

บทที่ 3

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ Phil 66-07

1. บทนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคพื้นฐานที่สำคัญในการสร้างพืชตัดแปรพันธุกรรมที่มีลักษณะตามที่ต้องการ ในการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยนั้นนิยมส่งถ่ายยีนสู่แคลลัส ทั้งนี้เนื่องจากแคลลัสเป็นส่วนที่ยังอ่อนและสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ในอัตราที่สูงและใช้ระยะเวลาสั้นในการเจริญ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย สามารถทำโดยนำชิ้นส่วนต่างๆของอ้อยมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ Gandonou *et al.* (2005) รายงานว่า ใบอ่อนอ้อย สามารถเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นในอัตราที่สูงได้ อย่างไรก็ตาม Mackinnon *et al.* (1986) พบว่า ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัส ยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น ชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงลักษณะของแคลลัส เช่น อายุของแคลลัส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ในสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้ใบอ่อนอ้อยเจริญเป็นแคลลัส จากนั้นทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสอ้อยเจริญเป็นต้น และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณราก ซึ่งจากผลการศึกษาจะนำไปใช้เตรียมแคลลัสเพื่อส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อยต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อใบอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ให้เจริญเป็นแคลลัส

นำใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 มาลอกกาบใบออก 2-3 ใบ ทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกและล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งนาน 30 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อโดย แช่ในเอทานอลนาน 2-3 นาที จากนั้น ย้ายใบอ่อนไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% ที่เติม tween 20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้งๆละ 5 นาที ตัดใบอ่อนขนาดประมาณ 0.5 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. และเติม 2,4-D, NAA, yeast extract น้ำมะพร้าวความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15%

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15%

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล.

อาหารทุกสูตรปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 เพาะเลี้ยงในที่มืด 2 สัปดาห์ ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 °C จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักของแคลลัสอ้อย เพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากใบอ้อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ สังเกตการเจริญเติบโตและลักษณะของแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 11

การทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ให้เจริญเป็นต้น

นำแคลลัสอ้อยที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส อายุ 4 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก./ล. และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดคือ BA และ IBA ที่มีความเข้มข้นต่างๆดังนี้

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

อาหารทุกสูตรปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลโดยนับจำนวนต้น เพอร์เซ็นต์การเกิดต้น จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัส และสังเกตการเจริญเติบโตและลักษณะของต้น

วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 11

การทดลองที่ 3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดรากของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07

นำต้นอ่อนอ้อยอายุ 2 สัปดาห์ ขนาดประมาณ 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมผงวุ้น 8 ก./ล. และเติม NAA ร่วมกับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

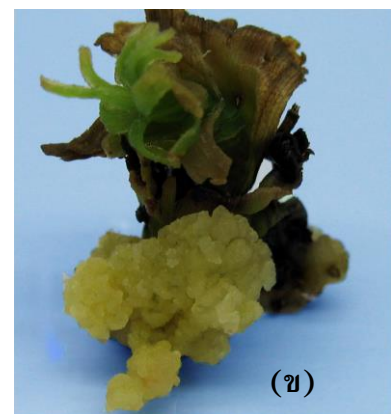
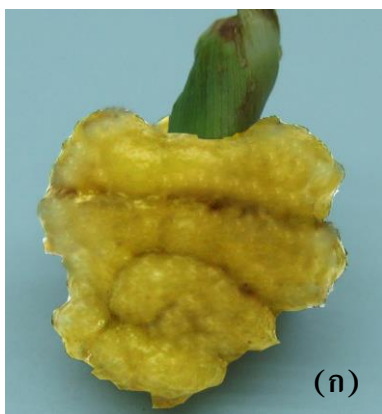
อาหารทุกสูตรปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2 ^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ บันทึกผลโดยนับจำนวนราก ความยาวราก วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 11

3. ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อใบอ่อนอ้อย

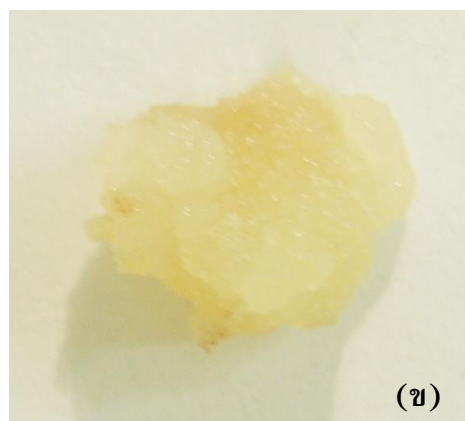
พันธุ์ Phil 66-07 ให้เจริญเป็นแคลลัส

การชักนำใบอ่อนอ้อยพันธุ์ phil 66-07 ให้เจริญเป็นแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. และเติม 2,4-D, NAA, yeast extract และน้ำมะพร้าว ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มีด 2 สัปดาห์ ใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตร มีสีเขียวอ่อน ใบขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มเกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดของใบ โดยการเกิดแคลลัสในอาหารทุกสูตรเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น (compact callus) (ดังภาพ 7ก) และบางแคลลัสเกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ (ดังภาพ 7ข) เมื่อย้ายใบอ่อนอ้อยมาเพาะเลี้ยงในที่มีแสงพบว่า ใบมีสีเขียวเข้ม ขยายขนาด และเกิดแคลลัสสีเหลืองที่รอยตัดของใบมากขึ้น แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นสีเหลือง (ดังภาพ 8ก) แต่บางแคลลัสมีสีเหลืองอ่อน (ดังภาพ 8ข) และบางแคลลัสมีสีม่วง (ดังภาพ 8ค)



ภาพที่ 7 ลักษณะแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เจริญบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15%

(ก) แคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่น (ข) แคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ



ภาพที่ 8 ลักษณะสีของแคลลัสที่เกิดขึ้น เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่

(ก) แคลลัสลักษณะสีเหลือง

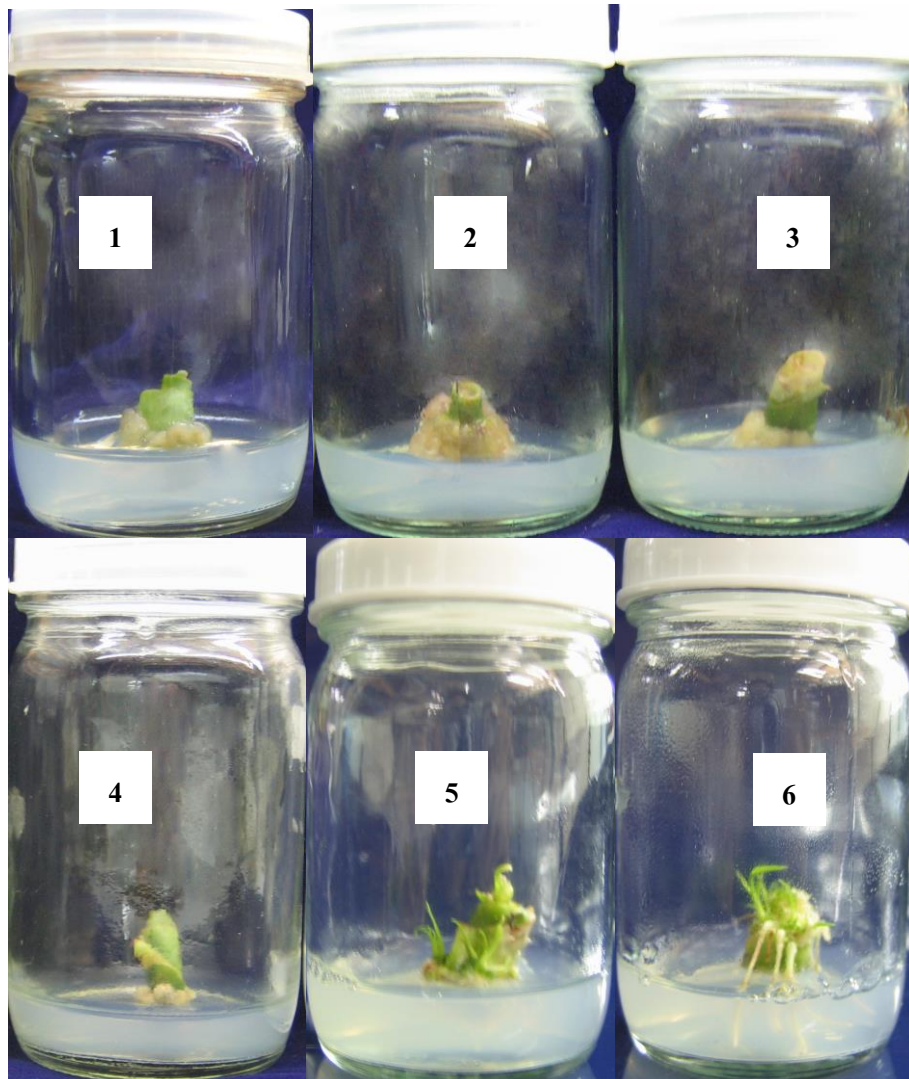
(ข) แคลลัสลักษณะสีเหลืองอ่อน

(ค) แคลลัสลักษณะสีม่วง

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียว อาหารที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% และอาหารที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล. พบว่า ใบอ่อนอ้อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีน้ำมะพร้าว มีลักษณะและความสามารถในการเกิดแคลลัสได้ดี และมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว และอาหารสูตรที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล. เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดแคลลัสในอาหารที่เติม NAA 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียว อาหารที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% และอาหารที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล. พบว่าใบอ่อนอ้อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีน้ำมะพร้าว มีลักษณะและความสามารถในการเกิดแคลลัสได้ดี และมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว และอาหารสูตรที่เติม

NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล. และเมื่อ เปรียบเทียบระหว่างการใช้ 2,4-D และ NAA พบว่า 2,4-D สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่า NAA แคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถเจริญเป็นยอดสีเขียว และสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ได้ในอาหารที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% และอาหารที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล. แต่ในอาหารสูตรที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล. จะเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นและรากดีกว่าสูตรอาหารอื่น (ภาพที่ 9)

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ใบอ่อนอ้อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% มีน้ำหนักสดของแคลลัสเท่ากับ 1.02 ก. ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับอาหารสูตรอื่น (ตารางที่ 7 ในภาคผนวก และภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ลักษณะแคลลส์อ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA, yeast extract น้ำมะพร้าวความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D, NAA ร่วมกับน้ำมะพร้าว และ yeast extract ความเข้มข้นต่างๆ กัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล.

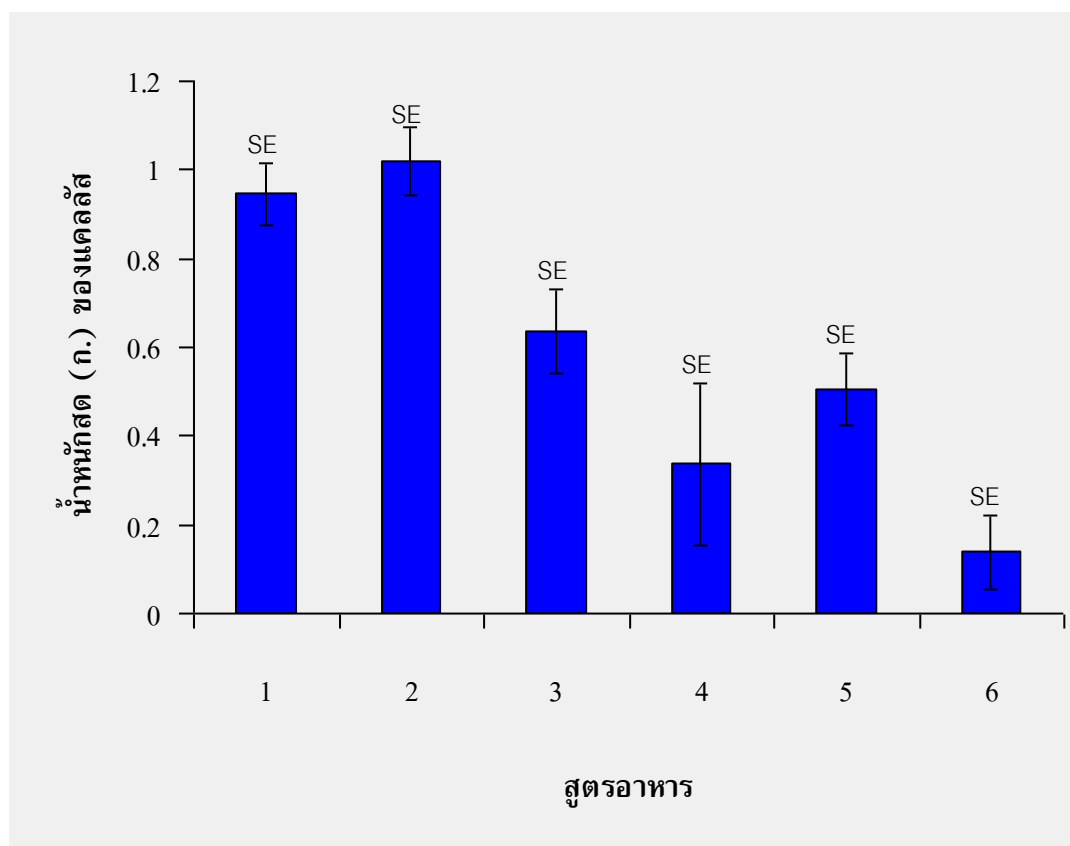
สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15%

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15%

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล.



ภาพที่ 10 น้ำหนักสดของแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D, NAA ร่วมกับน้ำมะพร้าว และ yeast extract ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D, NAA ร่วมกับน้ำมะพร้าว และ yeast extract ความเข้มข้นต่างๆ กัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15%

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล.

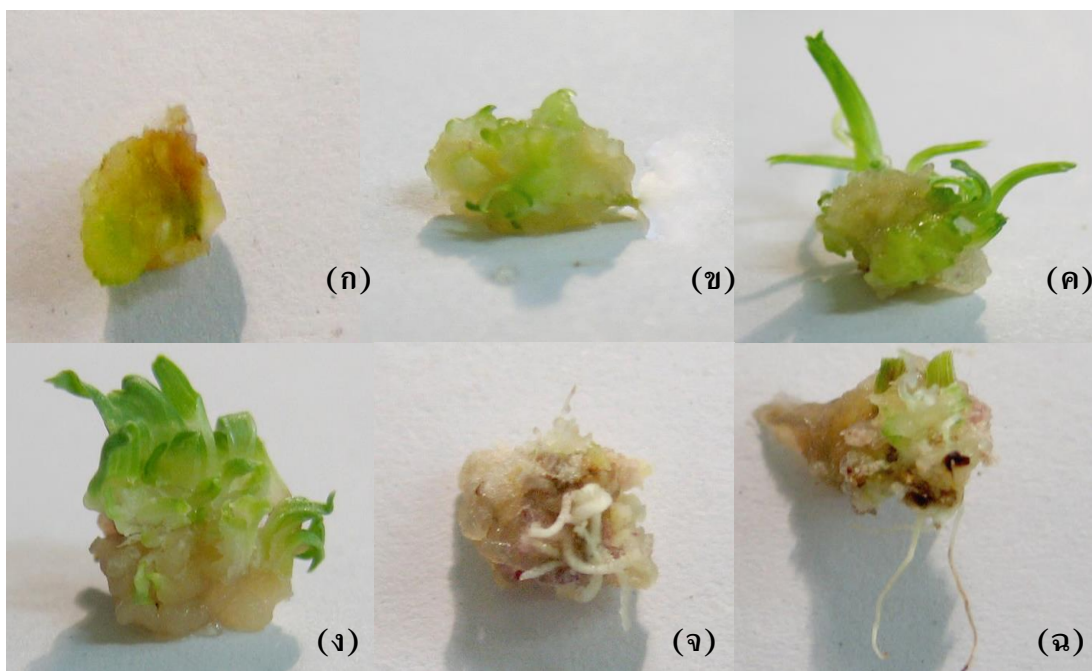
สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15%

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ yeast extract 20 มก./ล.

ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil

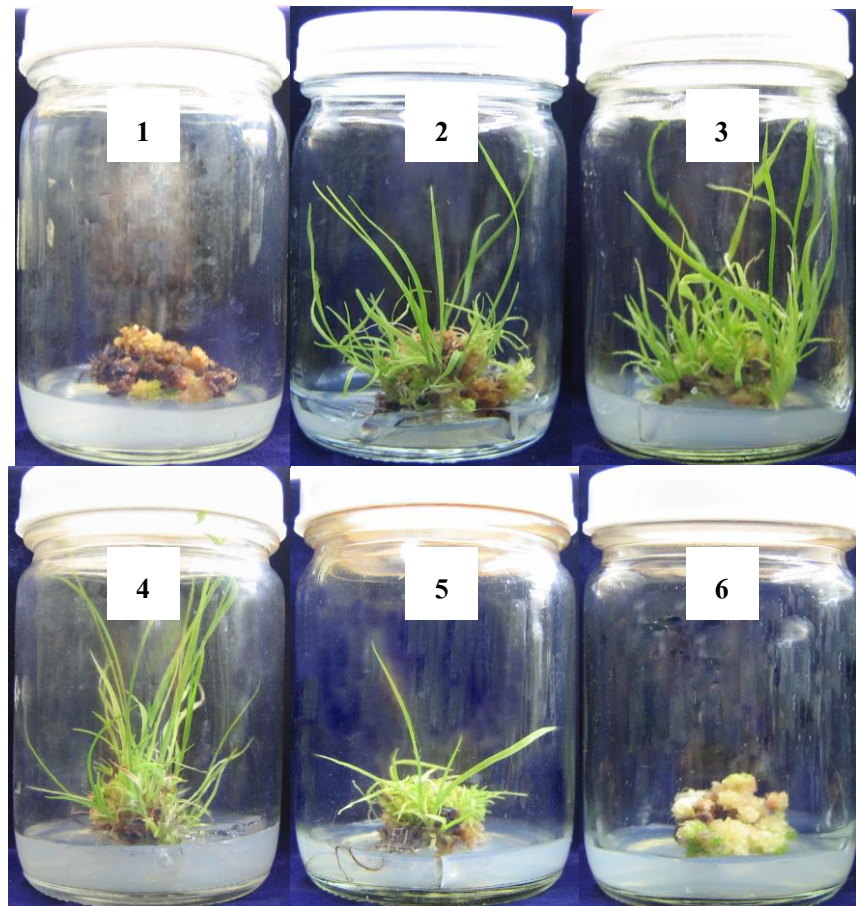
66-07 ให้เจริญเป็นต้น

เมื่อนำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. และเติม BA ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน พบว่า ใน 1-2 สัปดาห์ แคลลัสขยายขนาดและเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียว (green spot) เล็กๆบนก้อนแคลลัส (ภาพที่ 11ก) จากนั้นแคลลัสจะเจริญเป็นยอดสีเขียว (ภาพที่ 11ข) บางแคลลัสสร้างยอดเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 11ค และ 11ง) บางแคลลัสสร้างรากเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 11จ) บางแคลลัสสร้างทั้งยอดและรากพร้อมกัน (ภาพที่ 11ฉ) โดยจะมีการสร้างรากตรงบริเวณโคนยอดอ่อน แคลลัสจะเจริญเป็นยอดและรากที่สมบูรณ์เมื่ออายุได้ 4-6 สัปดาห์



ภาพที่ 11 ลักษณะการเจริญของแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 การขยายขนาดของแคลลัสและเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียวบนก้อนแคลลัส; (ก), ยอดสีเขียวบนก้อนแคลลัส; (ข), แคลลัสสร้างยอดเพียงอย่างเดียว (ค และ ง); แคลลัสสร้างรากเพียงอย่างเดียว (จ); แคลลัสสร้างทั้งยอดและรากพร้อมกัน (ฉ)

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดต้นในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA และ IBA กับอาหารสูตรที่เติม BA และ IBA พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BA และ IBA มีการเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียวอ่อนและมีการเจริญเป็นต้นได้น้อยและช้ากว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA และ IBA เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดต้นในอาหารสูตรที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้นต่างกัน โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นใหม่เท่ากับ 100 % จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัสเท่ากับ 39.1 ต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับสูตรอาหารอื่น (ตารางที่ 4 ในภาคผนวก และภาพที่ 12, 13 และ 14)



ภาพที่ 12 ลักษณะต้นใหม่จากแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่างกัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.

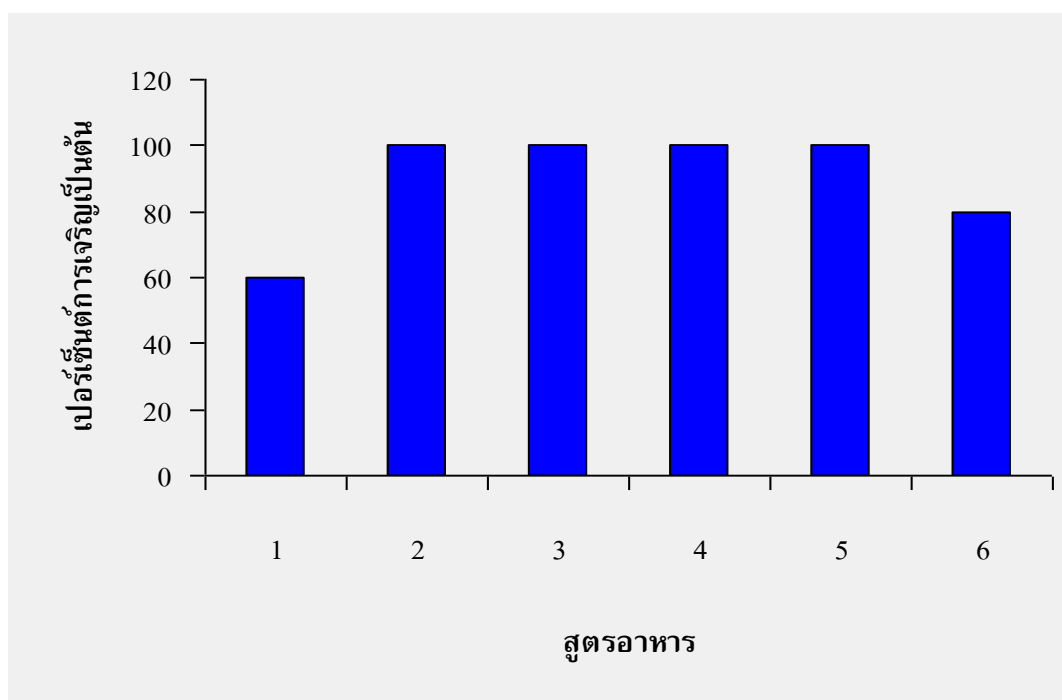
สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่างกัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.

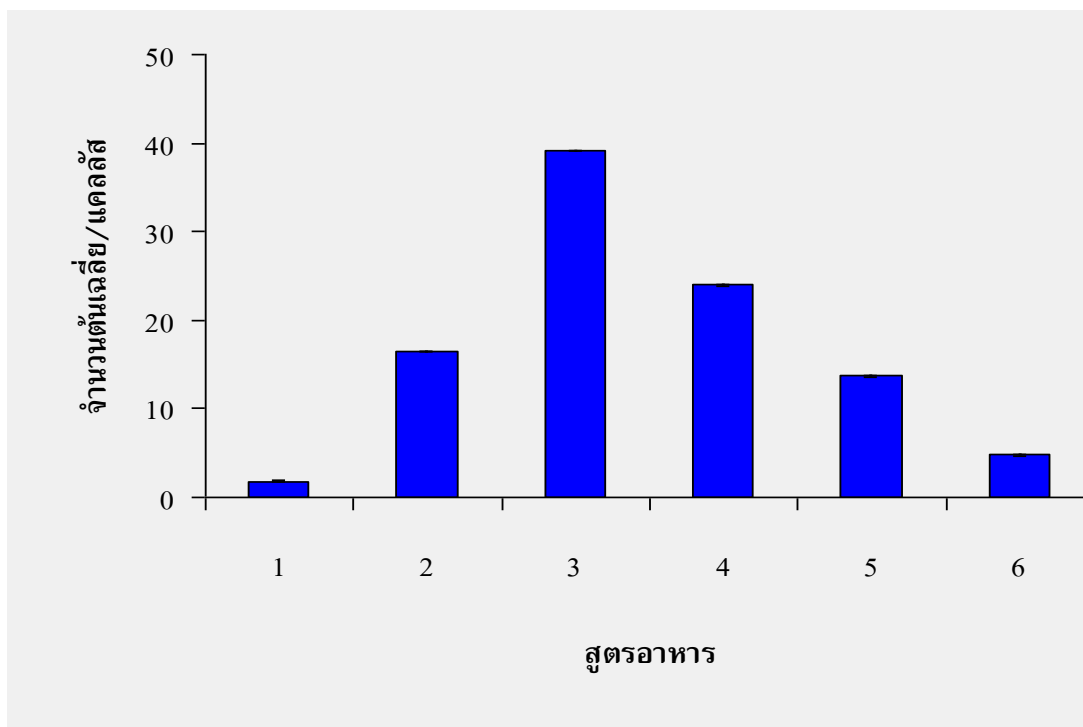
สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.



ภาพที่ 14 จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัสของอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

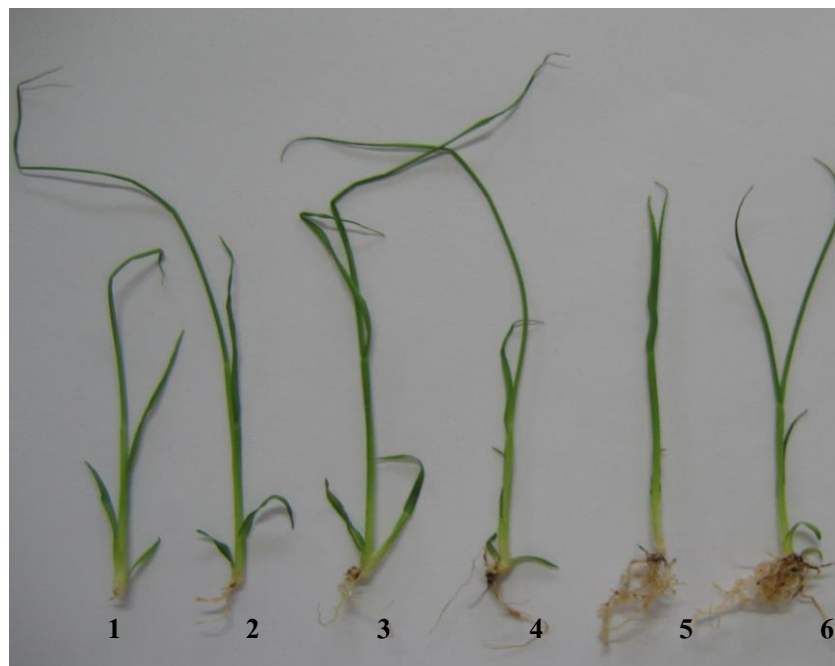
สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

ผลการทดลองที่ 3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดรากของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07

เมื่อนำต้นอ่อนอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม ผงวุ้น 8 ก./ล. และเติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน พบว่า ใน 1-2 สัปดาห์ ต้น

อ่อนเริ่มมีรากเกิดขึ้นตรงบริเวณโคนต้นอ่อน จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดราก ในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน โดยต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล. พบว่า ต้นอ่อนมีการเกิดรากได้ดีที่สุด (ภาพที่ 15) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 100% จำนวนรากเฉลี่ย/ต้นเท่ากับ 21.8 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับสูตรอาหารอื่น ภาพที่ 16 และ 17



สูตรอาหาร

ภาพที่ 15 ลักษณะรากที่เกิดขึ้นจากต้นอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นต่างๆ กัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

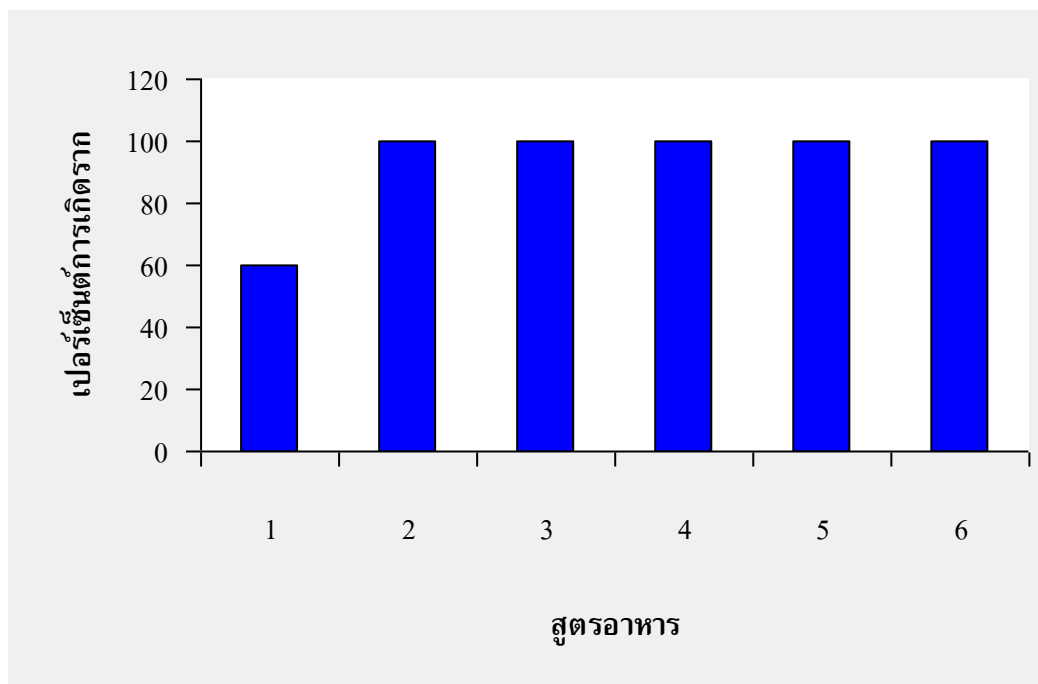
สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.



ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากต้นอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นต่างๆกัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

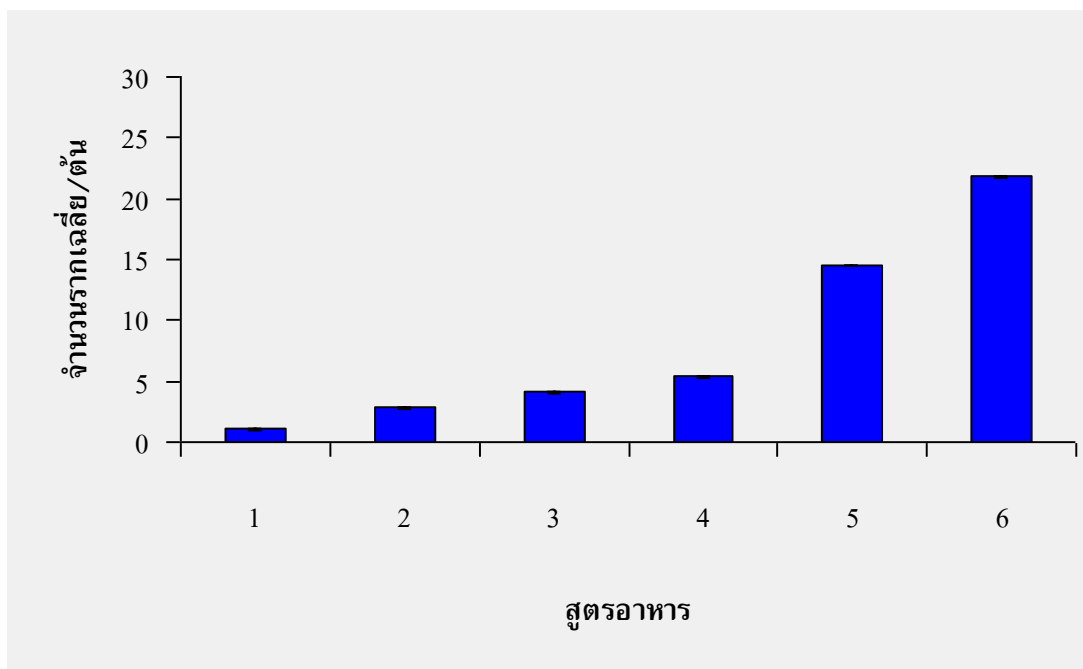
สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.



ภาพที่ 17 จำนวนรากเฉลี่ย/ต้นของอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่

เติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นต่างกัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม NAA 1 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม NAA 3 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม NAA 5 มก./ล ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการชักนำใบอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ให้เจริญเป็นแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA, yeast extract และน้ำมะพร้าว ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้ใบอ่อนอ้อยเจริญเป็นแคลลัสได้ 100% ภายหลังจาก เพาะเลี้ยงใบอ่อนอ้อยในที่มืด 2 สัปดาห์ ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อน ใบขยายขนาดใหญ่ขึ้นโดยแคลลัส จะเจริญจากบริเวณรอยตัดของใบ สอดคล้องกับรื่อง หอมหวล และคณะ (ม.ป.ป.) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงใบอ่อนอ้อยพันธุ์ KPS 89-20 บนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 3 มก./ล. ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะเริ่มเกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดของใบ เมื่อย้ายใบอ่อนอ้อยมาเพาะเลี้ยงในที่ มีแสงพบว่า ใบมีสีเขียวเข้ม ขยายขนาด และเกิดแคลลัสที่รอยตัดของใบมากขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยง ใบอ่อนอ้อยเป็นเวลา 5 สัปดาห์ แคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะสีเหลือง เกาะกลุ่มกันแน่น และบาง แคลลัสที่มีลักษณะสีเหลืองอ่อน เกาะกันหลวม สอดคล้องกับ Honda *et al.* (1999) รายงานการ คัดเลือก embryogenic callus ของอ้อยพบว่าแคลลัสอ้อยมี 2 ชนิดคือ มีลักษณะสีเหลือง เกาะ กลุ่มกันแน่น และบางแคลลัสที่มีลักษณะสีเหลืองอ่อน เกาะกันหลวม และ แคลลัสบางส่วนมีสีขาว และสีม่วงด้วยเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่ แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยมี โอกาสที่จะสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับอ้อยได้ ซึ่งสอดคล้องกับ(Nickell, 1964 อ้าง ใน ศุภชัย สารกาญจน์, 2527) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพาเรนิมาจากลำต้นอ้อยพันธุ์ H50-7209 พบว่า แคลลัสที่เกิดขึ้นแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งเมื่อนำมาแยกเป็นเซลล์เดี่ยวสามารถแยกความ แตกต่างของเซลล์ทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ เซลล์สีขาว 1 กลุ่ม เซลล์สีเหลือง 2 กลุ่ม และเซลล์สีเทาแกม แดงอีก 2 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 5 กลุ่มแตกต่างกันทั้งการเจริญเติบโตและจำนวนโครโมโซม แม้กระทั่งใน กลุ่มเซลล์สีเหลืองด้วยกันหรือสีเทาแกมแดงด้วยกัน

สำหรับอิทธิพลของ 2,4-D, NAA, yeast extract และน้ำมะพร้าว ที่มีผลต่อการชักนำใบ อ่อนอ้อยให้เจริญเป็นแคลลัสพบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบอ่อนอ้อยให้เจริญเป็นแคลลัส ซึ่งมีรายงานว่า 2,4-D เป็นฮอร์โมนที่นิยมใช้และมีประสิทธิภาพดีที่สุดในกลุ่มของออกซิน ในการชักนำเนื้อเยื่อพืชใบ เลี้ยงเดี่ยวให้เจริญเป็นแคลลัส (ทะนง พรประดับเกียรติ และไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา, 2527; Bhaskaran and Smith, 1990) 2,4-D มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดยอด มีผลในการกระตุ้นการ สร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิกเพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์ ทำให้มีการแบ่งเซลล์จำนวนมากและเซลล์ สามารถขยายขนาดกลายเป็นก้อนแคลลัสได้ นอกจากนี้ 2,4-D สามารถรักษาสภาพการเป็น แคลลัสในการเพาะเลี้ยงไว้ได้ดี และ 2,4-D ถูกทำลายโดยเซลล์พืชได้ช้ากว่าออกซินอื่น ๆ (รังสฤษฎ์ กาวีตะ, 2540) Kenia *et al.* (2006) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 4.5 มก./ล. สามารถทำให้เนื้อเยื่ออ้อยเกิดแคลลัสได้สูงสุด Gandonou *et al.* (2005)

รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อน พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. สามารถทำให้เนื้อเยื่อใบอ่อนอ่อนเกิดแคลลัสได้สูงที่สุดถึง 95% Abdulla *et al.* (2002) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อน 9 พันธุ์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 3 มก./ล. สามารถชักนำเนื้อเยื่ออ่อนให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด Heinz and Mee (1969) พบว่าการใช้ 2,4-D และ NAA ในปริมาณที่เหมาะสมสามารถทำให้เนื้อเยื่อของอ่อนเกิดแคลลัสได้เช่นกัน แต่ IAA ไม่เหมาะที่จะใช้ในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส การใช้ yeast extract และ น้ำมะพร้าวร่วมกับ 2,4-D และ NAA พบว่า น้ำมะพร้าวมีผลต่อการมีชีวิตของแคลลัสได้ดีกว่า yeast extract ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำมะพร้าวมีสารประกอบหลายชนิด เช่น ไซโตไคนิน sugar alcohol และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นน้ำมะพร้าวจึงมีผลต่อการมีชีวิตและการอยู่รอดของแคลลัสได้ดี จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ บุญยืน กิจวิจารณ์ (2528) รายงานการเพาะเลี้ยงใบอ่อนอ่อนพันธุ์ H48-3166 และ Q83 บนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15% พบว่าสามารถชักนำใบอ่อนให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด Visessuewan *et al.* (1998) รายงานการเพาะเลี้ยงใบอ่อนอ่อนพันธุ์ F10, Q83 และ Supan 1 พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบอ่อนอ่อนให้เจริญเป็นแคลลัส คือสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10%

จากผลการชักนำให้แคลลัสอ่อนเจริญเป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม ซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก./ล. และ BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสพัฒนามาจากการขยายขนาดแคลลัสและเริ่มเกิดสีเขียวบนแคลลัสจากนั้นพื้นที่สีเขียวจะเจริญเป็นยอดอ่อน มีรายงานว่า แคลลัสที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ สามารถเจริญเป็นอวัยวะได้โดยจุดกำเนิดของอวัยวะอาจเกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือกลุ่มของเซลล์ parenchyma จากการทดลองพบว่า แคลลัสมีการเจริญเป็นยอดหรือรากเพียงอย่างเดียวเท่านั้น บางแคลลัสมีการเจริญเป็นต้นและราก ซึ่งลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่เกิดโดยกระบวนการ organogenesis โดยระยะแรกไม่มีรากเกิดขึ้น เมื่อต้นเจริญเติบโตมีความยาวประมาณ 3-5 ซม. จึงเกิดราก Heinz and Mee (1969) รายงานว่า ความสามารถในการเกิดต้นและรากนั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์อ่อน และการกระตุ้นให้แคลลัสเกิดต้นง่ายกว่าการเกิดราก ซึ่งการกระตุ้นให้เกิดรากสามารถทำได้โดยการนำเอาต้นไปเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์

สำหรับอิทธิพลของ BA และ IBA ที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสอ่อน พบว่า ความเข้มข้นของ BA และ IBA ที่เหมาะสมคือ BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. เนื่องจาก IBA เป็นออกซินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก กระตุ้นการเกิดราก ส่วน BA เป็นไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ ทำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นและเพิ่มจำนวนต้นได้ดี (สุริยันต์ ฉะอุ่ม และคณะ, 2540) สอดคล้องกับ Karim *et al.* (2002) รายงานว่าอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล.

ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสอ้อยพันธุ์ Isd 31 เจริญเป็นต้นได้ Abdulla *et al.* (2002) รายงานว่าแคลลัสอ้อยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IBA 2 มก./ล. IAA 2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล. แคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้ นอกจากนี้ยังมีบางรายงานที่ทำการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการใช้สารอินทรีย์บางชนิดเช่น เคซีนไฮโดรไลเสท น้ำมะพร้าว และสารสกัดจากยีสต์ (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2538; Zhao *et al.*, 1999) สอดคล้องกับ Gandonou *et al.* (2005) รายงานว่าแคลลัสอ้อยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 ก./ล. เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสอ้อยพันธุ์ Isd 31 เจริญเป็นต้นได้

จากผลการชักนำให้ต้นอ่อนอ้อยเกิดราก บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นต่างกัน พบว่า ต้นอ่อนอ้อยเกิดรากได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล. ซึ่งสอดคล้องกับ Baksha *et al.* (2002) รายงานการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยบนอาหาร MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. พบว่า ต้นอ่อนอ้อยเกิดรากสูงสุดเฉลี่ย 15 ราก/ต้น Baksha *et al.* (2003) รายงานการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยบนอาหาร MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.พบว่า ต้นอ่อนอ้อยเกิดรากเฉลี่ย 17 ราก/ต้น เปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 95% เนื่องจาก NAA เป็นออกซินที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเกิดราก และน้ำตาลซูโครส และมีบทบาทในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืช (morphogenesis) (Spory, 1979)