รายงานโครงการวิจัย

การผลิตเมล็ดเทียมหญ้าแฝกเพื่อปลูกอนุรักษ์ดินและน้ำของภาคใต้

Production of Artificial Seed of Vetiver Grass for Land and Water Conservation in the South)

โดย

สมปอง เตชะโต

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

ภาควิชาพืชศาสตร์ **มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

คณะทรัพยากรธรรมชาติ **วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา**

คำนำ

การขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะของหญ้าแฝกประสบผลสำเร็จในหลายห้องปฏิบัติการ และมีบทบาทสำคัญในการผลิตต้นกล้าปลูกในอนาคตในสภาพพื้นที่ลาดชันเพื่อการอนุรักษ์ดิน และน้ำ เทคนิคนี้ได้มีการผลิตเพื่อแจกจ่ายไปยังเกษตรกรผู้ปลูกที่มีปัญหาของประเทศไทยบ้างแล้ว แต่ยังประสบปัญหาการอนุบาล และการขนย้ายต้นไปปลูกในพื้นที่ปลูกจริง การผลิตวัดุปลูกในอีกรูปแบบหนึ่งคือเมล็ดเทียมสามารถที่จะนำไปปลูกโดยตรง ขนย้ายได้สะดวก เมื่อนำไปถึงที่หมายแล้วก็สามารถที่จะเพาะเมล็ดเทียมให้งอกเป็นต้นกล้าเหมือนการปลูกด้วยเมล็ดจริง การวิจัยในโครงการ “การผลิตเมล็ดเทียมหญ้าแฝกเพื่อปลูกอนุรักษ์ดินและน้ำของภาคใต้” ได้รับการสนับสนุนเริ่มต้นในปีที่ 1 จากโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (กปร) และในปีต่อมาได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช)

จากผลความสำเร็จในการผลิตเมล็ดเทียมของหญ้าแฝก ประกอบกับความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วของการขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่ายคาดว่าสามารถที่จะตอบสนองพระราชดำริปลูกหญ้าแฝกในพื้นที่ที่มีความจำเป็นต้องอนุรักษ์ และยังสามารถที่จะเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไว้ใช้ประโยชน์ในอนาคต ป้องกันการสูญพันธุ์

สมปอง เตชะโต
รองศาสตราจารย์
ภาควิชาพืชศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	2
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
สถานที่ทำวิจัย	4
ระยะเวลการทำวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
บทนำ	7
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	9
ระเบียบวิธีการวิจัย	10
การชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อน	10
การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและทำเมล็ดเทียม	10
ผลการศึกษา	11
การชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อน	11
การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นและทำเมล็ดเทียม	23
การเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย	28
เอกสารอ้างอิง	31

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. **เพื่อพัฒนาเทคโนโนโลยีเซลล์ร่างกายของหญ้าแฝกให้เป็นต้นอ่อนโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิส และขยายพันธุ์หญ้าแฝกโดยเทคนิคการผลิตเมล็ดเทียม**
2. **เพื่อพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมาก และห่อหุ้มปลายยอดผลิตเมล็ดเทียมเสริมการใช้ต้นอ่อน**

สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก
ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
หาดใหญ่ สงขลา

ระยะเวลาการทำวิจัย

3 ปี โดยเริ่มต้นในเดือน ตุลาคม 2546 (งบประมาณจากโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ) และสิ้นสุดในเดือน กันยายน 2549

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1. ผลิตบัณฑิตปริญญาเอกในสาขาวิชาเอกพืชศาสตร์ที่มีความชำนาญพิเศษในเรื่องการขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยวิธีการผลิตเมล็ดเทียม ขณะนี้ประกอบธุรกิจส่วนตัวทางด้านการค้าพันธุ์ไม้ ในจังหวัดสงขลา
2. **ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ (จำนวน 1 เรื่อง) และนำเสนอผลงานวิจัยในลักษณะของโปสเตอร์ หรือ แผ่นพับเกี่ยวกับ "การขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยวิธีการผลิตเมล็ดเทียม" ในการประชุมพืชสวนแห่งชาติ (จำนวน 1 เรื่อง) หญ้าแฝกแห่งชาติ (จำนวน 2 เรื่อง) มอ. วิชาการ (1 เรื่อง) และงานวันเกษตรแห่งชาติ (2 เรื่อง)**
3. **ถ่ายทอดเทคโนโลยีการขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงในถังหมักอย่างง่ายไปยังนักศึกษาระดับปริญญาตรี และนักวิชาการที่สนใจ**

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงใบอ่อนหญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 โดยการสร้าง และไม่สร้างแผลในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) เติมออกซินชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ ในที่มืด หลังจากชักนำแคลลัสได้แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ดัดแปลงโดยการเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ ตลอดจนไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง 2,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียสเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น กรองแยกขนาดเซลล์และหุ้มห่อต้นอ่อนโดยใช้วุ้นแอลจิเนต (จากบริษัท Wako) ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปทดสอบความงอกในหลอดทดลอง นอกจากนี้ยังได้ชักนำยอดรวมจำนวนมากและใช้ยอดขนาด 3-5 มิลลิเมตร มาหุ้มเพื่อผลิตเมล็ดเทียมด้วย

จากการศึกษาพบว่า 2,4-dichlorophhenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด ในขณะที่ออกซินชนิดอื่นๆ ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ การสร้างแผลส่งเสริมการสร้างแคลลัสแบบโตเร็ว (fast growing callus: FGC) เมื่อใช้ 2,4-D เข้มข้นต่ำ (1 มิลลิกรัม/ลิตร) หรือสูง (5 มิลลิกรัม/ลิตร) การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นไปได้ส่งในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเป็น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เติม casein hydrolysate 500-1000 มิลลิกรัม/ลิตร หรือเติม benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นชักนำได้ในอาหารสูตรเดียวกัน แต่ปราศจากวุ้น เซลล์ขนาดใหญ่ในซัสเพนชั่นให้การเพิ่มต้นอ่อนระยะรูปกลม 4.87% สูงกว่าเซลล์ขนาดเล็ก เมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอด้วยวุ้นแอลจีเนต (จากบริษัท Wako) ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสม การหุ้มต้นอ่อนทุกระยะส่งเสริมการสร้างแคลลัส ส่วนเมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มปลายยอดงอกได้ 100% ดังนั้นการผลิตเมล็ดเทียมจำนวนมากที่มีประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการได้จากการหุ้มปลายยอดด้วยวุ้นโซเดียมแอลจิเนต เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยอดจำนวนมากนั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย ใช้สูตรอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% α-naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร

Abstract

Young leaf segments of vetever cv. Songkhla 3 in forms of wound and non wound were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various kinds and concentrations of auxins under dark condition. After callus induction phase it was transferred to culture on MS medium modified by complex addenda and cytokinins. The cultures were maintained under 2,000 lux illumination, 14 h photoperiod at 26±4°C in order to induce embryogenic callus. The callus was again brought to liquid culture medium for induction of embryogenic cell suspension. The cells/clumps/somatic embryos in suspension were synchronised and encapsulated by algenate bead (Wako Company) at various concentrations to form artificial seeds. The seeds were germinated *in vitro*. In addition, multiple shoots were also induced from apex culture. Excised single shoot was trimmed to size of 3-5 mm, encapsulated by algenate bead and then germinated in the same way as somatic embryo does.

The results revealed that 4 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) promoted the best percentage callus induction whereas the other auxins could not induce callus. Wound leaf segments enhanced fast growing callus (FGC) in low (1 mg/l) and high (5 mg/l) concentration of 2,4-D containing medium. Embryogenic callus formed in culture medium with decrement 2,4-D to 1 mg/l in the presence of 500-1000 mg/l casein hydrolysate or 1 mg/l benzyladenine (BA). Embryogenic cell suspension was successfully established in the above medium without gelling agent. Large clumps/fraction in the suspension promoted the higher proliferation of globular embryos (4.87%). Artificial seeds were optimised by encapsulating somatic embryos with 2% algenate. Artificial seeds in term of encapsulating somatic embryos lost their germination but callus formation was observed. While encapsulating shoot apex germinated to normal seedling at 100%. So, artificial seed production was optimised by encapsulating shoot apex with 2% algenate. Mass propagation of the shoot was routinely carried out in simple bioreactor in MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.5 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 mg/l BA.

บทนำ

พื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพื้นที่ลาดเอียง หรือภูเขาอยู่มากกว่า 50% พื้นที่ดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อการพังทะลายของหน้าดินอันเนื่องมาจากการกัดเซาะของน้ำฝนที่รุนแรงมาก ทำให้หน้าดินเกิดความเสียหายเป็นจำนวนมากมายมหาศาล (Vietmeyer, 1996) การแก้ปัญหาที่ผ่านมาเป็นการปลูกพืชต่างๆ เพื่อป้องกันการชะล้าง หรือพังทะลายของหน้าดิน และการปลูกพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจขวางแนวลาดชัน อย่างไรก็ตามพืชที่ปลูกมีระบบรากไม่ดี ทำให้การยึดเกาะดินไม่ดีจึงยังคงทำให้หน้าดินเกิดความเสียหาย

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีพระราชดำริของโครงการ/กิจกรรมนี้กับหม่อมราชวงศ์แซมแจ่มจรัส รัชนี คณะทำงานโครงการพัฒนาหญ้าแฝกเพื่อเป็นพืชเศรษฐกิจโครงการหลวงณ ศาลาเริง วังไกลกังวล อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2546 สรุปประเด็นสำคัญของพระราชดำริดังนี้ **ให้ทุกหน่วยงานและหน่วยราชการที่มีศักยภาพในการขยายพันธุ์ให้ความร่วมมือกับกรมพัฒนาที่ดินในการผลิตหญ้าแฝกที่มีคุณภาพ แจกจ่ายกลุ่มเป้าหมายที่ต้องการให้พอเพียง และหากดำเนินการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องหมั่นหมุนเวียนกลับมาเริ่มจากต้นแม่พันธุ์เพราะหากขยายพันธุ์หลายช่วงต่อเนื่องกันมากเกินไปจะทำให้กล้าหญ้าแฝกอ่อนแอได้ ควรพิจารณาให้การสนับสนุนงบประมาณการผลิตหญ้าแฝกให้เพียงพอ**

เนื่องจากหญ้าแฝกเป็นที่ทราบกันในประเทศไทยว่าเป็นพืชมหัศจรรย์ ที่ใช้กันเพื่ออนุรักษ์ดินและน้ำ (Suebsiri, 1996) ทั้งนี้เพราะมีการแตกกอที่แน่น มีอายุยืน มีระบบรากที่กว้างและแผ่ลึกปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ประดิษฐ์หัตถกรรมต่างๆ (Vietmeyer, 1996) และยังใช้ผลิตเป็นหญ้าแฝกแผ่นอัดในปัจจุบัน

เทคโนโลยีการผลิตหญ้าแฝกที่เหมาะสมจำเป็นต้องอาศัยการขยายพันธุ์ที่เหมาะสม คุณภาพของต้นพันธุ์ที่ดี ตลอดจนเทคนิคการปลูก ระบบการปลูก และการจัดการที่เหมาะสม (Yoon, 1996) การขยายพันธุ์ที่ทำกันในปัจจุบันใช้วิธีการแยกกอ ซึ่งอาจเจอปัญหาเกี่ยวกับอายุทำให้โตช้า และอาจออกดอก ระบบรากไม่ค่อยดี นอกจากนี้ต้องมีแปลงขยายพันธุ์ขนาดใหญ่เพื่อเตรียมต้นสำหรับการปลูกจำนวนมาก การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทำได้ยาก เนื่องจากเมล็ดมีการพักตัวทำให้ต้องใช้วิธีการแก้การพักตัวซึ่งยุ่งยากและซับซ้อน อีกทั้งความมีชีวิตและอัตราการงอกของเมล็ดหญ้าแฝกต่ำ และแม้ว่าจะได้นำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่นับว่าสามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น แต่ต้นทุนในการผลิตยังสูง (Sayamanonta,1996) ดังนั้นยังไม่สามารถที่จะนำผลการศึกษาที่ได้มาใช้ในทางปฏิบัติอย่างจริงจัง การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านมาประสบปัญหาเกี่ยวกับการขนส่งต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปยังพื้นที่เป้าหมาย กล่าวคือสิ้นเปลืองเนื้อที่และราคาค่าขนส่ง จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมในหญ้าแฝกซึ่งเป็นเครื่องมือในการขยายพันธุ์แทนการใช้เมล็ดจริงมาก่อน วัสดุดังกล่าว (เมล็ดเทียม) เป็นส่วนที่สามารถขยายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพราะไม่กินเนื้อที่ใน

การขนส่ง การเตรียมต้นเพื่อปลูกในพื้นที่จริงก็ทำได้ง่ายและสะดวก การเจริญและพัฒนาการของต้นกล้ามีความสม่ำเสมอสูงมาก ที่สำคัญคือต้นกล้าที่ได้มีระบบรากแก้ว ดังนั้นการแผ่กระจายของรากทั้งแนวลึกและแนวกว้างเป็นไปได้ดีกว่าวัสดุปลูกอื่น ๆ จากการใช้เทคโนโลยีเซลล์พืชเพื่อการขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยวิธีการผลิตเมล็ดเทียมคาดว่ามีประโยชน์มาก

การตรวจเอกสาร

ในปี พ.ศ. 2536 มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝกภายใต้โครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ 4 โครงการ ดำเนินการโดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น กรมส่งเสริมการเกษตร และกรมพัฒนาที่ดิน (คณะทำงานวางผังแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝก, 2536) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่เผยแพร่อย่างเป็นทางการมากนัก Sayamanonta (1996) รายงานการใช้หญ้าแฝกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับการแยกกอที่โครงการพัฒนาดอยตุงว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า การแตกกอเร็วกว่าต้นที่ได้จาการแยกกอ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝกใช้วัสดุพืชเริ่มต้นที่เป็นช่อดอกเสียส่วนใหญ่ (Prasertsongskun, 2003) ชิ้นส่วนดังกล่าวมีทั้งส่วนที่เป็นเซลล์ร่างกาย และเซลล์เพศปนกัน ดังนั้นต้นที่ได้อาจมีการปะปนของเซลล์ทั้งสองทำให้มีความสม่ำเสมอน้อย Prasertsongskun (2003) รายงานการเกิดต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากช่อดอกอ่อน ผ่านเซลล์ซัสเพนชั่น อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานการชักนำรากเพื่ออนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก และไม่ได้รายงานถึงพันธุกรรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงว่าต้นที่ได้มาจากเซลล์สืบพันธุ์หรือเซลล์ร่างกาย โดยทฤษฎีเทคโนโลยีเซลล์พืช พบว่า เซลล์ซัสเพนชั่นโดยเฉพาะเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นเป็นเครื่องมือที่วิเศษทั้งในการขยายพันธุ์พืชจำนวนมาก และการปรับปรุงพันธุ์ สำหรับการขยายพันธุ์นั้นสามารถที่จะชักนำต้นอ่อนจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว จากนั้นใช้วิธีการหุ้มด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม ทำให้ได้เมล็ดนับแสนจากฟลาสค์ขนาด 125 มล. เพียง 1 ฟลาสค์ หากมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงโดยใช้ถังหมัก (bioreactor) ที่สามารถควบคุมอาหารและสภาพแวดล้อมก็จะได้เมล็ดจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง

มีรายงานการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอเจนิซิสทั้งโดยตรงและผ่านการสร้างแคลลัสจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้ไดแคมบา (Di) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (Kackar *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1992; Wang, 1990; Te-chato *et al.*, 2002) ความเข้มข้น 1 มก/ล มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการชักนำแคลลัสเริ่มแรกในกุหลาบ (Murali *et al.*, 1996) ความเข้มข้น 1-2.5 มก/ล ส่งเสริมการสร้างแคลลัสและร่นระยะเวลาการสร้างแคลลัสในปาล์มน้ำมันได้ 15-30 วัน เมื่อลดความเข้มข้นลงเป็น 0.1 มก/ล สามารถชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสได้สูงสุด (Te-chato *et al.*, 2002) และเนื่องจาก Di มีความจำเพาะต่อการชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ดังนั้น Di น่าจะเป็นสารควบคุมที่มีประสิทธิภาพในการชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนหญ้าแฝกได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถที่จะชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นเพื่อการผลิตเมล็ดเทียมหญ้าแฝกที่มีประสิทธิภาพ การผลิตเมล็ดเทียมเป็นการค้านั้นมีรายงานในแครอท ซึ่งมีพื้นฐานการศึกษาจาก Fujimura และ

Komamine (1979a, b; 1980) Komamine และคณะ (1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตเมล็ดเทียมในกล้วยไม้ซิมบิเดียม (Corrie and Tandon, 1993) ข้าวบาร์เลย์ (Datta and Potrykus, 1989) สำหรับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวยืนต้น เช่นปาล์มน้ำมันก็มีการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมจากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นเช่นเดียวกัน (Duval, *et al*., 1995) แต่เนื่องด้วยปัญหาการงอกที่ไม่มีประสิทธิภาพ และการกลายพันธุ์ที่สูงในพืชนี้จึงทำให้อุตสาหกรรมเมล็ดเทียมปาล์มน้ำมันยังไม่เป็นรูปธรรม นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดเทียมเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษา (Gray *et al*., 1987, 1995; Senarathna *et al*., 1990; Janick *et al*., 1989; Takahata *et al*., 1993) และพัฒนาระบบการหุ้มห่อ (encapsulate/seed coat) (Dainty *et al*., 1986; Tay *et al*., 1993) เพื่อให้เมล็ดดังกล่าวเหมือนกับเมล็ดพันธุ์พืชปกติ

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของหญ้าแฝก คงมีเพียงช่อดอกอ่อนเท่านั้น (Prasertsongskun, 2003) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตอบสนองที่จำเพาะของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนมีปัญหาอย่างไร นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการใช้ Di ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ ในบ้านเราเลย ขณะนี้ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีความก้าวหน้าในการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์/โปรโตพลาสต์ของพืชในสกุล *Garcinia* และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยเฉพาะปาล์มน้ำมันจากการใช้ Di พบว่า สามารถที่จะร่นระยะเวลาการชักนำแคลลัส (Te-chato *et al*., 2002) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซัสเพนชั่น และป้องกันการกลายพันธุ์ โดยการดัดแปลงสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เพาะเลี้ยง (Te-chato, 1998) ตลอดจนการให้สภาพเครียดที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการงอกของต้นอ่อนที่ได้ วิธีการและขั้นตอนดังกล่าวเป็นประโยชน์มาต่อการวิจัยเพื่อผลิตเมล็ดเทียมในหญ้าแฝก

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุพืช

ใช้หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 เป็นตัวอย่างพืชในการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ นำใบอ่อนหญ้าแฝกมาชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซัสเพนชั่นและเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอจำนวนมาก

วัสดุสารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร MS
2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D, BA, 2-iP) ผงวุ้นแอลจีเนท
3. สารอินทรีย์ประกอบเชิงซ้อน อะดินินซัลเฟต

อุปกรณ์

อุปกรณ์การตัด ย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด

ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องเขย่าเลี้ยง ไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การชักนำแคลลัสเริ่มต้นจากชิ้นส่วนใบอ่อน

ในกิจกรรมดังกล่าวจะได้ทดลองในหญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 โดยศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เพื่อส่งเสริมกระบวนการสร้างแคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส นอกจากนี้ศึกษาและระยะพัฒนาการทางสรีรวิทยาของต้นแม่ที่จะใช้เป็นแหล่งใบอ่อนมาเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง จากปัจจัยทั้งหมดข้างต้นจะได้ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพื่อศึกษาในปีที่ 2 ต่อไป นอกจากนี้จะได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตให้น้อยที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงการกลายพันธุ์ที่อาจเกิดขึ้น

2 การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และทำเมล็ดเทียม

เป็นการศึกษาต่อเนื่องจาก 1 เมื่อได้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแล้ว การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพคือการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เรียกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น ในขั้นต้นอาจต้องมีการทดสอบเบื้องต้นถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตว่าที่ใช้ในตอนต้นนั้นมีประสิทธิภาพดีหรือเปล่า จากนั้นก็จะได้ศึกษาการ synchronise ซึ่งเป็นการคัดแยกขนาดของเซลล์ในซัสเพนชั่นด้วยวิธีการกรองด้วยกระชอนสเตนเลส หรือไนลอนเมช ขนาดช่องต่างๆ กัน นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วต่างๆ และสภาพแวดล้อมต่างๆ กัน เพื่อดูการพัฒนาของเซลล์/กลุ่มเซลล์ต้นอ่อน แล้วทำการเพลทเซลล์หรือต้นอ่อนในอาหารส่งเสริมการงอก ซึ่งโดยทั่วไปเป็นสูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในอันที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะได้มีการดัดแปลงสภาพแวดล้อมในการชักนำการงอก/ยับยั้งการงอก เช่นการทำ dehydration/desiccation การให้อุณหภูมิต่ำตลอดจนการให้สภาพเครียดออสโมติค หรือสารอาหาร ตลอดจนสารชะลอ/ยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น กรดแอบซิซิค (ABA), มาลิคไฮดราไซด์ (MH) เป็นต้น เพื่อทำให้งอกได้เร็วหรือชะลอการงอก (พักตัวเหมือนเมล็ดพันธุ์ปกติ) อย่างมีประสิทธิภาพ กิจกรรมสุดท้ายในปีนี้เป็นการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารที่จะใช้เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม (เช่นโซเดียมอัลจีเนท ไคโตแซน เป็นต้น) เพียงชั้นเดียวหรือสองชั้นมาหุ้มต้นอ่อนในระยะสุดท้ายที่พร้อมจะงอก (ทอร์ปิโด) รวมทั้งการการดัดแปลงสภาพแวดล้อมข้างต้นที่ศึกษา (การ dehydration/desiccation ฯลฯ) และการเติมสารควบคุมการงอก (ABA, MH) ลงในส่วนผสมของเมล็ดเทียมเพื่อวัตถุประสงค์ที่จำเพาะด้วย นอกจากนี้อาจพัฒนาออกแบบเครื่องมือที่ใช้ผลิตเมล็ดเทียมในระดับห้องปฏิบัติการ

3 การผลิตเมล็ดเทียมจากต้นอ่อนที่เพิ่มปริมาณอย่างต่อเนื่องในถังหมัก

ในปีนี้จะนำผลสำเร็จที่ได้จาก 2 ซึ่งเป็นการผลิตเมล็ดเทียมในระดับห้องปฏิบัติการมาประยุกต์สู่ระดับเชิงการค้า ซึ่งกิจกรรมส่วนใหญ่เป็นการติดตั้งและการใช้งานถังหมัก การหาปริมาณเอ็มบริโอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงในถังหมัก การเก็บรวบรวมต้นอ่อนในระที่สมบูรณ์มาเพื่อผลิตเมล็ดหญ้าแฝกเทียมอย่างต่อเนื่อง ศึกษาการงอกและดัดแปลงส่วนผสมของเปลือกหุ้มเมล็ดให้เหมาะสมต่อการงอก

4 สถิติที่ใช้ในการศึกษา

ทุกการศึกษาข้างต้นวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยเปรียบเทียบจากเปอร์เซ็นต์ของพัฒนาการ หรือใช้แผนการทดลองที่ง่ายที่สุด คือสุ่มตลอด (completely randomize design, CRD) ในแต่ละการศึกษาจะได้ศึกษาปัจจัยแต่ละปัจจัยแยกกัน เพราะมีความเป็นอิสระแก่กัน ไม่มีความสัมพันธ์กัน

ผลการศึกษา

1. การชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อน

1.1 <u>ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต</u>

จากการทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปออกซิน 3 ชนิดคือ ไดแคมบา 2,4-D และ ปิคลอแรมต่อการสร้างแคลลัสเริ่มแรกพบว่าคงมีเพียง 2,4-D เท่านั้นที่ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้างแคคลัสคือ 3 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร (ตารางที่ 1) ไดแคมบาที่ทดสอบก็ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่ใช้ต่ำเกินไป (0.25-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หากใช้ความเข้มข้นสูงใกล้เคียง 2,4-D อาจส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการชักนำแคลลัสเริ่มต้น หรือเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหญ้าแฝกโดยใช้ไดแคมบามาก่อนเลย ดังนั้นไดแคมบาจึงเป็นออกซินที่ไม่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงหญ้าแฝก นอกจากนี้การเตรียมต้นกล้าในเรือนกระจกเพื่อปรับสภาพทางสรีรวิทยาของต้นแม่ก็ไม่มีผลต่อการชักนำแคลลัส การเลี้ยงทั้งใน 2 สภาพคือในเรือนกระจก และแปลงปลูกให้ผลการสร้างแคลลัสได้ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม 2,4-D ยังคงให้การสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด

ตารางที่ 1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากการชักนำจากใบอ่อนหญ้าแฝกในสูตรอาหาร MS เป็นเวลา 75 วัน

ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก/ล)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส (ซม)	พัฒนาการของแคลลัส
2,4-D	1	0	0	-
	2	0	0	-
	3	30.00	0.08±0.07	Slow growing
	4	66.67	1.53±0.007	Fast growing
	5	0	0	-
ปิคลอแรม	1	0	0	-
	2	0	0	-
	3	0	0	-
	4	0	0	-
	5	0	0	-
ไดแคมบา	0.1	0	0	-
	0.25	0	0	-
	0.5	0	0	-
	0.75	0	0	-
	1.00	0	0	-

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ชักนำการสร้างแคลลัสคือ ความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ทั้งสองความเข้มข้นให้แคลลัสที่มีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบอย่างเห็นได้ชัด แคลลัสที่พัฒนาในสูตรอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้แคลลัสที่โตช้า (slow growing callus) ในขณะที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรส่งเสริมการสร้างแคลลัสที่โตเร็ว (fast growing callus) (ตารางที่ 1) แคลลัสดังกล่าวสร้างในที่มืด เมื่อย้ายไปเลี้ยงในสภาพการให้แสงต่ออีกเป็นเวลา 30 วัน ชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 15% (ตารางที่ 2) การไม่สร้างแผลกับชิ้นส่วนใบส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีกว่าการไม่สร้างแผล อัตราการสร้างแคลลัสในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงสุด 66% แคลลัสที่ได้เป็นแบบโตเร็วในขณะที่ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้อัตราการสร้างแคลลัสรองลงมา (30%) แต่แคลลัสที่สร้างเป็นแบบโต

ช้าอย่างไรก็ตามการสร้างแผลร่วมกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้นของ ต่ำ 1 และสูง 5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างแคลลัสแบบโตเร็วได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 พัฒนาการของแคลลัสจากการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน และที่สว่างเป็นเวลา 30 วัน)

พัฒนาการ	การตอบสนอง (%) (±SD)	ขนาด Embryogenic callus (มม)
Embryogenic callus	15.48±1.69	2.0±0
Fast growing	38.09±6.73	-
Slow growing	46.42±2.53	-

ตารางที่ 3 ผลของการสร้างแผลและความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสจากการชักนำจากใบอ่อนหญ้าแฝกบนอาหารสูตร MS เติมวุ้น phytagel 0.17% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มก/ล)	การสร้างแผล	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (±SD)	ขนาดของแคลลัส (ซม) (±SD)	พัฒนาการของแคลลัส
1	สร้าง	16.25±5.30	0.32±0	Fast growing
	ไม่สร้าง	0	0	-
2	สร้าง	0	0	-
	ไม่สร้าง	0	0	-
3	สร้าง	-	-	-
	ไม่สร้าง	30	0.08±0.07	Slow growing
4	สร้าง	-	-	-
	ไม่สร้าง	66.7	1.53±0.07	Fast growing
5	สร้าง	25.0±35.36	0.45±0.32	Fast growing
	ไม่สร้าง	0	0	-

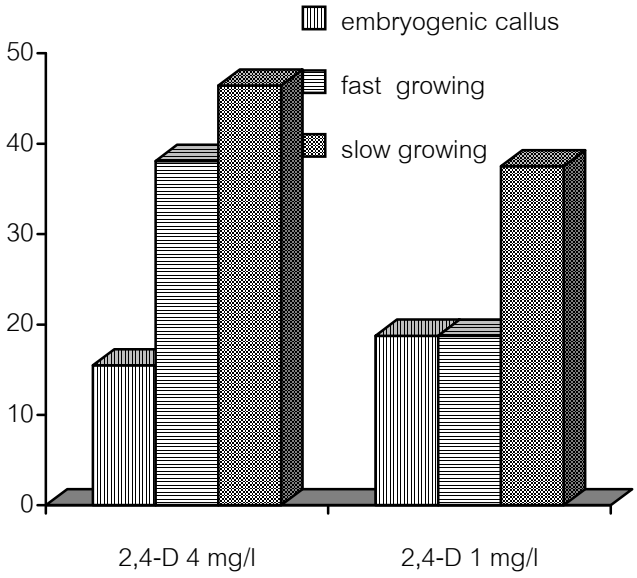
- ไม่ได้ทำการทดลอง

การดูแลหรือย้ายเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้อัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัสต่ำ พัฒนาการของแคลลัสเพื่อให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่ำ

เช่นเดียวกัน การย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเหลือ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงขึ้นเป็น 18% ขนาดของแคลลัสก็โตกว่าด้วย (ตารางที่ 4 รูปที่ 1) แคลลัสแบบต่างๆ ที่พัฒนาในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D แสดงในรูปที่ 2

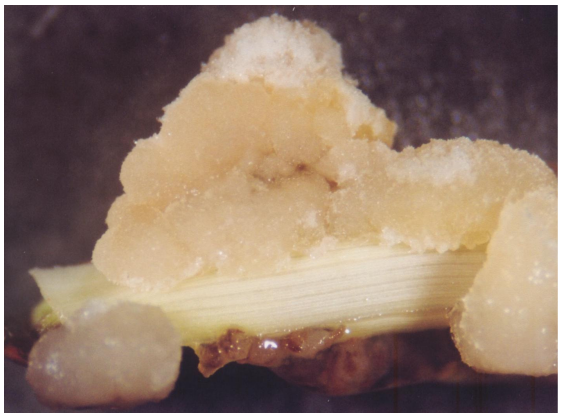
ตารางที่ 4 พัฒนาการของแคลลัจากการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่สว่าง) เป็นเวลานาน 60 วัน

พัฒนาการ	เปอร์เซ็นต์ (±SD)	ขนาด Embryogenic callus (mm^2) (±SD)
Embryogenic callus	18.75±12.5	3.33±1.15
Fast growing	18.75±12.5	-
Slow growing	37.5±14.43	-

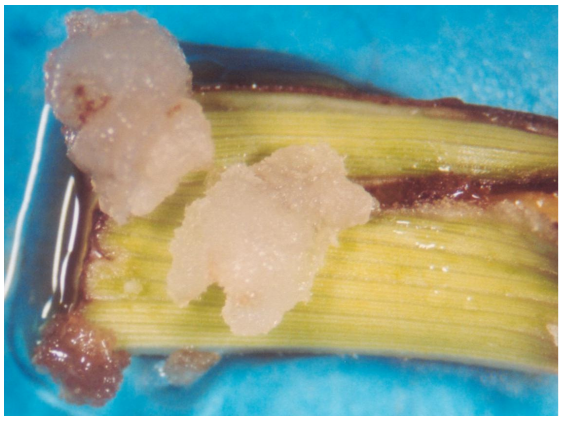


รูปที่ 1 พัฒนาการของแคลลัส (%) ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร(ที่สว่าง) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 60 วันและในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน และที่สว่างเป็นเวลา 30 วัน

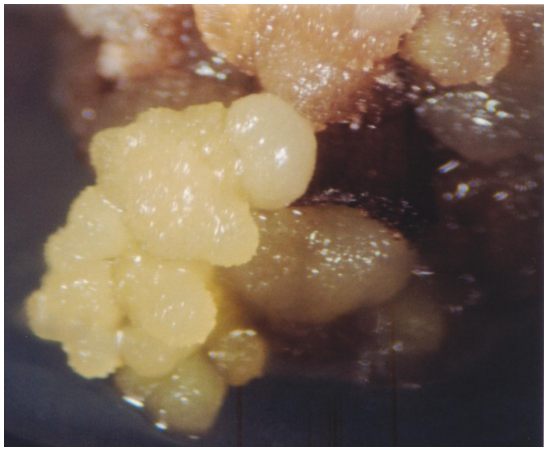
การใช้ไซโตไคนินเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับออกซินในระดับความเข้มข้นต่างๆ ส่งเสริม หรือช่วยเพิ่มการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคคลัสสูงขึ้นโดยเฉพาะ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตรให้การสร้างสูงถึง 29.5% (รูปที่ 3) อย่างไรก็ตามการใช้ BA ร่วมด้วยส่งเสริมให้การแบ่งเซลล์เป็นไปอย่างรวดเร็ว แคลลัสมีขนาดใหญ่ แคลลัสบางส่วนมีโครงสร้างเป็นเส้นยาวคล้ายราก



ก



ข



ค

รูปที่ 2 การชักนำแคลลัสและพัฒนาการจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนหญ้าแฝกในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ

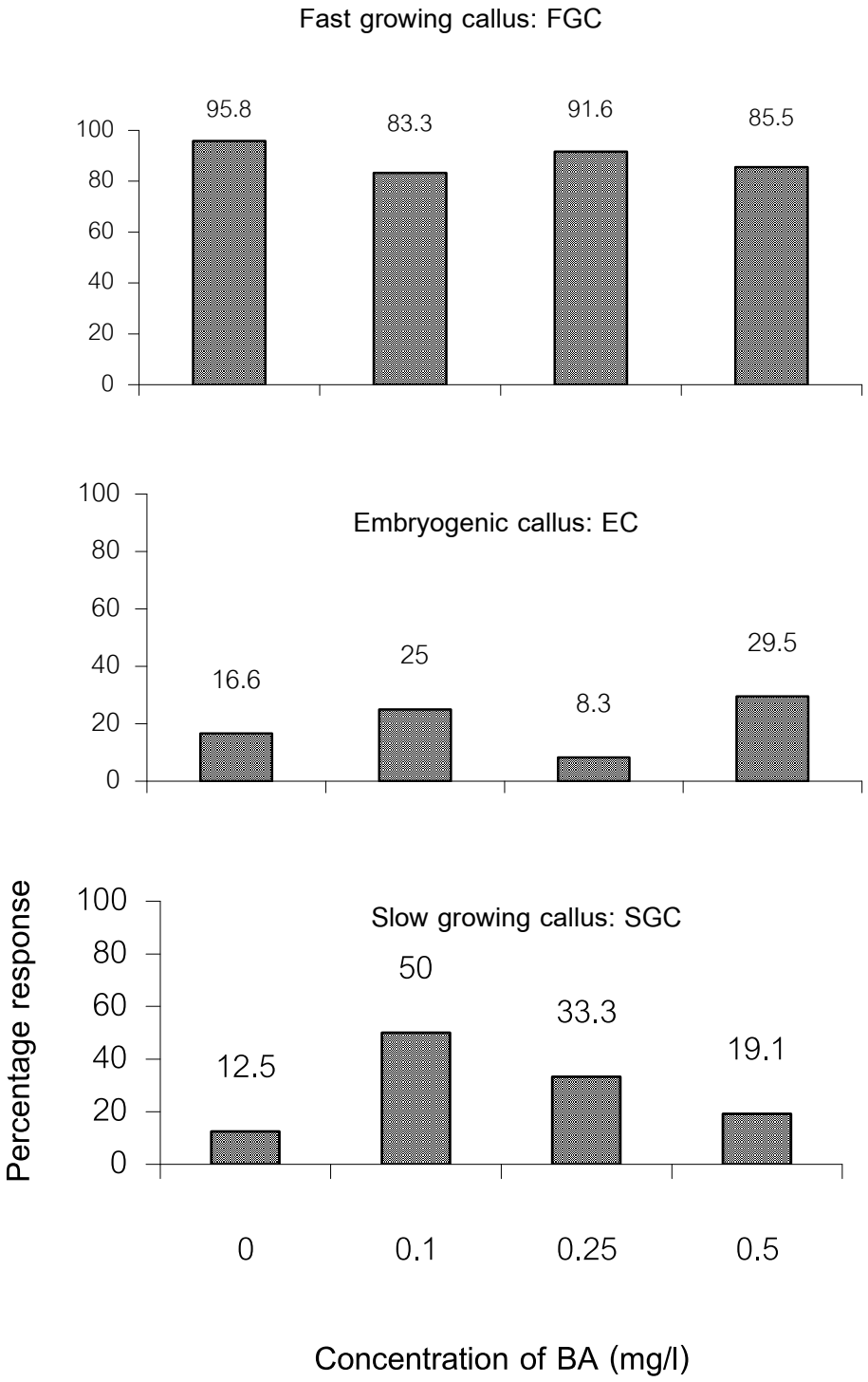
א. การชักนำแคลลัสจากใบที่ไม่มีการสร้างแผล (75 วันหลังการเพาะเลี้ยง)

ב. การชักนำแคลลัสจากใบที่มีการสร้างแผล (75 วันหลังการเพาะเลี้ยง)

ג. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติคเอ็มบริโอ (30 วันหลังย้ายเลี้ยง)

FGC=fast growing caallus; SGC=slow growing callus;

EC=embryogenic callus



รูปที่ 3 ผลของ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างแคลลัสแบบต่างๆ ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

1.2 **ผลของ casein hydrolysate หรือ adenine sulphate**

อาหารเติม casein hydrolysate ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างปมในแคลลัส โดยอาหารเติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casein hydrolysate 1000 มก/ล ในวุ้น phytagel ให้การสร้างปมสูงสุด 70 % จำนวนปมเฉลี่ย 4 ปม/ชิ้นส่วน ในขณะที่ adenine sulphate ไม่ส่งเสริม (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลของ casein hydrolysate (CH) หรือ adenine sulphate (AD) ต่อพัฒนาการของแคลลัสในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D หรือ ไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้นตรานางเงือกเข้มข้น 0.65% หรือวุ้น phyta gel เข้มข้น 0.2%

2,4-D+ผงวุ้นตรานางเงือก		% FGC	% EC (nodule calli)
AD(มก/ล)	CH (มก/ล)		
0	0	90	30 (1.33)
100	0	10	0
200	0	0	0
500	0	0	0
750	0	0	0
1000	0	0	0
0	100	30	10 (1.0)
0	200	20	30 (1.33)
0	500	20	20 (1.0)
0	750	30	30 (1.0)
0	1000	0	10 (1.0)
2,4-D+ ผงวุ้น phyta gel			
0	0	81.89	55.56 (2.6)
100	0	10	50 (1.6)
200	0	0	10
500	0	0	0
750	0	0	0
1000	0	0	0

ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนปม หรือต้นอ่อนระยะรูปกลม

ตารางที่ 5 (ต่อ)

2,4-D+ ผงวุ้น phyta gel		% FGC	% EC (nodule calli)
AD(มก/ล)	CH (มก/ล)		
0	100	70	50 (2.0)
0	200	70	70 (2.71)
0	500	40	40 (3.5)
0	750	60	70 (2.14)
0	1000	80	70 (4.0)
ไดแคมบา + ผงวุ้นตรานางเงือก			
0	0	83.33	50 (1.67)
100	0	33.33	50 (1.33)
200	0	0	0
500	0	0	0
750	0	0	0
0	100	50	50 (1.33)
0	200	33.33	16.67 (4.0)
0	500	33.33	16.67 (2.0)
0	750	33.33	33.33 (2.5)
0	1000	50	33.33 (2.5)

ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนปม หรือต้นอ่อนระยะรูปกลม

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ไดแคมบา+ผงวุ้น phyta gel		% FGC	% EC (nodule calli)
AD (มก/ล)	CH (มก/ล)		
0	0	66.67	33.33 (2)
100	0	0	0
200	0	0	0
500	0	0	0
750	0	0	0
1000	0	0	0
0	100	33.33	33.33 (2.0)
0	200	100	66.67 (1.75)
0	500	16.67	16.67 (1.0)
0	750	33.33	20.0 (1.0)
0	1000	50	40 (1.5)

ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนปม หรือต้นอ่อนระยะรูปกลม

ดังนั้นสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัสหญ้าแฝก คือ สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 1000 มก/ล อย่างไรก็ตามต้นอ่อนที่พัฒนาจากสูตรอหารที่ดัดแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโตข้างต้นไม่สามารถที่จะงอกเป็นต้นกล้าที่ปกติ คงมีเพียงการเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่องในอาหารเหลวที่ย้ายเลี้ยงเป็นช่วงเวลาที่แน่นอน จึงตั้งสมมติฐานว่าต้นอ่อนน่าจะมีการสร้างเอทธิลีนที่เป็นตัวยับยั้งการงอกดังนั้นในการศึกษาต่อไปเป็นการใช้สารที่มีกิจกรรมยับยั้งการสร้างเอทธิลีนเปรียบเทียบกับสารควบคุมและสารเติมที่เหมาะสมที่ผ่านมา

1.3 **ผลของ 2,4-D, AgNO3, 2-iP และ casein hydrolysate**

อาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate 500 มก/ล ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างปมในแคลลัส ให้การสร้างปมสูงสุด 67.5 % จำนวนปมเฉลี่ย 3.02 ปม/ชิ้นส่วนในขณะที่ $AgNO_3$ และ 2-iP ไม่ส่งเสริม แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ผลของ 2,4-D, $AgNO_3$, isopentenyl adenine (2-iP) และ casein hydrolysate (CH) ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์

2,4-D	$AgNO_3$	2-iP	CH	โนดูลาร์แคลลัส	จำนวนปม/แคลลัส	อัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัส (%)
มก/ล				(%)		
0	0	0	0	0	0	1.25
1	4	0.1	0	0	0	0
1	8	0.1	0	0	0	0
1	12	0.1	0	0	0	0
1	16	0.1	0	0	0	0
1	0	0	0	20.72	2.54	48.5
2	0	0	0	42.5	2.97	60
3	0	0	0	27.5	1.79	50
1	0	0	500	35	2.73	55
1	0	0	1000	30	1.67	47.5
2	0	0	500	47.5	3.45	70
2	0	0	1000	47.5	4.18	67.5
3	0	0	500	67.5	3.02	85
3	0	0	1000	27.5	2.12	70

1.4 <u>ผลของน้ำตาล</u>

เมื่อทำการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 500 มก/ล และเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ sucrose, lactose, fructose, manitol และ sorbitol ความเข้มข้น เท่ากันคือ 3% พบว่า น้ำตาล lactose ให้อัตราการสร้างปมสูงสุด 45% และจำนวนปมเฉลี่ย 5.62 ปม/ชิ้นส่วน รองลงมาคือ sucrose ให้อัตราการสร้างปม 42.5% อย่างไรก็ตามอาหารเติม fructose ให้จำนวนปมเฉลี่ยสูงสุด 8 ปม/ชิ้นส่วน (ตารางที่ 8) จึงทำการศึกษาการเติมน้ำตาล 2 ชนิดร่วมกันคือ lactose ร่วมกับ sucrose โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1.5% และlactose เข้มข้น 2 หรือ 2.5% ร่วมกับ fructose เข้มข้น 1 หรือ 0.5% พบว่า การใช้ lactose ร่วมกับ sucrose ส่งเสริมการสร้างปมสูงสุด 65% และจำนวนปมเฉลี่ย เพิ่มขึ้นเป็น 8.58 ปม/ชิ้นส่วน อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาล lactose ร่วมกับ fructose ให้จำนวนปมเฉลี่ยสูงกว่า (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 7 ผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 3% ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Carbon source	% of nodule calli	number of nodules/callus
Sucrose	42.50	2.41
Glucose	30.00	2.25
Lactose	45.00	5.62
Fructose	17.50	8.00
Manitol	25.00	1.70
Sorbitol	20.00	2.00

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลร่วมกันต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Carbon source	% of nodule calli	number of nodules/callus
1.5% Sucrose +1.5% Lactose	65.00	8.58
2% Lactose + 1% Fructose	52.50	11.49
2.5% Lactose + 0.5% Fructose	55.00	10.68

1.5 **ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัส**

เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเติมไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ คือ KN, BA และ 2-iP ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล พบว่า อาหารเติม BA 1 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 1 มก/ล ให้อัตราการสร้างปมสูงสุด 90.91 % จำนวนปมเฉลี่ยสูงสุด 2.71 ปม/ชิ้นส่วน (ตารางที่ 10) และเมื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ของแคลลัส โดยนำแคลลัสมา 0.3 กรัมละลายน้ำกลั่นปริมาตร 25 มล และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo พบว่า เซลล์ในระยะรูปกลม และระยะรูปหัวใจใกล้เคียงกันในอาหารเติม BA 1 หรือ 2 มก/ล (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 9 ผลของไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Cytokinin (mg/l)				Fast growing callus (%)	Nodular calli (%)	No of nodule	Rooted calli (%)	No of root
BA	KN	2-iP	TDZ					
1	-	-	-	41.48	90.91	2.71	0	0
2	-	-	-	25.00	75.00	1.83	0	0
-	1	-	-	87.50	2.50	1.00	5.00	1.00
-	2	-	-	33.34	0	0	2.50	0.50
-	-	1	-	95.00	20.00	1.36	7.50	(0.67)
-	-	2	-	35.00	12.50	1.00	0	0
-	-	-	1	60.00	12.50	2.00	15.00	1.33
-	-	-	2	78.82	14.24	1.25	23.96	1.30

ตารางที่ 10 จำนวนต้นอ่อนระยะรูปกลม และรูปหัวใจในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Cytokinin (mg/l)				The number of globular embryos/g.fr.wt.	The number of heart shape-embryos/g.fr.wt.
BA	KN	2-iP	TDZ		
1	-	-	-	34.5	25.6
2	-	-	-	42.0	25.8
-	1	-	-	0	0
-	2	-	-	0	0
-	-	1	-	10.0	10.0
-	-	2	-	10.0	10.0
-	-	-	1	12.0	10.0
-	-	-	2	10.0	0

และเมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก/ล เป็นเวลา 3 เดือน ทำการชั่งน้ำหนักสดเปรียบเทียบกัน พบว่า ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากัน คือ 0.415 กรัม/ชิ้นส่วน ดังนั้นจึงเลือกอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 มก/ล ในการย้ายเลี้ยงเพื่อชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น และเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและศึกษาพัฒนาการของเอ็มบริโอ ให้มีการงอกหรือพัฒนาเป็นต้นต่อไป เช่น อาจจะเพิ่มความเข้มข้นของ BA หรือปัจจัยอื่น ๆ เช่น การเติม ABA, PEG หรือ GA_3

2 การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และทำเมล็ดเทียม

2.1 <u>การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลลซัสเพนชั่น</u>

ย้ายเอ็มบริโอแคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 มก/ล ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิตร ปริมาตร 35 มิลลิลิตร โดยใช้แคลลัสน้ำหนักสดเริ่มต้น 0.5 กรัม เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีภายใต้การให้แสง 500-1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ โดยการดูดเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2 <u>ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและการคัดแยกขนาด</u>

ในการศึกษานี้คัดแยกเซลล์ซัสเพนชั่นที่ผ่านการกรองด้วยตะแกรง 2 ขนาด แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 1000 มก/ล เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ จึงย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือน บันทึกพัฒนาการของเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า การกรองแยกขนาดของเซลล์โดยกรองขนาดใหญ่ มีแนวโน้มการพัฒนาของเซลล์ดีกว่าการใช้กรองขนาดเล็ก และการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ให้เซลล์พัฒนาในระยะรูปกลมสูงสุด 4.87% อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ให้ผลใกล้เคียงกัน (4%) และไม่พบการพัฒนาเป็นโครงสร้างของราก (ตารางที่ 12)

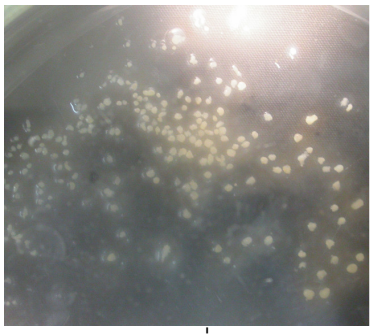
ตารางที่ 11 ผลของขนาดของซัสเพนชั่นเซลล์เริ่มต้นต่อการเจริญและพัฒนาการในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Time of culture & size of sieve	% of globular shape	% of heart-torpedo shape	% of rooted calli
1 week			
Small size	4.26	0	1
Large size	0.58	0	3
2 weeks			
Small size	2.82	0	3.36
Large size	4.87	0	2.02
3 weeks			
Small size	0.71	0	0
Large size	1.64	0	1.11
4 weeks			
Small size	0	0	0
Large size	4.00	0	0

ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น อย่างน้อย 4 สัปดาห์ อาจส่งเสริมให้เซลล์มีพัฒนาการที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้น และการกรองแยกขนาดของเซลล์ด้วยกรองขนาดใหญ่มีแนวโน้มในการพัฒนาของเซลล์ดีกว่า หรืออาจไม่ต้องมีการกรองแยกขนาดก็ได้ ซึ่งจากการสังเกตการย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเพิ่มปริมาณ (สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 1000 มก/ล) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการค่อนข้างดี อย่างไรก็ตามเซลล์ที่พัฒนาในขณะนี้อยู่ในระยะรูปกลม และพบบางเซลล์ที่คาดว่ามีการพัฒนาต่อในระยะหัวใจ (รูปที่ 4) เนื่องจากการเปลี่ยนรูปร่างค่อนข้างยาวขึ้น จึงทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่เป็นสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งประสบผลสำเร็จในการชักนำให้มีการงอกของเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามในหญ้าแฝก พบว่าต้นอ่อนไม่งอกหรือพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ แต่มีการพัฒนาเป็นรากแทน ดังนั้นในการศึกษาต่อไป อาจศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งเสริมพัฒนาการของต้นอ่อนในเซลล์ซัสเพนชั่นต่อไป เช่น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินบางชนิด เช่น BA หรือ TDZ การเติม ABA, PEG หรือ GA3

ซึ่งในขณะนี้กำลังศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 สัปดาห์) และศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (0, 1, 2, 3, 4 มก/ล) ร่วมกับ อาหารสูตรเพิ่มปริมาณ ต่อพัฒนาการของเซลล์ซัสเพนชั่น และเพื่อให้การผลิตเมล็ดเทียมประสบผลสำเร็จมีการงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ จึงได้มีการชักนำการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้ปลายยอดขนาด 3-5 มิลลิเมตรเป็นวัสดุพืชเริ่มต้นสำหรับการหุ้มห่อทำเมล็ดเทียม เสริมการใช้ต้นอ่อนที่ชักนำในเซลล์ซัสเพนชั่น

การกรองคัดแยกขนาดโซมาติคเอ็มบริโอ



เอ็มบริโอรูปกลมที่มีความสม่ำเสมอสูง

พัฒนาการเข้าสู่ระยะรูปหัวใจ

รูปที่ 4 การกรองคัดแยกเซลล์ซัสเพนชั่นเพื่อนำไปใช้ทำเมล็ดเทียมในระยะต่างๆ และส่งเสริมการงอกที่เหมาะสม

2.3 <u>การทำเมล็ดเทียมหญ้าแฝก</u>

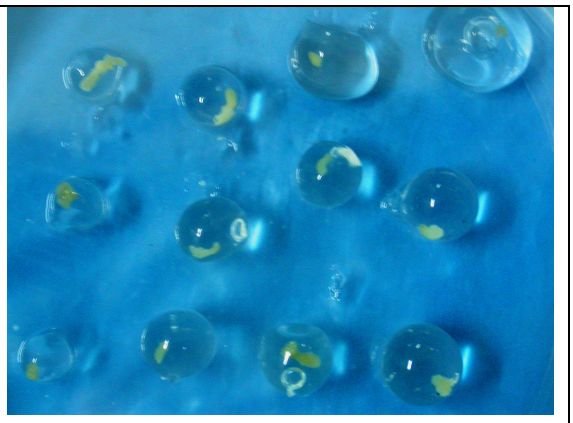
โดยการนำโซมาติคเอ็มบริโอ และปลายยอดอ่อนหญ้าแฝกมาห่อหุ้มด้วยแอลจิเนทบีท วิธีการเตรียมโซมาติคเอ็มบริโอและยอดอ่อนมีดังนี้คือ นำแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นชนิดละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้มาหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตชนิดต่างๆ ในกรณีของปลายยอดอ่อนได้จากการตัดปลายยอดไปต้นอ่อนที่ชักนำได้ในหลอดทดลองไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำโซมาติคเอ็มบริโอ และปลายยอดมา embed ในวุ้น Wako ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน บันทึกผลการงอกในระดับห้องปฏิบัติการบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือในสภาพที่ไม่มีอาหาร พบว่า เมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอสูญเสียความสามารถในการงอก มีการพัฒนากลับมาเป็นแคลลัสใหม่ไม่ว่าจะเป็นการหุ้มต้นอ่อนในระยะใด (รูปที่ 5) ส่วนเมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มยอดอ่อน (รูปที่ 6) นั้นสามารถงอก

ได้ 100% หลังจากเพาะในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และพัฒนาให้ต้นกล้าที่แข็งแรงในเวลา 2 สัปดาห์ต่อมา (รูปที่ 7) และวุ้น Wako ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โซมาติกเอ็มบริโอจะมีการพัฒนาเป็นแคลลัสมากที่สุด (89.78 %) (ตารางที่ 13) และการ embed ที่มีลักษณะกลมเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นอื่นๆ ดังรูป

ตารางที่ 12 ผลของโซเดียมแอลจิเนตจากบริษัท Wako ความเข้มข้นต่างๆ ต่อพัฒนาการของต้นอ่อนที่หุ้มเป็นเมล็ดเทียม และลักษณะของบีดที่ได้จากการหุ้ม

ความเข้มข้น (%)	การสร้างแคลลัส (%)	หมายเหตุ
1	52.65	วุ้นมีลักษณะเหลว
2	89.78	วุ้นมีลักษณะกลม
3	49.27	วุ้นกลม และเหนียวเล็กน้อย
4	43.74	วุ้นแข็ง และเหนียวมาก

การหุ้มต้นอ่อนในระยะรูปกลม



การหุ้มต้นอ่อนในระยะรูปหัวใจถึงทอร์ปิโด

รูปที่ 5 การหุ้มโซมาติคเอ็มบริโอในระยะต่างๆ ด้วยโซเดียมแอลจิเนทเข้มข้น 2%

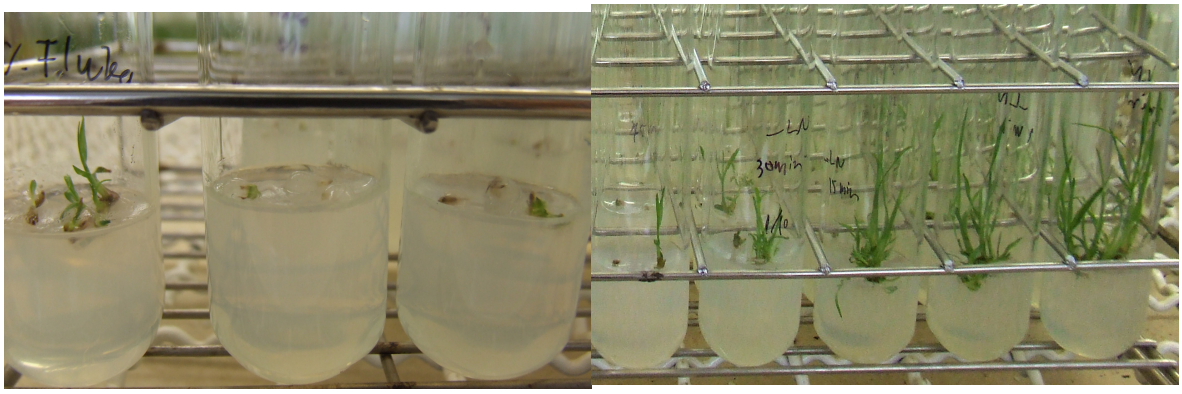
ก **ข** **ค**

รูปที่ 6 ลักษณะของเมล็ดเทียมจากการหุ้มปลายยอดขนาด 3-5 มิลลิเมตรด้วยโซเดียมแอลจิเนต (บริษัท Wako) ความเข้มข้นต่าง ๆ

ก ความเข้มข้น 2%

ข ความเข้มข้น 3%

ค ความเข้มข้น 4%



ก **ข**

รูปที่ 7 การเพาะเมล็ดเทียมในห้องปฏิบัติการบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

א) หลังจากเพาะเป็นเวลา 2 สัปดาห์

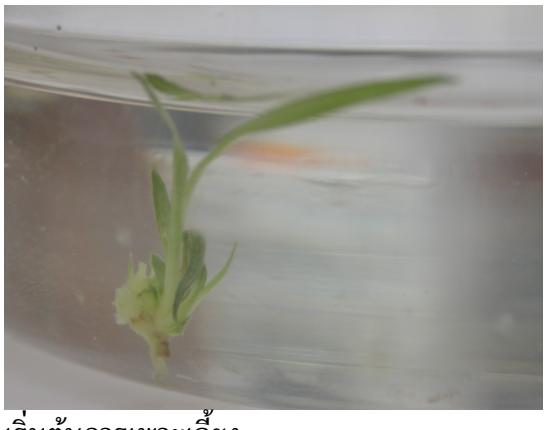
ב) หลังจากเพาะเป็นเวลา 4 สัปดาห์

แม้ว่าสามารถที่จะชักนำต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นจำนวนมากก็ตาม แต่เมื่อนำต้นอ่อนระยะต่างๆ มาหุ้มด้วยแอลจิเนตเพื่อผลิตเมล็ดเทียม พบว่า ไม่สามารถที่จะงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความซับซ้อนของการงอกที่ต้องการปัจจัยบางประการเช่น การลดความชื้น หรือน้ำตาลที่เกี่ยวกับสภาวะเครียดอันเนื่องมาจากแรงดันออสโมติค หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นอ่อนเอง ในขณะที่การใช้ปลายยอดให้ผลสำเร็จในอัตราสูงกว่าและให้อัตราการงอกหลังจากผลิตเป็นเมล็ดเทียมถึง 100% ดังนั้นการใช้ปลายยอดเป็นแหล่งวัสดุพืชเพื่อผลิตเมล็ดเทียมมีศักยภาพสูงมาก จึงได้พัฒนาวิธีการเพิ่มยอดจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นเพื่อนำปลายยอดมาทำเมล็ดเทียมต่อไป

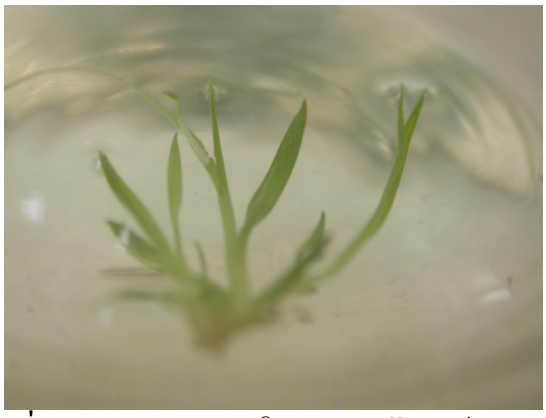
2.4 <u>การเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย</u>

เป็นการประยุกต์การเพาะเลี้ยงในฟลาสค์ขนาด 250-500 มิลลิลิตร โดยในขั้นต้นเป็นการเติมอาหารให้หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์เพื่อส่งเสริมการเจริญและพัฒนายอดรวมอย่างต่อเนื่อง ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มยอดรวมเริ่มต้นขนาดเล็ก 3-5 มิลลเมตร ภายในมีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด 3-5 ยอด อาหารเหลวที่ใช้เริ่มแรก 30-35 มิลลิลิตร อาหารที่เติมให้ใหม่ 15-20 มิลลิลิตร ทุกช่วงเวลา 3-4 สัปดาห์เป็นเวลา 6 เดือน หลังจากเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 80-100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 เดือน ตรวจนับจำนวนยอดรวมที่พัฒนาในแต่ละช่วงเพื่อดูความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์จำนวนมากเชิงพาณิชย์

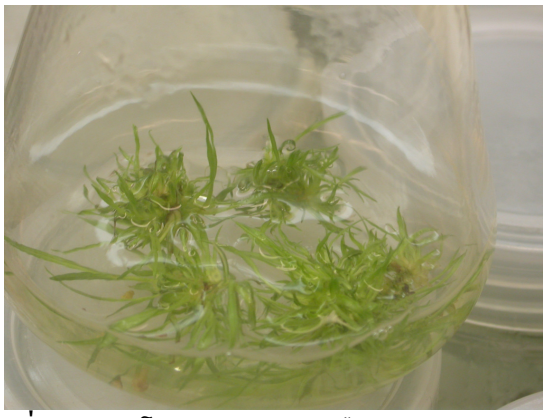
กลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมากสามารถที่จะพัฒนาให้ยอดขนาดเล็กๆ จำนวน 4-5 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (รูปที่ 8) ที่ฐานของยอดมีการพัฒนาเป็นกลุ่มตายอดขนาดเล็ก และหลุดออกมาจากกลุ่มยอดรวมเดิมและพัฒนาให้เป็นกลุ่มยอดรวมใหม่จำนวนมากนับร้อยหลังจากเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโดยไม่มีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 เดือน (รูปที่ 9) เพื่อลดปัญหาการย้ายเลี้ยงบ่อยครั้งและเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนยอดจึงได้ดัดแปลงการเพาะเลี้ยงเลียนแบบไบโอรีแอคเตอร์ ทำในฟลาสค์ขนาด 500 มิลลิลิตร มีการให้อาหารเป็นช่วงเวลา และดูดอาหารออกเมื่อครบเวลาการย้ายเลี้ยง (3-4 เดือน) จากนั้นจึงค่อยเติมอาหารใหม่โดยใช้ปั๊มไฟฟ้า สำหรับอัตราการเพิ่มปริมาณยอดรวมด้วยวิธีการนี้แสดงในตารางที่ 14 อุปกรณ์และเครื่องมือแสดงในรูปที่ 10



เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง



เพิ่มปริมาณ 4-5 เท่า ในเวลา 3 สัปดาห์



เพิ่มปริมาณโดยการแตกกอหรือยอดแขนง
หลังจากเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

รูปที่ 8 การเพิ่มปริมาณของยอดรวมจำนวนมากในอาหารเหลวจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากกลุ่มตายอดเพียงหนึ่ง ภายในเวลา 2 เดือน (8 สัปดาห์)

รูปที่ 9 การเพิ่มปริมาณยอดหญ้าแฝกจำนวนมากจากการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ batch culture เป็นเวลา 3-4 เดือน

ตารางที่ 14 อัตราการเพิ่มปริมาณยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างต่อเนื่องในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย

เวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	จำนวนกลุ่มตายอด	จำนวนยอด(รวม)	จำนวนยอดทั้งหมด
0	1	0	0
4	1	5	5
8	4	20	25
12	6	120	125
16	9	1,080	1,205
20-24	ไม่สามารถนับได้	1,200-1,500	1,500-1,700

กรเติมอาหารให้อย่างต่อเนื่อง 3-4 เดือน

ดูดอาหารเก่าออกเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่

รูปที่ 10 การออกแบบการเพาะเลี้ยงยอดหญ้าแฝกอย่างง่าย และต่อเนื่องโดยการลดขั้นตอนการย้ายเลี้ยง และเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างยอดจำนวนมาก

เอกสารอ้างอิง

คณะทำงานวางแผนแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝก. 2536. แผนแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝกอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. กองแผนงาน กรมพัฒนาที่ดิน หน้า 124-132.

Corrie, S. and Tandon, P. 1993. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. Through high frequency conversion of encapsulated protocorms under in vivo and in vitro conditions. Indian J. Exp. Biol. 31:61-64.

Dainty, A.I. Goulding, K.H., Robinson, P.K. and Simpkins, I 1986. Stability of alginate-immobilised algal cells. Biotechnol. Bioeng. 28:209-216.

Datta, S.K. and Potrykus, I. 1989. Artificial seeds in barley: Encapsulation of microspore-derived embryo. Theor. Appl. Genet. 77:820-824.

Duval, Y., Engelmann, F. and Durand-Gasselin, T. 1995. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 30, pp.335-352. Berlin: Springer-Verlag.

Fujimura, T. and Komamine, A. 1979a. Synchronization of somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. Plant Physiol. 64:162-164.

Fujimura, T. and Komamine, A. 1979b. . Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z Pflanzenphysiol. 95:13-19.

Fujimura, T. and Komamine, A. 1980. The serial observation of embryogensis in a carrot cell suspension culture. New Phytol. 86:213-218.

Gray, D.J., Conger, B.V. and Songstad, D.D. 1987. Desiccated quiescent somatic embryos of orchard grass for use as synthetic seeds. In Vitro Cell. Dev. Biol. 23:29-33.

Gray, D.J., Compton, M.E., Harrell, R.C. and Cantliffe, D.J. 1995. Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 30, pp.126-151. Berlin, Germany:Springer-Verlag

Janick, J., Kitto, S. and Kim, Y.H. 1989. Production of synthetic seed by desiccation and encapsulation. In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:1167-1172.

Kackar, A., Bhat, S.R., Chandel, K.P.S. and Malik, S.K. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32:289-292.

Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, T., Toya, T., Fujimura, A., Tsukahara, M., Smith, J., Itoh, M., Fukuda, H., Nomura, K. and Fujimura, T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell culture: Physiology, biochemistry and molecular biology. In vitro cell. Dev. Biol. 28:11-14.

Murali, S., Sreedhar, D. and Lokeswari, T.S. 1996. Regeneration through somatic embryogenesis from petal-derived calli of *Rosa hybrida* L. cv arizona (hybrid tea). Euphytica 91:271-275.

Prasertsongskun, S. 2003. Plant regeneration from callus of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash). Songklanakarin J. Sci. Technol. 25:637-642.

Sayamanonta, R. 1996. Vetiver grass and the Doi Tung development project. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass (eds. N. Chomchalow and H.V.Henle, 1998) pp. 41-43, The Chaipattana Foundation, Bangkok.

Senarathna, T., McKersie. B.D. and Bowley. S.R. 1990. Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Induction of desiccation tolerance in somatic embryos. In Vitro. Cell. Dev. Biol. 26:85-90.

Suebsiri, B. 1996. The use of vetiver hedge in soil and water conservation system under the Royal Project Foundation. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass (eds. N. Chomchalow and H.V.Henle, 1998) pp. 27-29, The Chaipattana Foundation, Bangkok.

Takahata, Y., Brown, D.C.W., Keller, W.A. and Kaizuma, N. 1993. Dry artificial seeds and desiccation tolerance induction in microspore-derived embryos of broccoli. Plant Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35:121-129.

Tay, L.F., Khoh, L.K., Loh, C.S. and Khor, E. 1991. Alginate-chitosan conservation in production of artificial seeds. Biotechnol. Bioeng. 42:449-454.

Taylor, P.W.J., Ko, H.L., Adkins, S.W., Rathus, C. and Birch, R.G. 1992. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28:69-78.

Te-chato, S. 1998. Fertile plant from young leaves-derived somatic embryos of oil palm. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20:7-13.

Te-chato, S., Hilae, A. and Yeedum, I. 2002. Improve callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. Thai J. Agric. Sci. 35:407-413.

Vietmeyer, N. D. 1996. Organizing vetiver's next steps to global acceptance. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass (eds. N. Chomchalow and H.V.Henle, 1998) pp. 18-26, The Chaipattana Foundation, Bangkok.

Wang, A.S. 1990. Callus induction and plant regeneration of American ginseng. HortScience 25:571-572.

Yoon, P.K. 1996. Use of vetiver for embankments and soil stabilization. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass (eds. N. Chomchalow and H.V.Henle, 1998) pp. 30-40, The Chaipattana Foundation, Bangkok.