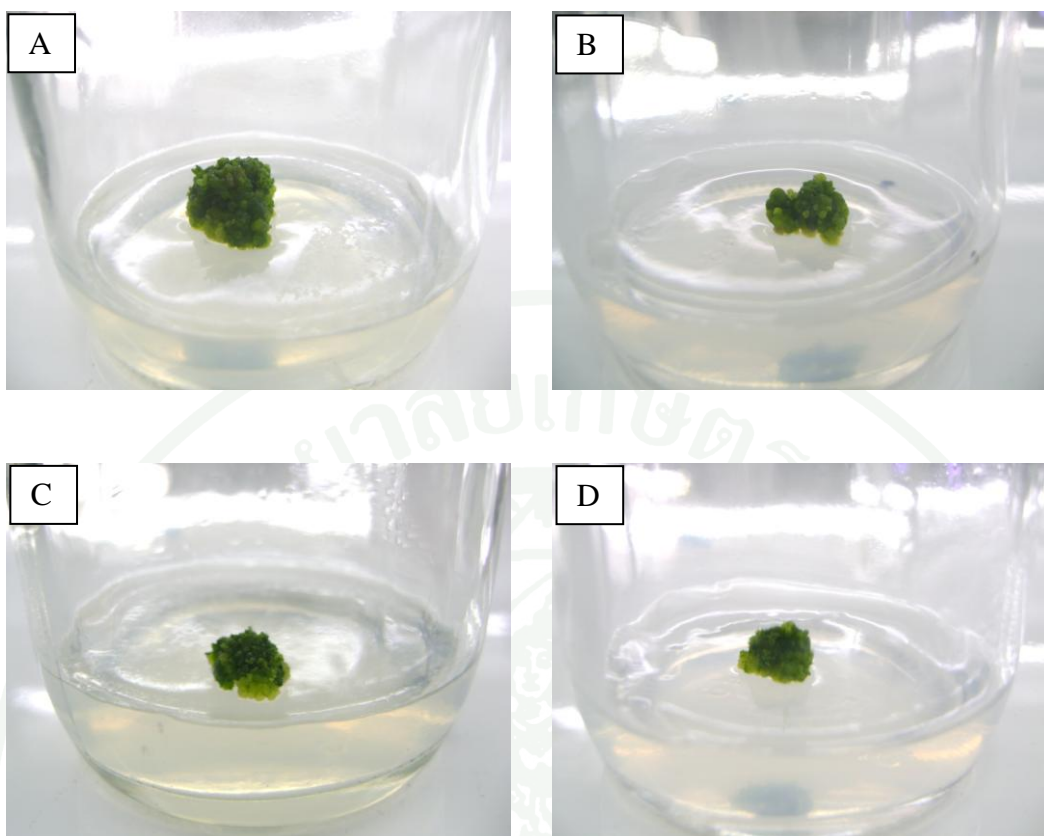
ตารางที่ 6 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สควมน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละช่วงสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	NAA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	BA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อสัปดาห์)					
			สัปดาห์					
			1	2	3	4	5	6
สูตรที่ 2	0	1	0	0.13	0.15	0.07	0.02	0.01
สูตรที่ 3	0	2	0	0.08	0.14	0.08	0.03	0.02
สูตรที่ 4	0.25	1	0	0.02	0.04	0.14	0.06	0.01
สูตรที่ 5	0.25	2	0	0.03	0.04	0.14	0.04	0.02



ภาพที่ 15 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแคลัสต์ดาวน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA และ BA ในแต่ละช่วงสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

- A สูตรที่ 2 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- B สูตรที่ 3 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- C สูตรที่ 4 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
- D สูตรที่ 5 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 16 การเกิดแคลลัสในอาหาร 4 สูตร ในช่วงสัปดาห์ที่แต่ละสูตรอาหารมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด

- A สูตรที่ 2 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
- B สูตรที่ 3 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
- C สูตรที่ 4 MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
- D สูตรที่ 5 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ในการขยายแคลลัสให้ได้ปริมาณมากควรเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์และเปลี่ยนอาหารสังเคราะห์ทุก 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสได้จำนวนมาก หากขยายแคลลัสได้ตามจำนวนที่ต้องการแล้ว สามารถนำแคลลัสไปชักนำไปกระตุ้นอ่อนได้โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้จากการขยายในห้องปฏิบัติการจะเป็นประโยชน์ต่อการใช้เป็นต้นพันธุ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์ ใช้ในการทำเมล็ดเทียม และใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้อีกด้วย

การทดลองที่ 3 การชักนำให้แคลัสของดาวน้อยเจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อน

ผลการศึกษการชักนำให้แคลัสของดาวน้อยเจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อน โดยนำชิ้นส่วนของแคลัสที่ได้จากผลการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ต่างๆกัน 4 สูตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ปรากฏผลการทดลอง ตามตารางที่ 7 ดังนี้

การศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร พบว่า อัตราการเกิดยอดในอาหารสูตรที่ 1 MS และอาหารสูตรที่ 2 ½ MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีอัตราการเกิดยอดสูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 3 MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอด 65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตรที่ 4 ½ MS salt ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 mg/l มีอัตราการเกิดยอด 25 เปอร์เซ็นต์

แคลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆกัน เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยแคลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 มีจำนวนยอดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เฉลี่ย 15.25 ± 3.83 ยอดต่อต้น รองลงมาคือ อาหารสูตรที่ 1 มีจำนวนยอด 9.25 ± 3.00 ยอดต่อต้น ในขณะที่สูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้น 3.38 ± 2.14 และ 2.60 ± 1.51 ยอดต่อต้น ตามลำดับ มีจำนวนใบ 4.44 ± 1.64 , 3.13 ± 0.82 , 4.31 ± 1.10 และ 3.84 ± 0.35 ใบต่อยอด ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า ต้นอ่อนมีจำนวนรากเกิดขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 มีจำนวนรากสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีจำนวนราก 26.00 ± 6.72 รากต่อต้น รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 1 มีรากเกิดขึ้น 10.20 ± 7.00 รากต่อต้น ส่วนอาหารสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ดังภาพที่ 17-20

ต้นอ่อนที่เจริญขึ้นในอาหารสูตรที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ สูตรที่ 1 และ 2 มีความสูงของต้นสูงกว่าอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยต้นอ่อนที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 มีความสูงของต้น 1.39 ± 0.49 , 1.57 ± 0.43 , 0.48 ± 0.21 และ 0.28 ± 0.13 เซนติเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 7 อัตราการเกิดยอด จำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความสูงต้นคาวน้อย (ค่าเฉลี่ย±SD) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	MS	อัตราการเกิดยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอด (ยอด/ต้น)	จำนวนใบ (ใบ/ยอด)	จำนวนราก (ราก/ต้น)	ความสูงต้น (เซนติเมตร)
สูตรที่ 1	MS	100	9.25 ± 3.00 ^b	4.44±1.64	10.20±7.00 ^b	1.39±0.49 ^b
สูตรที่ 2	½ MS	100	15.25 ± 3.83 ^c	3.13±0.82	26.00±6.72 ^c	1.57±0.43 ^b
สูตรที่ 3	MS	65	3.38 ± 2.14 ^a	4.31±1.10	0.00 ± 0.00 ^a	0.48±0.21 ^a
สูตรที่ 4	½ MS	25	2.60 ± 1.51 ^a	3.84±0.35	0.00 ± 0.00 ^a	0.28 ± 0.13 ^a

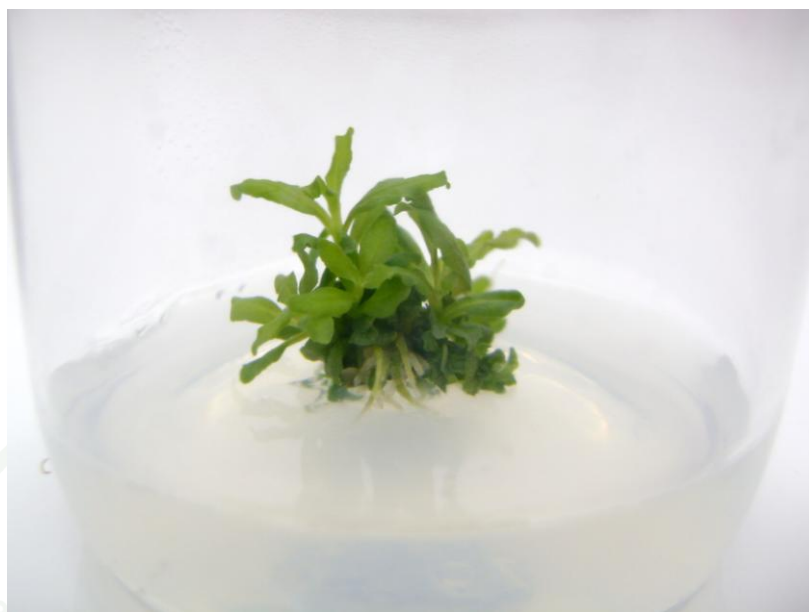
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรต่างกัน ในแนวตั้งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 1 MS

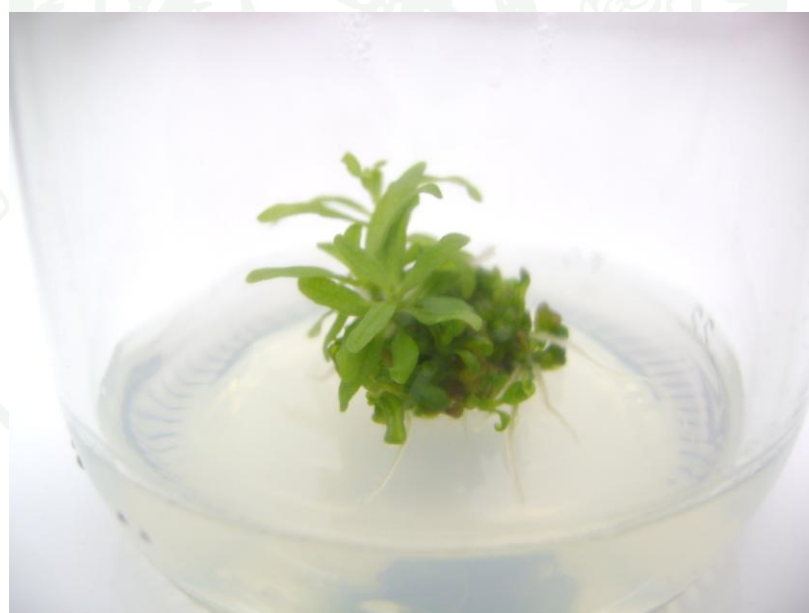
สูตรที่ 2 ½ MS

สูตรที่ 3 MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

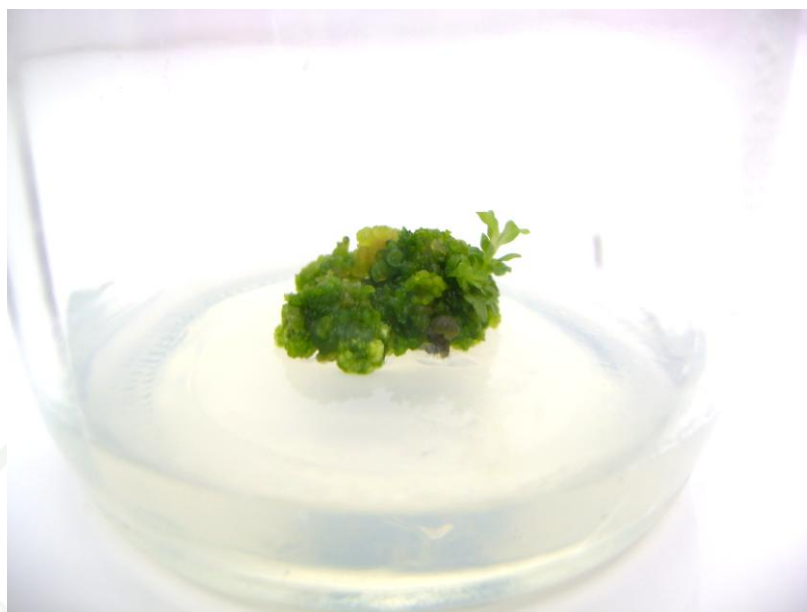
สูตรที่ 4 ½ MS+BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร



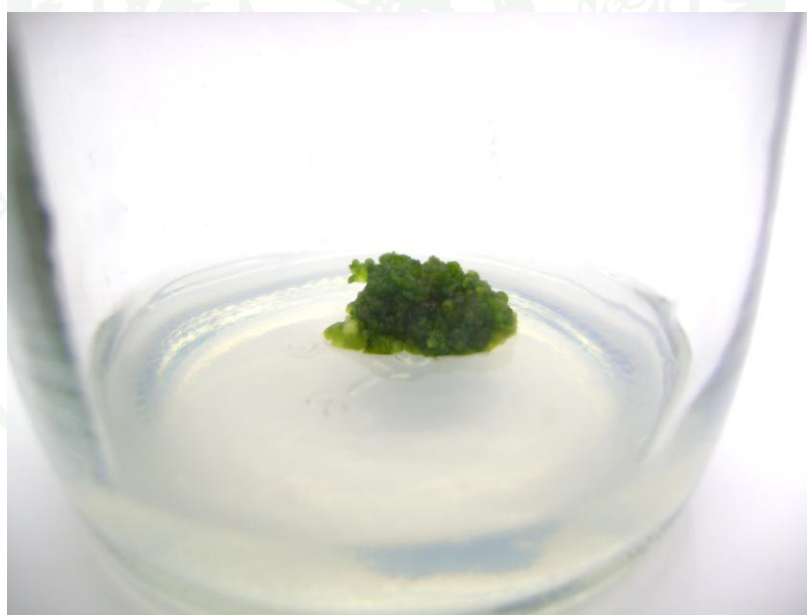
ภาพที่ 17 ต้นอ่อนของควาน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 18 ต้นอ่อนของควาน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 19 ต้นอ่อนของควาน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

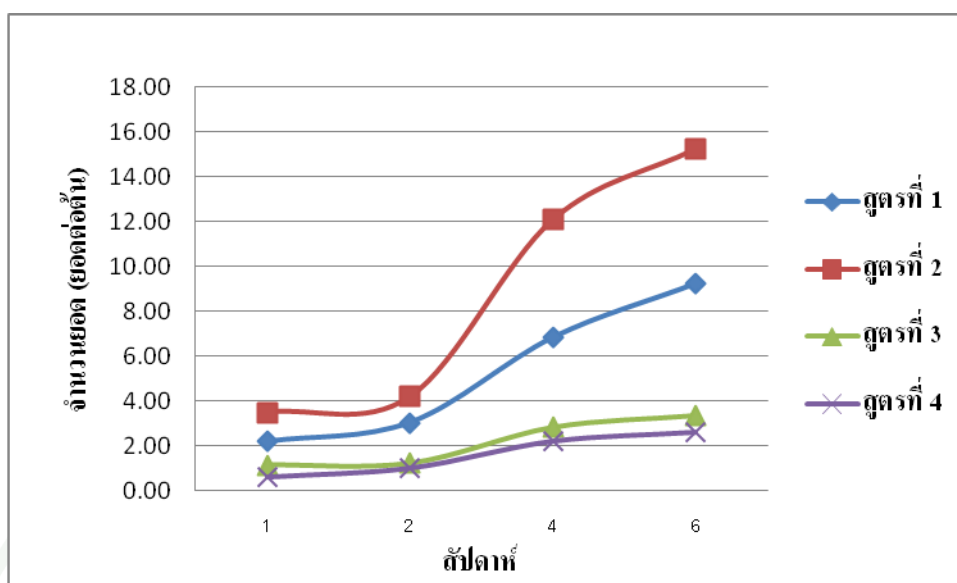


ภาพที่ 20 ต้นอ่อนของควาน้อยเกิดจากการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

การเกิดยอดเฉลี่ยของแต่ละสูตรจะมียอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8 และภาพที่ 21) จากการนำจำนวนยอดเฉลี่ยของดาวน้อย มาคำนวณหาอัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะในช่วงสัปดาห์ที่ 1, 2, 4 และ 6 พบว่า ในอาหารสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีอัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 4 โดยอาหารสูตรที่ 2 มีอัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะสูงที่สุด รองลงมา คือสูตรที่ 3 และสูตรที่ 1 เท่ากับ 0.26, 0.21 และ 0.20 ต่อสัปดาห์ตามลำดับ ส่วนในอาหารสูตรที่ 4 พบว่า มีอัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะสูงในช่วงสัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ 0.25 ต่อสัปดาห์ และในสัปดาห์ถัดไปอัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะจะค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น จากผลดังกล่าวทำให้พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้แคลัสต์เกิดยอดดีที่สุดคือ ช่วงสัปดาห์ที่ 4 แต่ยอดที่ได้เป็นยอดที่มีขนาดเล็กยังไม่เหมาะที่จะนำไปแยกขยายต่อ จึงควรจะต้องไปอีกถึงสัปดาห์ที่ 5 หรือ สัปดาห์ที่ 6 ซึ่งจะทำให้ได้ยอดที่มีขนาดใหญ่ ขยายพันธุ์ได้ดีกว่ายอดที่มีขนาดเล็ก สามารถทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่พร้อมจะนำไปปลูกเลี้ยงในโรงเรือนได้ดีกว่ายอดที่มีขนาดเล็ก เป็นการประหยัดต้นทุนและเวลา ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพสมบูรณ์แข็งแรง (ตารางที่ 9 และภาพที่ 22)

ตารางที่ 8 จำนวนยอด (ค่าเฉลี่ย±SD) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4 และ 6

ทริตเมนต์	MS	จำนวนยอด (ยอดต่อต้น)			
		สัปดาห์			
		1	2	4	6
สูตรที่ 1	MS	2.20 ± 0.95	3.05 ± 0.92	6.85 ± 1.95	9.25 ± 3.00
สูตรที่ 2	½ MS	3.50 ± 1.27	4.20 ± 1.25	12.1 ± 3.56	15.25 ± 3.83
สูตรที่ 3	MS	1.15 ± 1.14	1.23 ± 1.23	2.85 ± 1.81	3.38 ± 2.14
สูตรที่ 4	½ MS	0.60 ± 0.48	1.00 ± 0.63	2.20 ± 0.97	2.60 ± 1.51
หมายเหตุ	สูตรที่ 1	MS			
	สูตรที่ 2	½ MS			
	สูตรที่ 3	MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร			
	สูตรที่ 4	½ MS+BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร			

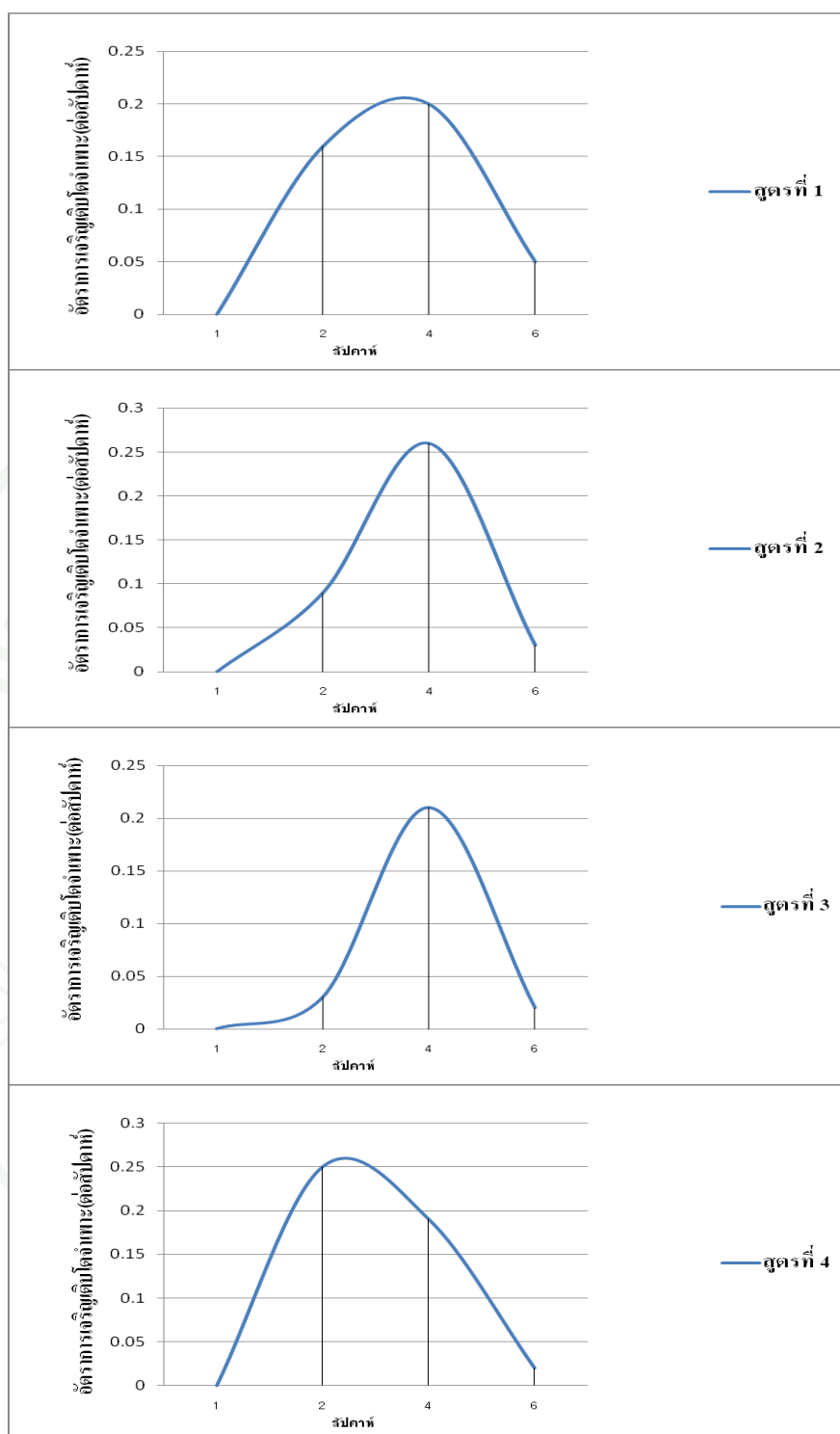


ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนยอคาวน้อย (ค่าเฉลี่ย) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, และ 6

ตารางที่ 9 อัตราการเพิ่มจำนวนยอคาวเฉพาะของคาวน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, และ 6

ทรีตเมนต์	MS	อัตราการเพิ่มจำนวนยอคาวเฉพาะ (ต่อสัปดาห์)			
		สัปดาห์			
		1	2	4	6
สูตรที่ 1	MS	0	0.16	0.20	0.05
สูตรที่ 2	$\frac{1}{2}$ MS	0	0.09	0.26	0.03
สูตรที่ 3	MS	0	0.03	0.21	0.02
สูตรที่ 4	$\frac{1}{2}$ MS	0	0.25	0.19	0.02

หมายเหตุ	สูตรที่ 1	MS
	สูตรที่ 2	$\frac{1}{2}$ MS
	สูตรที่ 3	MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
	สูตรที่ 4	$\frac{1}{2}$ MS+BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 22 อัตราการเพิ่มจำนวนยอดจำเพาะของคาวน้อย ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4 และ 6

จากผลการทดลองเปรียบเทียบอาหารทั้ง 4 สูตร พบว่าอาหารสูตรที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้แคลลัสดาวน์น้อยเกิดต้นอ่อนได้มากที่สุดคือ อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งอาหารสูตรนี้เป็นอาหาร ½ MS ซึ่งในการเจริญเติบโตของดาวน์น้อยในธรรมชาติมักพบตามบริเวณลำธารที่มีน้ำไหลซึ่งมีธาตุอาหารค่อนข้างต่ำ ทำให้การเจริญเติบโตบนอาหารสังเคราะห์อาจไม่ต้องการปริมาณอาหารในระดับที่มีความเข้มข้นสูง ผลจากการทดลองสอดคล้องกับ Cao *et al.* (2006) พบว่า ชิ้นส่วนยอดของต้นวาซาบิ (*Wasabia japonica*) ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าการเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS เช่นเดียวกับการทดลองของ รัฐภัทร์ และคณะ (2553) พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาวในอาหารสูตร ½ MS ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการใช้อาหารสูตร MS และสามารถชักนำให้เกิดใบอ่อนและรากได้มากที่สุด การไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ เลยทำให้ต้นอ่อนของอนุเบียสเกิดรากและมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ ก่อนนำไปปลูกลงในโรงเรือนเพาะชำ (อารดา, 2548) ส่วนอาหารสูตรอื่นๆ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำให้แคลลัสเกิดต้นอ่อนได้ในปริมาณน้อยมาก เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ทั้ง BA และ NAA ที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้ขนาดของแคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น จึงทำให้การเกิดยอดและรากมีปริมาณลดลง ดังนั้นการชักนำให้แคลลัสเกิดต้นอ่อนปริมาณมากควรใช้อาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และต้นพันธุ์ดาวน์น้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะสามารถเพิ่มปริมาณได้ในปริมาณมาก มียอดและรากจำนวนมาก พร้อมทั้งนำไปปลูกลงในโรงเรือนระบบปิด เพื่อปลูกให้ได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการ คือ ความสูง 3-5 เซนติเมตร มียอด 4-5 ยอด เป็นกอสวยงาม ซึ่งเป็นการประหยัดต้นทุนและได้ต้นพันธุ์ที่แข็งแรง ปลอดภัยและมีคุณภาพได้มาตรฐาน เหมาะสมกับความต้องการของตลาด (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ต้นพันธุ์ดาวน์น้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาปลูกเลี้ยงในระบบไร้ดิน เลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน ในโรงเรือนระบบปิด

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

วิธีฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่สุดในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดคือ วิธีที่ 3 ได้แก่การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่า มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดขึ้นใหม่ในสภาพปลอดเชื้อ 88.89 เปอร์เซ็นต์

ผลของการใช้ NAA (Naphthalene acetic acid) และ BA (6-Benzyladenine) ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของคาวน้อย พบว่า การใช้ BA เพียงอย่างเดียวในอัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนคาวน้อยเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอด 85 เปอร์เซ็นต์ และได้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเฉลี่ย 10.67 ± 2.54 เซนติเมตร ส่วนการใช้ NAA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนคาวน้อยเกิดแคลลัสได้ และการใช้ BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนคาวน้อยเกิดแคลลัสได้แต่ขนาดของแคลลัสที่ได้มีขนาดเล็กกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว

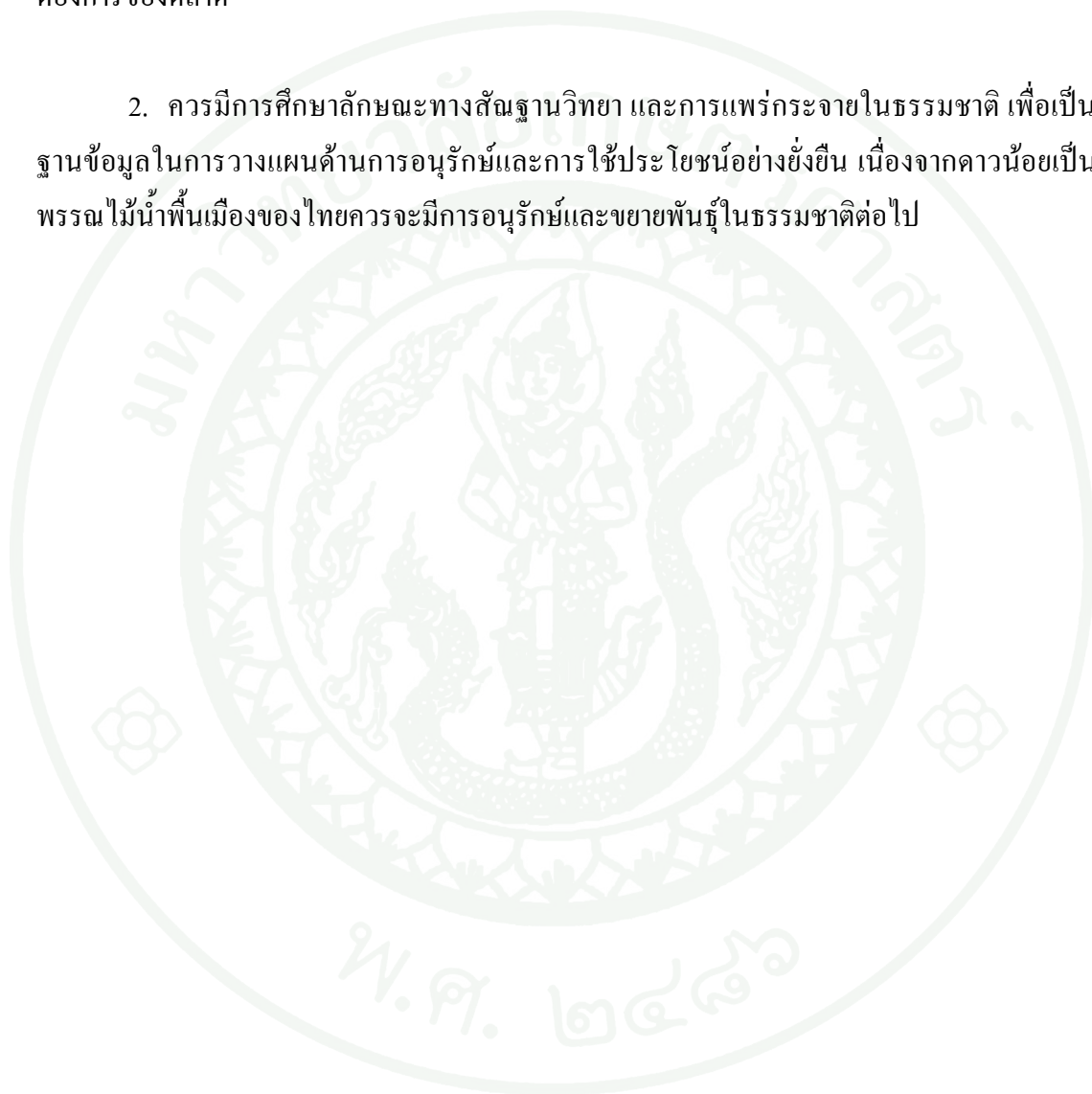
การชักนำให้แคลลัสของคาวน้อยเจริญพัฒนาเกิดขึ้นอ่อน พบว่าอาหารสูตรที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้แคลลัสคาวน้อยเกิดขึ้นอ่อนได้มากที่สุดคือ อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ ได้จำนวนยอดสูงที่สุดเฉลี่ย 15.25 ± 3.83 ยอดต่อชิ้น จำนวนใบเฉลี่ย 3.13 ± 0.82 ใบต่อยอด จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 26.00 ± 6.72 รากต่อต้น และความสูงต้นคาวน้อยเฉลี่ยสูงสุด 1.57 ± 0.43 เซนติเมตร ส่วนอาหารสูตร MS และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดขึ้นอ่อนได้ปริมาณน้อยกว่าการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาวน้อย การชักนำให้ชิ้นส่วนคาวน้อยเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ การใช้ BA ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และการชักนำให้แคลลัสคาวน้อยเกิดขึ้นอ่อนได้ดีที่สุด คือ การเลี้ยงคาวน้อยในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทำให้ได้ต้นคาวน้อยที่มีรากและต้นที่สมบูรณ์ก่อนที่จะนำออกปลูกในโรงเรือนเพาะชำ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการนำต้นพันธุ์ดาวน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปลูกในระบบไร้อิน เพื่อศึกษาสารละลายธาตุอาหารที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ที่ได้มาตรฐานตามความต้องการของตลาด

2. ควรมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการแพร่กระจายในธรรมชาติ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการวางแผนด้านการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน เนื่องจากดาวน้อยเป็นพรรณไม้พื้นเมืองของไทยควรมีการอนุรักษ์และขยายพันธุ์ในธรรมชาติต่อไป



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กาญจนรี พงษ์ฉวี. 2543. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโอบิเลีย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2543. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- กาญจนรี พงษ์ฉวี, พัฒนพงษ์ ชูแสง และวิจารณ์ ทองมีเอียด. 2542. การขยายพันธุ์ผสมหอมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2542. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- กาญจนรี พงษ์ฉวี และณัฐกร ประดิษฐ์สรรพ. 2547. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออานุเบียส (*Anubias nana* Engler, 1899). เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2547. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ, วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และกาญจนา จิรพันธุ์พิพัฒน์. 2552. การเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำสวยงาม. สัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ, วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และวารุณีย์ คันทรง. 2554. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne affinis* Hook. f., 1893, น. 48 - 76. ใน รายงานประจำปี 2553 สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- นงนุช เลาหะวิสุทธิ และมัลลิกา มิตรนอย. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอะโกลนีมา *Aglaonema simplex*. น. 267 - 274. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปิยะดา ตันตสวัสดิ์และอารีย์ วรรณวิวัฒน์. 2551. บทปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โรงพิมพ์ บริษัท เอเจนเทค จำกัด, กรุงเทพฯ.

ปิยะพร แสนสุข และนุชมะณี สุกดี. 2547. อิทธิพลของ NAA และ BA ต่อการเกิดแคลลัสและยอดของผักชีข้าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กัญทิลา อุดร. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวจงกลนี. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภาคภูมิ พระประเสริฐ. 2550. สรีระวิทยาของพืช. โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

รสา หงษ์รัตน์ สุริยา ตันติวิวัฒน์ และมาลี ณ นคร. 2548. การขยายพันธุ์ต้นใบพาย (*Cryptocoryne cordata*) ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, น. 483-490. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรพรพ์. 2550. การปลูกพรรณไม้น้ำโดยไมใช้ดินและการเตรียมสารละลายธาตุอาหาร. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการใช้การปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำโดยไมใช้ดิน. สถาบันวิจัยสัต์ว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง. กรุงเทพฯ.

รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรพรพ์. กาญจนรี พงษ์ณีวิ และวรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2553. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาว *Microsorium pteropus*(Blume) Ching, 1993. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2553. สถาบันวิจัยสัต์ว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, กรมประมง. กรุงเทพฯ.

รังสฤษดิ์ กาวิตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- สมบูรณ์ ศรีนวลชาติ. 2538. อิทธิพลของ 2,4-D, NAA และ 2iP ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฐาน
ต้นของหอมหัวใหญ่พันธุ์ GRANEX 33. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตร
ศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุกัญญา พริกจำรูญ. 2548. คู่มือการเพาะเลี้ยงและส่งออกพรรณไม้น้ำ-ปลาสวยงาม. สำนักพิมพ์
นีออน บুক มีเดีย, นนทบุรี.
- สุรียา ตันติวิวัฒน์, มาลี ณ นคร และนนทนีย์ นุมนวล. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขาไกคาง
(*Hygrophila polysperma* T. And.), น. 560-567. ใน รายงานการ ประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อารดา มณีรัตน์. 2548. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุเบียส
ใบกว้าง (*Anubias barteri var. barteri* Engler). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อรดี สหวัชรินทร์. 2526. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- อรุณี รอดลอย, สุจินต์ หนูขวัญ, วรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และนาฎพดา สุขผล. 2552. พรรณไม้น้ำ
ไทยที่ใช้ประดับตู้ปลาและสวนน้ำ. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ,
สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- Brock, T.G. and P.B. Kaufman. 1991. Growth Regulators : an Account of Hormones and Growth
Regulation, pp. 277-340. In F.G. Steward (ed.) **Plant Physiology : A Tretise. Vol. 10 :
Growth and Development.** Academic Press Inc., London.
- Cao, D.H., K. Johnson, and F. Torpy. 2006. Liquid culture for efficient micropropagation of
Wasabia japonica (Miq.) Matsumura. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 42: 548-552.

- Christensen C., A. Troels and P. Ole. 2008. Hunting for *Pogostemon helferi*. **The Aquatic Gardener** 21(2): 30-41.
- Cook, C.D.K. 1996. **Aquatic Plant Book**. SPB Academic Publishing, Amsterdam.
- Gould, J., M. Devey, O. Hasegawa, E. C. Ulian, G. Peterson and R. H. Smith. 1991. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. **Plant Physiology** 95: 426-434.
- Hembrom M. E., K. P. Martin, S. K. Patchathundika. and J. Madassery. 2006. Rapid *in vitro* production of true-to-type plants of *Pogostemon heyneanus* through dedifferentiated axillary buds. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 42(3) : 283-286.
- Kumaraswamy, M. and M. Anuradha, 2010. Micropropagation of *Pogostemon cablin* Benth. Through Direct Regeneration for Production of True to Type Plants. **Plant Tissue Cult. & Biotech.** 20(1) : 81-89.
- Kyte, L. and J. Kleyn. 1999. **Plants from Test Tube**. Timber press., Inc., Oregon.
- Lakshmanan, P. 1994. *In vitro* establishment and multiplication of *Nymphaea* hybrid 'James Brydon'. **Plant Cell ,Tissue and OrganCulture** 36: 145 - 148.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures **Plant Physiology** 15: 437-497.
- Prasartkul, A. 2004. *Pogostemon* Hook. f. Press (Lamiaceae), eine neue Aquarienpflanze aus Thailand. **Aqua Planta** 29: 143-148.
- Thomas, J. E. 2004. The Patterns Method of Plant Identification. **Botany In A Day**. Herbal Field Guide to Plant Families of North American.

Zaerr, J.B. and M.O. Mapes. 1982. Action of growth regulators, pp. 231 – 255. *In* J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.) **Tissue Culture in Forestry, Vol. 1.** Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.





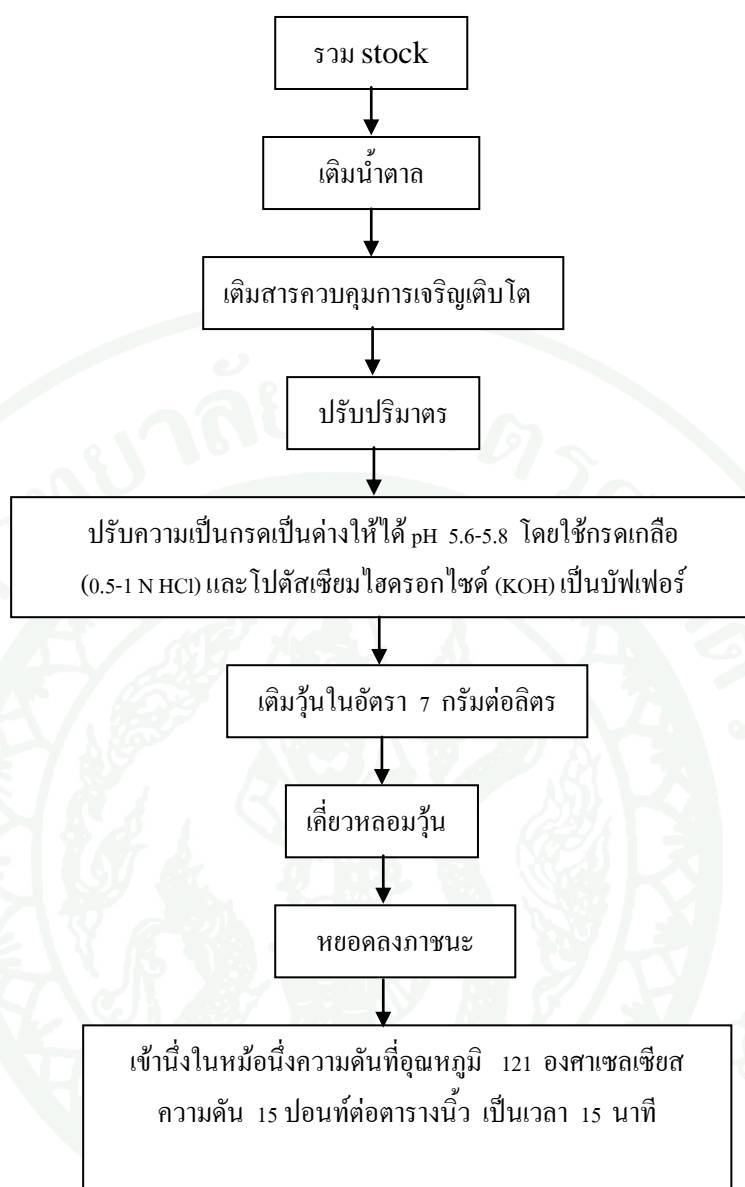
ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ (ml)
1	NH ₄ NO ₃	1,650	20	
	KNO ₃	1,900	20	
	CaCl ₂ •2H ₂ O	440	20	50
	MgSO ₄ •7H ₂ O	370	20	
	KH ₂ PO ₄	170	20	
2	H ₃ BO ₃	6.2	100	
	MnSO ₄ •4H ₂ O	22.3	100	
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	8.6	100	
	KI	0.83	100	10
	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.25	100	
	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.025	100	
	CoCl ₂ •6H ₂ O	0.025	100	
3	Na ₂ EDTA	37.25	100	10
	FeSO ₄ •7H ₂ O	27.85	100	
4	Glycine	2	100	
	Nicotinic acid	0.5	100	
	Pyridoxine HCL	0.5	100	10
	Thiamine HCL	0.1	100	
	Myoinositol	100	100	

ตารางผนวกที่ 2 การเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร ½ MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ (ml)
1	NH ₄ NO ₃	1,650	20	
	KNO ₃	1,900	20	
	CaCl ₂ •2H ₂ O	440	20	25
	MgSO ₄ •7H ₂ O	370	20	
	KH ₂ PO ₄	170	20	
2	H ₃ BO ₃	6.2	100	
	MnSO ₄ •4H ₂ O	22.3	100	
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	8.6	100	
	KI	0.83	100	10
	Na ₂ MoO•2H ₂ O	0.25	100	
	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.025	100	
	CoCl ₂ •6H ₂ O	0.025	100	
3	Na ₂ EDTA	37.25	100	10
	FeSO ₄ •7H ₂ O	27.85	100	
4	Glycine	2	100	
	Nicotinic acid	0.5	100	
	Pyridoxine HCL	0.5	100	10
	Thiamine HCL	0.1	100	
	Myoinositol	100	100	



ภาพผนวกที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	ทิพวรรณ มหาวรรณ
เกิดวันที่	22 มกราคม พ.ศ. 2525
สถานที่เกิด	ลพบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (การจัดการประมง) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล (พ.ศ. 2547)
ตำแหน่งปัจจุบัน	นักจัดการงานทั่วไปปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักงานรัฐมนตรี กระทรวงคมนาคม
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-