

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาการขยายพันธุ์เฟิร์นน้ำเชิงปริมาณเพื่อการส่งออก

Research and Development of Water Ferns Mass propagation for Export

คณะผู้วิจัย

กาญจนา พงษ์วิ¹ ศาสลักษณ์ พรรณศิริ² รัฐภัทร ประดิษฐ์สรรพ¹

¹ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 0 2558 0180

² ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 0 2942 8740 ต่อ 306

บทคัดย่อ

การพัฒนาการขยายพันธุ์เฟิร์นน้ำรากดำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* (Presl) Ching ex. C. Chr. โดยการเก็บรวบรวมต้นพันธุ์จากธรรมชาติมาปลูกเลี้ยงในเรือนเพาะชำจนกระทั่งแตกใบใหม่จึงนำชิ้นส่วนใบอ่อนไปฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จนกระทั่งเกิดต้นอ่อนปลอดเชื้อจึงนำไปอ่อนไปศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเกิดยอด ราก และใบ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 3% วุ้น 0.7% และผงถ่าน (activated charcoal) 0.1% โดยมี 6-Benzyladenine (BA) หรือ kinetin ระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 8 และ 16 μM ร่วมกับ naphthaleneacetic acid (NAA) หรือ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 μM ควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน ทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ จากนั้นทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่เหมาะสมในโรงเรือนที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติระดับความเข้มแสงต่างๆ กันคือ 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 ลักซ์ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA, kinetin, NAA และ 2,4-D มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด และใบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด และใบได้แก่อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่มี BA 2 μM และ 2,4-D 1 μM สามารถชักนำให้เกิดยอด ใบ และรากได้มากที่สุด โดยมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 6.87 ± 1.27 ยอด/ชิ้น มีจำนวนรากเฉลี่ย 6.93 ± 2.12 ราก/ชิ้น และมีจำนวนใบใหม่ที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 10.53 ± 2.41 ใบ/ชิ้น เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่ในโรงเรือนที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติพบว่าระดับความเข้มของแสงที่เหมาะสมมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด ราก และใบคือ 2500 ลักซ์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 6.48 ± 1.62 ยอด/ชิ้น มีจำนวนใบเฉลี่ย 8.63 ± 2.54 ใบ/ชิ้น และมีจำนวนรากเฉลี่ย 9.85 ± 2.79

ราก/ชิ้น เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงขนาด 50 ตารางเมตร ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องปรับอากาศ และให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ มีค่าไฟฟ้า 67,234.21 บาท/ปี ในขณะที่โรงเรือนขนาดพื้นที่เท่ากัน ที่ใช้ evaporative cooling system และให้แสงธรรมชาติ สามารถลดค่าไฟฟ้าลงได้เหลือเพียง 7,291.59 บาท/ปี

คำสำคัญ: เพิร์นน้ำรากดำใบใหญ่, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, สารควบคุมการเจริญเติบโต, ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, โรงเรือนระบบทำความเย็นแบบระเหยน้ำ

Abstract

Research and development of water ferns mass propagation for export was studied. *Bolbitis heteroclita* (Presl) Ching ex. C. Chr. were collected from natural habitats and cultured in the greenhouse. Young leaves were selected for explants tissue, surface disinfested and cultured for 12 weeks on MS tissue culture medium. Leaves produced in vitro were used as explants for study on the effect of plant growth regulators on shoots, roots, and leaves proliferation. Young leaves were cultured for 10 weeks on semi-solid modified MS medium containing 3% sucrose, 0.7 % agar and 0.1% activated charcoal supplemented with 0, 2, 4, 8 and 16 μM BA or kinetin in combination with 0, 1, 2 and 4 μM NAA or 2,4-D under fluorescent light, 12/12 dark/light cycle at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As a comparison to the air-conditioned laboratory conditions, young leaves were also cultured for 10 weeks on semi-solid modified MS medium supplemented with appropriate PGRs in a greenhouse with an evaporative cooling system under natural light of 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 lux to evaluate the effects on shoot and leaves multiplication.

The results indicated that the effects of plant growth regulators, BA, kinetin, NAA and 2,4-D on inducing shoots and leaves were statistically significant ($p < 0.05$). The appropriate medium for inducing shoots and leaves was semi-solid modified MS medium supplemented with 2 μM BA in combination with 1 μM 2,4-D. The average number of shoots, roots and leaves were 6.87 ± 1.27 shoots/piece, 10.53 ± 2.41 leaves/piece, and 6.93 ± 2.12 roots/piece, respectively, after culturing for 10 weeks. Natural light intensity of 2500 lux was appropriate to promote shoots and leaves multiplication. The average number of shoots, roots and leaves were 6.48 ± 1.62 shoots/piece, 8.63 ± 2.54 leaves/piece, and 9.85 ± 2.79 roots/piece, respectively, after culturing in the greenhouse with evaporative cooling system for 10 weeks. Tissue culture in a 50 square-meters culture room with air conditioning and fluorescent lamps has electricity cost of 67,234.21 Baht/year, while the same size greenhouse with evaporative cooling system using natural light has electricity cost of 7,291.59 Baht/year.

Key words: *Bolbitis heteroclita*, tissue culture, plant growth regulators, culture room, greenhouse with evaporative cooling system

บทนำ

เฟิร์นน้ำได้แก่พรรณไม้น้ำในสกุลรากคำใบยาว (*Microsorium*) และ รากคำใบใหญ่ (*Bolbitis*) อยู่ในกลุ่มเฟิร์นที่มีความสวยงาม และสามารถนำไปปลูกยึดเกาะติดกับวัสดุต่างๆ เช่น ขอนไม้หรือก้อนหิน เพื่อนำไปปลูกเลี้ยงประดับในตู้ปลา ปัจจุบันได้รับความนิยมอย่างสูงทั้งตลาดในประเทศ และตลาดต่างประเทศ จัดเป็นสินค้าพรรณไม้น้ำสวยงามที่สำคัญและมีราคาสูง นิยมนำมาประดับตกแต่งตู้ปลาหรือจัดสวนพรรณไม้น้ำ สำหรับรากคำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* (Presl) Ching ex. C. Chr. เป็นพืชพื้นเมืองของไทย อยู่ในวงศ์ Lomariopsidaceae สกุล *Bolbitis* มีเหง้าพอมกลมขนาดเล็ก กว้างประมาณ 1-2 มิลลิเมตร มีสีเขียวทอดขนานยาวไปตามผิวที่เกาะอาศัย เหง้ามีขนหรือเกล็ดสีดำ แตกกิ่งสาขา ก้านใบกลมมีสีเขียวแตกออกจากเหง้า มีเกล็ดหุ้ม ใบเป็นใบเดี่ยวหรือใบประกอบขนนกปลายคี่ แผ่นใบยาว 20-30 เซนติเมตร ใบย่อยแตกเป็นคู่จำนวน 2-3 คู่ ใบย่อยรูปขอบขนาน โคนสอบ ก้านสั้น ปลายแหลมเรียวเป็นติ่ง ขนาดใบย่อย กว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร ปลายติ่งยาว 4-7 เซนติเมตร ขอบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ใบที่ปลายก้านคอดและแหลมเรียวยาว คูคล้ายหาง ยาวประมาณ 50-80 เซนติเมตร บริเวณปลายใบสามารถเกิดต้นอ่อนเป็นต้นใหม่ได้ เส้นใบเป็นร่างแหเห็นได้ชัดเจนทั้งด้านบนและด้านล่าง (รูปที่ 1) ใบสปอร์มีรูปร่างแตกต่างจากใบปกติที่ไม่สร้างสปอร์ ก้านใบยาวกว่าใบปกติ และชูตัวใบตั้งขึ้นสูงกว่าทรงพุ่ม มีใบย่อย 4 คู่ รูปขอบขนาน และพอมเรียวกว่าใบปกติ กลุ่มอับสปอร์เรียงตัวทั่วใต้แผ่นใบย่อย รากคำใบใหญ่ มักพบเจริญอยู่ตามริมลำธารน้ำตก ทั้งบนดินและโขดหินที่มีหินติด ในพื้นที่ป่าดิบชื้น ที่ที่มีความชุ่มชื้นสูง มีการแพร่กระจายในอินเดีย พม่า จีน ไต้หวัน และไทย ฯลฯ นิยมนำมาปลูกเลี้ยงในตู้ปลาสวยงาม (Rataj and Horemán, 1977; Cook, 1996)

ผลผลิตส่วนใหญ่ของเฟิร์นน้ำได้จากการเก็บรวบรวมจากธรรมชาติเพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งออก จนกระทั่งมีปริมาณเหลือน้อยลงมาก แทบไม่ปรากฏในแหล่งธรรมชาติทั่วไป คงเหลืออยู่บ้างไม่มากนักในเขตอุทยานแห่งชาติ หรือป่าสงวน นอกจากนี้ยังแทบไม่มีการเพาะขยายพันธุ์เฟิร์นน้ำในฟาร์ม เนื่องจากการใช้วิธีขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะชำจากต้นแม่ หรือการเพาะสปอร์ต้องควบคุมสภาวะแวดล้อมภายนอกให้มีความชื้นสูง และอุณหภูมิไม่สูงมาก ตลอดจนต้องใช้ระยะเวลามากกว่า 6 เดือนจึงจะได้ต้นอ่อน และมีการสูญเสียของผลผลิตจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เชื้อโรคและ ศัตรูพืช จึงไม่สามารถผลิตในเชิงปริมาณได้ ทำให้ในปัจจุบันมีผลผลิตเฟิร์นน้ำปริมาณน้อย ไม่เพียงพอสำหรับการส่งออก ส่งผลให้เสียโอกาสในการขยายตลาดต่างประเทศ นอกจากนี้ยังมีการนำเข้าเฟิร์นน้ำจากต่างประเทศเพื่อจำหน่ายในตลาดในประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่ยังไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ในฟาร์ม หรือไม่สามารถผลิตได้ในเชิงปริมาณ

การเก็บรวบรวมต้นเฟิร์นน้ำธรรมชาติเพื่อส่งออกยังมีการปนเปื้อนของเชื้อโรคศัตรูพืชมาก จึงเป็นอุปสรรคต่อการส่งออกที่ต้องมีใบรับรองปลอดโรคศัตรูพืช นอกจากนี้การนำต้นอ่อนที่เพาะจากแปลงดินไป

ปลูกต่อในระบบไฮโดรโปนิคส์ยังเสี่ยงต่อการนำเชื้อโรคศัตรูพืชไปแพร่ระบาดในเรือนเพาะชำแบบปิด โดยเฉพาะเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาในปัจจุบันได้เช่นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่า และไส้เดือนฝอยที่เข้าไปในรากและแพร่กระจายในระบบปลูกแบบไฮโดรโปนิคส์ได้อย่างรวดเร็วเนื่องจากการให้ปุ๋ยสารละลายธาตุอาหารในระบบหมุนเวียน ดังนั้นการผลิตต้นอ่อนแบบปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกในปัจจุบัน

อย่างไรก็ตามเนื่องจากเฟิร์นน้ำเป็นพืชในกลุ่มเฟิร์น การเพิ่มจำนวนยอดปริมาณมาก (shoot proliferation) และการชักนำให้เกิดรากเพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นยังเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาการเพาะขยายพันธุ์เฟิร์นน้ำในสกุลรากคำใบใหญ่ (*Bolbitis*) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นทั่วไปต้องใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาวนานจึงจะสามารถเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้ โดยรณรงค์ (2542) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นจากใบอ่อนม้วนที่มีการเจริญแตกใบใหม่และเพิ่มจำนวนต้นได้ในระยะเวลา 3 เดือน นอกจากนี้ยังเกิดรากได้ช้า

เนื้อเยื่อพืชที่แยกมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มีความต้องการธาตุอาหาร และสารที่จำเป็นซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่าความต้องการของพืชทั้งต้น เช่นมีความต้องการวิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) หรือคัพภะ (embryogenesis) ซึ่งพืชมีความต้องการแตกต่างกัน การพัฒนาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนปลอดเชื้อให้ได้ในระยะเวลาอันสั้น

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนที่สำคัญนอกจากค่าอาหารสังเคราะห์แล้ว ยังมีต้นทุนค่าไฟฟ้าที่ใช้สำหรับเครื่องควบคุมอุณหภูมิในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งโดยทั่วไปจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส และค่าไฟฟ้าสำหรับหลอดไฟที่ให้แสงสว่างในชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของพืช โดยทั่วไปจะตั้งเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นอกจากนี้ยังมีค่าหลอดไฟที่มีราคาแพงอีกด้วย

ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาการขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำเชิงปริมาณโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ต้นอ่อนปลอดเชื้อโรคศัตรูพืชของเฟิร์นน้ำ ทั้งสายพันธุ์ไทยและต่างประเทศที่ได้รับความนิยมสูงในตลาดโลก จะทำให้สามารถพัฒนาการผลิตเฟิร์นน้ำเพื่อการส่งออก และตอบสนองต่อความต้องการภายในประเทศ นอกจากนี้การลดต้นทุนการผลิตต้นพันธุ์จะเป็นการเพิ่มศักยภาพการแข่งขันของไทยในตลาดโลก ตลอดจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพรรณไม้น้ำชนิดอื่นๆได้ต่อไป



รูปที่ 1 รากคำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* (Presl) Ching ex. C. Chr.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำ รากคำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* โดยการศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และปริมาณต่างกัน
- 2 เพื่อศึกษาการลดต้นทุนการผลิตต้นพันธุ์เฟิร์นน้ำ รากคำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* โดยการศึกษาเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เฟิร์นน้ำได้แก่พรรณไม้น้ำในสกุลรากคำใบยาว (*Microsorium*) และสกุลรากคำใบใหญ่ (*Bolbitis*) สำหรับสกุล *Bolbitis* เฟิร์นน้ำในสกุลนี้มีลักษณะทั่วไป มีเหง้าพอมกลม เลื้อยสั้น แตกกิ่งสาขา ยอดเหง้ามีขนหรือเกล็ดปกคลุม ก้านใบออกจากเหง้า ไม่มีปุ่มตาที่โคนก้าน ก้านใบกลม ใบมีใบเดี่ยวปกติ หรือใบประกอบขนนก ปลายเดี่ยว มีน้อยมากที่เป็นใบประกอบขนนก 2 ชั้น ใบย่อย อาจมีก้านใบย่อยหรืออาจไม่มี ใบย่อยที่ปลายเป็นรูปสามเหลี่ยม หรืออาจเป็นใบประกอบ ขอบใบย่อยมีทั้งแบบขอบเรียบและหยักซี่ฟัน มีสปอร์เกิดบนใบ ใบสปอร์มีลักษณะแตกต่างจากใบปกติ มีก้านใบยาว ใบประกอบแบบขนนก อับสปอร์กระจายติดกันเป็นพืดอยู่ทั่วหลังใบ ไม่มีเยื่ออินดูเซียม และไม่มีเส้นใยคลุมสปอร์ กระจายพันธุ์อยู่ในเขตร้อน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมาก ในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งนับว่าเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยใช้ชิ้นส่วนของพืชขนาดเล็กเช่น อวัยวะต่างๆ เช่น ชิ้นส่วนยอด ปลายยอด ใบ ราก ดอก หรือเซลล์ นอกจากนี้ต้นที่ได้ยังปราศจากโรค เมื่อนำไปปลูกจึงได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี สม่าเสมอ มีปริมาณที่มากพอตามความต้องการของตลาดทั้งใน และ

ต่างประเทศได้ตลอดปี ตลอดจนใช้เป็นวิธีการเก็บรักษา และรวบรวมพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช การคัดเลือกพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ต้านทานและทนทาน การพัฒนาพันธุ์ใหม่ๆ (Gould *et al.*, 1991; Kyte and Kleyn, 1999)

การเลือกชนิดของเนื้อเยื่อพืชมาเลี้ยง ขึ้นกับจุดประสงค์ของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งแบ่งได้เป็นการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์, เพื่อการปรับปรุงพันธุ์, เพื่อผลิตต้นที่ปราศจากโรค และเก็บรักษาพันธุ์ การเลือกชนิดเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์จะต้องเลือกเนื้อเยื่อที่ปกติตรงตามพันธุ์โดยไม่มีการแปรปรวนใดๆ เกิดขึ้น โดยหลักทั่วไปเซลล์ของพืชจะมีการแบ่งตัวได้ก็ต่อเมื่อกลายเป็น meristematic cells ฉะนั้นการเลือกเนื้อเยื่อที่มีเซลล์เป็นแบบ meristematic cells มาเลี้ยง จะมีโอกาสสำเร็จได้มาก นอกจากนี้การเลือกใช้เนื้อเยื่อที่ยังอยู่ในระยะวัยอ่อน ซึ่งยังมี meristematic cells อยู่ ย่อมมีโอกาสสำเร็จได้ดีกว่าการเลือกเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะแก่หรือเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงแล้ว (ไพบลีย์, 2524) ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน (auxins) เช่น indole-3-acetic acid (IAA) และ naphthaleneacetic acid (NAA) เป็นต้น สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) เช่น N_6 -Benzyladenine (BA), kinetin และ N_6 -isopentenyl adenine (2-iP) เป็นต้น สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น gibberellic acid (รังสฤษฎี, 2540; Brock and Kaufman, 1991)

ออกซินเป็นกลุ่มของสารที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์และการเกิดราก ฮอร์โมนกลุ่มนี้ที่พืชสร้างขึ้นได้เอง คือ IAA โดยมีมากบริเวณปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญ บางครั้งจึงไม่มีความจำเป็นต้องใส่สารในกลุ่มนี้ ออกซินมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถกระตุ้นการเกิดรากและการเจริญของราก สารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้ในการเร่งราก คือ NAA และ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) อย่างไรก็ตามการใช้ออกซินความเข้มข้นสูงมักจะก่อให้เกิดความเป็นพิษกับพืช เช่น ใบร่วง และต้นชะงักการเจริญเติบโตจนอาจตายได้ นอกจากนี้มีหลายการทดลองที่พบว่าออกซินมีผลกระตุ้นให้เกิดรากในระยะเริ่มแรก แต่จากนั้นจะมีผลขัดขวางการเจริญพัฒนาของราก (Klerk, et al., 1990) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ออกซินในระดับความเข้มข้นที่สูง (Conner and Falloon, 1993)

สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินจะส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การเกิดยอด และกระตุ้นการแตกตาข้าง มีประโยชน์ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก โดยไซโตไคนินไปช่วยกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว เร่งให้เนื้อเยื่อพืชเจริญไปเป็นยอดและต้น สารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้ได้แก่ BA, kinetin, zeatin และ 2-iP โดยทั่วไปแล้วควรใช้ไซโตไคนินในอัตรา 0.5-30 มิลลิกรัม/ลิตร (McGaw, 1987; Brock and Kaufman, 1991; Smith, 1992)

ขั้นตอนสำคัญซึ่งจะทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จขึ้นอยู่กับความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนปริมาณมาก โดยการใช้ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และการควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เพื่อผลิตต้นอ่อนที่ปลอดเชื้อได้ในเชิงปริมาณ จะทำให้ได้ต้นพันธุ์คุณภาพสูงปริมาณมาก โดยใช้ระยะเวลาที่สั้นลงกว่าการเพาะขยายพันธุ์ด้วยวิธีปกติ ได้ผลผลิตที่มีความสม่ำเสมอ

และคงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เนื่องจากการขยายพันธุ์โดยใช้เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ทำให้มีสารพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ (รังศฤษฎี, 2540; Gamborg and Phillips, 1995; Trigiano and Gray, 2000)

กาญจนรี และคณะ (2542) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพมหอม (*Cryptocoryne tonkinensis*) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และกาญจนรี (2543) รายงานว่าสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดของโลบีเลีย *Lobellia cardinalis* เกิดยอดและมีการเจริญเติบโตสูงเมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี NAA 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมียอดเฉลี่ย 45 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอนุเบยส *Anubias nana* พบว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียวมีผลชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้มากที่สุด โดยการใช้ BA 8.0 ไมโครโมลลาร์ สามารถชักนำให้ต้นอ่อนเฉลี่ย 6.80 ± 0.79 ต้น ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่การเติม NAA มีผลลดประสิทธิภาพของ BA ในการกระตุ้นให้อนุเบยสเกิดยอด (กาญจนรี และ ณฐกร, 2547) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพาย *Cryptocoryne affinis* พบว่าสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมได้แก่อาหารสูตร MS ที่มี BA ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และจิบเบอเรลลิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 7.90 ± 2.41 ยอด ต่อชิ้นเนื้อเยื่อ มีรากเกิดขึ้นเฉลี่ย 11.30 ± 1.49 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ใบเกิดขึ้นเฉลี่ย 31.65 ± 11.49 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (กาญจนรี และคณะ, 2551)

วันเพ็ญ (2547) รายงานว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 4.0 ไมโครโมลลาร์ ร่วมกับ NAA 1.0 ไมโครโมลลาร์ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนแดง *Cryptocoryne blassii* สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดสูงสุด มีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.90 ± 0.87 ยอดต่อชิ้น ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพรรณไม้น้ำแอมมานีย *Ammannia senegalensis* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อมากกว่าที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 2 เดือน ส่วนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดรากมากที่สุด คืออาหารสูตร MS ที่ไม่เติม IBA (ลักขณา, 2545)

Lakshmanan (1994) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวลูกผสม *Nymphaea hybrid* "James Brydon" โดยใช้ชิ้นส่วนยอดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA, NAA, 2,4-D, BA และ 2iP อัตราความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 11.1 μM + 2-iP ความเข้มข้น 32 μM + NAA ความเข้มข้น 4.0 μM รวมกันทำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 2.8 ยอด ภายในเวลา 45 วัน Agrawal and Ram (1995) รายงานว่าศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระเจี๊ยบบนอาหารสังเคราะห์สูตร NBL (Nitsch's basal liquid medium) โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินต่างๆ กัน ได้แก่ BA kinetin และ 2-iP พบว่า BA มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการชักนำให้เนื้อเยื่อกระเจี๊ยบเจริญพัฒนาเกิดยอดจำนวนมาก

สำหรับการขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำในกลุ่มเฟิร์นนั้น ขยายพันธุ์โดยใช้ใบ หรือสปอร์ที่เกิดอยู่ใต้ใบนำไปเพาะบนวัสดุปลูกที่มีความชื้นสูงเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน จะเกิดโปรแทรกเลียม (กาญจนรี และคณะ, 2551) อย่างไรก็ตามเมื่อแยกโปรแทรกเลียมไปเพาะชำต่อในที่มีความชื้นสูงแล้วต้องใช้เวลาเนิ่นนานมากกว่า 3 เดือน จึงจะเกิดใบและต้นอ่อน รรรอง (2542) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นจากชิ้นส่วนปลาย

ใบเฟิร์นในระยะใบอ่อนม้วนฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยคลอโรกซ์ 10% และ 5 % เป็นเวลาครั้งละ 10 นาที เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าเนื้อเยื่อมีการเจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อนภายในระยะเวลา 3 เดือน

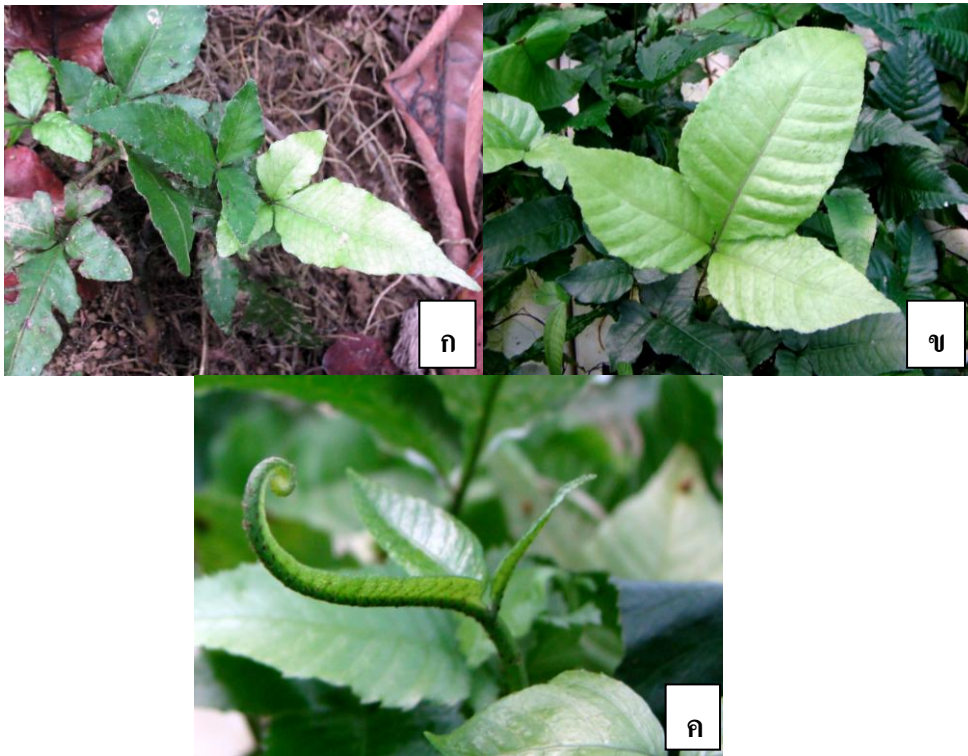
ระดับความเข้มของแสงมีผลต่อการเกิดยอดและรากของพืช เนื่องจากแสงมีความสำคัญต่อกระบวนการเจริญพัฒนาเกิดต้นของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Seibert *et. al.*, 1975; Reuveni and Evenor, 2007) โดยมีอิทธิพลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทั้งนี้แสงเกี่ยวข้องกับ Glyoxalase I activity ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของพืช นอกจากนี้ยังพบว่าแสงมีอิทธิพลมากกว่าฮอร์โมนพืชในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Chakravarty and Sopory, 1998) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เยอบีร่าที่พบว่าความเข้มของแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มจำนวนต้นของเยอบีร่า ถ้าความเข้มของแสงเพิ่มเป็น 3,000 ลักซ์ จะไปยับยั้งการเกิดต้น (บุญยืน, 2544) โดยทั่วไปความเข้มของแสงสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 1000-5000 ลักซ์ (Hussey, 1980) นอกจากนี้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงความเข้มของแสงมากจะช่วยกระตุ้นการเกิดรากและทำให้พืชแข็งแรง ระดับความเข้มแสงที่สูงจะมีผลต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นภายในภาชนะเพาะเลี้ยงซึ่งอาจมีผลต่อการขาดน้ำของพืช โดยจะพบลักษณะอาการใบเหี่ยว การเปลี่ยนสีเป็นสีแดงบริเวณหลังใบ ความเข้มของแสงที่สูงมากอาจทำให้พืชเจริญเติบโตช้า แต่เมื่อนำออกปลูกแล้วการอยู่รอดได้ดีกว่าต้นที่มีสีเขียวที่ขึ้นยึดอยู่ในสภาพความเข้มแสงต่ำ (Murashige, 1977)

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

ก. การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำรากดำใบใหญ่

1. การเตรียมต้นพันธุ์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำรากดำใบใหญ่

ทำการเก็บรวบรวมต้นพันธุ์รากดำใบใหญ่, *Bolbitis heteroclita* จากแหล่งธรรมชาติ นำมาปลูกเลี้ยงในเรือนเพาะชำแบบปิด (Greenhouse) จนกระทั่งมีการเจริญเติบโตแตกใบอ่อนจึงนำชิ้นส่วนใบอ่อนของรากดำใบใหญ่ที่แตกขึ้นใหม่ (รูปที่ 2) ไปทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามวิธีในกาญจนรีและคณะ (2551) โดยการแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ (Clorox) 4% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) 0.1% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำไปตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กในตู้ปลอดเชื้อแล้วนำลงเลี้ยงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่มี น้ำตาลซูโครส 3% วุ้น 0.7% และผงถ่าน (activated charcoal) 0.1% เลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน ต้นอ่อนปลอดเชื้อมีการเจริญเติบโตขึ้นมาจากชิ้นส่วนของใบอ่อนเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 3) จึงนำไปทดลองสูตรอาหารต่อไป



รูปที่ 2 รากคำใบใหญ่ในธรรมชาติบริเวณริมฝั่งคลองเตรียม จังหวัดพังงา (ก), ต้นพันธุ์รากคำใบใหญ่ที่นำมาปลูกเลี้ยงในเรือนเพาะชำ (ข), ใบอ่อนแตกใหม่ของรากคำใบใหญ่ที่นำมาฟอกมาเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ค)



รูปที่ 3 ต้นอ่อนปลอดเชื้อของรากคำใบใหญ่ที่เจริญขึ้นจากชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

2. การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน เพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน และเพิ่มปริมาณต้นในสภาพปลอดเชื้อ

วางแผนการทดลองแบบ 5x4 factorial design in CRD ศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัย ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเฟิร์นน้ำ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ โดยปัจจัย A ได้แก่ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน 2 ชนิด คือไคเนติน (kinetin) หรือ BA (N_6 -Benzyladenine) ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 5 ระดับ คือ 0, 2, 4, 8 และ 16 μM ปัจจัย B ได้แก่สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 2 ชนิด คือ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) และ NAA (1-Naphthaleneacetic acid) ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 4 μM โดยใส่ชิ้นส่วนปลายใบของรากดำใบใหญ่เลี้ยงบนอาหารทดลองขวดละ 2 ชิ้น ชุดการทดลอง (treatment combination) ละ 30 ซ้ำ (30 ขวด) ตามแผนการทดลองดังนี้

Kinetin/BA (μM)	NAA/2,4-D (μM)			
	0	1	2	4
0	a1b1	a1b2	a1b3	a1b4
2	a2b1	a2b2	a2b3	a2b4
4	a3b1	a3b2	a3b3	a3b4
8	a4b1	a4b2	a4b3	a4b4
16	a5b1	a5b2	a5b3	a5b4

นำชิ้นส่วนของใบอ่อนปลอดเชื้อมาทดลองเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และปริมาณต่าง ๆ กันตามแผนการวิจัยข้างต้น นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1000-2000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญพัฒนา อัตรารอด จำนวนยอดที่เกิดขึ้น จำนวนใบ และจำนวนรากที่เกิดขึ้น

นำผลที่ได้ไปทดสอบอิทธิพลของ 2 ปัจจัย และ ปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง 2 ปัจจัย โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง Two Ways Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ข. การศึกษาการลดต้นทุนการผลิตพันธุ์เฟิร์นน้ำโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ

1. การพัฒนาระบบห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปรับปรุงโรงเรือนเพาะชำพรรณไม้น้ำบางส่วนของสถาบันวิจัยสัณฐานน้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำเป็นห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการติดตั้ง evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ ควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติโดยให้ระบบ evaporative cooling ทำงานพร้อมกับพัดลมเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 26 ± 2 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเลี้ยงในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ โดยมีการพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสงเพื่อให้มีความเข้มของแสงต่างๆ กัน 5 ระดับ คือประมาณ 1000, 1500, 2000, 2500 และ 3000 ลักซ์ นำชิ้นส่วนใบอ่อน เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ ก. โดยใส่ชิ้นส่วนปลายใบอ่อนขนาด 2 ซม. การทดลองละ 30 ซ้ำ (30 ขวด) เลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญพัฒนา อัตรารอดจำนวนยอด จำนวนราก และจำนวนใบ

นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

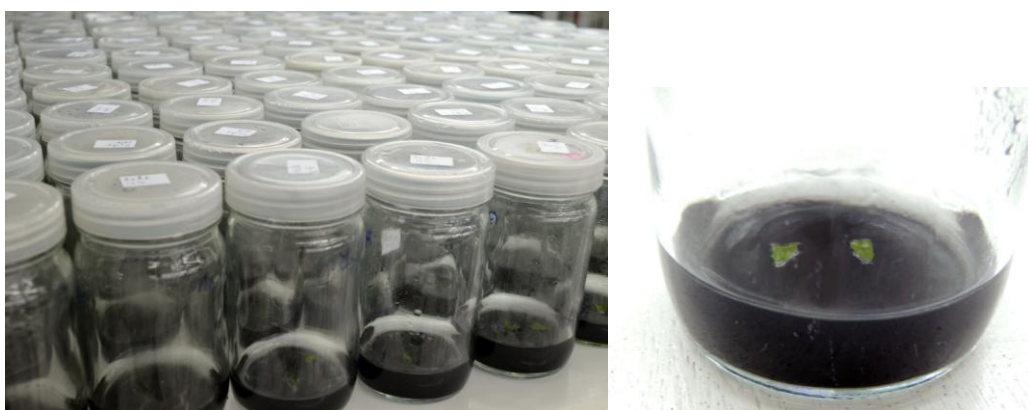
ก. ผลการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำรากดำใบใหญ่

1. ผลของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA

ผลการนำชิ้นส่วนปลายใบอ่อนที่ปลอดเชื้อของรากดำใบใหญ่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ซึ่งประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (รูปที่ 4) เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ปรากฏว่าชิ้นเนื้อเยื่อมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกชุดการทดลอง และไม่มีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง 2 ปัจจัย ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดยอด ($p > 0.05$) (ตารางผนวกที่ 1) ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่าง BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่า BA และ NAA มีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณยอดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดย BA มีผลชักนำให้เกิดยอดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากตารางที่ 1 พบว่า BA 2 และ 4 μM มีผลชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มี BA อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA สูงกว่า 4 μM ปรากฏว่าการเกิดยอดมีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 5) โดย BA 0 และ 16 μM มีผลชักนำให้เกิดยอดได้ใกล้เคียงกัน

($p>0.05$) และมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) สำหรับผลของ NAA พบว่ามีผลชักนำให้เกิดยอดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดย NAA 2 และ 4 μM มีผลชักนำให้เกิดยอดได้ใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) และสูงกว่า NAA 0 และ 1 μM อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามทุกชุดการทดลองมีอัตราการเกิดยอด 100 %

ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ BA 2 และ 4 μM ร่วมกับ NAA 2 และ 4 μM โดยผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่จากชิ้นส่วนปลายใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA 2 μM และ NAA 2 μM มียอดเกิดขึ้นเฉลี่ย 6.45 ± 1.32 ยอด เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

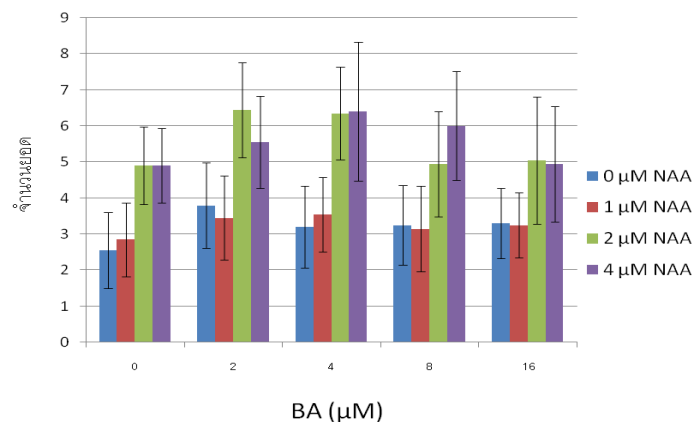


รูปที่ 4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่จากชิ้นส่วนของปลายใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนปลายใบอ่อนของรากคำใบใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

BA (μM)	NAA (μM)				Mean $\pm$ SD
	0	1	2	4	
0	2.55 ± 1.06	2.85 ± 1.02	4.90 ± 1.07	4.90 ± 1.04	3.80 ± 2.62^a
2	3.80 ± 1.19	3.45 ± 1.16	6.45 ± 1.32	5.55 ± 1.27	4.81 ± 2.02^b
4	3.20 ± 1.14	3.55 ± 1.03	6.35 ± 1.29	6.40 ± 1.92	4.87 ± 2.87^b
8	3.25 ± 1.11	3.15 ± 1.18	4.95 ± 1.46	6.00 ± 1.51	4.34 ± 2.03^{ab}
16	3.30 ± 0.97	3.25 ± 0.91	5.05 ± 1.76	4.95 ± 1.60	4.14 ± 1.90^a
Mean $\pm$ SD	3.22 ± 1.38^a	3.25 ± 1.67^a	5.54 ± 2.51^b	5.56 ± 2.40^b	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวนอนหรือแนวตั้งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5 จำนวนยอด (Mean $\pm$ SD) ของรากคำใบใหญ่ ที่เจริญขึ้นบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

สำหรับผลของ BA และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดรากนั้นพบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ BA และ NAA ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดราก (ตารางผนวกที่ 2) ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่าง BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดราก ($p>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง BA และ NAA ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก โดยรากดำใบใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างกันทุกชุดการทดลอง มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 2) รากดำใบใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่มียอดเกิดขึ้นมากที่สุดคือ BA 2 μM และ NAA 2 μM มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 6.15 ± 4.59 ราก เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ตารางที่ 2 จำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบอ่อนของรากดำใบใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

BA (μM)	NAA (μM)				Mean $\pm$ SD
	0	1	2	4	
0	6.60 ± 3.47	5.45 ± 2.72	9.80 ± 3.75	5.07 ± 3.61	$6.73 \pm 3.83^{\text{ns}}$
2	4.90 ± 3.17	5.50 ± 1.96	6.15 ± 4.59	6.35 ± 3.89	$5.72 \pm 3.52^{\text{ns}}$
4	6.30 ± 3.29	5.95 ± 2.76	5.75 ± 3.32	5.95 ± 4.92	$5.98 \pm 3.60^{\text{ns}}$
8	4.65 ± 3.77	4.60 ± 1.81	5.95 ± 3.70	6.05 ± 3.81	$5.31 \pm 3.39^{\text{ns}}$
16	6.50 ± 3.23	6.10 ± 3.61	5.95 ± 3.59	5.25 ± 4.17	$5.95 \pm 3.62^{\text{ns}}$
Mean $\pm$ SD	$5.79 \pm 3.43^{\text{ns}}$	$5.52 \pm 2.65^{\text{ns}}$	$6.72 \pm 4.04^{\text{ns}}$	$5.73 \pm 4.05^{\text{ns}}$	

หมายเหตุ ^{ns} มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

ผลของ BA และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดใบพบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ BA และ NAA ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดใบใหม่ของรากดำใบใหญ่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างกัน (ตารางผนวกที่ 3) ดังนั้นจึงมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง BA และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดใบใหม่ ($p>0.05$) จึงได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง (treatment combinations) พบว่ารากดำใบใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่มี NAA 2 μM ร่วมกับ BA 2 μM มีการเกิดใบใหม่ได้สูงที่สุด ($p<0.05$) เฉลี่ย 11.70 ± 3.06 ใบ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบจำนวนใบใหม่เฉลี่ยที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

BA (μ M) : NAA (μ M)	จำนวนใบ (Mean $\pm$ SD)
0 : 0	7.45 $\pm$ 1.98 ^{abcd}
0 : 1	7.40 $\pm$ 2.90 ^{abcd}
0 : 2	11.05 $\pm$ 3.06 ^{de}
0 : 4	7.15 $\pm$ 3.88 ^{abcd}
2 : 0	7.80 $\pm$ 3.84 ^{abcd}
2 : 1	8.70 $\pm$ 2.27 ^{cde}
2 : 2	11.70 $\pm$ 3.06 ^e
2 : 4	11.15 $\pm$ 4.04 ^{de}
4 : 0	7.60 $\pm$ 2.93 ^{abcd}
4 : 1	8.85 $\pm$ 3.45 ^{cde}
4 : 2	6.50 $\pm$ 2.19 ^{abc}
4 : 4	7.25 $\pm$ 3.71 ^{abcd}
8 : 0	8.35 $\pm$ 3.57 ^{bcd}
8 : 1	8.40 $\pm$ 3.37 ^{bcd}
8 : 2	7.05 $\pm$ 2.64 ^{abcd}
8 : 4	6.85 $\pm$ 2.60 ^{abc}
16 : 0	5.95 $\pm$ 1.93 ^{ab}
16 : 1	5.45 $\pm$ 2.16 ^a
16 : 2	8.20 $\pm$ 3.34 ^{bcd}
16 : 4	7.90 $\pm$ 3.82 ^{bcd}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดและใบได้มากที่สุดคือ BA 2 μ M ร่วมกับ NAA 2 μ M มียอดเกิดขึ้นเฉลี่ย 6.45 ± 1.32 ยอด มีจำนวนใบเฉลี่ย 11.70 ± 3.06 ใบ และมีจำนวนรากเฉลี่ย 6.15 ± 4.59 ราก เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ต้นอ่อนรากคำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่มี BA 2 μ M + NAA 2 μ M เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

2. ผลของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ร่วมกับ NAA

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบอ่อนของรากคำใบใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่ามีอัตรารอด 100% ทุกชุดการทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ kinetin และ NAA ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดยอด (ตารางผนวกที่ 4) ดังนั้นจึงมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง kinetin และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ ($p < 0.05$) จึงได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองปรากฏว่าชุดการทดลองที่มีการเกิดยอดได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ได้แก่ชุดการทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin 8 μ M+NAA 0 μ M, kinetin 8+NAA 1 μ M และ kinetin 16 μ M+NAA 1 μ M โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวน 5.00 ± 1.53 , 5.20 ± 2.80 และ 5.35 ± 2.39 ยอด ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ตารางที่ 4, รูปที่ 7)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบจำนวนยอดเฉลี่ยของรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

kinetin : NAA (μM)	จำนวนยอด (Mean $\pm$ SD)
0 : 0	2.85 ± 0.34^{bc}
0 : 1	2.70 ± 0.34^{bc}
0 : 2	3.10 ± 1.74^c
0 : 4	4.40 ± 1.30^{de}
2 : 0	2.90 ± 0.58^{bc}
2 : 1	2.30 ± 0.45^{abc}
2 : 2	4.45 ± 2.18^{de}
2 : 4	4.80 ± 2.89^{de}
4 : 0	1.95 ± 0.73^{ab}
4 : 1	1.95 ± 0.60^{ab}
4 : 2	2.10 ± 0.68^{ab}
4 : 4	2.45 ± 0.63^{abc}
8 : 0	5.00 ± 1.53^e
8 : 1	5.20 ± 2.80^e
8 : 2	1.15 ± 0.58^a
8 : 4	1.55 ± 0.15^a
16 : 0	4.40 ± 2.13^{de}
16 : 1	5.35 ± 2.39^e
16 : 2	2.30 ± 0.18^{abc}
16 : 4	2.40 ± 0.39^{abc}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

สำหรับผลของ kinetin และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดรากนั้นพบว่า kinetin และ NAA มีผลต่อการเกิดรากของรากดำใบใหญ่โดยพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ kinetin และ NAA ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดรากของรากดำใบใหญ่ (ตารางผนวกที่ 5) ดังนั้นจึงมีอิทธิพลร่วมระหว่าง kinetin

และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดราก ($p < 0.05$) จึงได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin 0 μM + NAA 2 μM มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 7.25 ± 4.22 ราก (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

kinetin (μM) : NAA (μM)	จำนวนราก (Mean $\pm$ SD)
0 : 0	$5.30 \pm 2.00^{\text{cd}}$
0 : 1	$5.95 \pm 1.79^{\text{cd}}$
0 : 2	$7.25 \pm 4.22^{\text{e}}$
0 : 4	$6.20 \pm 5.80^{\text{cde}}$
2 : 0	$3.95 \pm 2.08^{\text{bc}}$
2 : 1	$5.55 \pm 3.18^{\text{cd}}$
2 : 2	$6.45 \pm 4.17^{\text{de}}$
2 : 4	$5.55 \pm 3.17^{\text{cd}}$
4 : 0	$5.15 \pm 2.25^{\text{cd}}$
4 : 1	$3.60 \pm 1.46^{\text{b}}$
4 : 2	$3.95 \pm 3.03^{\text{bc}}$
4 : 4	$5.70 \pm 2.65^{\text{cd}}$
8 : 0	$6.35 \pm 8.29^{\text{cde}}$
8 : 1	$4.65 \pm 4.01^{\text{c}}$
8 : 2	$1.15 \pm 1.50^{\text{a}}$
8 : 4	$1.50 \pm 1.79^{\text{a}}$
16 : 0	$5.65 \pm 4.05^{\text{cd}}$
16 : 1	$6.70 \pm 3.86^{\text{de}}$
16 : 2	$6.45 \pm 3.03^{\text{de}}$
16 : 4	$7.05 \pm 3.47^{\text{e}}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง kinetin และ NAA ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดใบ (ตารางผนวกที่ 6) ดังนั้นจึงมีอิทธิพลร่วมระหว่าง kinetin และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดใบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จึงได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin 0 μM + NAA 1 μM มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เฉลี่ย 7.50 ± 3.95 ใบ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) กับชุดการทดลองที่เกิดยอดมากที่สุดคือ kinetin 8 μM + NAA 0 μM , kinetin 8 μM + NAA 1 μM และ kinetin 16 μM + NAA 1 μM ซึ่งมีจำนวนใบที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 6.15 ± 2.91 , 6.05 ± 3.26 และ 6.00 ± 2.64 ใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบจำนวนใบเฉลี่ยของรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

kinetin (μM) : NAA (μM)	จำนวนใบ (Mean $\pm$ SD)
0 : 0	6.90 ± 2.82^{bc}
0 : 1	7.50 ± 3.95^c
0 : 2	5.05 ± 2.64^{bc}
0 : 4	5.45 ± 3.34^{bc}
2 : 0	5.90 ± 3.17^{bc}
2 : 1	4.15 ± 1.95^{ab}
2 : 2	5.95 ± 3.64^{bc}
2 : 4	6.10 ± 3.95^{bc}
4 : 0	5.35 ± 3.34^{bc}
4 : 1	4.35 ± 1.22^{ab}
4 : 2	5.60 ± 3.84^{bc}
4 : 4	5.80 ± 2.45^{bc}
8 : 0	6.15 ± 2.91^{bc}
8 : 1	6.05 ± 3.26^{bc}
8 : 2	2.30 ± 1.68^a
8 : 4	5.25 ± 3.23^{bc}
16 : 0	5.55 ± 2.56^{bc}
16 : 1	6.00 ± 2.64^{bc}
16 : 2	5.10 ± 3.10^{bc}
16 : 4	5.70 ± 3.19^{bc}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

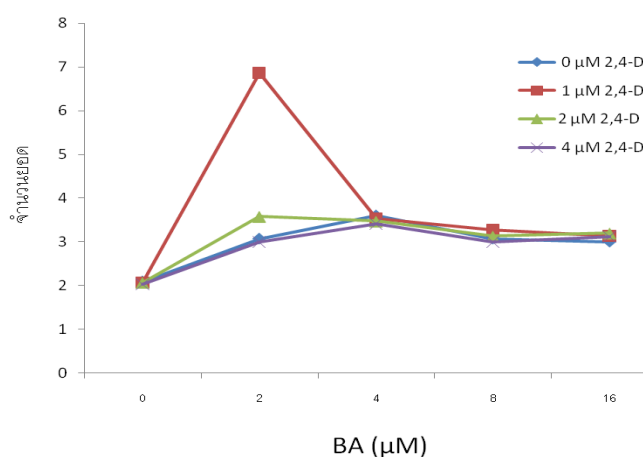
ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ kinetin และ NAA ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดและใบได้มากที่สุดคือ kinetin 8 μM เพียงอย่างเดียวโดยไม่เติม NAA มียอดเกิดขึ้นเฉลี่ย 5.00 ± 1.53 ยอด มีจำนวนใบเฉลี่ย 6.15 ± 2.91 ใบ และมีจำนวนรากเฉลี่ย 6.35 ± 8.29 ราก เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ต้นอ่อนของรากคำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ที่มี kinetin 8 μM เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

3. ผลของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ 2,4-D

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบอ่อนของรากคำใบใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่ามีอัตรารอด 100% ทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง BA และ 2,4-D ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดยอด (ตารางผนวกที่ 7, รูปที่ 8) ดังนั้นจึงมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง BA และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ ($p < 0.05$) จึงได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง ปรากฏว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA 2 μM + 2,4-D 1 μM มีการเกิดยอดได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 6.87 ± 1.27 ยอด ภายในระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ตารางที่ 7)



รูปที่ 8 ผลของ BA และ 2,4-D ที่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการชักนำให้เกิดยอดของรากคำใบใหญ่ เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบจำนวนยอดเฉลี่ยของรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

BA : 2,4-D (μM)	จำนวนยอด (Mean $\pm$ SD)
0 : 0	2.09 ± 0.25^a
0 : 1	2.06 ± 0.44^a
0 : 2	2.07 ± 0.25^a
0 : 4	2.03 ± 0.18^a
2 : 0	3.07 ± 0.25^{ab}
2 : 1	6.87 ± 1.27^d
2 : 2	3.58 ± 1.85^{bc}
2 : 4	3.00 ± 0.82^{ab}
4 : 0	3.60 ± 0.63^{bc}
4 : 1	3.53 ± 0.80^{bc}
4 : 2	3.47 ± 0.58^{bc}
4 : 4	3.42 ± 0.59^{bc}
8 : 0	3.07 ± 0.25^{ab}
8 : 1	3.27 ± 0.59^{ab}
8 : 2	3.13 ± 0.35^{ab}
8 : 4	3.00 ± 0.37^{ab}
16 : 0	3.00 ± 0.21^{ab}
16 : 1	3.13 ± 0.35^{ab}
16 : 2	3.20 ± 0.41^{ab}
16 : 4	3.12 ± 0.32^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

สำหรับผลของ BA และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดรากพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ BA และ 2,4-D ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดรากของรากดำใบใหญ่ (ตารางผนวกที่ 8) ดังนั้นจึงมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง BA และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดราก ($p < 0.05$) จึงได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง

พบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA (μM):2,4-D (μM) เท่ากับ 2:1, 2:2, 2:4, 4:1 และ 4:2 มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 6.93 ± 2.12 , 7.13 ± 2.32 , 7.13 ± 2.09 , 7.93 ± 3.26 และ 7.87 ± 2.64 ราก ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

BA : 2,4-D (μM)	จำนวนราก (Mean $\pm$ SD)
0 : 0	5.47 ± 1.40^{abc}
0 : 1	5.53 ± 1.68^{abc}
0 : 2	6.67 ± 2.02^{cd}
0 : 4	6.53 ± 1.92^{cd}
2 : 0	5.40 ± 2.35^{abc}
2 : 1	6.93 ± 2.12^{cd}
2 : 2	7.13 ± 2.32^{cd}
2 : 4	7.13 ± 2.09^{cd}
4 : 0	6.13 ± 2.06^{bc}
4 : 1	7.93 ± 3.26^d
4 : 2	7.87 ± 2.64^d
4 : 4	5.80 ± 2.11^{abc}
8 : 0	6.40 ± 2.22^{bcd}
8 : 1	6.47 ± 2.55^{bcd}
8 : 2	5.47 ± 2.19^{abc}
8 : 4	4.60 ± 1.05^a
16 : 0	5.07 ± 1.43^{ab}
16 : 1	4.20 ± 0.41^a
16 : 2	6.00 ± 1.88^{bc}
16 : 4	6.47 ± 2.58^{bcd}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวดังกล่าวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ผลของ BA และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดใบพบว่า มีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ BA และ 2,4-D ที่มีต่อการกระตุ้นให้เกิดใบของรากดำใบใหญ่ ($p < 0.05$) (ตารางผนวกที่ 9) ดังนั้น จึงมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง BA และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดใบใหม่จึงได้ทำการเปรียบเทียบระหว่าง ชุดการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA 2 μM + 2,4-D 1 μM และ BA 8 μM + 2,4-D 2 μM มีจำนวนใบมากที่สุด โดยมีจำนวนใบใหม่ที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 10.53 ± 2.41 และ 9.20 ± 3.05 ใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบจำนวนใบเฉลี่ยของรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

BA (μM) : 2,4-D (μM)	จำนวนใบ (Mean $\pm$ SD)
0 : 0	5.60 ± 1.50^{bc}
0 : 1	5.87 ± 1.69^{bc}
0 : 2	4.07 ± 1.65^{ab}
0 : 4	3.40 ± 1.91^a
2 : 0	6.87 ± 1.50^{bcd}
2 : 1	10.53 ± 2.41^e
2 : 2	7.21 ± 1.69^{cd}
2 : 4	4.93 ± 1.79^{abc}
4 : 0	8.87 ± 2.06^{cde}
4 : 1	7.60 ± 3.81^{cd}
4 : 2	6.73 ± 2.91^{bcd}
4 : 4	6.80 ± 2.05^{bcd}
8 : 0	7.00 ± 2.44^{bcd}
8 : 1	7.20 ± 2.00^{cd}
8 : 2	9.20 ± 3.05^{de}
8 : 4	3.80 ± 2.07^a
16 : 0	5.67 ± 1.87^{bc}
16 : 1	6.87 ± 2.77^{bcd}
16 : 2	5.67 ± 2.09^{bc}
16 : 4	4.67 ± 1.91^{abc}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบของรากคำใบใหญ่บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 3% วุ้น 0.7% และ activated charcoal 0.1% โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างกัน เมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องปรับอากาศ ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน (รูปที่ 9) ปรากฏว่าระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่คือ BA $2 \mu\text{M}$ + 2,4-D $1 \mu\text{M}$ สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 6.87 ± 1.27 ยอด มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 10.53 ± 2.41 ใบ และมีจำนวนรากเฉลี่ย 6.93 ± 2.12 ราก โดยมีอัตราการรอด 100 % เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 10 และ 11)



รูปที่ 9 ห้องทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่ที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน และควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องปรับอากาศ



รูปที่ 10 ต้นอ่อนของรากคำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ที่มี BA $2 \mu\text{M}$ + 2,4-D $1 \mu\text{M}$ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

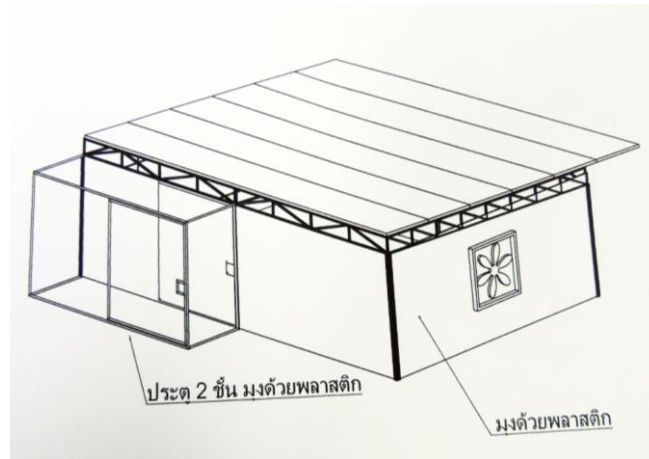


รูปที่ 11 รากดำใบใหญ่เจริญเติบโตเกิดต้นอ่อนจำนวนมากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่มี BA 2 μ M + 2,4-D 1 μ M เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ข. ผลการศึกษาการลดต้นทุนการผลิตต้นพันธุ์เฟิร์นน้ำโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ

1. ผลการพัฒนาห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ดำเนินการปรับปรุงโรงเรือนเพาะชำพรรณไม้น้ำบางส่วนของสถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำให้เป็นห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 50 ตารางเมตร ตามแบบแปลนรูปที่ 12 โดยได้ดำเนินการปรับปรุงโครงสร้างเหล็กของโรงเรือน และปรับปรุงหลังคาห้องโดยใช้กระเบื้องมุงหลังคาชนิดใสที่ให้แสงส่องผ่านได้เพื่อใช้แสงธรรมชาติในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และคลุมผนังห้องทุกด้านด้วยพลาสติกใสแบบกันยูวีและกันฝุ่นเกาะ สร้างประตูทางเข้า 2 ชั้น เพื่อควบคุมความสะอาดในการเข้าห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รูปที่ 13) ติดตั้งระบบ evaporative cooling system โดยติดตั้งแผ่น cooling pad พร้อมราง (รูปที่ 14) และติดตั้งปั้มน้ำ Mitsubishi WSP-105S พร้อมระบบจ่ายน้ำ ติดตั้งพัดลมดูดอากาศขนาด 36 นิ้ว (รูปที่ 15) พร้อมกับการติดตั้งตู้ควบคุม Axon 2200 NT สำหรับควบคุมอุณหภูมิและความชื้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รูปที่ 16) โดยมีระบบเซ็นเซอร์ที่มีหัววัดอุณหภูมิ จำนวน 2 หัว และหัววัดความชื้นจำนวน 1 หัว ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รูปที่ 17) ตลอดจนติดตั้งสแตนลีสตีลกรองแสง 80 70 60 และ 50% เพื่อให้มีความเข้มแสงแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองตามแผนการทดลองข้อ 2



รูปที่ 12 แบบแปลนห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปรับปรุงจากเรือนเพาะชำ



รูปที่ 13 ประตูทางเข้าห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปรับปรุงจากเรือนเพาะชำให้มีประตู 2 ชั้น



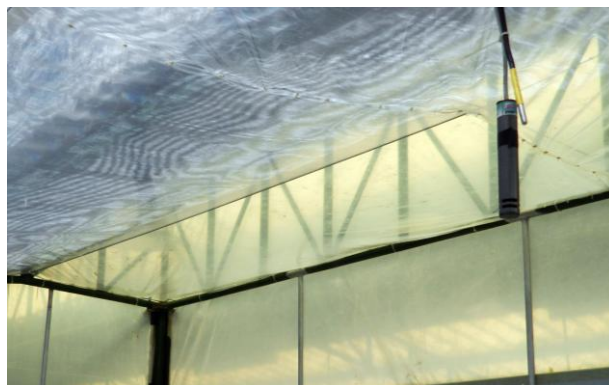
รูปที่ 14 การติดตั้งแผ่น cooling pad ที่ผนังห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปรับปรุงจากเรือนเพาะชำ (ซ้าย) พร้อมวางระบบน้ำลงถึงก่อนปั้มน้ำกลับไปใช้ใหม่ (ขวา)



รูปที่ 15 การติดตั้งพัดลมขนาด 36 นิ้ว ที่ผนังห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปรับปรุงจากเรือนเพาะชำเพื่อระบายความร้อน



รูปที่ 16 ตู้ควบคุม Axon 2200 NT ที่ติดตั้งด้านนอกห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับควบคุมอุณหภูมิและความชื้น โดยมีเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดอุณหภูมิและความชื้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ



รูปที่ 17 ระบบเซ็นเซอร์ที่มีหัววัดอุณหภูมิ และความชื้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อเข้ากับตู้ควบคุมให้มีการเปิด/ปิดการทำงานของปั๊มน้ำ และพัดลมอัตโนมัติ

2. ผลการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ

ผลการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำในอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อ ก. ได้แก่ การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายใบอ่อนบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มี BA 2 μ M + 2,4-D 1 μ M โดยใส่ชิ้นส่วนปลายใบอ่อนขดละ 2 ชิ้น การทดลองละ 30 ซ้ำ (30 ขวด) นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 28 ± 2 องศาเซลเซียสและใช้แสงธรรมชาติ โดยมีการพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสงเพื่อให้มีความเข้มของแสงต่างๆ กัน 5 ระดับ คือ 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 ลักซ์ (รูปที่ 18) เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอด 100% อย่างไรก็ตามพบว่าระดับความเข้มแสงมีผลต่อการเกิดยอด ราก และใบ ของรากดำใบใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยชิ้นเนื้อเยื่อส่วนปลายใบอ่อนของรากดำใบใหญ่ที่เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 1500 2000 และ 2500 ลักซ์ มีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) เฉลี่ย 5.98 ± 1.18 5.90 ± 1.39 และ 6.48 ± 1.62 ยอด ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 500 และ 1000 ลักซ์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกันกับจำนวนใบที่เกิดขึ้นซึ่งพบว่า การเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 1500 2000 และ 2500 ลักซ์ มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) เฉลี่ย 7.68 ± 2.87 7.50 ± 2.12 และ 8.63 ± 2.54 ใบ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 500 และ 1000 ลักซ์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อย่างไรก็ตามพบว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 2500 ลักซ์ มีการเกิดรากได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีจำนวนรากที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 9.85 ± 2.79 ราก และเมื่อลดระดับความเข้มของแสงพบว่าการเกิดรากมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 จำนวนยอด จำนวนราก และจำนวนใบใหม่ (Mean $\pm$ SD) ของรากดำใบใหญ่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติระดับความเข้มแสงต่างๆกัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ความเข้มของแสง (lux)	จำนวนยอด	จำนวนราก	จำนวนใบ
500	4.42 ± 1.08^a	4.50 ± 1.87^a	5.48 ± 2.98^a
1000	4.10 ± 1.46^a	6.25 ± 2.38^{ab}	5.73 ± 2.02^a
1500	5.98 ± 1.18^b	5.70 ± 2.41^{ab}	7.68 ± 2.87^b
2000	5.90 ± 1.39^b	6.83 ± 2.16^b	7.50 ± 2.12^b
2500	6.48 ± 1.62^b	9.85 ± 2.79^c	8.63 ± 2.54^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



รูปที่ 18 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่ในโรงเรือนระบบ evaporative cooling system ที่มีตาข่ายพรางแสงเพื่อให้มีความเข้มของแสงต่างๆ กัน

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบของรากคำใบใหญ่นานอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 3% ู้น 0.7% และ activated charcoal 0.1% โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 μM + 2,4-D 1 μM เมื่อเลี้ยงในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบ evaporative cooling system พบว่าระดับความเข้มของแสงธรรมชาติที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบอ่อนของรากคำใบใหญ่คือ 2500 ลักซ์ โดยมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 6.48 ± 1.62 ยอด จำนวนใบเฉลี่ย 8.63 ± 2.54 ใบ จำนวนรากเฉลี่ย 9.85 ± 2.79 ราก และมีอัตราการรอด 100 % เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 19 และ 20)



รูปที่ 19 ต้นอ่อนของรากคำใบใหญ่ที่เจริญเติบโตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในโรงเรือนระบบ evaporative cooling system ที่มีความเข้มแสง 2500 ลักซ์ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์



รูปที่ 20 รากดำใบใหญ่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบ evaporative cooling system และให้แสงธรรมชาติ มีการเจริญเติบโตได้ดีเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้จำนวนมาก

ผลการศึกษาคำนวณค่าไฟฟ้าโดยใช้อัตราค่าไฟฟ้าตามตารางที่ 11 การคำนวณประมาณการจากการใช้ไฟฟ้าปริมาณเท่ากันทุกวันทั้งปี พบว่าค่าไฟฟ้าที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 50 ตารางเมตร ที่ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องปรับอากาศ และให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ พบว่ามีค่าไฟฟ้าประมาณ 67,234.21 บาท/ปี (ตารางที่ 12) ในขณะที่การเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่ในโรงเรือนขนาด 50 ตารางเมตร ที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ มีค่าไฟฟ้าประมาณ 7,291.59 บาท/ปี (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 11 อัตราค่าไฟฟ้าสำหรับกิจการขนาดเล็ก

	ค่าพลังงานไฟฟ้า (บาท/หน่วย)	ค่าบริการ (บาท/เดือน)
1.1 แรงดัน 22-33 กิโลโวลท์	2.4649	228.17
1.2 แรงดันต่ำกว่า 22 กิโลโวลท์		40.9
- 150 หน่วยแรก (หน่วยที่ 0 - 150)	1.8047	
- 250 หน่วยต่อไป (หน่วยที่ 151 - 400)	2.7781	
- เกิน 400 หน่วยขึ้นไป (หน่วยที่ 401 เป็นต้นไป)	2.978	

หมายเหตุ อัตราค่าไฟฟ้า การไฟฟ้าส่วนภูมิภาค ประเภทที่ 2 กิจการขนาดเล็กสำหรับการใช้ไฟฟ้าเพื่อประกอบธุรกิจ ธุรกิจรวมกับบ้านอยู่อาศัย อุตสาหกรรม ส่วนราชการที่มีลักษณะเป็นอุตสาหกรรม รัฐวิสาหกิจ หรืออื่นๆ ตลอดจนบริเวณที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีความต้องการพลังไฟฟ้าเฉลี่ยใน 15 นาที สูงสุดต่ำกว่า 30 กิโลวัตต์ โดยผ่านเครื่องวัดไฟฟ้าเครื่องเดียว

ที่มา: <http://www.eppo.go.th/power/pw-Rate-PEA.html>

ตารางที่ 12 ค่าไฟฟ้าในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำขนาด 50 ตารางเมตร

ลำดับ ที่	รายการ	ขนาด (W)	จำนวน	ระยะเวลา ใช้ไฟ (ชั่วโมง/ วัน)	รวมจำนวน วัตต์ที่ใช้ (ต่อวัน)	รวม จำนวน กิโลวัตต์ ที่ใช้ (ต่อวัน)	หน่วยต่อ เดือน (30 วัน)	หน่วยต่อปี	อัตราค่า ไฟฟ้าต่อ หน่วย (บาท)	จำนวน เงินต่อ เดือน (บาท)	จำนวนเงิน ต่อปี (บาท)
1	หลอดไฟชั้น วางเนื้อเยื่อ	36.00	33.00	12.00	14,256.00	14.26	427.68	5,132.16	2.9780	1,273.63	15,283.57
2	หลอดไฟชั้น วางเนื้อเยื่อ	18.00	100.00	12.00	21,600.00	21.60	648.00	7,776.00	2.9780	1,929.74	23,156.93
3	เครื่องปรับอากาศ ขนาด 38,000 BTU	1,100.00	2.00	12.00	26,400.00	26.40	792.00	9,504.00	2.9780	2,358.58	28,302.91
4	ค่าบริการ (การ ไฟฟ้า ฯ)									40.90	490.80
	รวม	1,154.00			62,256.00		1,867.68	22,412.16		5,602.85	67,234.21

ตารางที่ 13 ค่าไฟฟ้าในโรงเรือนเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ evaporative cooling system ขนาด 50 ตารางเมตร

ลำดับ ที่	รายการ	ขนาด (W)	จำนวน	ระยะเวลา ใช้ไฟ (ชั่วโมง/ วัน)	รวมจำนวน วัตต์ที่ใช้ (ต่อวัน)	รวม จำนวน กิโลวัตต์ ที่ใช้ (ต่อวัน)	หน่วยต่อ เดือน (30 วัน)	หน่วยต่อปี	อัตราค่า ไฟฟ้าต่อ หน่วย (บาท)	จำนวน เงินต่อ เดือน (บาท)	จำนวนเงิน ต่อปี (บาท)
1	พัดลมขนาด 36 นิ้ว 1/2 แรง 220 โวลท์	750.00	1.00	8.00	6,000.00	6.00	180.00	2,160.00	2.7781	500.06	6,000.70
2	ปั๊มน้ำขนาด 0.1 K Watt	100.00	1.00	8.00	800.00	0.80	24.00	288.00	2.7781	66.67	800.09
3	ค่าบริการ (การ ไฟฟ้า ฯ)									40.90	490.80
	รวม	850.00			6,800.00		204.00	2,448.00		607.63	7,291.59

อภิปรายและวิจารณ์ผล

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่จากชิ้นส่วนปลายใบอ่อนบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ซึ่งประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ปรากฏว่าชิ้นเนื้อเยื่อมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกชุดการทดลอง ถึงแม้ว่าบางชุดการทดลองจะมีการเจริญเติบโตช้าจนกระทั่งชิ้นส่วนใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลก็ตาม แต่ต่อมาจะมีต้นอ่อนเกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตามพบว่า BA มีผลกระทบทำให้เกิดยอดของรากคำใบใหญ่เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญไปเป็นยอดและต้น (Gamborg and Phillip, 1995) เช่นเดียวกันกับ NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินที่พบว่ามีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการใช้ BA ร่วมกับ NAA สามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้สูงกว่าการใช้ BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับรายงานของวันเพ็ญ (2547) ที่พบว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA มีผลชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำบอนแดง (*Cryptocoryne blassii*) โดยการใช้ BA ความเข้มข้น 4.0 ไมโครโมลลาร์ ร่วมกับ NAA 1.0 ไมโครโมลลาร์ สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้สูงสุด Gamborg and Phillip (1995) กล่าวว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน มักใช้ร่วมกันกับไซโตไคนิน เช่นเดียวกับการเพาะขยายพันธุ์พืชประเภทไม้ดอกไม้ประดับ ซึ่งมีหลายชนิดที่พบว่าประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน และออกซิน (Preil, 2003) และมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้งสองกลุ่มนี้ร่วมกันในการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ตายอดเนื้อเยื่อ ใบ และก้านใบ (Geier, 1977; Dillen *et al.*, 1996; Hosoki and Kajino, 2003) สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่ในครั้งนี้พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 2 μM ร่วมกับ NAA 2 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 6.45 ± 1.32 ยอด เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่า BA และ NAA มีอิทธิพลร่วมกันในการชักนำให้เกิดใบใหม่ โดยพบว่ารากคำใบใหญ่ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรที่มี BA 2 μM + NAA 2 μM มีการเกิดใบใหม่ได้สูงที่สุดเฉลี่ย 11.70 ± 3.06 ใบ และมีรากเกิดขึ้นเฉลี่ย 6.15 ± 4.59 ราก เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบอ่อนของรากคำใบใหญ่ในอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่ามีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง kinetin และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด และใบใหม่ โดยชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin 8 μM + NAA 0 μM , kinetin 8 μM + NAA 1 μM และ kinetin 16 μM + NAA 1 μM มีการเกิดยอดได้สูงที่สุดเฉลี่ย 5.00 ± 2.53 , 5.20 ± 2.80 และ 5.35 ± 2.39 ยอด และพบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin 0 μM + NAA 1 μM มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นมากที่สุด ($p < 0.05$) เฉลี่ย 7.50 ± 3.95 ใบ

เมื่อเปรียบเทียบผลของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA และ kinetin พบว่า BA มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดและใบของรากคำใบใหญ่ได้ดีกว่า kinetin ซึ่ง

แตกต่างจากผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำรากดำใบยาว *Microsorium pteropus* ที่พบว่าการใช้ kinetin ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดใบใหม่ได้ดีกว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีใบใหม่เกิดขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 6.75 ± 1.61 ใบ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ (รัฐภัทร์ และคณะ, 2553) รงรอง (2542) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นจากชิ้นส่วนปลายใบเฟิร์นในระยะใบอ่อนมีวุ้นในอาหารสูตร MS ที่มี kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าเนื้อเยื่อมีการเจริญพัฒนาเกิดขึ้นอ่อนภายในระยะเวลา 3 เดือน อย่างไรก็ตามจากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่ในครั้งนี้การใช้ BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดใบใหม่ได้มากกว่าการใช้ kinetin ร่วมกับ NAA นอกจากนี้ kinetin มีราคาแพงกว่า BA โดย kinetin 1 กรัม มีราคา 126 เหรียญสิงคโปร์ ในขณะที่ BA 1 กรัม 65.70 เหรียญสิงคโปร์ (www.sigmaaldrich.com) ดังนั้น BA จึงเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่มากกว่า kinetin

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบอ่อนของรากดำใบใหญ่ในอาหารสังเคราะห์ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า BA และ 2,4-D มีอิทธิพลร่วมกันต่อการชักนำให้เกิดยอด ใบใหม่ และราก ($p < 0.05$) โดยชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี BA 2 μM + 2,4-D 1 μM มีการเกิดยอดได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 6.87 ± 1.27 ยอด นอกจากนี้ยังพบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี BA 2 μM + 2,4-D 1 μM และ BA 8 μM + 2,4-D 2 μM มีจำนวนใบใหม่ที่เกิดขึ้นมากที่สุด เฉลี่ย 10.53 ± 2.41 และ 9.20 ± 3.05 ใบ ตามลำดับ สำหรับผลการชักนำให้เกิดรากชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี BA (μM):2,4-D (μM) เท่ากับ 2:1, 2:2, 2:4, 4:1 และ 4:2 โดยชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี BA 2 μM + 2,4-D 1 μM มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 6.93 ± 2.12 ราก ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ BA และ 2,4-D ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายใบอ่อนของรากดำใบใหญ่คือ BA 2 μM + 2,4-D 1 μM ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถชักนำให้เกิดยอด ใบใหม่ และราก ได้สูงที่สุด

จากการทดลองพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่ในห้อง พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนปลายใบอ่อนในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA 2 μM + NAA 2 μM และ BA 2 μM + 2,4-D 1 μM ให้ผลดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอด ใบใหม่ และราก อย่างไรก็ตาม NAA มีราคาแพงกว่า 2,4-D โดย NAA 100 กรัม มีราคา 256.50 เหรียญสิงคโปร์ ในขณะที่ 2,4-D 100 กรัม มีราคา 58.40 เหรียญสิงคโปร์ (www.sigmaaldrich.com) ดังนั้นสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่ได้แก่อาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มี BA 2 μM + 2,4-D 1 μM

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่ในอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่มี BA 2 μM + 2,4-D 1 μM เลี้ยงในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติ ระดับความเข้มของแสงต่างๆ กัน พบว่าระดับความเข้มแสงมีผลต่อการเกิดยอด ราก และใบของรากดำใบใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ

($p < 0.05$) เนื่องจากแสงมีอิทธิพลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยแสงเกี่ยวข้องกับ Glyoxalase I activity ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของพืช จึงมีอิทธิพลในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Chakravarty and Sopory, 1998) โดยระดับความเข้มของแสงมีผลต่อการเกิดยอดและรากของพืช เนื่องจากแสงมีความสำคัญต่อกระบวนการเจริญพัฒนาเกิดขึ้นของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Seibert *et al.*, 1975; Reuveni and Evenor, 2007) โดยทั่วไปความเข้มของแสงสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 1000-5000 ลักซ์ (Hussey, 1980) จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าขึ้นเนื้อเยื่อส่วนปลายใบอ่อนของรากคำใบใหญ่ที่เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 1500 2000 และ 2500 ลักซ์ มีจำนวนยอด และจำนวนใบใหม่ที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกัน และสูงกว่าการเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 500 และ 1000 ลักซ์ นอกจากนี้ยังพบว่าขึ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 2500 ลักซ์ มีการเกิดรากได้มากที่สุด ดังนั้นจากการทดลองในครั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่ในสภาพที่ได้รับแสงธรรมชาติประมาณ 2500 ลักซ์ จึงเหมาะสมที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 6.48 ± 1.62 ยอด มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 8.63 ± 2.54 ใบ และมีจำนวนรากที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 9.85 ± 2.79 ราก เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

เมื่อเปรียบเทียบกับกรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการซึ่งควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องปรับอากาศ และให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ กับการเลี้ยงในโรงเรือนเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ evaporative cooling system ที่ให้แสงธรรมชาติ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอด และใบ ได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่ในโรงเรือนเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ evaporative cooling system ที่ให้แสงธรรมชาติดังสามารถลดต้นทุนค่าไฟฟ้า ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่โดยการนำชิ้นส่วนใบอ่อนของรากคำใบใหญ่มาฟอกฆ่าเชื้อโดยการแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 4% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมทิลริกคลอไรด์ 0.1% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน พบว่าต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตขึ้นมาจากชิ้นส่วนของใบอ่อนเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10-12 สัปดาห์

ผลการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่โดยการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนปลายใบอ่อนในอาหารสังเคราะห์สูตร MS คัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 3% วุ้น 0.7% และผงถ่าน (activated charcoal) 0.1% โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน และออกซิน ชนิดและปริมาณต่างๆ กัน ได้แก่การใช้ BA และ kinetin ระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 8 และ 16 μM ร่วมกับ NAA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 μM เมื่อเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าชนิด และ

ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่คือการใช้ BA ความเข้มข้น $2 \mu\text{M}$ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 6.87 ± 1.27 ยอด มีจำนวนใบใหม่ที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 10.53 ± 2.41 ใบ และมีจำนวนรากเฉลี่ย 6.93 ± 2.12 ราก

ผลการศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA $2 \mu\text{M}$ + 2,4-D $1 \mu\text{M}$ โดยการเลี้ยงในห้องเลี้ยงที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติที่มีการพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสง ให้มีระดับความเข้มของแสงต่างๆ กันคือ ประมาณ 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 ลักซ์ พบว่าระดับความเข้มแสงมีผลต่อการเกิดยอด ราก และใบของรากคำใบใหญ่ โดยขึ้นเนื้อเยื่อส่วนปลายใบอ่อนของรากคำใบใหญ่ที่เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 1500 2000 และ 2500 ลักซ์ มีจำนวนยอด และจำนวนใบใหม่ที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกัน และสูงกว่าการเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 500 และ 1000 ลักซ์ อย่างไรก็ตามในสภาพที่ได้รับแสง 2500 ลักซ์ มีการเกิดรากได้มากที่สุด ระดับความเข้มแสงที่เหมาะสมคือ 2500 ลักซ์ โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 6.48 ± 1.62 ยอด มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 8.63 ± 2.54 ใบ และมีจำนวนรากที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 9.85 ± 2.79 ราก เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ผลการวิเคราะห์ค่าไฟฟ้าที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องปรับอากาศ และให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ พบว่ามีประมาณการค่าไฟฟ้า 67,234.21 บาท/ปี ในขณะที่โรงเรือนเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ evaporative cooling system ที่ให้แสงธรรมชาติมีประมาณการค่าไฟฟ้าต่ำกว่าคือ 7,291.59 บาท/ปี

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยในครั้งนี้ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากคำใบใหญ่โดยการฟอกฆ่าเชื้อ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนปลายใบอ่อน จึงควรศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนของเฟิร์นน้ำในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเชิงธุรกิจ โดยการศึกษาในขั้นตอนการ Subculture เพื่อเลี้ยง และเพิ่มปริมาณต้นอ่อนสำหรับจำหน่าย ซึ่งอาจใช้วิธีการตัดแบ่งต้นอ่อนปลอดเชื้อจากขวดแม่พันธุ์ให้เป็นกอขนาดเล็ก ลงปลูกเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสม โดยใส่ลงขวดละมากกว่า 1 กอ ซึ่งอาจจะทำให้สามารถเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้มากขึ้น ในระยะเวลาที่สั้นลง

นอกจากนี้ควรมีการศึกษาต้นทุน และผลตอบแทนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำที่เลี้ยงในโรงเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ evaporative cooling system ที่ให้แสงธรรมชาติ ซึ่งได้พัฒนาขึ้นจากการวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนนำผลวิจัยไปต่อยอดศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นน้ำชนิดอื่นได้แก่ *Microsorium pteropus* 'narrow leaves' และ *Bolbitis heudelotii* ซึ่งมีปริมาณความต้องการสูงของตลาดทั้งในประเทศ และตลาดต่างประเทศ ตลอดจนพรรณไม้น้ำชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อพัฒนาธุรกิจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและพรรณไม้น้ำ เนื่องจากปัจจุบันมีห้องปฏิบัติการของภาคเอกชนที่เป็นธุรกิจขนาดเล็กอยู่จำนวนมาก หากได้รับการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีการลงทุนไม่สูง ตลอดจนสามารถเพิ่มผลผลิต และลดต้นทุน

การผลิต ลดการใช้พลังงาน จะทำให้เพิ่มศักยภาพในการดำเนินธุรกิจขนาดเล็กได้อย่างยั่งยืน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตต้นพันธุ์จำนวนมากที่สะอาดปลอดภัยให้กับฟาร์มผลิตพรรณไม้น้ำนำไปปลูกเลี้ยงให้ได้ผลผลิตที่ได้มาตรฐานส่งออกไป

บรรณานุกรม

- กาญจนาธิ พงษ์ฉวี, พัฒนพงษ์ ชูแสง และวิจารณ์ ทองมีเอียด. 2542. การขยายพันธุ์หมอมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2542. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- กาญจนาธิ พงษ์ฉวี. 2543. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโอบิเลีย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2543. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- กาญจนาธิ พงษ์ฉวี และณัฐกร ประดิษฐ์สรพร. 2547. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออโนเบียส (*Anubias nana* Engler, 1899). เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2547. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- กาญจนาธิ พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรพร, วรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และกาญจนา จิรพันธ์พิพัฒน์. 2551. การเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำ. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง. 62 หน้า.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 207 หน้า.
- ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ. 118 หน้า.
- รณรงค์ วิเศษสุวรรณ. 2542. การขยายพันธุ์เฟิร์นโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นพื้นฐาน. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 97.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 219 หน้า.
- รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรพร, กาญจนาธิ พงษ์ฉวี และวรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2553. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาว *Microsorium pteropus* (Blume) Ching. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2553. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง. 47 หน้า.
- ลักขณา ต่างใจ. 2545. การขยายพันธุ์แอมมานเนีย (*Ammannia senegalensis* Lamarck) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ มินกาญจน์. 2547. การขยายพันธุ์บอนแดง (*Cryptocoryne blassii* De wit, 1960) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารการประมง 57(2): 148-160.

Agrawal, A. and H. Y. M. Ram. 1995. In vitro germination and micropropagation of water chestnut (*Trapa* sp.). Aquat. Bot. 51: 135-146.

Brock, T. G. and P. B. Kaufman. 1991. Growth regulators: an account of hormones and growth regulation. **In:** Steward, F. G. (ed.) Plant Physiology. Academic Press Inc., London. pp. 277-340.

Chakravarty, T. N. and S. K. Sopory. 1998. Blue light stimulation of cell proliferation and glyoxalase I activity in callus cultures of *Amaranthus paniculatus*. Plant Sci. 132: 63-69.

Conner, A. J. and P. J. Falloon. 1993. Osmotic versus nutritional effects when rooting in vitro asparagus minicrowns on high sucrose media. Plant Sci. 89: 101-106.

Cook, C. D. K. 1996. Aquatic Plant Book. SPB Academic Publishing, Amsterdam. 288 p.

Dillen, W., I. Dijkstra and J. Oud. 1996. Shoot regeneration in long-term callus cultures derived from mature flowering plants of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell Reports 15: 545-548.

Gamborg, D. L. and G. C. Phillips. 1995. Sterile Techniques. *In:* Gamborg, O. L. and G. C. Phillips (eds). Plant Cell Tissue and Organ Culture Fundamental Methods. Springer-Verlag, Berlin. pp. 35-42.

Geier, T. 1977. Morphogenesis and plant regeneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*. Acta Hort. 78: 167-174.

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 Physiol. 95: 426-434.

Hosoki, T. and E. Kajino. 2003. Shoot regeneration from petioles of coral bells (*Heuchera sanguinea* Engelm) cultured *in vitro*, and subsequent planting and flowering *ex vitro*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 39: 135-138.

Hussey, G. 1980. In vitro propagation. *In* D. S. Ingram and J. P. Helgeson (eds). Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Blackwell, Oxford. pp. 51-61.

Klerk, G. J., J. Ter Brugge, R. Smulders and M. Benschop. 1990. Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. Acta Hort. 280: 29-36.

Kyte, L. and J. Kleyn. 1999. Plants from Test Tube. Timber press., Inc., Oregon. 240 p.

Lakshmanan, P. 1994. In vitro establishment and multiplication of *Nymphaea hybrid* "James Brydon". Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36: 145-148.

- McGaw, B. A. 1987. Cytokinin biosynthesis and metabolism. **In:** Davies, P. J. (ed.). Plant. Hormones and their Role in Plant Development. Martinus Nihoff Publishers, Dordrech. pp. 76-93.
- Murashige, T. 1977. Plant cell and organ culture as horticultural practices. *Acta Hort.* 78: 17-30.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Preil, W. 2003. Micropropagation of ornamental plants. **In:** Laimer, M. and W. Rucker (eds.). Plant tissue culture 100 years since Gottlieb Haberlandt vol 1. Springer-Verlag. New York. pp. 115-133.
- Rataj, K. and T. J. Horeman. 1977. *Aquarium Plant: Their Identification, Cultivation and Ecology.* T. F. H Publ. Inc., West Sylvania. 448 p.
- Reuveni, M. and D. Evenor. 2007. On the effect of light on shoot regeneration in *Petunia*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89: 49–54.
- Seibert, M., P. J. Wetherbee and D. B. Job. 1975. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiol.* 56: 130–139.
- Smith, R. H. 1992. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments.* Academic Press, Inc., California. 171 p.
- Trigiano, R. N. and D. J. Gray. 2000. *Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercises.* CRC Press, Washington, D. C. 374 p.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอคราคำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหาร
สังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	644.927(a)	19	33.944	8.769	.000
Intercept	5307.123	1	5307.123	1371.023	.000
a	27.340	4	6.835	1.766	.135
b	573.928	3	191.309	49.422	.000
a * b	43.660	12	3.638	.940	.507
Error	1470.950	380	3.871		
Total	7423.000	400			
Corrected Total	2115.877	399			

a R Squared = .305 (Adjusted R Squared = .270)

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากของรากคำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหาร
สังเคราะห์ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	445.456(a)	19	23.445	1.873	.015
Intercept	14118.192	1	14118.192	1128.161	.000
a	85.315	4	21.329	1.704	.148
b	84.973	3	28.324	2.263	.081
a * b	275.168	12	22.931	1.832	.052
Error	4755.452	380	12.514		
Total	19319.100	400			
Corrected Total	5200.908	399			

a R Squared = .086 (Adjusted R Squared = .040)

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนใบรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหารสังเคราะห์
ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	456.187(a)	19	24.010	2.285	.002
Intercept	13167.563	1	13167.563	1253.033	.000
a	159.625	4	39.906	3.798	.005
b	23.248	3	7.749	.737	.530
a * b	273.315	12	22.776	2.167	.013
Error	3993.250	380	10.509		
Total	17617.000	400			
Corrected Total	4449.438	399			

a R Squared = .103 (Adjusted R Squared = .058)

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหาร
สังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10
สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	667.910(a)	19	35.153	10.050	.000
Intercept	4006.890	1	4006.890	1145.515	.000
a	121.710	4	30.428	8.699	.000
b	47.630	3	15.877	4.539	.004
a * b	498.570	12	41.548	11.878	.000
Error	1329.200	380	3.498		
Total	6004.000	400			
Corrected Total	1997.110	399			

a R Squared = .334 (Adjusted R Squared = .301)

ตารางผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากของรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1053.490(a)	19	55.447	4.143	.000
Intercept	10836.810	1	10836.810	809.719	.000
a	490.415	4	122.604	9.161	.000
b	3.690	3	1.230	.092	.964
a * b	559.385	12	46.615	3.483	.000
Error	5085.700	380	13.383		
Total	16976.000	400			
Corrected Total	6139.190	399			

a R Squared = .172 (Adjusted R Squared = .130)

ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนใบรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหารสังเคราะห์ที่มี kinetin และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	432.660(a)	19	22.772	1.760	.026
Intercept	12144.040	1	12144.040	938.469	.000
a	72.035	4	18.009	1.392	.236
b	52.140	3	17.380	1.343	.260
a * b	308.485	12	25.707	1.987	.024
Error	4917.300	380	12.940		
Total	17494.000	400			
Corrected Total	5349.960	399			

a R Squared = .081 (Adjusted R Squared = .035)

ตารางผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอคราคำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหาร
สังเคราะห์ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10
สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	472.747(a)	19	24.881	47.849	.000
Intercept	633.653	1	633.653	1218.564	.000
a	100.880	4	25.220	48.500	.000
b	83.520	3	27.840	53.538	.000
a * b	288.347	12	24.029	46.209	.000
Error	145.600	280	.520		
Total	1252.000	300			
Corrected Total	618.347	299			

a R Squared = .765 (Adjusted R Squared = .749)

ตารางผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากของรากคำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหาร
สังเคราะห์ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10
สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	272.303(a)	19	14.332	3.233	.000
Intercept	1335.630	1	1335.630	301.335	.000
a	81.920	4	20.480	4.621	.001
b	3.237	3	1.079	.243	.866
a * b	187.147	12	15.596	3.519	.000
Error	1241.067	280	4.432		
Total	2849.000	300			
Corrected Total	1513.370	299			

a R Squared = .180 (Adjusted R Squared = .124)

ตารางผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนใบรากดำใบใหญ่ที่เกิดขึ้นบนอาหารสังเคราะห์
ที่มี BA และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1182.170(a)	19	62.219	8.942	.000
Intercept	12198.563	1	12198.563	1753.147	.000
a	305.987	4	76.497	10.994	.000
b	379.050	3	126.350	18.159	.000
a * b	497.133	12	41.428	5.954	.000
Error	1948.267	280	6.958		
Total	15329.000	300			
Corrected Total	3130.437	299			

a R Squared = .378 (Adjusted R Squared = .335)