

บทที่ 1

ประวัติและความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มต้นในปี ค.ศ.1902 โดย Haberlandt นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันได้ทำการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยง เพื่อจะทำการศึกษาคูณสมบัติของเซลล์ แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จจนถึงระดับเซลล์มีการแบ่งตัว เพียงแต่พบว่าเซลล์มีการขยายขนาดขึ้นเท่านั้น ในปี ค.ศ.1930 ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจากกรากของพืชหลายชนิดโดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ต่อมาในปี ค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Organ) และ แคลลัส (Callus) ของพืชได้หลายชนิดและนับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีการพัฒนาไปได้อย่างกว้างขวาง และมีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆอีกมากมาย ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงพืชเซลล์เดี่ยวๆและโปรโตพลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อยีนส์ การถ่ายยีนส์ ฯลฯ เทคนิค การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น

แนวคิดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดขึ้นจากหลักการในทฤษฎีเซลล์ ของ Schleiden (1838) and Schwann (1939) ที่กล่าวถึงคุณสมบัติที่เรียกว่า totipotency ของเซลล์ไว้ว่าเซลล์แต่ละเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นสิ่งมีชีวิตที่สมบูรณ์ใหม่ได้อีก เมื่ออยู่สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม แนวคิดดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของคน สัตว์ และพืช เป็นเหตุให้ในเวลาต่อมา นักวิทยาศาสตร์พยายามทดลองพิสูจน์ โดยแบ่งความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกเป็น 3 ยุคคือ

1. ยุคการบุกเบิก (ค.ศ. 1902-1939) เป็นยุคเริ่มต้นของงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์และเนื้อเยื่อพืช เริ่มในปี ค.ศ. 1902 เมื่อ Haberlandt เป็นผู้ริเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเป็นคนแรก โดยนำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อให้ได้เป็นต้นใหม่ แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ต่อมาในปี ค.ศ. 1934 Went and Thiman ค้นพบสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด IAA (indole-acetic acid) ทำให้ White (1934) สามารถสร้างสูตรอาหารที่สมบูรณ์และเหมาะสมต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุดในยุคนั้น ความก้าวหน้าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ประสบความสำเร็จอย่างแท้จริงในปี ค.ศ. 1939 โดย Nobecourt and Gautheret ได้พบว่าเมื่อเติม IAA ลงในอาหารทำให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางอย่างในอาหารทำให้ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัส ซึ่งสามารถสรุปความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในยุคบุกเบิกได้

2. ยุคการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารอาหารและการพัฒนาทางสัณฐาน (ค.ศ. 1940-1978) การพัฒนางานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในยุคนี้นับเป็นการค้นพบที่สำคัญสรุปได้ดังนี้คือ

- 2.1 การค้นพบคุณค่าทางโภชนาการของอาหารเลี้ยงดินอ่อนที่เป็นของเหลว (liquid endosperm) จากน้ำมะพร้าว ต่อมาภายหลังได้จำแนกน้ำมะพร้าวไว้ในกลุ่มของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชื่อ ไซโตไคนิน ทำให้นักวิทยาศาสตร์ในยุคนั้นเริ่มมีการนำเอาน้ำมะพร้าวไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อร่วมกับสารตัวอื่น เช่น ใช้ร่วมกับ 2,4 -D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ซึ่งเป็นสารควบคุมการ

เจริญเติบโตชนิดหนึ่งในกลุ่มออกซิน พบว่าสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อดังกล่าวเพิ่มจำนวนและพัฒนาต่อไปได้เป็นอย่างดี

2.2 การศึกษาหาชนิดของสารที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์และได้พัฒนาเทคนิคสำหรับการเลี้ยงสารแขวงลอยโดยการย้ายก้อนแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

2.3 เทคนิคเกี่ยวกับการเลี้ยงอับละอองเรณูและละอองเรณู

2.4 เทคนิคการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาส

การค้นพบสารอาหารที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาของเนื้อเยื่อตลอดจนเทคนิคต่าง ๆ ทำให้มีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์อย่างมากในการขยายพันธุ์พืชเชิงการค้า ปัจจุบันมีการนำเอามาใช้ในการขยายพันธุ์เป็นปริมาณมาก (mass propagation) ในพืชเกือบทุกชนิด

3. ยุคของการนำเอาเทคโนโลยีมาใช้ประโยชน์ (ค.ศ. 1979-ปัจจุบัน) เป็นยุคที่มีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม ไม่ว่าจะเป็นการขยายพันธุ์พืช การผลิตพืชปลอดโรค การปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้ผลิตสารทุติยภูมิ เทคนิคที่มีการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อในปัจจุบัน ได้แก่ การเลี้ยงต้นอ่อน การเลี้ยงอวัยวะ การเลี้ยงคัพภะ การเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือแคลลัส และการเลี้ยงเซลล์แขวงลอย (บุษราภรณ์, 2548)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้พัฒนาเพื่อใช้ในงานขยายพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันมีการสร้างห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการค้าอย่างแพร่หลายในประเทศแถบทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่น ความก้าวหน้าต่อไปในอนาคตยังมีมากขึ้นในแง่การหาวิธีที่เหมาะสมทางด้านอุตสาหกรรม การลดต้นทุนการผลิต การผลิตเป็นการค้า ซึ่งเมื่อใดที่วิทยาการด้านนี้ก้าวหน้าจนสามารถพัฒนาไปในเชิงการค้าและอุตสาหกรรมได้แล้ว ย่อมส่งผลไปสู่การสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ๆ ตลอดจนผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในทางปฏิบัติที่กว้างขวางยิ่งขึ้น(รังสฤษฎ์, 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ นั้นมีจุดมุ่งหมายแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้หลายประการ สรุปได้ดังนี้

1. เพื่อการขยายพันธุ์พืชให้ได้เป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงตายอด เป็นต้น เพื่อผลิตพันธุ์พืชซึ่งเราสามารถขยายหรือเพิ่มปริมาณพืชที่มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ในปริมาณมาก และรวดเร็ว โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ สะดวกต่อการเก็บรักษารวมพันธุ์ แนวทางนี้ใช้กันแพร่หลายทั่วไปในประเทศไทย มีพืชหลายชนิดที่เรานำมาขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ เช่น กล้วยไม้ ปาล์มน้ำมัน กล้วย สตรอเบอรี่ ไม้ดอกไม้ประดับต่าง ๆ เป็นต้น

2. เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืชคือ การเกิดโรคพืช โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ แบคทีเรีย ไวรัส และไฟโตพลาสมา ที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีความสำคัญมากต่อการผลิตพืช เนื่องจากทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก ทำโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลอดเชื้อ จะสามารถผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อได้

3. เพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืช โดยเก็บรักษาในรูปคลัสต์ หรือต้นที่สมบูรณ์ในหลอดทดลองสามารถทำได้คราวละมาก ๆ แต่ใช้เนื้อที่แรงงานต้นทุนน้อย ปลอดภัยจากภัยธรรมชาติที่อาจเกิดขึ้นในแปลงรักษาพันธุ์ด้วย

4. เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช โดยนำเนื้อเยื่อของพืชบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นยาหรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม มาสกัดสารดังกล่าว

5. เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน หรือต้านทาน ได้จากเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือการชักนำการกลายพันธุ์ โดยใช้รังสี หรือสารเคมี

6. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพปลูกปกติ(นิธย์ศรีและคณะ,2549)

การเจริญของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์พบว่าเนื้อเยื่อมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในลักษณะต่าง ๆ ได้ 3 แบบ คือ

1. เกิดแคลลัส คือ กลุ่มเซลล์ที่ยังไม่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ เมื่อได้รับอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็สามารถเกิดเป็นยอดและรากได้

2. เกิดออร์แกโนจีเนซิส (organogenesis) คือชิ้นส่วนของพืชเกิดยอด หรือเกิดเป็นราก เกิดเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกันขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อหรือเซลล์ ได้รับการกระตุ้นให้เจริญเป็นยอดหรือราก ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ควบคุม

3. เกิดเอ็มบริโอจีเนซิส (embryogenesis) กลายเป็นเอ็มบริอยด์ (embryoid) มีการพัฒนาการเหมือนเอ็มบริโอแต่ต่างกันตรงจุดกำเนิด กล่าวคือ เอ็มบริโอได้จากการที่ละอองเรณูเข้าผสมกับโอวุลได้ไซโกตแล้วเจริญเป็นเอ็มบริโอ ส่วนเอ็มบริอยด์ มีจุดกำเนิดจากเซลล์ร่างกายหลังจากนั้นก็จะพัฒนาเป็นขั้นตอนต่าง ๆ เป็นต้นกล้า(รังสฤดี,2541)

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถเลี้ยงเซลล์จากต้นพืชตลอดจนเซลล์สืบพันธุ์ เช่น ละอองเกสรพืช ทำให้เป็นต้นได้สำเร็จ นอกจากนั้นยังสามารถเลี้ยงโปรโตพลาสแล้วบังคับให้เจริญเป็นต้นได้ และได้นำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจเป็นการค้าได้สำเร็จ (จิรา,2551)

สำหรับประเทศไทย ได้เริ่มนำมาใช้ขยายพันธุ์พืชเป็นการค้าในประเทศ ในปี 2516-2518 โดยศาสตราจารย์พี ศาคริก นำมาพัฒนาต่อยอดเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อขยายพันธุ์เป็นการค้าและส่งเสริมให้เกิดเป็นอาชีพใหม่ จนกลายเป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศ ต่อมาได้มีการพัฒนาขีดความสามารถให้สามารถขยายพันธุ์ไม้อื่นๆ ในเชิงการค้าอย่างแพร่หลาย ได้แก่ กล้วยหน่อไม้ฝรั่ง ฝรั่ง ไข่ เฮอร์บีร่า หน้าวัว เบญจมาศ บอนสี ปทุมมา กระเจียว กุหลาบสตอร์เบอรี่ ขนุน ไม้สัก และพันธุ์ไม้อื่น ๆ อีกมากมาย (อุทัย, 2545) นอกจากใช้เพื่อการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วแล้ว ยังนำมาใช้เพื่อการผลิตพันธุ์ปลอดโรคซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียที่มักติดมากับหัวพันธุ์/ท่อนพันธุ์ทำความเสียหายให้กับพืชที่ปลูกใหม่และการส่งออก(วิภาดา, 2545) รวมถึงการนำมาใช้เพื่ออนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช

ความหมาย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหมายถึง การนำชิ้นส่วนพืชชนิดใดก็ได้ เช่น อวัยวะต่าง ๆ ขั้ว ตา ปลายยอด ราก โปรโตพลาส มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้นซึ่งประกอบไปด้วย กลือแร่ ธาตุอาหารต่าง ๆ ไวตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในกลุ่มของ ออกซิน หรือ ไซโตไคนิน เนื้อเยื่อจะถูกไว้ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส ได้รับแสงประมาณ 1,000-2,000 ลักซ์ ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชโดยตรง หรือเจริญเป็นแคลลัส หรือเอ็มบริอย และหลังจากนั้นพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป(รณรงค์,2542)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่าหมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชหรืออาจหมายถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการเพาะเลี้ยงอวัยวะในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ นักวิทยาศาสตร์พบว่าเซลล์ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความสามารถที่จะเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ความสามารถของเซลล์เช่นนี้เรียกว่า โททิโพเทนซี (totipotency) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวนี้เองทำให้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืชร่วมกับเทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อการคัดต่อจลินให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการ(สมพร,2549)

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การทำให้เกิดต้นต้นใหม่จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช เช่น กิ่ง ก้าน เมล็ด ต้น ยอดอ่อน แคลลัส และละอองเกสรตัวผู้ ในอาหารเทียมในสภาพปลอดเชื้อจากการวิจัยพบว่า สามารถที่จะเก็บรักษาแคลลัส หรืออวัยวะต่าง ๆ เช่น ราก ให้คงสภาพอยู่ได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยไม่ให้เกิดต้นพืชได้อย่างไม่มีกำหนด พืชทุกชนิดมีแนวโน้มที่จะขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ได้ ถ้าหากทราบความต้องการธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และการเพาะเลี้ยง(จิรา,2542)

จากความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่กล่าวข้างต้นสามารถให้คำจำกัดความการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็น เซล โปรโตพลาส เนื้อเยื่อ แคลลัส และอวัยวะมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยเกลือแร่ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่างให้เหมาะสมและปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เป็นสมบัติที่โดดเด่นของเซลล์พืชที่เรียกว่าโททิโพเทนซี

ประโยชน์ของการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เข้ามามีบทบาทต่อการเกษตร โดยเฉพาะในด้านการขยายพันธุ์พืช เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์พืชได้อย่างรวดเร็ว มีความสม่ำเสมอ ได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีทั้งข้อดี และข้อจำกัด ดังนี้

ข้อดีของการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. เพิ่มปริมาณได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น
2. ต้นที่ได้มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนพ่อแม่
3. ต้นพืชที่ได้จะ โตเร็วและมีขนาดสม่ำเสมอ เก็บเกี่ยวผลผลิตได้พร้อมกันและผลผลิตได้มาตรฐาน
4. ต้นที่ได้จะปลอดโรค

ข้อจำกัดสำหรับการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการอาจเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม(ในกรณีการชักนำต้นจากแคลลัส)
2. ในพืชบางชนิด(ไม้เนื้อแข็ง)ชักนำการเกิดรากค่อนข้างยาก
3. การย้ายปลูกต้นไม้อาจจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงปลูกในดินค่อนข้างยุ่งยาก
4. การลงทุนสูง เพาะต้องใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและสารเคมีเฉพาะทาง ซึ่งมีราคา งาน ประสิทธิภาพมีค่าแรงสูง ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการค้นคว้าหาเทคนิคและอาหารที่เหมาะสม รวมทั้งต้องลงทุนในการสร้างห้องปฏิบัติงานสูง ทำให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยค่อนข้างสูง จะต้องผลิตจำนวนมากๆจึงจะคุ้ม(จิรา,2551)

พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จในประเทศไทย

ในปัจจุบันมีหน่วยงานวิชาการต่าง ๆ ที่ดำเนินการการศึกษา ทดสอบ วิจัย และพัฒนา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เพื่อให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรได้มากมายหลายด้าน เช่น การขยายพันธุ์พืชจำนวนมากในเชิงพาณิชย์ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ การผลิตพืชปลอดโรค และการปรับปรุงพันธุ์เป็นต้น ซึ่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(2542) ได้รวบรวมชื่อพืช ขึ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง สูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชี้ ลักษณะการเจริญ ของเนื้อเยื่อ ดังนี้

ตัวอย่างพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จในประเทศไทย (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง	สูตรอาหาร	ฮอร์โมนที่ใช้	การเจริญของเนื้อเยื่อ	เอกสารอ้างอิง
ข้าว <i>Oryza sativa</i> L.	อับละอองเกสร แคลลัส	N ₆ MS	2,4-D 2 มก./ล. Kinetin 0.5 มก./ล. น้ำตาล 50 กรัม/ล. IAA 0.5 มก./ล. BA 2 มก./ล.	แคลลัส ยอด	ภัทรพร ภักดีฉนวน. 2540
	ยอด	MS	-	ต้นและราก	
รักเร่	ตาข้าง ใบ แคลลัส ยอด	MS MS MS MS	BA 0.3 มก./ล. BA 0.1 มก./ล. NAA 0.1 มก./ล. หรือ NAA 0.3 มก./ล. BA 0.1 หรือ 0.5 มก./ล. ล. ยอดและ NAA 0.1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล.	ยอด แคลลัส ราก	กุหลาบ คงทอง. 2539

ตัวอย่างพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จในประเทศไทย

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง	สูตรอาหาร	ฮอร์โมนที่ใช้	การเจริญของเนื้อเยื่อ	เอกสารอ้างอิง
กลีอกจีนี <i>Sinnigia speciosa</i>	ก้านดอกตูม	MS	Kinietin 2 มก./ล. หรือ Matozim MT 0.25 มก./ล.	ต้น ต้น	รณรงค์ วิเศษ-สุวรรณ, 2528
กุหลาบ	ตาข้าง ยอด	MS น้ำตาลซูโครส 4% MS, น้ำตาลซูโครส 4%	BA 2 มก./ล. -	ยอด ราก	ประนอม พงศ์พิงษ์ และคณะ. 2531
แกลดิโอลัส <i>Gladiolus hybridus</i>	ปลายยอดและตาข้าง ยอดที่เกิดจากปลาย ยอดและตาข้าง	MS MS	BA 0.1 - 2 มก./ล. NAA 0.5 มก./ล. น้ำ มะพร้าว 15 % หรือ Kinietin 0.1 - 0.5 มก./ล.	ยอดจำนวนมาก ราก	วิไลลักษณ์ ชินะจิตร, 2524
	หัว ก้านช่อดอก	MS MS	BA 0.1 - 6 มก./ล. Kinietin 0.5 มก./ล. NAA 10 มก./ล.	ยอดจำนวนมาก แคลลัสและราก	
โกสน <i>Codiscum variegatum</i>	ปลายยอด ลำต้น ก้าน ใบและใบอ่อน แคลลัส	MS MS	BA 5 มก./ล. 2,4-D 2-4 มก./ล. BA 5 มก./ล. NAA 5 มก./ล.	แคลลัส ยอด	วิไลลักษณ์ สุขจิต-ดา นนท์. 2528
คาร์เนชัน <i>Diantus caryophyllus</i>	ปลายยอด	MS	Kinietin 0.5 มก./ล. NAA 1.0 มก./ล. หรือน้ำมะพร้าว 15 %	ต้น	ชัยชุมพล สุริยะ-ศักดิ์. 2526
บอนสี <i>Caladium bicolor</i>	ใบอ่อน	MS	BA 1 มก./ล. NAA 1 มก./ล.	แคลลัส	ชุดิมา คุณาไทย. 2526
บีโกเนีย	เมล็ด	MS	BA 1 มก./ล. NAA 1 มก./ล.	ต้น	สุนนา กิจไพฑูรย์. 2528
	ต้นอ่อน	MS	Kinietin 5 มก./ล. NAA 1 มก./ล.	เพิ่มจำนวนต้น	
เบญจมาศ	ตาข้าง ลำต้น ใบ	MS	Kinietin 2 มก./ล. NAA 0.02 มก./ล.	แคลลัส ต้น	สุเมธ อรัญนารถ. 2524

ตัวอย่างพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จในประเทศไทย (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง	สูตรอาหาร	ฮอร์โมนที่ใช้	การเจริญของเนื้อเยื่อ	เอกสารอ้างอิง
พุดสวน <i>Ervatamia Coronaria</i>	ตาข้าง ยอด	WPM WPM WPM	BA 16 มก./ล. 2,4-D 1 มก./ล.	ยอด ยอด	ประนอม พงพิพจน์ และคณะ. 2531
เฟิร์นก้านดำ <i>Adiantum Capillus Veneris</i> Linn.	สปอร์ Phothallus	MS MS	น้ำมะพร้าว 15 % Matozim MT 0.25 มก./ล.	Phothallus	รณรงค์ วิเศษสุวรรณ. 2528
ยิบโซฟิลลา <i>Gypsophilla paniculata</i>	ปลายใบ ปล้อง แคลลัส	MS หรือ Vacin & Went MS	NAA 2 มก./ล. BA 1- 4 มก./ล. NAA 0.5 - 1 มก./ล.	แคลลัส ยอด	บันเทิง บรรพศิริ. 2527
	ยอดจากแคลลัส	Vacin & Went BA 0.5 มก./ล. ความเข้มข้น 2 เท่า		ยอดจำนวนมาก	
เยอบีรา <i>Gerbera jamesonii</i>	เมล็ด ดอกอ่อน	MS (1974) MS (1962) MSH	Kinetin 0 มก./ล. IAA 0.5 มก./ล. BA 10 มก./ล. BA 10 มก./ล.	เพิ่มจำนวนต้น ต้น	รณรงค์ วิเศษ-สุวรรณ. 2528 วันดี ใจนิ่ม และคณะ. 2531
ว่านสี่ทิศ <i>Hippeastrum hybridum</i>	ก้านช่อดอก อับเกสร และก้านชูเกสรตัวผู้ รังไข่ และก้านช่อดอกย่อย กลีบดอก ไข่อ่อน และกลีบหัวส่วนกลาง	MS	2,4-D 0.5 - 1 มก./ล.	ต้น	ศัลักษณ์ พรหมศิริ. 2526
สแตติส <i>Statice perizii</i>	ต้นเมอร์โคลนจากญี่ปุ่น	MS	IAA 0.5 มก./ล.	ราก	สุนา กิจไพฑูรย์. 2528
สับปะรดกระ <i>Ananas</i>	ตาข้าง	MS	BA 2 มก./ล. NAA 0.1 มก./ล.	แคลลัส ยอด	สะอาด ร่มรื่น สุวารมย์
	แคลลัส	MS	BA 1 มก./ล. NAA 0.1 มก./ล.	ยอดจำนวนมาก ราก	
อะโลคาเซีย <i>Alocasia anazonica</i>	ปลายยอด ปลายราก ต้น ใบอ่อน ก้านใบอ่อน	MS ซึ่งมีวิตามินของ Nitsch & Nitsch	NAA 0.5 มก./ล. NAA 1 มก./ล. Kinetin 1 มก./ล. NAA 0.5 มก./ล.	ต้น แคลลัส ราก	ชลิดา พงศ์ทุกสมิทธิ์

ตัวอย่างพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จในประเทศไทย (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง	สูตรอาหาร	ฮอร์โมนที่ใช้	การเจริญของเนื้อเยื่อ	เอกสารอ้างอิง
หน้าวัว <i>Anthurium andraeanum</i>	ตาข้าง ใบและก้านใบ	MS	Kinetin 1 มก./ล.	ต้น	จารุวรรณ ไตวิวัฒน์
	ใบอ่อน	MS	BA 5 มก./ล. 2,4- D 1 มก./ล. BA 1 มก./ล. 2,4 –D 0.5 มก./ล.	แคลลัส แคลลัส	
	แคลลัส	Pierik (1976) น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรแทน กลูโคส	BA 2 มก./ล.	ต้น	
	Embryo 1 มก./ล. ยอดจาก Embryo	MS MS	Kinetin NAA 0.5 มก./ล. หรือ IAA 0.5 มก./ล.	ยอด ราก	สรลลภ สวงนดิกุล. 2526
ยี่หุบ <i>Magnolia Coco</i>	ตาข้าง	WPM	BA 9 มก./ล. IBA 2 มก./ล.	ยอด ราก	มณฑิรา สาลักษณ์. 2534
ผักกาดขาวปลี Chinese cabbage	ปลายยอด ใบ ก้านใบ	MS	BA 2 – 4 มก./ล. NAA 1 มก./ล.	ยอด ราก	สุนี รัตนวงษ์นรา. 2530
กิวีฟรุต <i>Actindia Chinensis</i>	ก้านใบ ปล้อง ข้อ	MS	2 iP 2 มก./ล.	ต้น	สาธิต ธิยากรณ์. 2529
ไลออปติส <i>Liatrispicata</i>	ก้านช่อดอก	MS	BA 3 มก./ล. น้ำตาล ซูโครส 4% IAA 0.8 มก./ล.	ยอด	รุ่งนภา วงศ์วิจิตร. 2533
หวายตะค้าทอง <i>Calamus cacsius</i>	ลำต้นอ่อน	MS	NAA, BA 5×10^6 M	ยอด	จารุวรรณ ไตวิวัฒน์
อินทผลัม <i>Date Plam</i>	ต้นยอด (ตายอด)	MS	2,4- D 2 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 4.5% ถ่าน 3 กรัม/ล.	แคลลัส	ทวีพงศ์ สุวรรณโร. 2529
อินทผลัม(ต่อ) <i>Date Plam</i>	แคลลัส		NAA 4.0 มก./ล. Kinetin 0.4 มก./ล.	หน่อ	
กระเทียม <i>Garlic</i>	ตายอด	MS	2 iP 2 มก./ล. NAA 0.1 มก./ล.	หน่อ	ประพันธ์ ปัญญา-บาล

ที่มา : (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542: 111 – 115)

บทที่ 2

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอุปกรณ์

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนที่มีสำคัญต่อการปฏิบัติงาน ในห้องปฏิบัติการที่เป็นหน่วยงานใหญ่ ๆ มักจะแบ่งอุปกรณ์และเครื่องมือเครื่องใช้ตามความเหมาะสมต่อการการใช้งานของห้องนั้นๆ ในการออกแบบห้องปฏิบัติการไม่ว่าจะเล็กหรือใหญ่สิ่งที่จะต้องคำนึงถึงคือความสะอาด การปลอดเชื้อซึ่งเป็นเรื่องที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการดำเนินการผลิตขยายพืชปลอดโรค โดยส่วนใหญ่จะแบ่งพื้นที่เป็น 3 ส่วน ตามลักษณะการใช้งาน ดังนี้

1. ห้องเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช(Laboratory or Preparation room)
2. ห้องปลอดเชื้อหรือห้องย้ายเนื้อเยื่อหรือห้องถ่ายเนื้อเยื่อ(Clean room or Transfer room)
3. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room)

สำหรับหน่วยงานปฏิบัติงานเล็ก ๆ อาจแบ่งห้องปฏิบัติการออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นห้องปฏิบัติการซึ่งรวมห้องเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและห้องย้ายเนื้อเยื่อพืชอยู่ในห้องเดียวกัน และอีกส่วนเป็นห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อุปกรณ์และเครื่องมือ

การจัดวางอุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรกำหนดจุดวางที่เหมาะสมเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งานสามารถจัดแบ่งเครื่องมือตามการใช้งานของห้องต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. ห้องเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช(Laboratory or Preparation room) เป็นห้องปฏิบัติงานทั่ว ๆ ไป โดยมากจะเป็นห้องที่อยู่บริเวณด้านนอก ควรมีเนื้อที่พอสมควร ใช้เพื่อการเตรียมอาหาร ล้างและจัดเก็บเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นต่าง ๆ ควรจัดแบ่งให้เหมาะสมและสะดวกกับการใช้งาน ประกอบด้วย โต๊ะสำหรับเตรียมอาหาร ตู้เก็บสารเคมี หม้อ เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ อ่างล้างอุปกรณ์ ตู้อบความร้อนแห้ง ตู้เย็น เครื่องกรองน้ำ เป็นต้น

2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ หรือห้องถ่ายเนื้อเยื่อ(Clean room or Transfer room) ควรเป็นห้องที่สะอาดและปลอดเชื้อ ฝาผนัง เพดาน และพื้นห้องควรเป็นพื้นมันเรียบ ทำความสะอาดได้ง่าย ไม่เป็นที่สะสมของฝุ่นละออง ใช้สำหรับเลี้ยงและย้ายเนื้อเยื่อพืช สำหรับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นได้แก่ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เครื่องปรับอากาศ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะแกรงสำหรับวางมีดและปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ กระดาษรองตัดหรือจานรอง รถเข็นสำหรับวางขวดอาหาร ขวดเนื้อเยื่อ เครื่องแก้ว สารเคมีและอุปกรณ์เพื่อทำความสะอาด เป็นต้น

3. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture room) ควรเป็นห้องที่สะอาดปราศจากเชื้อโรค สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ แสง อุณหภูมิ และความชื้นได้ ใช้เป็นห้องสำหรับเก็บต้นเนื้อเยื่อ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นประกอบด้วย โต๊ะหรือชั้นวางพืชพร้อมอุปกรณ์ให้แสงสว่าง หลอดไฟฟ้า เครื่องเขย่า เครื่องปรับอากาศ เป็นต้น

เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



เครื่องกวนสารละลาย



เครื่องวัด pH



เครื่องชั่งหยาบใช้ชั่งสารเคมีที่มีความแม่นยำอยู่ที่
ทศนิยม 2 ตำแหน่ง



เครื่องชั่งอย่างละเอียดใช้ชั่งสารเคมีที่ใช้ในปริมาณน้อย
มีความแม่นยำอยู่ที่ทศนิยม 4 แห่ง



กระบอกตวง



หม้อเตรียมอาหาร



ชั้นวางสารเคมี



อ่างน้ำ



หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง



ตู้อบความร้อนแห้ง



ผู้ตัดเนื้อเยื่อ เป็นผู้ปลอดเชื้อที่ใช้กับงานตัดย้ายชิ้นพืช มีระบบการหมุนเวียนของอากาศภายในตู้ที่สะอาด เชื้อจุลินทรีย์ตลอดเวลาของการปฏิบัติงานด้วยระบบการถ่ายเทอากาศผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุน ขนาดเล็ก ประมาณ 0.3 ไมครอน

กล้องจุลทรรศน์ เป็นกล้องสเตอริโอที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กมาก ๆ เช่น เนื้อเยื่อเจริญ(meristem) เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปลอดจากเชื้อไวรัส



เครื่องมือที่อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเนื้อเยื่อที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ กรรไกร มีด ตะแกรงวางเครื่องมือ



ชั้นวางพืช ประกอบด้วยชั้นวางพืช หลอดไฟที่ใช้ในการให้แสงสว่างแก่พืช ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ พืชควรได้แสงติดต่อกันเป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง

บทที่ 3

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. **อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญยิ่งต่อความสำเร็จในการขยายพืช หลักการทั่วไปที่ใช้ในการพิจารณาคัดเลือกสูตรอาหารเพื่อให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดนั้นสำหรับสูตรอาหารมาตรฐานที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางทั่วไป เช่น MS (Murashige & Skoog, 1962) Gamborg's B5 VW (Vacin & Went, 1949) เป็นต้น แล้วปรับสูตรอาหารให้มีธาตุอาหารตรงตามความต้องการของพืชนั้นให้มากที่สุด อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายสูตร ซึ่งแต่ละสูตรจะมีชนิดและปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปสูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีองค์ประกอบของสารอาหารที่สำคัญสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มๆ ดังนี้

1. สารอินทรีย์ ประกอบด้วยธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 ธาตุอาหารหลัก เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากในรูปเกลือของสารอนินทรีย์ เช่น คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และกำมะถัน

1.2 ธาตุอาหารรองในสัดส่วนที่พอเหมาะในรูปเกลือของสารอนินทรีย์ เช่น เหล็ก ทองแดง สังกะสี แมงกานีส โคบอลต์ โมลิบดีนัม โบรอน

2. สารอินทรีย์ ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน แบ่งได้ดังนี้

2.1 น้ำตาล เป็นสารที่ให้พลังงาน ที่ใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ปกติในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ประมาณ 20-40 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

2.2 วิตามิน ได้แก่ อินโนซิโตน วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน ไพริดอกซิน วิตามินซี

2.3 กรดอะมิโน จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต และสร้างอวัยวะต่างๆ ที่นิยมใช้กัน คือ ไกลซีน

2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ การแบ่งเซลล์และการขยายเซลล์ นับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ เช่น ออกซิน ไซโทไคนิน จิบเบอเรลลิน และสารชะลอการเจริญเติบโต หากระดับของไซโทไคนินสูงกว่าระดับออกซินจะมีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดต้น ในทางตรงข้ามหากระดับออกซินสูงกว่าระดับไซโทไคนินจะมีผลในการชักนำให้เกิดราก นอกจากนี้ชิ้นส่วนของพืช อายุ ชนิดพืชของก็ระดับฮอร์โมนอยู่ภายในที่ไม่เหมือนกันมีผลทำให้พืชมีความแตกต่างกันถึงแม้ว่าจะเลี้ยงในสภาพเดียวกันและอาหารชนิดเดียวกัน กลุ่มของฮอร์โมนไซโตไคนินที่นิยมใช้คือ 6-benzylaminopurine(BAP) 6-furfuryl-aminopurine(kinetin) เป็นต้นในกลุ่มของออกซิน เช่น Indole-3-acetic acid(IAA) Indole-3-butyric acid(IBA) naphthaleneacetic acid(NAA)

2.5 สารอินทรีย์จากธรรมชาติ ได้มาจากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ กล้วย มันฝรั่ง และสารที่สกัดจากยีสต์ เป็นต้น

3. น้ำ เนื่องจากคุณภาพของน้ำมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นน้ำที่ใช้เตรียมอาหารจึงต้องมีความสะอาด สำหรับการขยายพันธุ์พืชทั่ว ๆ ไปนั้นใช้น้ำกลั่นธรรมดาหรือน้ำกรองที่มีคุณภาพก็เพียงพอแล้ว

4. วัณ เป็นสาร polysaccharide ที่มีมวลโมเลกุลสูง สกัดจากสาหร่ายทะเลและลายน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ใช้สำหรับการเตรียมอาหารแข็ง ความเข้มข้นที่ใช้ทั่วไป 6-10 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

5. สารอื่น ๆ ได้แก่

5.1 อะคีนินซัลเฟต เป็นสารที่ใส่เพื่อช่วยกระตุ้นการเกิดยอดในพืชบางชนิดที่เกิดยอดได้ค่อนข้างยาก ปริมาณที่ใช้ประมาณ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 ผงถ่าน ได้มาจากการเผาถ่านที่อุณหภูมิสูง และมีรูพรุนขนาดเล็กที่เชื่อมต่อกันอย่างมาก ทำให้พื้นที่ภายในเพิ่มขึ้น จึงสามารถดูดซับสารต่าง ๆ ได้ดี ผสมลงในอาหารเพื่อดูดซับสารพิษที่มีสี น้ำตาลหรือสีดำ หรือเพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพจากที่สว่างเป็นที่มืดเพื่อชักนำให้พืชเกิดรากและการเจริญเติบโตของรากดีขึ้น และช่วยให้ pH ของอาหารคงที่มากขึ้น ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.2-0.3 % w/v

2. **ชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** หากเลือกชิ้นส่วนเริ่มต้นจากต้นแม่ที่ดียอมทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำเร็จไปแล้วครั้งหนึ่ง ชิ้นส่วนเลือกมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ขึ้นอยู่กับอายุหรือระยะของพืชที่นำมาเลี้ยง และชนิดพืชที่นำมาเลี้ยง เช่น ปลายยอด ตายอด ตาข้าง ใบอ่อน เป็นต้น การเลือกชนิดของเนื้อเยื่อควรเลือกให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เพื่อการขยายพันธุ์ ควรใช้เนื้อเยื่อที่มีลักษณะปกติ ได้แก่ ส่วนตา ใบ ยอด ลำต้น หลีกเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิด chimera เพื่อการผลิตพืชปลอดโรค ควรใช้เนื้อเยื่อส่วน apical meristem ขนาด 0.1-0.2 มิลลิเมตร



3. **เทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจำเป็นต้องทำงานภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอาหารที่มีความสมบูรณ์สูง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว หากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ย่อมเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้ ทักษะ ในเรื่องที่เป็นพื้นฐานของเทคนิคการปลอดเชื้อ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญในควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อขึ้นอยู่กับเทคนิคในการทำให้สิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานให้ปลอดเชื้อ ได้แก่ ฝุ่นละอองที่อยู่ในอากาศ อยู่บนผิวของขวดอาหารหรือเครื่องมือต่างๆ จุลินทรีย์ที่ติดมากับผม มือ เสื้อผ้า ดังนั้นก่อนเริ่มปฏิบัติงานจึงต้องมี

ขั้นตอนปฏิบัติให้ถูกต้องเพื่อควบคุมและป้องกันให้สิ่งแวดล้อมที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนมีผลกระทบต่อการปฏิบัติงานให้น้อยที่สุดดังนี้

3.1 การเตรียมตัวก่อนปฏิบัติงาน

3.1.1 เตรียมตัวผู้ปฏิบัติงานให้อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน คือ ให้ล้างทำความสะอาดมือแขนด้วยสบู่และเช็ดมือด้วย 70 % เอทิลแอลกอฮอล์ทุกครั้งก่อนเริ่มปฏิบัติงาน รวบผมไว้ด้านหลังหรือสวมผ้าคลุมผม ใส่ถุงมือ ผ้าปิดปาก จมูก สวมชุดปฏิบัติการ เป็นต้น

3.1.2 เตรียมตู้ถ่ายเชื้อให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน โดยเช็ดทำความสะอาดภายในตู้ก่อนใช้งานด้วย 70 % เอทิลแอลกอฮอล์ เปิดหลอดอัลตราไวโอเลตก่อนใช้งาน 15 นาที และ/หรือเปิดเครื่องก่อนใช้งานประมาณ 5-10 นาที

3.1.3 การเตรียมเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อ ให้จัดวางเครื่องมืออุปกรณ์ในตู้ในตำแหน่งที่เหมาะสมและสะดวกต่อการใช้งาน ได้แก่ กระดาษ หรือจานแก้วรองตัด ปากกีสบ ด้ามมีดพร้อมใบมีดที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ตะเกียงไฟ ขวดแอลกอฮอล์สำหรับแช่เครื่องมือ ให้เช็ดด้วย 70 % เอทิลแอลกอฮอล์ทุกครั้งก่อนเข้าสู่ตู้ทุกครั้งและขณะทำงาน



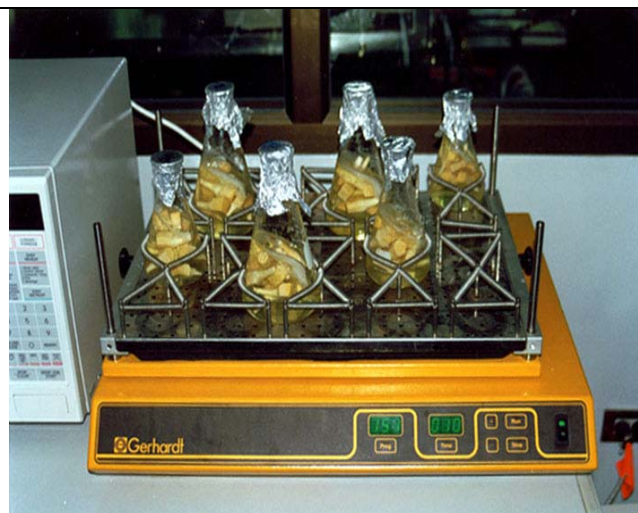
3.2 การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.2.1 การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนเลือกมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ขึ้นอยู่กับอายุหรือระยะของพืชที่นำมาเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงควรเลือกที่เป็นข้อปลายยอด ตายอด ตาข้าง เนื่องจากจะสามารถชักนำยอดได้จำนวนมาก

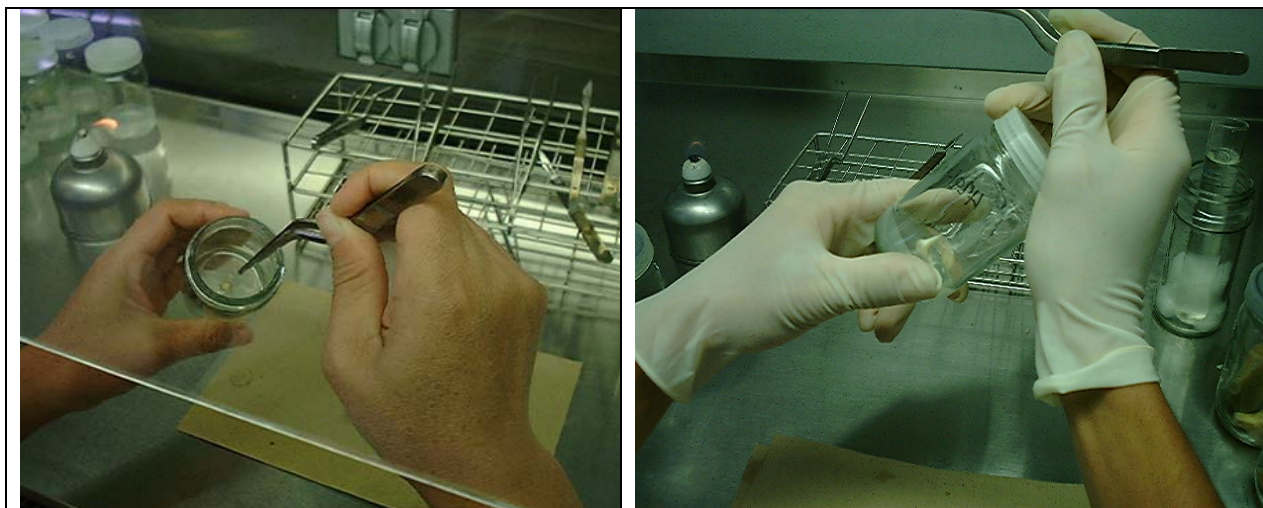
3.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืชเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชปลอดโรค เป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชไม่ให้อมมีผลยับยั้งการเจริญและการพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช เมื่อเลือกส่วนของพืชที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ ได้แก่ ปลายยอด ตาข้าง หน่อ ใบอ่อน ราก เป็นต้น ได้แล้วตามความต้องการ ให้ตัดแต่งชิ้นส่วนพืชให้มีความยาวที่เหมาะสม นำมาทำการล้างทำความสะอาด โดยการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อเพื่อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เช่น เนื้อเยื่อพืชที่อ่อนนุ่มและบาง ต้องทำด้วยความระมัดระวัง โดยแช่เนื้อเยื่อพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5% หรือ คลอรีน 10 % เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง สำหรับเนื้อเยื่อพืชที่ผิวหนากแข็ง เช่น ไม้เนื้อแข็ง ผักกล้วยไม้ เป็นต้น ให้นำเนื้อเยื่อไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาซักฟอก และน้ำ แล้วจุ่มเนื้อเยื่อลงใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ และลนไฟ ส่วนเนื้อเยื่อพืชที่มีสารประเภทขี้ผึ้งหรือขนปกคลุม ให้จุ่มเนื้อเยื่อลงใน 70-95% เอทิลแอลกอฮอล์ นาน 30 วินาที ถึง 1 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5% หรือ คลอรีน 10 % เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง



3.3 การตัดชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเลี้ยง เริ่มจากต้องนำชิ้นส่วนพืชมาล้างน้ำให้สะอาด และตัดส่วนที่ไม่ต้องการใช้ออกให้มากที่สุด นำชิ้นส่วนพืชที่ล้างแล้วมาตัดเป็นท่อนใหญ่ ๆ พอประมาณ แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตามขั้นตอน ต่อจากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดตามต้องการ แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การตัดเนื้อเยื่อ ให้ใช้มีดผ่าตัดที่คม และทำความสะอาดโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟฆ่าเชื้อที่ผิว รอให้ใบมีดเย็นก่อนทำการตัดเนื้อเยื่อ ขนาดและรูปร่างของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงขึ้นอยู่กับลักษณะวัตถุประสงค์ และความพอใจของผู้ปฏิบัติงาน แต่ถ้าตัดเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่เนื้อเยื่อมีโอกาสรอดชีวิตสูงแต่ก็มีโอกาสปนเปื้อนสูง แต่ถ้าตัดเนื้อเยื่อชิ้นเล็กก็มีโอกาสรอดชีวิตต่ำแต่ก็มีโอกาสปนเปื้อนน้อย



3.4 การย้ายเนื้อเยื่อ ก่อนนำเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรเช็ดขวดอาหารเพื่อฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ก่อนนำเข้าตู้ตัดเนื้อเยื่อ เมื่อจะย้ายเนื้อเยื่อลงขวดให้เปิดฝาและฉลупไฟที่คอขวด จากนั้นใช้ปากคีบที่ฉลุปไฟมาเชื้อและทิ้งให้เย็นแล้วคีบเนื้อเยื่อใส่ขวด ควรกดเนื้อเยื่อให้จมลงในอาหารเล็กน้อย แล้วจึงปิดฝาตามเดิม



4. การเพิ่มปริมาณต้นพืช

4.1 เทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นพืช โดยการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ตายอด ตาข้าง นั้น ชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถจะชักนำให้เกิดจุดกำเนิดยอดและพัฒนาเป็นต้นได้โดยตรงหรือเกิดยอดผ่านแคลลัส วิธีการเพิ่มปริมาณยอดพืชสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

4.1.1 การเพิ่มปริมาณยอดโดยการชักนำให้เกิดตาข้าง ปกติการใช้ฮอร์โมนไซโตไคนิน จะมีผลกระตุ้นการแตกตาข้าง เมื่อนำส่วนของปลายยอดหรือเนื้อเยื่อเจริญมาเลี้ยงในอาหารซึ่งระยะแรกจะใช้ความเข้มข้นของไซโตไคนินอย่างเดียว หรือร่วมกับออกซินในปริมาณต่ำ เมื่อยอดเริ่มมีการพัฒนาขึ้นมาเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่ที่เพิ่มความเข้มข้นของ BAP และทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BAP ในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก และแข็งแรง ในระยะที่ความเข้มข้นของออกซินจะค่อย ๆ ลดลงหรือไม่เติมออกซินลงในอาหาร เนื่องจากออกซินจะมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสที่ฐานของรอยตัด เมื่อเพิ่มปริมาณได้ต้นจำนวนมาก สามารถชักนำให้ออกรากได้โดยการย้ายยอดที่ได้มาเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนเช่น สับประรด ๘๐๐๐ เป็นต้น

4.1.2 การเพิ่มยอดโดยการชักนำให้เกิด adventitious shoots การนำเอาชิ้นส่วนของใบ ลำต้น ราก มาเลี้ยงในอาหาร ยอดที่เกิดขึ้นจะพัฒนามาจาก adventitious shoots สามารถนำเอาวิธีนี้มาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการตัดชำ การตอน ใช้ได้กับพืชหลายชนิด

4.1.3 การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส โดยปกติแล้วแคลลัสจะเกิดจากรอยแผลหรือรอยตัดของชิ้นส่วนหรือในอาหารที่มีออกซินหรือออกซินร่วมกับไซโตไคนิน การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสจะสามารถชักนำได้โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีระดับไซโตไคนินในระดับที่สูงกว่าออกซิน เมื่อ

พิจารณาถึงระดับฮอร์โมน ออกซิน: ไซโตไคนิน พบว่าถ้าสัดส่วนของออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินแคลลัสจะพัฒนาเป็นยอด หรือเอมบริโอ ซึ่งจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสจะมีข้อจำกัดคือ หลังจากย้ายเนื้อเยื่อไปนานๆความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นต้นจะลดลง และโอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงของยีนภายในเซลล์ บางครั้งทำให้ต้นพืชที่พัฒนาขึ้นมามีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างไปจากต้นพ่อแม่

4.2 ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญของเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน ปัจจัยแวดล้อมที่เกี่ยวข้องและมีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เลี้ยง แบ่งเป็น

4.2.1 ปัจจัยภายใน (endogenous factors) ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) การเกิดเป็นยอดและ/หรือรากนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช หรือบางชนิดอาจเกิดเป็นยอดและรากได้ง่าย ในขณะที่เดียวกันพืชอีกชนิดหนึ่งเกิดขึ้นได้ยากแม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมฮอร์โมนในพืช (hormone) ซึ่งมีบทบาทอย่างมากกับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชิ้นส่วนพืช โดยฮอร์โมนบางชนิดอาจจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน ในขณะที่ฮอร์โมนบางตัวจะจำกัดการเกิดขบวนการดังกล่าว ซึ่งระดับ (levels) และชนิด (kinds) ของฮอร์โมนในชิ้นส่วนของพืชจะมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สภาพของเนื้อเยื่อ และอื่นๆ

4.2.2 ปัจจัยภายนอก (exogenous factors) ได้แก่

แสง พืชหลายชนิดต้องการความมืดในการเกิดรากหรือยอด เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหาร แสงจึงเป็นตัวจำกัด (limiting factor) การเกิดตายอด ในทางตรงข้ามมีพืชอีกหลายชนิดที่เกิดยอดหรือรากได้ก็ต่อเมื่อได้รับแสงเท่านั้น ชนิดและความเข้มของแสงก็เป็นปัจจัยที่สำคัญพบว่าแหล่งของแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชคือ หลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว จะให้แสงสีขาวมีความเข้มของแสงอยู่ประมาณ 1,000-5,000 ลักซ์ ปลูกพืชต้องการช่วงแสงประมาณ 8-16 ชั่วโมง

อุณหภูมิ โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 20-28 องศาเซลเซียส ที่เหมาะสมสำหรับพืชส่วนใหญ่คือ 25-27 องศาเซลเซียส แต่ก็มีพืชอีกหลายชนิดที่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเป็นเพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดความสำเร็จนี้

ความชื้นสัมพัทธ์ ที่เหมาะสมอยู่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์

ฮอร์โมนพืช การใช้ฮอร์โมนในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นใช้กันมานานแล้ว แต่เพิ่งจะนำมาใช้กันอย่างจริงจังเมื่อ Miller และ Skoog (1957) ได้ตั้งสมมุติฐานว่าการเกิดเป็นต้น ราก หรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินในอาหาร

ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่

ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (size of explant) โดยการใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่มีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ดีกว่าการใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก

สภาวะการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition) เนื้อเยื่อบางชนิดเมื่อเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ แต่เมื่อนำเนื้อเยื่อนั้นไปเลี้ยงในอาหารเหลวกลับไม่

เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน แต่พืชบางชนิดสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลว นอกจากนี้ปริมาณอากาศที่อยู่ในภาชนะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็มีส่วนควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานด้วย เช่น ปริมาณออกซิเจนมากเนื้อเยื่อมักเกิดเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซิเจนน้อยเนื้อเยื่อจะเกิดเป็นยอด

การเปลี่ยนถ่ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าลงสู่อาหารใหม่ (subculture) ซึ่งการกระทำได้กล่าวหลายๆ ครั้ง จะทำให้ความสามารถในการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของเนื้อเยื่อนั้นลดลงและหายไป ซึ่งสาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใด อาจจะเป็นไปได้ที่เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมขึ้น

ส่วนประกอบของอาหาร (medium component) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน เช่น การให้ไนโตรเจนในรูปของ NH_4^+ ปริมาณมากในอาหารจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดเอ็มบริโอเจนิซึ่มมากกว่าการเกิดออร์แกโนเจนิซึ่ม การผสมสารพวกลูกของพิวรีน (purine derivatives) เช่น อดีนีน (adenine) หรือ กัวนีน (guanine) ลงในสูตรอาหารจะช่วยให้เนื้อเยื่อเกิดยอดได้ดีขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลก็มีส่วนควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานด้วยเช่นกัน



5. เทคนิคการชักนำให้พืชออกราก

เมื่อเพิ่มปริมาณได้จำนวนมากแล้ว ตัดแบ่งเป็นต้นเดี่ยว จากนั้นชักนำให้ออกรากได้ ซึ่งการชักนำให้พืชออกรากนั้นทำได้ 2 วิธี คือ

5.1 การชักนำให้พืชออกรากในสภาพปลอดเชื้อนั้น มีปัจจัยหลายชนิดที่เอื้ออำนวยต่อการเกิดราก ได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น การทำให้เกิดความเครียดของน้ำ การเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น การเติมผงถ่าน การเติมอากาศ และการลดความเข้มของแสง ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ การเพิ่มปริมาณธาตุโบรอน แคลเซียม และแมกนีเซีย ในอาหาร การใช้สาร phenolics บางชนิดและวิตามินดี การเพิ่มปริมาณน้ำตาลในอาหารจากปริมาณน้ำตาลที่ใช้ปกติจะช่วยให้พืชสร้างลิกนิน และทำให้พืชบางชนิดออกรากได้ดี การใช้สาร

ควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA NAA จะมีประสิทธิภาพมากกว่า IAA เนื่องจาก IAA สลายตัวได้ง่าย การลดปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้ออกราก พืชบางชนิดที่ออกรากได้ง่าย สามารถใช้อาหารสูตรมาตรฐานที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อชักนำให้ออกรากได้ เช่น สูตร MS

5.2 การชักนำพืชให้ออกรากนอกสภาพปลอดเชื้อ วิธีนี้ใช้กับพืชที่ออกรากยาก เช่น ไม้เนื้อแข็ง โดยการทำให้พืชที่อยู่ในระยะแตกกอซึ่งมีบางต้นมีความสมบูรณ์พร้อมทำการยึดต้นได้ เมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์สูงประมาณ 2.5-4 เซนติเมตร ตัดให้เป็นต้นเดี่ยว ๆ เลี้ยงไว้ในดินแข็งแรง ล้างวันออกให้สะอาด ตัดโคนออกเล็กน้อย จุ่มฮอร์โมนเพื่อชักนำให้ออกรากแล้วแชลงในภาชนะสำหรับเพาะชำที่ใส่วัสดุปลูกที่นิ่งมาเชื้อแล้ว เช่น พีทมอส จีแกลบ ใส่ถุงพลาสติกและปิดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น คอยดูแลรดน้ำเพื่อให้ความชื้นอย่างสม่ำเสมอจนต้นพืชออกรากและพร้อมนำออกปลูก

5.3 เทคนิคที่อาจนำมาใช้กับพืชออกรากยากในสภาพปลอดเชื้อได้ ดังนี้

1. ฮอร์โมนในอาหารที่ชักนำให้เกิดยอด อาจมีผลต่อช่วงการเกิดราก อาจแก้ไขได้โดยย้ายยอดลงในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน ในกรณีที่มี GA_3 ในอาหารที่เกิดยอด อาจใส่ ancymidol ในอาหาร prerooting medium

2. การให้ auxin เข้มข้นสูง ในระยะเวลานั้นอาจมีประสิทธิภาพมากกว่าการให้ auxin เข้มข้นต่ำแต่ระยะเวลานาน

3. การลด mineral nutrient ในอาหาร MS----> เป็น ¼ macro nutrient หรือการไม่ใช้ ammonia ในอาหาร จะทำให้การออกรากดีขึ้น

4. การเก็บยอดไว้ในที่มีมืดเพื่อให้ยอดยาวอาจช่วยให้เกิดรากดีขึ้น

5. การใส่ถ่าน ในอาหารอาจช่วยให้การออกรากดีขึ้น

6. เมื่อชักนำยอดให้เกิดราก ต้องเอา callus ออกให้หมด และต้องไม่ให้ใบพืช ติดกับ medium เพราะเหตุว่ารากจากใบและ callus ไม่มี vascular tissue ที่ต่อกับ vascular ของลำต้น

6. เทคนิคการย้ายพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก

ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อจะมีลักษณะทางสรีระวิทยาที่แตกต่างจากต้นที่เกิดในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติหลายประการ ได้แก่ ส่วนของชั้นผิว(cuticle) บาง ลักษณะของใบจะบาง อ่อน palisade mesophyll cell เล็ก แต่ spongy mesophyll cell ใหญ่กว่าพืชปกติ การควบคุมการปิดเปิดของปากใบยังทำงานได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้พืชมีการคายน้ำสูง การเชื่อมต่อระหว่างลำต้นและรากที่ส่วนของ vascular มีน้อย ทำให้การลำเลียงน้ำจากรากไปยังต้นได้น้อย รวมทั้งพืชมีการสังเคราะห์แสงน้อยมากเนื่องจากพืชใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลที่ใส่ลงไปในการอาหาร ดังนั้นพืชที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อจึงไม่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก ทำให้เกิดความเครียด และปรับตัวไม่ทัน มักทำให้เกิดอาการเหี่ยวและตายในที่สุด ดังนั้นก่อนนำพืชออกปลูกในโรงเรือนจึงต้องฝึกให้พืชได้มีการปรับสภาพและเคยชินกับสภาพแวดล้อมใหม่ ซึ่งสามารถทำได้ตั้งแต่ต้นยังอยู่ในขวด/ถุง เทคนิคการย้ายพืชออกปลูก ทำได้ดังนี้

1. ต้องนำต้นพืชที่พร้อมย้ายปลูกออกเลี้ยงไว้ในภาชนะในสภาพโรงเรือนก่อนย้ายปลูก 3-5 วัน

2. คลายฝาขวดก่อนย้ายปลูก 1-2 วัน
3. การนำต้นออกจากอาหารวุ้นด้วยความระมัดระวัง แล้วล้างเอาวุ้นออกให้หมด เก็บในตะกร้าหรือภาชนะที่สามารถรักษาความชื้นได้จนกว่าจะนำออกปลูก
4. ป้องกันกำจัดศัตรูพืชทันทีที่ย้ายออกปลูก โดยการแช่สารป้องกันกำจัดเชื้อรา
5. นำออกปลูกในวัสดุปลูกที่มีขนาดค่อนข้างละเอียด และมีการระบายน้ำดี และผ่านการฆ่าเชื้อ
6. พืชที่ปลูกใหม่ในระยะแรกควรไว้ในโรงเรือนที่มีระบบการให้น้ำที่สม่ำเสมอ มีความชื้นสูง ควบคุมแสง และอุณหภูมิได้
7. หลังย้ายปลูก 7-14 วัน จึงให้ค่อย ๆ ปรับสภาพแวดล้อม เช่น ความเข้มของแสง อุณหภูมิ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนพืชตั้งตัวได้ ปรับให้เหมาะสมกับลักษณะนิสัยของพืช หลังจากนั้นจึงให้ปุ๋ยในสัดส่วนที่ต่ำกว่าคำแนะนำประมาณครึ่งหนึ่ง



7. เทคนิคที่ทำให้ปลอดเชื้อ ทำให้หลายวิธีขึ้นอยู่กับว่าจะใช้กับอะไร จะต้องเลือกใช้วิธีและชนิดของสารเคมีให้เหมาะสม ดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ นิยมใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที เมื่อครบกำหนดนำขวดอาหารออกจากหม้อนึ่งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อ และควรเก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้เพื่อตรวจสอบอีกครั้งว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

2. เครื่องแก้ว เครื่องมือ ทำได้หลายวิธี ดังนี้

การใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง แล้วแต่ปริมาณเครื่องมือ วิธีนี้สามารถใช้ฆ่าเชื้อเครื่องมือที่เป็นเครื่องแก้ว วัสดุทนร้อนและอุปกรณ์ได้ทุกชนิด รวมทั้งกระดาษ และล้าลี

การใช้ตู้อบความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง วิธีนี้เหมาะสำหรับอบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ

การแช่อุปกรณ์ในการฆ่าตัดและย้ายเนื้อเนื้อใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ นำมาลนไฟแล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปใช้

3. ชิ้นส่วนของพีช ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1-10 % และเอทิลแอลกอฮอล์ 70 %

4. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ การฆ่าเชื้อบริเวณต่างๆ ภายในตู้ให้เปิดหลอด UV ทิ้งไว้ 20-30 นาที ก่อนปฏิบัติงาน และแอลกอฮอล์ 70 % เช็ดทำความสะอาดบริเวณที่ใช้ปฏิบัติงาน

8. การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นิยมเตรียมเป็นสารอาหารเข้มข้น(stock solution) ที่มีความเข้มข้นเป็นหลาย ๆ เท่าของความเข้มข้นที่ใช้จริง โดยมากมักให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่า 200 เท่า หรือ 1,000 เท่า ของความเข้มข้นจริง โดยรวมสารเคมีชนิดที่ไม่มีปฏิกิริยาต่อกันไว้ด้วยกัน จากนั้นจึงนำสารอาหารเข้มข้นแต่ละชนิดมารวมกัน และเติมสารอื่นๆ ให้ครบ ดังนี้

1. ชั่งสารตามสูตรอาหารที่ต้องการ ผสมเป็นสต็อกสารละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง หลอมอาหารและบรรจุขวดก่อนนำมาเชื้อเพื่อ รอกการนำไปใช้ตามลำดับดังนี้

2. ชั่งสารเคมี เป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง ต้องการความแม่นยำสูง โดยเฉพาะสารเคมีที่ใช้ปริมาณน้อย จึงต้องชั่งด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด สามารถชั่งได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3. สำหรับสารเคมีที่ใช้ปริมาณมาก จะชั่งด้วยเครื่องชั่งอย่างหยาบ ชั่งได้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง เช่น น้ำตาล หรือวุ้น

4. ผสมสารเคมี ต้องทำให้ส่วนประกอบของสารเคมีละลายผสมเข้ากันได้หมด โดยใช้เครื่องคนสารละลายร่วมกับแท่งคนไฟฟ้า

5. วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ปรับใช้ที่ระดับ 5.6 ซึ่งเหมาะสมต่อการที่พืชจะนำธาตุอาหาร

ไปใช้ในการเจริญเติบโตในอาหารบางสูตรอาจใช้ที่ระดับ pH 5 เช่น อาหารกล้วยไม้

6. หลอมอาหาร เมื่อผสมอาหารเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำมาหลอมอุ่นให้ละลายบนเตาแก๊ส

7. กรอกอาหาร ลงภาชนะต่างๆ เช่นขวดหรือถุงหรือกล่องพลาสติก เป็นต้น แต่ภาชนะที่ต้องทนความร้อน และสิ่งที่ต้องระมัดระวังขณะกรอกอาหาร คือ พยายามอย่าให้อาหารเลอะปากภาชนะ เพราะเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย

8. นำอาหารอุ่นเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เพื่อฆ่าเชื้อ เมื่อเตรียมอาหารเรียบร้อยแล้ว ควรทำให้ปลอดเชื้อภายในวันเดียวกัน ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที (เวลาอาจปรับเปลี่ยนตามขนาดของภาชนะ และปริมาณของอาหาร) เมื่อฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ให้นำอาหารออกจากหม้อนึ่งความดันไอน้ำทันที ที่ความดันลดลงเป็น 0 ถ้าเป็นขวดควรปิดฝาให้แน่นเนื่องจากฝาขวดอาจขยายตัว เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และควรเก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนไปใช้เพื่อตรวจสอบอีกครั้งว่า ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

9. สกัดอาหารผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้



บทที่ 5

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีขยายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว ต้นพืชมีความสม่ำเสมอ สมบูรณ์แข็งแรง สะอาดปราศจากโรค และตรงตามพันธุ์ (อัมพา, ปริญญารัตน์ และวรรณัฐ, 2546) จึงได้นำมาใช้ขยายพันธุ์พืชเป็นการค้าในประเทศไทย ในปี 2516-2518 ศาสตราจารย์ระพี สาคริก นำมาพัฒนาต่อยอดเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อขยายพันธุ์เป็นการค้าและส่งเสริมให้เกิดเป็นอาชีพใหม่ จนกลายเป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศ ต่อมาได้มีการพัฒนาขีดความสามารถให้สามารถขยายพันธุ์ไม้อื่นๆ ในเชิงการค้าอย่างแพร่หลาย ได้แก่ กล้วยหน่อไม้ฝรั่ง ไข่ เฮอร์บีร่า หน้าวัว เบญจมาศ บอนสี ปทุมมา กระเจียว กุหลาบสตอรี่เบอร์รี่ ขนุน ไม้สัก และพันธุ์ไม้อื่น ๆ อีกมากมาย (อุทัย, 2545) ตลอดจนไม้ใหญ่ที่มีคุณค่าทางด้านป่าไม้ เช่น สัก ไข่ เป็นต้น นอกจากนี้ใช้เพื่อการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วแล้ว ยังนำมาใช้เพื่อการผลิตพันธุ์ปลอดโรคซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรียที่มักติดมากับหัวพันธุ์/ท่อนพันธุ์ทำความเสียหายให้กับพืชที่ปลูกใหม่และการส่งออก (วิภาดา, 2545) รวมถึงการนำมาใช้เพื่ออนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช

ปัจจุบัน โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจอย่างมหาศาล จึงมีการนำความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์เพื่อผลิตพืชปลอดโรค ปัญหาพืชเศรษฐกิจหลายชนิดมีโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ไมโคพลาสมา และแบคทีเรียติดมากับหัว/ต้น/ท่อนพันธุ์ เช่น โรคใบขาวของอ้อย โรคเหี่ยวของสับปะรด เป็นต้น เชื้อจะแพร่กระจายภายในต้นผ่านทางท่อน้ำท่ออาหารพืช ทำให้พืชทุกต้นที่ขยายพันธุ์โดยวิธีอื่นมีเชื้อติดมา (จิรา, 2551) ส่วนของพืชที่มักไม่มีเชื้ออยู่คือเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากปลายยอดของลำต้นยังไม่มีท่อน้ำท่ออาหารต่อเชื่อมกับส่วนของต้นจึงไม่มีเชื้อไวรัส ดังนั้นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการกำจัดโรคออกจากต้น คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดของลำต้น ต้นพืชที่ได้จึงมีโอกาสปลอดโรคสูง หากใช้ร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานด้วยแล้วจะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อที่ติดมากับต้น/ท่อนพันธุ์ได้เป็นอย่างดีมีประสิทธิภาพ

นอกจากนี้ยังนำมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพ เช่น เบญจมาศ ซึ่งขยายพันธุ์โดยการปักชำ พบว่าเมื่อปักชำไปได้ 5-6 รอบแล้ว กิ่งพันธุ์จะให้ดอกที่มีคุณภาพเลวลง แก้ไขโดยการคัดเลือกต้นที่แข็งแรงมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วจึงนำมาขยายพันธุ์โดยวิธีการปักชำ เช่นเดียวกับหน่อไม้ฝรั่งพบว่าเมื่อนำต้นพันธุ์ที่มีลักษณะดี แข็งแรงมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อนำไปปลูกได้ต้นที่มีคุณภาพสามารถให้ผลผลิตได้เกรด A มากกว่าร้อยละ 80 ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพเพิ่มขึ้นอย่างน้อยร้อยละ 20 จึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายเพิ่มปริมาณพันธุ์ต้นพันธุ์ดีเพื่อพัฒนาคุณภาพและผลิตหน่อไม้ฝรั่งเพื่อการส่งออก

ดังนั้น กรมส่งเสริมการเกษตรจึงได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ในงานส่งเสริมการเกษตรมาตั้งแต่ปี 2537 จนถึงปัจจุบัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อส่งเสริม สนับสนุนให้เกษตรกรมีพืชพันธุ์ที่ดีที่มี

คุณภาพดีใช้อย่างเพียงพอตามความต้องการ ได้แก่ เบญจมาศ กล้วยหอม กล้วยน้ำว่า หน่อไม้ฝรั่ง อ้อยปลอดโรค และมันสำปะหลัง เป็นต้น

กล้วย

บทนำ

กล้วยจัดอยู่ใน family Musaceae ใน Order Scitamina หรือ Zingiberales เป็นพืชที่ต้องการอากาศร้อนชื้นและกึ่งร้อน ลำต้นแท้ของกล้วยมีลักษณะเป็นหัวอยู่ใต้ดิน (crom) หรือเรียกว่า rhizome มีการเจริญคล้ายซิมโปเดียล (sympodial like) ซึ่งต้นกล้วยที่เห็นจริงๆ แล้วเป็นส่วนของกาบใบที่เจริญแผ่ออกมาจากอกรวมกันเป็นต้นเทียม หรือเรียกว่า pseudostem กล้วยเกือบทุกชนิดการเจริญของหน่อ (sucker) จะอยู่ขนานกับพื้นดินและแทงขึ้นสู่อากาศซึ่งจะมองเห็นได้ชัดเจน เมื่อมีการแทงหน่อมาก ๆ เรียกว่าการแตกกอ

กล้วยเป็นพืชที่ชอบอากาศร้อนชื้น เป็นพืชท้องถิ่นในแถบเอเชียตอนใต้ซึ่งประกอบทางเหนือของอินเดีย พม่า กัมพูชา ไทย ลาว จีนตอนใต้ แถบหมู่เกาะอินโดนีเซีย เกาะบอเนียว ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกล้วยพันธุ์เมืองไม่มีเมล็ด ปลูกแบบปล่อยละเลงกระจัดกระจายทั่วไป ตามการอพยพย้ายถิ่นของประชากรเพื่อหาที่ทำกินที่สมบูรณ์ เป็นพืชที่อยู่คู่คนไทยมาตั้งแต่โบราณ โดยนำส่วนต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ เช่น ผลกล้วยสามารถนำไปประกอบอาหารคาวหวาน ปลี ลำต้นเทียมนำมาประกอบอาหาร หรือให้สัตว์เลี้ยงกินได้ ใบกล้วยหรือใบตอง สามารถนำมาห่ออาหาร ใช้ในงานฝีมือ เช่นบายศรี ลอยกระทง และเกี่ยวข้องกับพิธีสำคัญต่าง ๆ ของคนไทย เช่น นำใบกล้วยมารองตัวเด็กอ่อนคลอดใหม่ หรือนำไปรองศพก่อนจะนำไปฝังหรือเผา ส่วนของกาบกล้วยนำมาแกะสลัก ที่เรียกว่าการแทงหยวก ประกอบในพิธีเผาศพ พิธีแต่งงาน และปลูกบ้านใหม่ สำหรับพื้นที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นกล้วยน้ำว่าซึ่งปลูกเพื่อบริโภคภายในครัวเรือน ส่วนกล้วยที่ปลูกเพื่อส่งออก ได้แก่ กล้วยหอมทองและกล้วยไข่ ประเทศที่รับซื้อกล้วยไข่มากที่สุดคือ สหประชาชาติ สาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาคือประเทศสิงคโปร์ และยุโรป ส่วนประเทศที่รับซื้อกล้วยหอมทองมากที่สุดคือประเทศญี่ปุ่น พื้นที่ที่ปลูกกล้วยหอมทองมากที่สุดอยู่ที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดชุมพร โดยเกษตรกรไม่ใช้สารเคมีในการปลูกเนื่องจากเป็นข้อจำกัดของประเทศญี่ปุ่น

การขยายพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มมีมาตั้งแต่ปีพ.ศ.2517 โดย L.A.Berg และ Bustamante โดยใช้ส่วนเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้มากในเวลาอันรวดเร็ว ได้ต้นที่สะอาด ปราศจากโรค โดยเฉพาะโรคไวรัส ซึ่งหากขยายพันธุ์โดยใช้หน่อเชื้ออาจติดมากับท่อนพันธุ์ได้ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ การชักนำแคลลัสและเซลล์แขวงลอย การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส จากวิธีดังกล่าวข้างต้นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดและประหยัดค่าใช้จ่ายมากที่สุดสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย ขึ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ได้แก่ หน่อหรือลำต้นที่มีตาที่กำลังเจริญ ส่วนใหญ่มักนิยมใช้หน่อที่แตกออกมาแล้วโดยเฉพาะหน่อใบแคบ สำหรับตาที่กำลังเจริญนั้นสามารถนำมาใช้ได้เช่นกัน แต่ไม่ค่อยนิยมเพราะทำยากกว่า ส่วนดอกตัวผู้หรือหัวปลี เป็นส่วนขยายพันธุ์ที่ดีเพราะเป็นส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินจึงไม่ได้รับเชื้อโรคที่อยู่ใต้ดิน(สุจิตรา,2541) การขยายพันธุ์กล้วยสามารถใช้ส่วนปลายยอด ช่อดอกอ่อน ปลายของช่อดอกอ่อน แต่ส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือปลายยอด ทั้งนี้เพราะสามารถกำจัดโรคทั้งที่เกิดจากเชื้อไวรัส

และเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังมีประโยชน์ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมและแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมกล้วย(สมปอง,2537) รวมทั้งการปรับปรุงพันธุ์กล้วยเพื่อให้ได้กล้วยพันธุ์ใหม่ (อรดี และคณะ 2541)

งานวิจัยด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อรดี และคณะ 2541 รายงานว่าการปรับปรุงพันธุ์กล้วยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับวิธีการต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.1 การปรับปรุงพันธุ์กล้วยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีหรือแช่ในสารละลายโคชิซิน

1) สามารถทำให้กล้วยกลายพันธุ์ได้กล้วยพันธุ์ใหม่ เนื่องจาก Somaconal variation เป็นการเกิดขึ้นเองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมากพบกับการเกิดสีของลำต้น และเปลือก ซึ่งได้ทำการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยแอปเปิ้ลต้นเดิมมีเปลือกสีแดงพันธุ์ใหม่มีเปลือกสีเหลือง กล้วยนาคนต้นเดิมมีเปลือกสีแดงคล้ำ พันธุ์ใหม่มีเปลือกสีแดงอมเขียว และพบลักษณะการกลายพันธุ์ของกล้วยไข่ และกล้วยเล็บมือนางที่ได้จากการขยายพันธุ์จากปลี กล้วยไข่บางต้นมีลักษณะใบหนากว่าปกติ และต้นมีลักษณะสีดำคล้ำ และกล้วยเล็บมือนางบางต้นมีอาการใบด่าง

2) การปรับปรุงกล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา โดยนำกล้วยเล็บมือนาง กล้วยไข่กล้วยนมสาว และกล้วยนาคน ฉายรังสีแกมมาอัตรา 0, 1, 2 และ 3 Krad แล้วนำออกปลูกพบว่า กล้วยเล็บมือนางเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 95 % การเจริญเติบโตและผลผลิตในแปลงแตกต่างกันเล็กน้อยไม่พบลักษณะกลายพันธุ์ในแปลงให้เห็นอย่างชัดเจน

3) การปรับปรุงพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารละลายโคชิซินโดยการแช่ยอดกล้วยใช้เทคนิคปลอดเชื้อในสารละลายโคชิซิน ความเข้มข้น 0.5 % เป็นเวลา 4 ถึง 8 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเปลี่ยนโครโมโซมของกล้วยเล็บมือนางและกล้วยไข่จากต้นดิพลอยด์ $2n = 22$ เปลี่ยนเป็น $2n = 44$

4) การชักนำต้นอ่อนกล้วยไข่ให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สาร colchicine 0, 0.5, 0.75, 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ oryzalin 0, 15, 30 45 μM ร่วมกับ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2.5, 5.0, 7.5 ชั่วโมง ตามลำดับพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นและเวลาที่ได้รับการชักนำขึ้นทำให้กล้วยมีอัตราการรอดชีวิตลดลง หน่อที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดมีการเกิดหน่อใหม่ในชั่ว VMI ได้น้อยกว่าต้นควบคุม และก่อให้เกิดลักษณะผิดปกติเช่น ต้นเดี่ยว ใบหนาใบด่างซึ่งเป็นการเกิดในลักษณะ chimera และความยาวของเซลล์ปากเพิ่มมากขึ้น ซึ่งนำลักษณะนี้ไปคัดเลือกต้นที่มีเซลล์ปากใบเพิ่มมากขึ้นไปศึกษาโครโมโซมของกล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งโครจะเปลี่ยนจาก $2n=22$ เป็น $2n=44$ (ภาสันต์ 2540)

2.2 การคัดเลือกกล้วยทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการศึกษาการชักนำกล้วยหอมพันธุ์Williams ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS+ 15 % CW + BA 5 มิลลิกรัม/ลิตร โดยวิธีการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อ และทำให้กลายพันธุ์โดยวิธีการฉายรังสีแกมมา 2 กิโลเรด 1 ครั้ง 2 กิโลเรด 2 ครั้ง และ 4 กิโลเรด มีผลทำให้กล้วยมีการเจริญเติบโตลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณรังสีสูงขึ้น มีผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงเช่น ทำให้ใบอ้วนป้อม ใบเรียวยาว ขอบใบขาวใบหนาและเป็นมันวาว แตกหน่อเล็ก ๆ เป็นจำนวนมาก เมื่อนำมาทดสอบในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-2 % พบว่ากล้วยสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อมีเกลือ 0.4- 0.8 % แต่มีจำนวนหน่อและใบลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มมากขึ้น

สุภาพร (2532) รายงานว่าการเลี้ยงส่วนปลายยอดอ่อนของลำต้นกล้วยไข่บนอาหารสูตร Murashige และ Skoog 1962 (MS) ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเกิดต้นอ่อนได้ภายใน 6 สัปดาห์ และเมื่อนำมาขยายต่อพบว่าให้จำนวนต้น 3.3 ต้นต่อ 1 ชิ้นส่วนภายใน 3 เดือน

กวิศร์ (2536) และคณะ รายงานผลการทดสอบและเปรียบเทียบศักยภาพของกล้วยพันธุ์การค้า เช่นกล้วยไข่ กล้วย Grand Nain พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยได้ดีที่สุดคือสูตร MS ซึ่งมีน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และ BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า pH 5.6 และความเข้มข้นของวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าไม่ใส่ supporting agent และวางบนเครื่องเขย่าจะทำให้ค่าน้ำหนักและเส้นผ่าศูนย์กลางหน่อดีขึ้น ในด้านการเพิ่มปริมาณต้นพบว่าเนื้อเยื่อกล้วยจะเจริญเป็นต้นได้ขนาดใน 2 เดือน และเมื่อนำมาตัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วนตามยาวจะเพิ่มปริมาณเป็น 2.44 เท่าทุก 1 เดือน

กัลยาณี (2536) รายงานการทดลองเลี้ยงปลายยอดอ่อนของลำต้นกล้วยหอมทอง 5 พันธุ์ในกลุ่ม AAA บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA พบว่าได้ต้นอ่อน 2.29-3.47 ต้นต่อชิ้นส่วน ในระยะเวลา 6 สัปดาห์

จิรพันธ์ (2546) ทดลองสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและวัสดุปลูกสำหรับกล้วยนวล โดยนำปลายยอดไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 7 ppm. พบว่าสูตรอาหารที่มี BA 1, 3 และ 5 ppm สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ส่วนความเข้มข้น 7 ppm สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และเมื่อนำมาเพิ่มจำนวนโดยการตัดแบ่งเนื้อเยื่อและเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าในระยะเดือนสุดท้าย สูตรอาหารที่เติม BA 3 ppm เกิดหน่อมากที่สุด 2.6 หน่อ และนำไปชักนำรากในสูตรอาหาร MS และ 1/2 MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตพบว่าจำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 4.03 และ 3.48 ตามลำดับ และมีความยาวรากเฉลี่ย 2.28 และ 2.81 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อนำไปอนุบาลในโรงเรือนโดยใช้อัตราส่วนของ ทราย ดินผสม และดินผสมต่อทราย อัตราส่วน 1 : 1 ทรายเพียงอย่างเดียวเป็นวัสดุปลูกที่ ต้นกล้าสามารถเจริญได้ดี คือ ลำต้นเทียมยึดสูง เส้นผ่าศูนย์กลางและความยาวใบยาวที่สุดเมื่อเทียบกับวัสดุปลูกชนิดอื่น

มูจลินท์ (2538) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยยี่โนม AA จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยไข่ กล้วยน้ำไท กล้วยไข่ทองร่วง กล้วยหอมจันทร์ และกล้วยสา โดยใช้สูตรอาหาร MS + BA 5 ส่วนในล้านส่วน + วุ้น 5 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดีที่สุด

กรณี(2543) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่จากหน่อใบแคบและป้ออายุต่างๆ กัน พบว่า เมื่อมีการชักนำให้เกิดยอดแรกบนอาหารสูตร MS ชนิดกึ่งแข็งและเหลว ที่เติม BA 5 ppm ขึ้นส่วนของหน่อและป้ออายุต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหารเหลวเกิดยอดแรกได้เร็วกว่าขึ้นส่วนของหน่อและป้ออายุต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือนทำการตรวจนับจำนวนยอด ขึ้นส่วนของหน่อที่เลี้ยงบนอาหารเหลวมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.08 หน่อ/ชิ้น ในขณะที่ขึ้นส่วนของหน่อที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง มีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.6 หน่อ/ชิ้น ส่วนขึ้นส่วนของป้ออายุ 5, 3 และ 1 วัน เมื่อเลี้ยงบนอาหารเหลวเกิดยอดเฉลี่ย 1.93 1.88 และ 1 หน่อต่อชิ้นตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งไม่มีการพัฒนาของยอดเกิดขึ้น เมื่อศึกษาอัตราการขยายโดยการย้ายขึ้นส่วนของหน่อและป้ออายุต่างๆ เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA 5 ppm. เป็นเวลา 5 เดือนพบว่า ขึ้นส่วนหน่อและป้อกล้วยอายุต่างๆ ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารเหลวมีแนวโน้มการแตกหน่อเฉลี่ยสูงกว่าขึ้นส่วนหน่อและป้อที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารกึ่งอย่างเดียว

V.M. Kulkarni et al, 2002 รายงานว่า การใช้โปรโตคอลเพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่ โดยใช้ละอองเฮอร์คิวต์โดยการชักนำให้เกิดรากในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6- benzylaminopurine (BAP) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร adeninehemisulphate (AH) 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ giberlic acid (GA₃) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ส่วน 0.8 เปอร์เซ็นต์ สูตรเร่งรากจะประกอบไปด้วย MS ที่เติม 6- benzylaminopurine (BAP) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ adeninehemisulphate (AH) 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ส่วน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหาร MS ที่เติมกลูตามีน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

สุธนา (2552) รายงานว่าการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสในกล้วยน้ำว้าโดยการนำขึ้นส่วนของกล้วยน้ำว้ามาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม Picloram และ 2,4-D ความเข้มข้น 8, 12 และ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าขึ้นส่วนพืชที่เลี้ยงในอาหารฮอร์โมนต่างชนิดกัน มีการตอบสนองอาหารที่แตกต่างกัน โดยจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของขึ้นส่วน และการเปลี่ยนแปลงบริเวณรอยตัดที่เริ่มมีการบวมพองภายหลัง จากการย้ายลงอาหารที่เดิมสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าว โดยขึ้นส่วนของกล้วยน้ำว้าที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Picloram 8 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นโสมาคิกเอ็มบริโอ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งใช้เวลาน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับความอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Picloram เข้มข้น 12 และ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนขึ้นส่วนของกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารที่มีการเติม 2,4-D ทุกความเข้มข้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ

อมรรวรรณ์ และคณะ(2546) รายงานว่าการชักนำแคลลัสสีเหลืองฟร่ายเอเบิลของกล้วยหอมทอง (*Musa* sp.) ‘Gros Michel, AAA group’ จากตาของต้นที่เลี้ยงไว้ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารแข็งสูตร Murashing and Skoog (MS) ที่เติม 2,4-D 1.5 มก/ล, 2,4-D 1.5 มก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 % หรือไม่มีทั้ง 2,4-D และน้ำมะพร้าวจะเกิดแคลลัสรูปร่างกลมแข็งสีเหลืองแต่ไม่เกิดยอด เมื่อย้ายแคลลัสรูปร่างกลมแข็งสีเหลืองนี้ลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่มี thidiazuron (TDZ) embryogenic callus ขึ้นและ embryogenic callus จะพัฒนาไปเป็นยอดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA 2.0 มก/ล และ BA 1.0 , มก/ล เมื่อย้ายยอดที่เกิดขึ้นไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มก/ล และผงถ่าน 0.2 % จะเกิดรากได้เป็นต้นกล้วยที่สมบูรณ์ โดยมีลักษณะปกติเหมือนต้นกล้วยธรรมชาติ

6. การขยายผลผลิตและขยายพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้แม่พันธุ์ที่ปลอดโรค

ประเทศไต้หวันมีการผลิตขยายกล้วยหอมทองปลอดโรคไวรัสบันจีท็อป (BBTV) และโรคใบด่าง (CCMV) โดยใช้ส่วนของโปรโตพลาสมะเลี้ยงในอาหารสูตรอาหาร MS ที่เสริมด้วยวิตามินที่มี CH 10.4 mg/L ,มายโออินโดซิทอล (myo-inositol) และ แอลไทโรซีนบอท (L-tyrosine both) 100mg/L น้ำตาลทราย 30 g/L ผงวุ้น 5 g/L สารควบคุมการเจริญ BA 4 mg/L IAA 1.6 mg/L และ aolenine sulfate ปรับ pH เป็น 5.8 ก่อนที่จะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 °C ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน หลังจาก 4-8 สัปดาห์ จากนั้นเพิ่มขยาย ในอาหาร MS ระดับสารควบคุมการเจริญจะมี BA 4 mg/L และ IAA 1.6 mg/L ในการเปลี่ยนอาหารใหม่จะลดความเข้มข้นของ BA อยู่ที่ 3 mg/L และ IAA ต้นพืชจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในเรือนเพาะชำ ระยะแรกของการเพิ่มจำนวนของตัวอ่อน ใช้เจลแทนวุ้นจะได้ยอดมากกว่าการใช้วุ้น ในการใช้เจลผสมกับวุ้น โดยใช้วุ้น 2.5 g/L และ เจล 1.0 g/L การชักนำต้นพืชเกิดตายอดได้ดีกว่าการชักนำโดยใช้วุ้นเพียงอย่างเดียว (S.W. Lee,2003)

การขยายพันธุ์กล้วย สามารถทำได้ 3 วิธี คือ

1. การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด การขยายพันธุ์กล้วยโดยวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากการเพาะใช้เวลานานและเมล็ดมีความงอกไม่ดี จะใช้ในกรณีมีการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ๆที่ดี

2. การขยายพันธุ์โดยใช้หน่อ เป็นวิธีที่นิยมทั่วไป ในการขยายพันธุ์โดยวิธีนี้จะได้หน่อ 8-10 หน่อต่อต้นต่อปี ดังนั้นใน 1 ปี ถ้าขยายพันธุ์จากต้นต่อ 1,000 ต้น จะได้หน่อใหม่ประมาณ 8,000-10,000 ต้น หรืออาจใช้วิธีการผ่าหน่อ โดยชุดเหง้าของต้นแม่มาผ่าออกเป็นชิ้นๆ โดยให้แต่ละชิ้นมีตาที่พร้อมที่จะแตกเป็นต้นใหม่ ชำชิ้นส่วนเหล่านี้ลงในทรายหรือขี้เถ้ากลบตาที่อยู่บนชิ้นพืชจะแตกเจริญเป็นต้นใหม่ หน่อกล้วยที่เกิดจากต้นแม่แบ่งได้ 3 ชนิด ดังนี้

หน่ออ่อน เป็นหน่ออายุน้อย มีขนาดเล็ก ยังมีส่วนต่างๆไม่ครบ อ่อนแอไม่เหมาะนำไปปลูก

หน่อใบแคบหรือหน่อใบดาบ เป็นหน่อที่เกิดจากลำต้นแม่หรือจากตาของเหง้า ใบมีลักษณะเรียวยาว ยังไม่คลี่ใหญ่ หน่อมีความสูงไม่เกิน 75 เซนติเมตร เป็นหน่อที่เหมาะในการนำไปปลูกเพราะจะให้ต้นที่แข็งแรงและผลผลิตดี

หน่อใบกว้าง เป็นหน่อที่เกิดมาจากตาของเหง้าแก่หรือเหง้าที่ไม่สมบูรณ์ หรือจากต้นที่เก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วหรือตัดทิ้งแล้ว หรือจากหน่อใบแคบ หน่อพวกนี้ถึงจะมีอายุน้อยหรือขนาดเล็กแต่ใบจะคลี่แผ่กว้าง ไม่เหมาะสำหรับนำไปปลูก และถ้าพบอยู่ติดกับต้นแม่ควรทำลายเสีย ถ้านำหน่อชนิดนี้ไปปลูกจะได้ต้นที่อ่อนแอ และผลมีขนาดเล็ก

3. การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มจำนวนต้นให้ได้มากในเวลาอันรวดเร็ว ได้ต้นที่สะอาด ปราศจากโรค

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์
2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
- 3.การทวี่จำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น

4. การชักนำรากและการย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์

การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ซึ่งต้นที่ได้จะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่ต้องคัดเลือกแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดีเพื่อนำมาใช้ขยายพันธุ์ สำหรับแม่พันธุ์ที่ดีต้องมีลักษณะตรงตามพันธุ์ สมบูรณ์ แข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง ให้ผลผลิตสูง จากแหล่งที่พันธุ์ที่เชื่อถือได้ หรือสร้างแหล่งแม่พันธุ์ไว้โดยเฉพาะเพื่อการขยายพันธุ์

สำหรับการสร้างแหล่งแม่พันธุ์ไว้โดยเฉพาะเพื่อการขยายพันธุ์นั้น แปลงแม่พันธุ์ควรเป็นพื้นที่ isolate สะอาด มีขอบเขตมีขีดอย่างน้อยแบ่งเป็น 2 ชั้น/ส่วน เพื่อป้องกันโรคและแมลง อาจใช้ตาข่ายกันแมลงหรือปลูกพืชเป็นกันชนล้อมรอบแปลง ขึ้นอยู่กับชนิดพืชและการบริหารจัดการตามความเหมาะสม ต้นที่จะนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์นอกจากจะเป็นต้นที่มีลักษณะดีตรงตามพันธุ์แล้วยังต้องผ่านการตรวจสอบและรับรองว่าปราศจากโรคและแมลงที่ติดมากับต้นพันธุ์

ระบบการจัดการแปลงแม่พันธุ์

พันธุ์ดี (NUCLEAR STOCK) → ผ่านการตรวจสอบความปลอดภัยโรค → ปลูกขยายพันธุ์ในแปลงพันธุ์ที่การป้องกันโรคและแมลงได้ → ขยาย → ปลูกต้นMother Plant ในพื้นที่Isolate → ตรวจสอบโรคทุกปี → ผ่านการตรวจว่าปลอดภัย → ปลูกเป็นแม่พันธุ์ 5 ปี → นำแม่พันธุ์ดีเข้ามาใหม่
ส่ง/นำพันธุ์ดีเพื่อมาทำ → NUCLEAR STOCK

↓ ขบวนการขยายพันธุ์ให้ได้
↓ ปริมาณมากเพียงพอปลูกใน
↓ แปลงแม่พันธุ์

MOTHER PLANT

↓ ส่งเกษตรกร

ทำแปลงปลูกเพื่อผลิตและขยายพันธุ์ → ทุกปีต้องตรวจสอบการเจริญเติบโต

↓

เมื่อครบ 5 ปีหรือถึงส่ง

ต้นพันธุ์ใหม่มาปลูกแทน

ผลผลิต ลักษณะประจำพันธุ์ถูกต้อง

เมื่อพบต้นที่มีลักษณะดีตามต้องการ

ให้ทำเครื่องหมายเรียก MAKED PLANT

ตรวจสอบ 3 ปีจึงรับรองให้เป็นต้นพันธุ์

ที่เกษตรกรใช้ผลิตเป็นแม่พันธุ์ขยายได้

NUCLEAR CENTER ต้องเป็นสถานที่/โรงเรือนที่ดีมีประสิทธิภาพเพื่อใช้ขยายแม่พันธุ์ ซึ่งส่งมาหรือนำเข้ามานำน้อย ราคาแพง จึงต้องนำมาขยายเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นโดยปลูกในโรงเรือนที่มีการดูแลอย่างดีหรือแปลงขยายที่มีการดูแลที่ดีเพื่อขยายให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปปลูกในแปลงแม่พันธุ์ (MOTHER PLAN) เพื่อนำไปขยายสู่เกษตรกรต่อไป

MARKED PLANT คือต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง ผลมีความสม่ำเสมอและตามสายพันธุ์ ผ่านการตรวจสอบและรับรองพันธุ์จากหน่วยงานราชการ เกษตรกรสามารถนำไปใช้เป็นแม่พันธุ์ได้

2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.1 การเลือกชิ้นส่วนพืช ทำโดย

นำหน่อใบแคบมาลอกกาบออกจนเหลือขนาดประมาณ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปาดส่วนโคนให้เหลือส่วนของจุดเจริญ

2.2 การฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ดังนี้

นำหน่อมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ 30 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที และครั้งที่ 2 ในสารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นให้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งครั้งละ 3-5 นาที เพื่อล้างสารเคมีออกให้หมด

นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้น โดยลอกกาบออกด้วยใช้มีดผ่าตัดและปากคิ๊บ จนเหลือขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วจึงนำมาตัดชิ้นเนื้อเยื่อจากจุดเจริญส่วนยอด (Apical meristem) ได้กลึงจุดทรรศน์ ให้ได้ขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.3 มิลลิเมตร

นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog 1962 (MS) เดิม สารควบคุมการเจริญเติบโต BA 5 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร เนื่องจาก BA เป็นสารในกลุ่มไซโตไคนินที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด (shoot meristem)

นำไปเลี้ยงในห้องบ่มสภาพห้องที่ควบคุมที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน

3. การทวีจำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น

เพิ่มปริมาณยอดทวีคูณโดยนำเนื้อเยื่อที่แตกเป็นกอมียอดอ่อนเล็กๆ มาตัดแต่งลอกกาบออกแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด เซนติเมตร ผ่าที่โคนให้ถึงจุดเจริญ แล้วจึงย้ายลงอาหารสูตรสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog 1962 (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตรา 5 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน ทำหลาย ๆ ครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณยอดจนได้ปริมาณตามต้องการ

4. การชักนำรากและการย้ายปลูก

เมื่อเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมากแล้วให้นำมาชักนำให้เกิดราก โดยตัดแต่งยอดเลี้ยงในอาหาร MS กิ่งเหลว (ลดน้ำตาลลงครึ่งหนึ่ง) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA อัตรา 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร



1. คัดเลือกหน่อไอบแคบจากต้นแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดี
ตรงตามพันธุ์ ต้นสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรค
และแมลง



2. ลักษณะของหน่อกล้วยที่จะนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์
ต้องเป็นหน่อไอบแคบ อายุประมาณ 3-4 เดือน



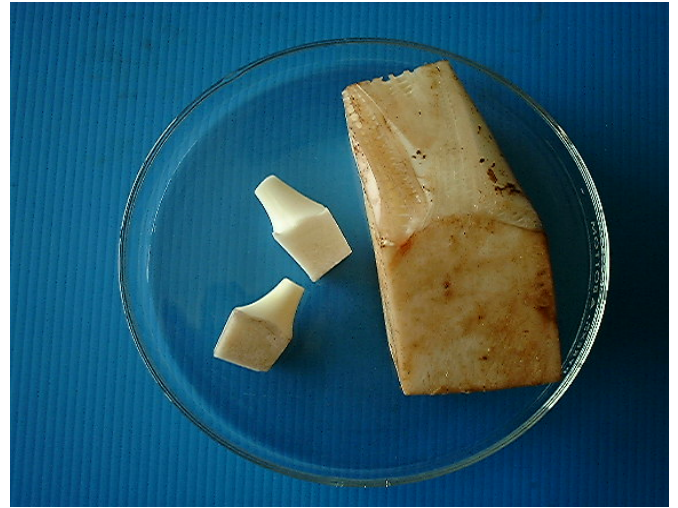
3. นำหน่อมาตัดแต่งขึ้นพืชให้เหลือแต่ส่วนที่ต้องการ
เพื่อสะดวกในการทำงานขั้นต่อไป



4. นำหน่อกล้วยที่ได้ตัดแต่งให้เหลือเฉพาะส่วนลำ
ต้นที่มีตายอดและตาข้าง บรรจุลงในถุงพลาสติกเพื่อ
รักษาความชื้นให้หน่อสดตลอดเวลา



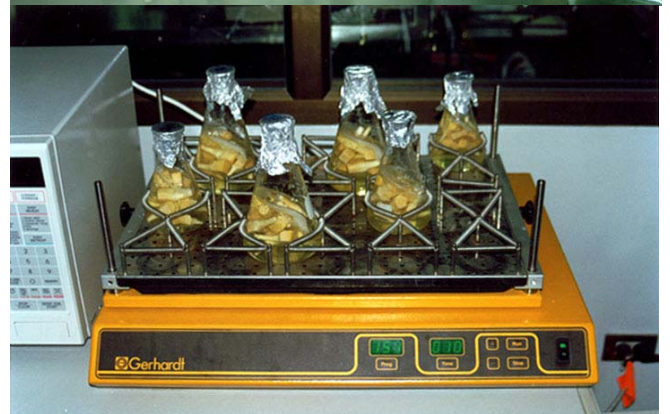
5. นำมาลอกกาบออก ตัดแต่งจนเหลือขนาดเล็ก
ปาดส่วนโคนให้เหลือส่วนของจุดเจริญ



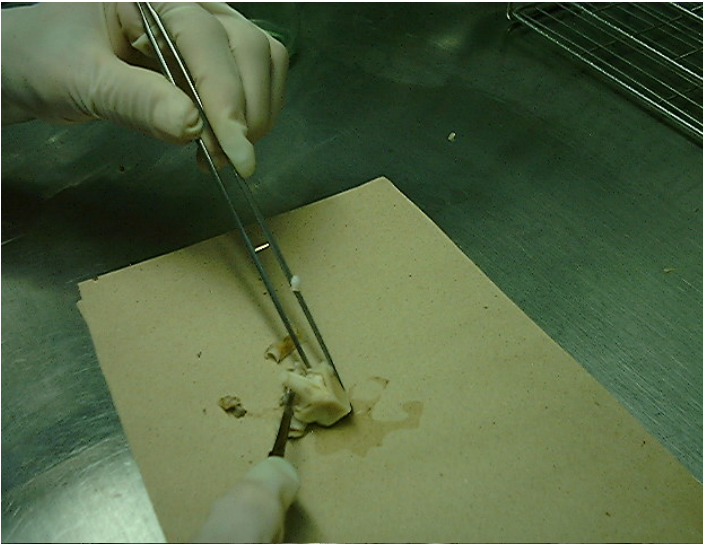
6. ขนาดของหน่อที่ถูกตัดแต่งเล็กประมาณ 2
ลูกบาศก์เซนติเมตร



7. ล้างในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดมา
ที่ผิวภายนอก



8. นำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ 2 ครั้ง
ครั้งที่ 1 ใช้ สารละลายคลอโรกซ์ 30 % นาน 30 นาที
ครั้งที่ 2 ใช้ สารละลายคลอโรกซ์ 15 % นาน 30 นาที
ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5
นาที เพื่อล้างสารเคมีออกให้หมด



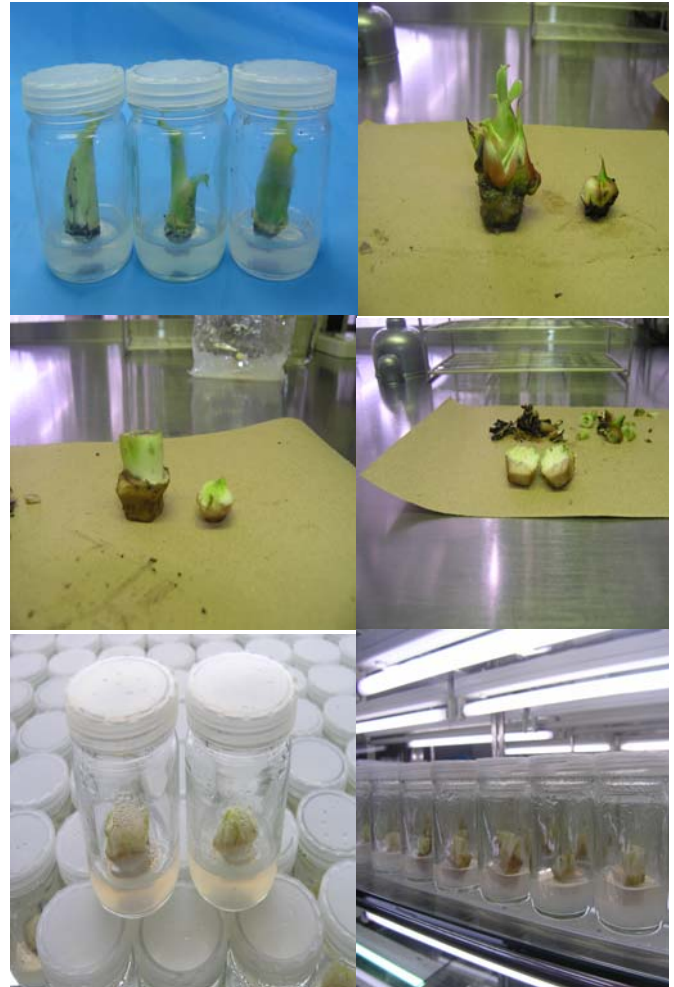
9. นำมาตัดแต่งชิ้นพืชให้มีขนาดเล็กประมาณ 3-5 มิลลิเมตร หรือตัดชิ้นเนื้อเยื่อจากจุดเจริญส่วนยอด (Apical meristem) ได้กลีบงูลงทรรศน์ให้ได้ขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.3 มิลลิเมตร ทำในตู้ปลอดเชื้อ



10. เตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้น โดยชักนำยอดเลี้ยงในสูตรอาหาร MS + BA อัตรา 5 มิลลิกรัม/ลิตร (อัตราขยาย 1 เท่า/ชิ้น/เดือน)



11. นำไปเลี้ยงในห้องบ่มสภาพห้องที่ควบคุมที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน



12. นำยอดอ่อนมาชักนำยอดเพิ่มปริมาณ โดยตัดปลายส่วนยอดทิ้ง ลอกกาบแล้วผ่าครึ่งเป็น 2 ซีก เปลี่ยนอาหารใหม่ (อัตราขยาย 2 เท่า/ขึ้น/เดือน)



13. นำยอดมาตัดขยายเพิ่มปริมาณ โดยตัดแบ่งเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ทุก 1 เดือน (อัตราขยาย 3 เท่า/ขึ้น/เดือน)



14. นำยอดมาตัดแต่งเพื่อเพิ่มปริมาณทุก 1 เดือน
ทำหลาย ๆ ครั้ง จนได้ปริมาณมากเท่าที่ต้องการ
(อัตราขยาย 5 เท่า/ชิ้น/เดือน)



15. ชักนำให้เกิดราก โดยตัดแต่งยอดเลี้ยงในอาหาร
MS แข็งกึ่งเหลว(ลดวุ้นลงครึ่งหนึ่ง) ที่เติมสาร
ควบคุมการเจริญเติบโต NAA อัตรา 0.1 มิลลิกรัม
ต่อลิตร





16. นำต้นอ่อนที่ชักนำให้เกิดรากพัฒนาเป็นต้นอ่อน
ที่สมบูรณ์ ล้างวุ้นออก นำออกปลูกในโรงเรือนที่มี
สภาพแวดล้อมเหมาะสม

มันสำปะหลัง

บทนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย มีปริมาณการส่งออกในปี 2552 ประมาณ 4,357,032 ตัน คิดเป็นมูลค่า 33,758 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2552)สามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น มันเส้น มันอัดเม็ด และใช้ทำเอทานอล เพื่อเป็นพลังงานทดแทน น้ำมันเชื้อเพลิง เมื่อวันที่ 2 กันยายน 2546 คณะรัฐมนตรีมีมติ เพิ่มสัดส่วนการใช้พลังงานทดแทนจากร้อยละ 0.5 ในปี 2545 เป็นร้อยละ 8 ของการใช้พลังงานรวมของประเทศในปี 2554 และได้มีการกำหนดยุทธศาสตร์การผลิตเชื้อเพลิงเหลวชีวภาพ เอทานอลและไบโอดีเซลขึ้น ในส่วนเอทานอลได้มีการกำหนดเป้าหมายให้ใช้เอทานอลเพื่อทดแทนสาร MTBE ซึ่งเป็นสารที่ใช้เพื่อเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน 95 ให้ได้วันละ 1 ล้านลิตร ในปี 2549 และเพิ่มเป็นวันละ 3 ล้านลิตร ภายในปี 2554 นอกจากนี้ยังมีนโยบายให้ยกเลิกการใช้ MTBE ในวันที่ 1 มกราคม 2550 แต่เนื่องจากมีปัญหาเรื่องปริมาณเอทานอล มีไม่เพียงพอ ผลกระทบต่อรถยนต์ที่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ได้ จึงได้มีการเลื่อนมาตรการยกเลิกการใช้ MTBE ออกไปก่อน ฉะนั้น กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงมีนโยบายเร่งรัดการผลิตพืชเพื่อนำไปทำเอทานอล ซึ่งประกอบด้วย อ้อย และมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีความมั่นคงทางด้านอาหาร(Food security crop) เพราะให้ผลผลิตสูง (High productivity) ให้ผลผลิตพลังงานต่อหน่วยแรงงานและที่ดินมากกว่าข้าวโพด 30-100 % ทนทานต่อความแห้งแล้ง (drought resistance) มีความยืดหยุ่นสูง (flexibility) สามารถเก็บเกี่ยวได้ตลอดปี เจริญเติบโตดีในทุกสภาพดินฟ้าอากาศของประเทศไทย เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตั้งแต่อายุ 8-24 เดือนหลังปลูก เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทำรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นที่สองจาก ข้าว ยางพารา และอ้อย ซึ่งปัจจุบันมีแนวโน้มส่งออกมากขึ้นเนื่องจากประเทศคู่ค้า เช่นจีน และยุโรปมีความต้องการผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังจากประเทศไทยมาก และนโยบายของรัฐบาลได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกมันสำปะหลังเพื่อเป็นพืชพลังงานทดแทน ดังนั้นจึงเป็นสัญญาณที่ดีสำหรับเกษตรกรที่จะเพิ่มพื้นที่การปลูกมันสำปะหลังมากขึ้น โดยไม่ต้องกังวลเรื่องของราคาและตลาด

ในปี 2553 มีรายงานจากกรมส่งเสริมการเกษตรว่ามีพื้นที่ระบาดของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังจำนวน 600,000 ไร่ พบว่าสามารถตัดวงจรการระบาดและเผยแพร่ความรู้การจัดการเพลี้ยแป้งให้เกษตรกรให้ตระหนักถึงภัยจากการเข้าทำลายของเพลี้ยและสามารถควบคุมเพลี้ยแป้งได้ระดับหนึ่ง แต่เนื่องจากเพลี้ยแป้งมีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพอากาศร้อนและแห้งแล้ง และสามารถแพร่กระจายได้หลายรูปแบบ โดยมด ลม คน และท่อนพันธุ์ จึงพบการระบาดแพร่กระจายออกไปได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อมันสำปะหลังส่งผลกระทบต่อเกษตรกรการส่งออกผลผลิตมันสำปะหลังและอุตสาหกรรมและผลกระทบต่อแรงงานที่เกี่ยวข้องต่อเกษตรกร และระบบการตลาดมันสำปะหลัง จากข้อมูลทะเบียนผู้ปลูกพืชเศรษฐกิจของกรมส่งเสริมการเกษตร (มีนาคม 2531) พบมีต้นมันสำปะหลังที่ยืนต้นในพื้นที่ประมาณ 4.55 ล้านไร่ ซึ่งเป็นต้นมันสำปะหลังอายุมากกว่า 8 เดือนขึ้นไปที่มีแนวโน้มจะเก็บเกี่ยวเพื่อปลูกใหม่ อายุ 1-4 เดือน ที่มีการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งและเป็นแหล่งสะสมและแพร่กระจายเพลี้ยแป้งไปสู่แปลงอื่น

และอายุ 4 เดือนขึ้นไป จากสถานการณ์การระบาดของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำมันรำข้าว หากยังไม่มี การดำเนินการจัดการเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำมันรำข้าวตามหลักวิชาการแบบครอบคลุมพื้นที่ปลูกน้ำมันรำข้าว โดยพร้อมเพรียงกัน จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งระบบ ซึ่งจากการประมาณการของ สมาคมผู้ปลูกน้ำมันรำข้าว การตลาดและอุตสาหกรรม จะส่งผลกระทบต่อ 80,000 ล้านบาท กิจกรรมหนึ่งที่ ผู้เกี่ยวข้องเห็นความสำคัญคือการใช้ดิน/ท่อนพันธุ์สะอาด ร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดแบบผสมผสานจะ สามารถลดการแพร่ระบาดของโรคแมลงจากแหล่งหนึ่งได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคโนโลยีการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตขยายแม่พันธุ์น้ำมันรำข้าว จึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถผลิตขยายท่อนพันธุ์ สะอาดในปริมาณมาก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การปรับปรุงพันธุ์น้ำมันรำข้าว

น้ำมันรำข้าวเป็นพืชหัวชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Manihot esculenta* Crantz อยู่ในตระกูล Euphobiaceae เช่นเดียวกับอย่างพารา ละหุ่ง และสบู่ดำ มีทั้งหมดประมาณ 7,200 ชนิด มีถิ่นกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) มีหลักฐานปลูกในโคลัมเบียและเวเนซุเอลา มานานกว่า 3,000-7,000 ปี แพร่เข้ามาใน เมืองไทย โดยถูกนำเข้ามาจากประเทศมาเลเซียมาปลูกทางภาคใต้ เมื่อปี ค.ศ. 1786 เป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็น อันดับ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และฝรั่ง น้ำมันรำข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกาใต้ ในทวีปเอเชียประเทศอินโดนีเซียและอินเดียมี การบริโภคน้ำมันรำข้าวเป็นจำนวนมาก

การปรับปรุงพันธุ์น้ำมันรำข้าวในประเทศไทยมีรายงานว่า มีการศึกษามานานกว่า 60 ปีแล้วเริ่ม ตั้งแต่ ทวน คมกฤต ศึกษาการปลูกน้ำมันรำข้าวเพื่อทำมาค้าขายในจังหวัดสงขลา ในวารสารกสิกรรม เมื่อ พ.ศ. 2480 มีการนำพันธุ์น้ำมันรำข้าวมาจากประเทศฟิลิปปินส์และประเทศมาเลเซีย เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับ พันธุ์พื้นเมือง ในสถานีการเกษตรภาคใต้ (ปัจจุบันคือ สถานีวิจัยยาง จังหวัดสงขลา) หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

1) สถานีวิจัยพืชไร่ รมวิชาการเกษตร มีศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง เป็นศูนย์วิจัยหลักในการสร้างพันธุ์ น้ำมันรำข้าว พันธุ์ที่ปรับปรุงขึ้นมาใช้ชื่อว่า “ระยอง” หมายเลขต่าง ๆ

2) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้งานประสานงานโดยภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มีพันธุ์ที่ แนะนำออกมาคือ พันธุ์ศรีราชา 1 เกษตรศาสตร์ 50 และห้วยบง 60 และห้วยบง 80

3) มูลนิธิสถาบันพัฒนามันน้ำมันรำข้าวแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาการผลิตและการค้ามันน้ำมันรำข้าว และสนับสนุน การวิจัยพัฒนามันน้ำมันรำข้าว ตลอดจนขยายและแจกจ่ายพันธุ์มันน้ำมันรำข้าวสู่เกษตรกร

4) ศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (Centro Internacional de Agricultura Tropical) มีชื่อย่อว่า CIAT เป็นศูนย์กลางวิจัยและพัฒนามันน้ำมันรำข้าวนานาชาติ และเป็นแหล่งรวมเชื้อพันธุ์มันน้ำมันรำข้าว จากทวีป อเมริกากลาง และทวีปอเมริกาใต้ เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ตั้งอยู่ที่เมือง คาลิ ประเทศ โคลัมเบีย ตั้งสำนักงานสาขาสำหรับในประเทศไทยที่ประเทศฟิลิปปินส์ และได้ร่วมมือสนับสนุนการ พัฒนาพันธุ์มันน้ำมันรำข้าวของประเทศไทย

พันธุ์มันสำปะหลังที่นิยมปลูกในประเทศไทย มี 9 พันธุ์ ได้แก่ ระยะเวลา 5 ระยะของ 60 ระยะของ 72 ระยะของ 90 ระยะของ 7 ระยะของ 9 เกษตรศาสตร์ 50 หัวขบง 60 และหัวขบง 80

1. พันธุ์ระยะของ 5 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ 27 - 77 - 10 กับพันธุ์ระยะของ 3 มีลักษณะประจำพันธุ์คือ ยอดอ่อนสีม่วงอ่อน ใบสีเขียวเข้ม ก้านใบสีแดงเข้ม ต้นสีเขียวมน้ำตาล มีการแตกกิ่ง 2 - 3 ระดับที่ความสูง 1.00 - 1.20 เมตร ความสูงของต้นประมาณ 1.70 เมตร เก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 12 เดือน หัวมีลักษณะอ้วน เปลือกหัวสีน้ำตาลอ่อนและมีเนื้อสีขาว ผลผลิตหัวสด 4.42 ตัน/ไร่ มีแป้ง 23 % ในฤดูฝนและ 26 % ในฤดูแล้ง มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้ปานกลาง ฤดูปลูกที่เหมาะสม ต้นฤดูฝน พฤษภาคมถึงมิถุนายน และปลายฤดูฝน กันยายน ถึง ตุลาคม ปลูกได้ดีทั้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2. พันธุ์ระยะของ 60 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ MCot 1684 กับพันธุ์ระยะของ 1 มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ ยอดอ่อนสีเขียวอมม่วง ใบสีเขียว ก้านใบสีเขียวปนแดง ลำต้นสีน้ำตาลอ่อน มีการแตกกิ่ง 2 ระดับเมื่อสูง 1.70 เมตร ความสูงของต้นประมาณ 2.75 เมตร หัวเป็นกระจุกรวมกันแน่นที่โคนต้น ทำให้ง่ายต่อการขุด เปลือกหัวสีน้ำตาลอ่อนและมีเนื้อสีขาวครีม ให้ผลผลิตหัวสด 4.42 ตัน/ไร่ มีแป้ง 20 % ในฤดูฝนและ 25 % ในฤดูแล้ง มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้ปานกลาง แนะนำให้ปลูกในภาคตะวันออก ฤดูปลูกที่เหมาะสม คือ ต้นฤดูฝน พฤษภาคม ถึง มิถุนายน และปลายฤดูฝน กันยายน ถึง ตุลาคม

3. พันธุ์ระยะของ 72 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ระยะของ 1 กับระยะของ 5 มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ ลำต้นสีเขียวเงินสูง 2.00 เมตร มีระดับการแตกกิ่ง 0.1 ระดับ ความสูงของการแตกกิ่งระดับ 1.30 - 1.40 เมตร มุมของกิ่ง 60 - 75 องศา ใบแก่สีเขียวเข้ม ก้านใบสีแดงเข้ม ความยาวก้านใบ 25 - 30 เซนติเมตร ยอดอ่อนสีม่วง เปลือกนอกของหัวสีขาวนวล เนื้อสีขาว ผลผลิตหัวสด 5.09 ตัน/ไร่ มีแป้ง 20.9 % มีความต้านทานต่อโรคใบจุดและโรคใบไหม้ปานกลาง ฤดูปลูกที่เหมาะสม คือ ปลูกได้ทั้งต้นฤดูฝน พฤษภาคม ถึง มิถุนายน และปลายฤดูฝน กันยายน ถึงตุลาคม เหมาะสมมากสำหรับปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การใช้พันธุ์นี้ปลูกในภาคตะวันออกให้ผลผลิตหัวสดและคุณภาพใกล้เคียงกับพันธุ์แนะนำอื่น ๆ มีข้อควรระวังคือ เมื่อปลูกในภาคตะวันออก ไม่ควรเก็บเกี่ยวในฤดูฝนเพราะอาจทำให้มีแป้งต่ำกว่า 20 %

4. พันธุ์ระยะของ 90 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ CMC 76 กับพันธุ์ V 43 มีลักษณะประจำพันธุ์คือ ยอดอ่อนสีเขียวอ่อน ใบสีเขียวเข้ม ก้านใบ สีเขียวอ่อน ต้นสีน้ำตาลอ่อน ลำต้นโค้งสูงประมาณ 1.75 เมตร มี 2 - 3 ลำต่อต้น เก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 12 เดือน หัวมีลักษณะเรียวยาว มีหัวตอกมากเปลือกหัวสีน้ำตาลเข้มและมีเนื้อสีขาว ให้ผลผลิตหัวสด 3.96 ตัน/ไร่ มีแป้ง 25 % ในฤดูฝนและ 30 % ในฤดูแล้ง มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้ ฤดูปลูกที่เหมาะสม ต้นฤดูฝน พฤษภาคม ถึง มิถุนายน ถ้าปลูกปลายฤดูฝนในดินที่สูญเสียความชื้นง่าย อาจมีปัญหาจำนวนท่อนพันธุ์หรือต้นงอกต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้ผลผลิตต่ำ ปลูกได้ทั้งภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีดินค่อนข้างดี

5. พันธุ์ระยะของ 7 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ CMR 30 -71-25 กับพันธุ์ OMR29-20-18 มีลักษณะประจำพันธุ์ ยอดอ่อนสีเขียวอ่อน ใบสีเขียวอ่อน ก้านใบ สีเขียวอ่อน ต้นสีน้ำตาลอ่อน มีการแตกกิ่ง 0.1 ระดับ ความสูงของต้นประมาณ 1.83 เมตร เก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 10-16 เดือน เปลือกหัวสีครีมและมีเนื้อสีขาว ให้ผลผลิตหัวสด 6.30 ตัน/ไร่ มีแป้ง 27.2 % ในฤดูฝน 27.6 % ในฤดูแล้ง ปลูกได้ดีในทุกแหล่งปลูก

มันสำปะหลังศักยภาพในการให้ผลผลิตขึ้นอยู่กับสภาพพื้นที่และการดูแลรักษา มีข้อควรระวังคือเมื่อปลูกในดินที่สมบูรณ์ต่ำและแล้งยาวนานจะเกิดการแตกตาตามลำต้น

6. พันธุ์ระยอง 9 เป็นพันธุ์ดีที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลเป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ CMR 31 -19-23 กับพันธุ์ OMR 29-20-118 มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ ลำต้นสีน้ำตาลอมเหลือง ไม่ค่อยแตกกิ่ง เมื่ออายุ 1 ปี สูง 2.35 เมตร ก้านใบ สีเขียวอ่อนชมพูแฉกใบกลางเป็นรูปหอกใบและยอดอ่อนสีเขียวอ่อน หัวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อของหัวสีขาว ให้ผลผลิตหัวสด 4.94 ตัน/ไร่และให้ผลผลิตมันแห้ง 2.11 ตัน/ไร่ การให้เอทานอลเมื่อเก็บเกี่ยวอายุ 8 เดือน 191 ลิตรต่อตันหัวสด อายุ 12 เดือน 208 ลิตรต่อตันหัวสด อายุ 18 เดือน 194 ลิตรต่อตันหัวสด ปลูกได้ดีในทุกแหล่งปลูกมันสำปะหลังศักยภาพในการให้ผลผลิตขึ้นอยู่กับสภาพพื้นที่และการดูแลรักษา มีข้อควรระวัง คือ ควรเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 1 ปี เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงแต่สมน้ำหนักการเก็บเกี่ยวเร็วจะให้ผลผลิตหัวสดต่ำกว่าพันธุ์มาตรฐานอื่น ๆ

7. พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ ระยอง 1 กับพันธุ์ ระยอง 9 มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ ยอดอ่อนสีม่วง ใบสีเขียวอมม่วง ต้นสีเทาเงิน ลำต้นโค้ง แตกกิ่งน้อย คือ 0.1 ระดับหากแตกกิ่ง กิ่งแรกจะแตกสูงจากพื้นดินประมาณ 1.50 เมตร กิ่งทำมุมกว้าง 75-90 องศา หัวมีขนาดสม่ำเสมอ เปลือกสีน้ำตาล เนื้อสีขาว ให้ผลผลิตหัวสด 3.67 ตัน/ไร่ มีแป้ง 23.3 % ในฤดูฝน มีความต้านทานโรคใบไหม้ปานกลาง

8. พันธุ์ห้วยบง 60 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ ระยอง 5 กับพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 มี

ลักษณะประจำพันธุ์ คือ ยอดอ่อนสีม่วงอ่อน ใบสีเขียวปนม่วง ก้านใบสีเขียวอมม่วง ลำต้นสีเขียวเงิน ความสูงของการแตกกิ่ง 90-140 เซนติเมตร ความสูงต้น 1.80 - 2.50 เมตร เปลือกนอกของหัวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อสีขาว ให้ผลผลิตหัวสด 5.75 ตัน/ไร่ ผลผลิตมันแห้ง 2.14 ตันต่อไร่ แป้ง 25.4 %

9. พันธุ์ห้วยบง 80 เป็นพันธุ์ใหม่พัฒนาโดยความร่วมมือระหว่างมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทยในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพราชสุตาฯ สยามบรมราชกุมารี กับภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลักษณะเด่นคือ มีแป้งเฉลี่ยสูงถึง 27.3% มีลักษณะทรงต้นสูง แตกกิ่งน้อยสะดวกต่อการเก็บเกี่ยวและเก็บต้นพันธุ์ เพื่อใช้ในการปลูกต่อไป นอกจากนี้ยังเหมาะกับการใช้แปรรูปทำมันเส้น แป้งและเอทานอล

จะเห็นได้ว่านักปรับปรุงพันธุ์ได้ปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ใหม่ออกมาหลายพันธุ์ซึ่งแต่ละพันธุ์มีคุณสมบัติเด่นแตกต่างกันไป เกษตรกรสามารถเลือกพันธุ์ให้เหมาะกับสภาพพื้นที่ของตนเองได้ เกษตรกรบางรายได้พันธุ์ใหม่ไปขยายปลูกและขายท่อนพันธุ์ให้เกษตรกรรายอื่นในราคาที่สูงมาก เช่นราคาลำละ 10-20 บาท ซึ่งเกษตรกรที่ซื้อพันธุ์ต่อจากเพื่อนมีความคาดหวังสูงมากกับท่อนพันธุ์ที่ซื้อในราคาสูง แต่มีปัจจัยเสี่ยงคือ พันธุ์ที่ซื้อมาจะเป็นพันธุ์แท้หรือไม่ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการเลือกท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง แต่มีวิธีที่สามารถทำให้เกษตรกรมีความมั่นใจกับพันธุ์มันสำปะหลังคือการใช้ต้นพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถขยายผลต่อจากการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตาม

ต้องการ แล้วนำมาขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะได้ต้นพันธุ์ที่ได้ตรงตามสายพันธุ์ อีกทั้งได้แม่พันธุ์ที่ปลอดโรคและแมลง

งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง

La'szlo' และคณะ (1987) ศึกษาการเกิด somatic embryo และการพัฒนาเป็นต้นของมันสำปะหลังในหลอดทดลอง โดยเพาะเลี้ยงใบอ่อนและปลายยอดมันสำปะหลัง 15 สายพันธุ์ บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.76 ไมโครโมลาร์) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบมันสำปะหลังบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-16 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.22-3.52 ไมโครโมลาร์) พบว่ามี somatic embryo เกิดขึ้นในมันสำปะหลัง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ M Col 22, M Col 1505, M Col 1940 และ M Ven 270 และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด somatic embryo จากปลายยอดน้อยกว่าใบอ่อน โดยปลายยอดเกิด somatic embryo เฉลี่ย 29.5 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ใบอ่อนเกิด somatic embryo เฉลี่ย 47 เปอร์เซ็นต์

Guohua (1998) ศึกษาผลของออกซินต่อการเกิด somatic embryo จากใบอ่อนมันสำปะหลังพันธุ์ Nanzhi 188 โดยนำชิ้นส่วน somatic embryo ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.1 ไมโครโมลาร์ ที่เพาะเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 20 วัน ก่อนนำมาเลี้ยงในที่มีแสงอีก 10 วัน และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.9, 4.5, 18.1 และ 45.2 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 18.1 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมที่สุดในการชักนำ somatic embryo และได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเกิด organogenesis โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน somatic embryo บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20, 30, 40 50 และ 60 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.1 ไมโครโมลาร์ ในที่มืด เป็นเวลา 20 วัน พบว่า somatic embryo ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 วัน เกิด organogenesis มากที่สุด

Guohua และ Xu (2002) ศึกษาการเกิด somatic embryo และ adventitious shoot ของมันสำปะหลังพันธุ์ Nanzhi 188 โดยนำใบอ่อนมันสำปะหลังมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18.1 ไมโครโมลาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-8 วัน พบว่ามี adventitious shoot เกิดขึ้นที่ผิวของแคลลัส จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.02 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.002 ไมโครโมลาร์ ในที่มืดเป็นเวลา 20 วัน และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม แต่ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ adventitious shoot จะพัฒนาเป็นยอด นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้เกิดราก

รังสี และคณะ (2551) ศึกษาการสร้างมันสำปะหลังเตตราพลอยด์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดำเนินการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ คือ ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 90 และเกษตรศาสตร์ 50 โดยใช้ตาขอดและตาข้าง อายุ 30-45 วัน เป็น explant นำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น

0.01 % เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผสมซูโครส 20 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 30-45 วัน ได้ต้นกล้ามันสำปะหลังที่สมบูรณ์และแข็งแรง ซึ่งถูกใช้เป็น explant สำหรับชักนำให้เป็นมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 0.002-0.003 % ผสม DMSO 2 % ในสภาพปลอดเชื้อ จะได้ explant ที่มีชีวิตรอด จำนวน 33-58 % ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปเป็นต้นกล้าที่มีลักษณะโพลิพลอยด์ที่มีลักษณะต้นเดี่ยว ข้อถี่ ใบหนา เจริญเข้ม หยักเว้าน้อย การเจริญเติบโตช้า รากใหญ่ และสั้น รวมทั้งมีปริมาณน้อยกว่าต้นปกติ การคัดเลือกมันสำปะหลังโดยวิธีการตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตา ปลูกชำ ทุก 4-6 รุ่น จะได้ต้นกล้ามันสำปะหลังโพลิพลอยด์ที่ไม่มีลักษณะ Chimera 100 %

สุรชาติพิทย์ และคณะ (2551) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดทิวของมันสำปะหลัง พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50) โดยเพาะเลี้ยงข้อและปลายยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS, AP และ WPM ที่เติมอะดีนีนซัลเฟต 3.68 ไมโครโมลาร์ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร WPM ที่เติมอะดีนีนซัลเฟต 3.68 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ข้อและปลายยอดเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดทิว โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร WPM ที่เติมอะดีนีนซัลเฟต 3.68 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร WPM ที่เติมอะดีนีนซัลเฟต 3.68 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.002 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดทิวมากที่สุด (2.6 ยอด) และเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร WPM ที่เติมอะดีนีนซัลเฟต 3.68 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA, KIN และ IAA พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร WPM ที่เติมอะดีนีนซัลเฟต 3.68 ไมโครโมลาร์, BA และ KIN ความเข้มข้น 0.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.018 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ปลายยอดเกิดยอดทิวมากที่สุด

สุรชาติพิทย์ และคณะ (2552) ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำแคลลัสของมันสำปะหลัง พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50) โดยเพาะเลี้ยงใบของมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.11, 0.22 และ 0.44 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 0, 0.093 0.186 และ 0.558 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า BA และ NAA มีผลต่อการสร้างแคลลัส โดยใบของมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.11 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 0.558 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 2.64 เซนติเมตร

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์
2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
3. การทิวจำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น
4. การชักนำราก
5. การย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์

การคัดเลือกแม่พันธุ์นับว่ามีความสำคัญ เนื่องจากเป็นปัจจัยเริ่มต้นของการผลิตพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หากเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงมีความสมบูรณ์แข็งแรง ตรงตามพันธุ์ ปราศจากโรค

และแมลงต่างๆ ต้นพืชที่ได้ก็จะมีคุณสมบัติสม่ำเสมอ เนื่องจากการพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ การคัดเลือกแม่พันธุ์มันสำปะหลัง ควรพิจารณา ดังนี้

1. คัดเลือกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังจากต้นแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดี ตรงตามพันธุ์
2. อายุของท่อนพันธุ์ ประมาณ 8-12 เดือน ตัดเก็บไว้ไม่เกิน 15 วัน
3. ต้นสมบูรณ์แข็งแรง สด ไม่ซ้ำ ปราศจากโรคและแมลง

2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.1 การเลือกชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมคือส่วนที่เป็นตายอดและตาข้าง ทำโดยนำท่อนมันสำปะหลังมาตัดเป็นท่อน ๆ มีความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร แล้วนำไปปักชำในกระบะที่มีวัสดุเพาะชำ หลังปลูกประมาณ 2 สัปดาห์ชิ้นส่วนพืชจะแตกยอดใหม่ ให้ตัดยอดที่แตกใหม่มีความยาว 10-15 เซนติเมตร นำมาตัดแต่งเอาใบออกให้หมดมีตาติดมา 4-5 ตา เพื่อให้สะดวกในการทำงานขั้นตอนต่อไป

2.2 การฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ทำโดย

นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาตัดแต่งเป็น 3 ท่อน ให้ชิ้นส่วนปลายยอดมีตาติดมา 2-3 ตา และมีตาข้างติดมาชิ้นละ 1 ตา นำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 % จำนวน 2-3 ครั้ง

นำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที และครั้งที่ 2 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที เพื่อดึงสารเคมีออกให้หมด โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้นโดยนำมาตัดแต่ง แบ่งเป็นชิ้นส่วนตายอด ความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตรและชิ้นส่วนตาข้างความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร

นำมาชักนำยอดโดยตัดแต่งให้เหลือเฉพาะส่วนตานำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog 1962 (MS) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร adenine sulfate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 40 กรัม

นำไปเลี้ยงในห้องบ่มสภาพห้องที่ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน

3. การทวีจำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น

เพิ่มปริมาณยอดโดยนำยอดมาตัดแต่งเป็นข้อเล็ก ๆ ย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติม adenine sulfate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 40 กรัม/ลิตร และสูตรอาหาร WPM ที่เติม adenine sulfate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร MS ที่เติมอะดีนีนซัลเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน ทำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อเพิ่มปริมาณยอดจนได้ปริมาณตามต้องการ

4. การชักนำรากและการย้ายปลูก

เมื่อเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมากแล้วให้นำมาชักนำให้เกิดราก โดยตัดแต่งยอดเลี้ยงในอาหาร MS หรือ WPM นำยอดที่ชักนำรากและพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ในสูตรอาหาร MS มาล้างอาหารร่วนออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เทคนิควิธีการขยายพันธุ์มันสำปะหลังโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



เตรียมชิ้นพืช ทำโดยนำท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง มาตัดท่อนยาวประมาณ 15 เซนติเมตร นำมาปักชำใน ถาดเพาะชำ นานประมาณ 2 สัปดาห์



หลังปักชำประมาณ 2 สัปดาห์ ท่อนพันธุ์จะแตกยอด ใหม่จำนวนมาก



ให้ทำการตัดยอดที่แตกใหม่ ความยาว 10 เซนติเมตร



นำมาตัดแต่งเอาใบออกให้หมดเหลือก้านใบ ให้มีตาติด มา 4-5 ตา



นำมาตัดท่อนสั้นๆ ได้ 3 ชิ้น ให้แยกชิ้นส่วนที่เป็นตา ยอดและตาข้าง จากกัน เพื่อสะดวกต่อการทำงานในขั้นต่อไป



การฟอกฆ่าเชื้อให้นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาล้างด้วย แอลกอฮอล์ 70% จำนวน 2-3 ครั้งนำออกผึ่งให้แห้ง ในตู้ปลอดเชื้อ



ทำการฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ 15 %
และ 10 % นานครั้งละ 20 นาที บนเครื่องเขย่าแล้ว
ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆละ 3-5 นาที
เพื่อล้างสารเคมีออกให้หมด ทำในตู้ปลอดเชื้อ



เตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้น นำชิ้นส่วนพืชมาทำการตัด
แต่ง แบ่งเป็นชิ้นส่วนตายอดและชิ้นส่วนตาข้าง
ความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร



แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมอะดีนีน ซัลเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในห้องบ่มที่อุณหภูมิ $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน



การเพิ่มปริมาณต้น โดยนำต้นอ่อนมาตัดแต่งเป็น ข้อเล็กๆ ย้ายลงอาหารสูตร MS เปลี่ยนอาหารใหม่ ทุก 1 เดือน ทำหลาย ๆ ครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณยอดจน ได้ปริมาณตามต้องการ



การชักนำให้เกิดราก โดยนำยอดและตาข้างมาเลี้ยง ในอาหาร MS หรือ WPM เพื่อชักนำรากและพัฒนา เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ในสูตรอาหาร MS มาล้าง อาหารร่วนออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการ ควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการ เจริญเติบโต

หน่อไม้ฝรั่ง

บทนำ

หน่อไม้ฝรั่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรเป็นจำนวนมากและเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย ในปี 2552 มีปริมาณการส่งออก ประมาณ 9,802.01 ตัน คิดเป็นมูลค่าถึง 631.01 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2552) ผลผลิตส่วนใหญ่จะส่งออกไปขายยังต่างประเทศในรูปหน่อสดและแช่แข็ง ประเทศคู่ค้าที่สำคัญคือ ประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน ออสเตรเลีย เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2552) ซึ่งเป็นตลาดที่รับซื้อหน่อไม้ฝรั่งที่มีคุณภาพ เนื่องจากหน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชที่มีอายุยืนนานมากกว่า 3 ปี การเลือกปลูกหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมพื้นที่จึงมีความสำคัญต่อคุณภาพผลผลิตและรายได้ที่เกษตรกรจะได้รับ เกษตรกรส่วนใหญ่ยังขาดพันธุ์ดีที่จะใช้ปลูกและผลผลิตต่อพื้นที่ต่ำ อีกทั้งผลผลิตที่ได้ไม่ตรงกับความต้องการของตลาด เช่น หน่อไม่สม่ำเสมอ

โดยทั่วไปการปลูกหน่อไม้ฝรั่งจะใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสม F1 จากต่างประเทศซึ่งจะมีราคาค่อนข้างแพง เกษตรกรส่วนใหญ่มักจะเก็บเมล็ดพันธุ์จากต้นลูกผสม F1 ไปปลูกต่อไปทำให้คุณภาพและผลผลิตหน่อไม้ฝรั่งที่ได้ลดลง และยังพบว่าการใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสมจากต่างประเทศ บางครั้งต้นที่ได้ยังปรับตัวได้ไม่ดีนัก ทำให้มีปัญหาเรื่องโรคและอายุการให้ผลผลิตของต้นหน่อไม้ฝรั่งสั้นลง นอกจากนี้จากการสังเกตของเกษตรกรพบว่าต้นหน่อไม้ฝรั่งที่ปลูกจากเมล็ดบางต้นมีลักษณะดีให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีตรงตามความต้องการของตลาด สามารถคัดเกรดผลผลิตได้เกรด A มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งโดยปกติเกษตรกรสามารถคัดผลผลิตได้เกรด A ในการเก็บแต่ละครั้งได้เพียงร้อยละ 50-60 เท่านั้น หากเกษตรกรปลูกต้นพันธุ์ที่มีลักษณะดีดังกล่าวแล้วทุกต้น ก็จะทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตที่มีคุณภาพเพิ่มขึ้นอย่างน้อยร้อยละ 20 จึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายเพิ่มปริมาณพันธุ์ต้นพันธุ์ดีเพื่อพัฒนาคุณภาพและผลผลิตหน่อไม้ฝรั่งเพื่อการส่งออก

พันธุ์หน่อไม้ฝรั่ง

ปัจจุบันพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่ปลูกเป็นการค้าทั่วโลกมากกว่า 30 พันธุ์ แต่พันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่คนไทยเคยนำเข้ามาปลูกตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบันมีหลายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่เกษตรกรใช้ปลูกเป็นการค้าหลัก มีจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่

1. **พันธุ์แมริวชิงตัน** เป็นพันธุ์ผสมเปิด (open pollination) พันธุ์แรกที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยให้ผลผลิตสูง ด้านทานโรคราสนิม สีของหน่อเป็นสีเขียว
2. **พันธุ์แคลอฟเนีย 309** เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่ให้ผลผลิตสูง ด้านทานโรคสูง สีของหน่อเป็นสีเขียว
3. **พันธุ์แคลิฟอร์เนีย 500** เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่ให้ผลผลิตดี หน่อมีขนาดปานกลาง ส่วนปลายหน่อจะมีกาบใบหุ้มแน่น สีของหน่อเป็นสีเขียว

4. พันธุ์ยูซี 157 เป็นพันธุ์ลูกผสมมีทั้งรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2 (F_1 Hybrid และ F_2 Hybrid) ที่ให้ผลผลิตดีมาก หน่อมีขนาดใหญ่ ปลายหน่อและโคนยาวเรียวเสมอกัน ส่วนปลายจะมีกาบใบหุ้มแน่น สีของหน่อเป็นสีเขียวเข้ม ในแหล่งปลูกที่มีสภาพอุณหภูมิกลางวันเย็น และมีปริมาณฝนไม่ตกชุกมากเกินไป คุณภาพของหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์นี้จะมีคุณภาพดีมาก ปลูกเป็นเชิงการค้าที่ จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี และสุพรรณบุรี

5. พันธุ์ร็อคอิมปริฟ เป็นพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตดีมาก หน่อมีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะส่วนโคนหน่อจะใหญ่ แต่ส่วนปลายยอดหน่อจะเรียวเล็กกว่า ส่วนโคนส่วนปลายหน่อจะมีกาบใบหุ้มไม่ค่อยแน่น มีปลูกในเชิงการค้าในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคตะวันตก เช่น จังหวัดนครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี

6. พันธุ์พอลโล เป็นพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตดี ลักษณะของหน่อยาวเรียวเสมอกันทั้งโคนหน่อและส่วนปลาย แต่โคนหน่อพันธุ์นี้จะมีลักษณะเป็นสีเขียวอมม่วง ส่วนปลายจะมีกาบใบหุ้มไม่แน่น ค่อนข้างบานเร็วกว่าพันธุ์อื่น ๆ ถ้าปลูกในแหล่งที่มีปริมาณฝนตกชุกจะไม่ทนทานต่อโรค มีปลูกเป็นเชิงการค้ากระจายในจังหวัด นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี และมหาสารคาม

7. พันธุ์ร็อคอิมพีเรียล เป็นพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตดี หน่อมีลักษณะของส่วนปลายหน่อและโคนหน่อกลมมนสวย ส่วนปลายหน่อจะมีกาบใบหุ้มแน่น มีปลูกเชิงการค้าในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี

8. พันธุ์เอทลาส เป็นพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตดี หน่อมีลักษณะยาวเรียวเสมอกัน กาบใบหุ้มแน่น มีปลูกเป็นเชิงการค้าเพียงเล็กน้อยในประเทศไทย

งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง

Santana และคณะ (2009) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง เพื่อผลิตต้นกล้าพันธุ์มันสำปะหลังที่ง่ายและใช้อาหารต้นทุนต่ำ โดยเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ CM6740 พันธุ์มันสำปะหลัง จาก CIAT บนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลและกากน้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตและวิตามิน จาก Praquim C.A. เป็นแหล่งของออกซินและ activol เป็นแหล่งของกรด gibberellic จำนวนรากและใบ ความสูงและน้ำหนักแห้ง ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าอาหารนี้สามารถเพิ่มจำนวนตาได้ดี (อัตราการเพิ่มจำนวนอย่างทวีคูณ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน การออกแบบง่ายและต้นทุนต่ำ

Mamiya and Sakamoto (2000) ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลและการได้รับ basal medium ต่อการเปลี่ยนแปลงของ somatic embryo หน่อไม้ฝรั่งโดยเพาะเลี้ยง somatic embryo หน่อไม้ฝรั่ง พันธุ์ Fest บนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 กรัม/ลิตร พบว่าน้ำหนักสดของยอด เท่ากับ 31.5, 14.9 และ 8.6 มิลลิกรัม/ต้น ตามลำดับ และน้ำหนักสดของราก เท่ากับ 14.5, 33.7 และ 46.3 มิลลิกรัม/ต้น ตามลำดับ ความแตกต่างของ basal medium มีผลต่อการเจริญของยอด แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำ somatic embryo เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS, MS และ 2MS พบว่าน้ำหนักยอดเพิ่มขึ้นเป็น 8.9, 31.0 และ 60.0 มิลลิกรัม/ต้น ตามลำดับ

Stajner และคณะ (2002) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ที่หายาก ซึ่งเจริญในเขตเมดิเตอร์เรเนียน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 3 % และปรับระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ ไคเนติน ความเข้มข้น 0.93 ไมโครโมลาร์ NAA ความเข้มข้น 1.70 ไมโครโมลาร์ และแอนไซมอคอล ความเข้มข้น 3.90 ไมโครโมลาร์ ที่สามารถชักนำยอดเริ่มต้นได้มากที่สุด จำนวน 3-4 ยอด/ชิ้นพืช นอกจากนี้สูตรอาหารที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 3 % BA ความเข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ ไคเนติน ความเข้มข้น 0.93 ไมโครโมลาร์ NAA ความเข้มข้น 1.07 ไมโครโมลาร์ และแอนไซมอคอล ความเข้มข้น 0.39 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดยอดที่ถูกต้องได้มากที่สุด เท่ากับ 11.9 ยอด/กอล สูตรอาหารที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 6 % NAA ความเข้มข้น 1.07 ไมโครโมลาร์ และเพิ่มความเข้มข้นของแอนไซมอคอลเป็น 5.07 ไมโครโมลาร์ ส่งผลต่อการสร้างรากของเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง คิดเป็น 82.0 %

Dasgupta และคณะ (2003) ศึกษาการสร้างหน่อไม้ฝรั่งเตตราพลอยด์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ดำเนินการชักนำ callus บนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม ไคเนติน 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำ somatic embryo บนอาหารที่เติมกลูโคส 10 % เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงอาหารที่เติม ซูโครส 2 % ซึ่งอัตราการเปลี่ยนแปลงจะมากกว่าการย้ายลงอาหารที่เติม ซูโครส 3 %

Shalaby และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA, 2,4-D และ BA และสายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Hanibal, Ariane, Huchels Alpha และ Huchels Leistungsauslese ต่อการชักนำ callus และ embryo callus จากอับละอองเกสรหน่อไม้ฝรั่ง พบว่าความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน ส่งผลต่อการสร้าง callus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสายพันธุ์ Hanibal ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 3 % 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการชักนำ callus มากที่สุด คิดเป็น 58.8 % และการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 3 % 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการสร้าง embryo callus มากที่สุด

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์
2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
3. การทวี่จำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น
4. การชักนำราก
5. การย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์ ให้คัดเลือกหน่อจากต้นแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดี ให้ปริมาณผลผลิตมากและสม่ำเสมอ เป็นหน่อเกรด เอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 เซนติเมตร หรือมากกว่า 1.0 เซนติเมตร และมีความยาวประมาณ 19-25 เซนติเมตรขึ้นไป ตรงตามพันธุ์ ต้นสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง

2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.1 การเลือกชิ้นส่วนพืช ใช้ตายอดและตาข้างจากหน่อ ทำโดยนำหน่อมาตัดเป็นชิ้น/ท่อนสั้น ๆ มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แยกชิ้นส่วนตายอดและตาข้างเพื่อสะดวกในการทำงานขั้นตอนต่อไป

2.2 การฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ทำโดย

นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างมาล้างด้วยล้างในแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว

แล้วจึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ครั้งที่ 1 ฟอกด้วยคลอโรกซ์ 15 % นาน 20 นาที ครั้งที่ 2 ฟอกด้วยคลอโรกซ์ 10% นาน 20 นาที หยอดสารจับใบประมาณ 3 หยด ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 3-5 นาที เพื่อล้างสารเคมีออกให้หมด

นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้น โดยนำมาตัดแต่งให้เหลือเฉพาะตายอดและตาข้างชิ้นละ 1 ตา ทำในตู้ปลอดเชื้อ

นำตายอดและตาข้างมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog 1962 (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต KIN 0.1 หรือ 1 มก./ลิตร และน้ำตาล 30 กรัม เพื่อชักนำยอด

3. การทวีจำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น ทำการเพิ่มปริมาณยอด โดยย้ายยอดอ่อนลงในสูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังนี้

นำต้นอ่อนมาตัดเป็นท่อน/ข้อสั้น ๆ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โรยข้อในสูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.2 มก./ลิตร น้ำตาล 30 กรัม

เมื่อครบ 1 เดือนให้นำข้อที่มีลักษณะบวม มาย้ายลงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเมื่อครบ 1 เดือน ข้อจะพัฒนาเป็นกอมีต้นอ่อนจำนวนมาก

นำต้นอ่อนมาทำการตัดแต่งแยกเป็น 2 ส่วน คือ

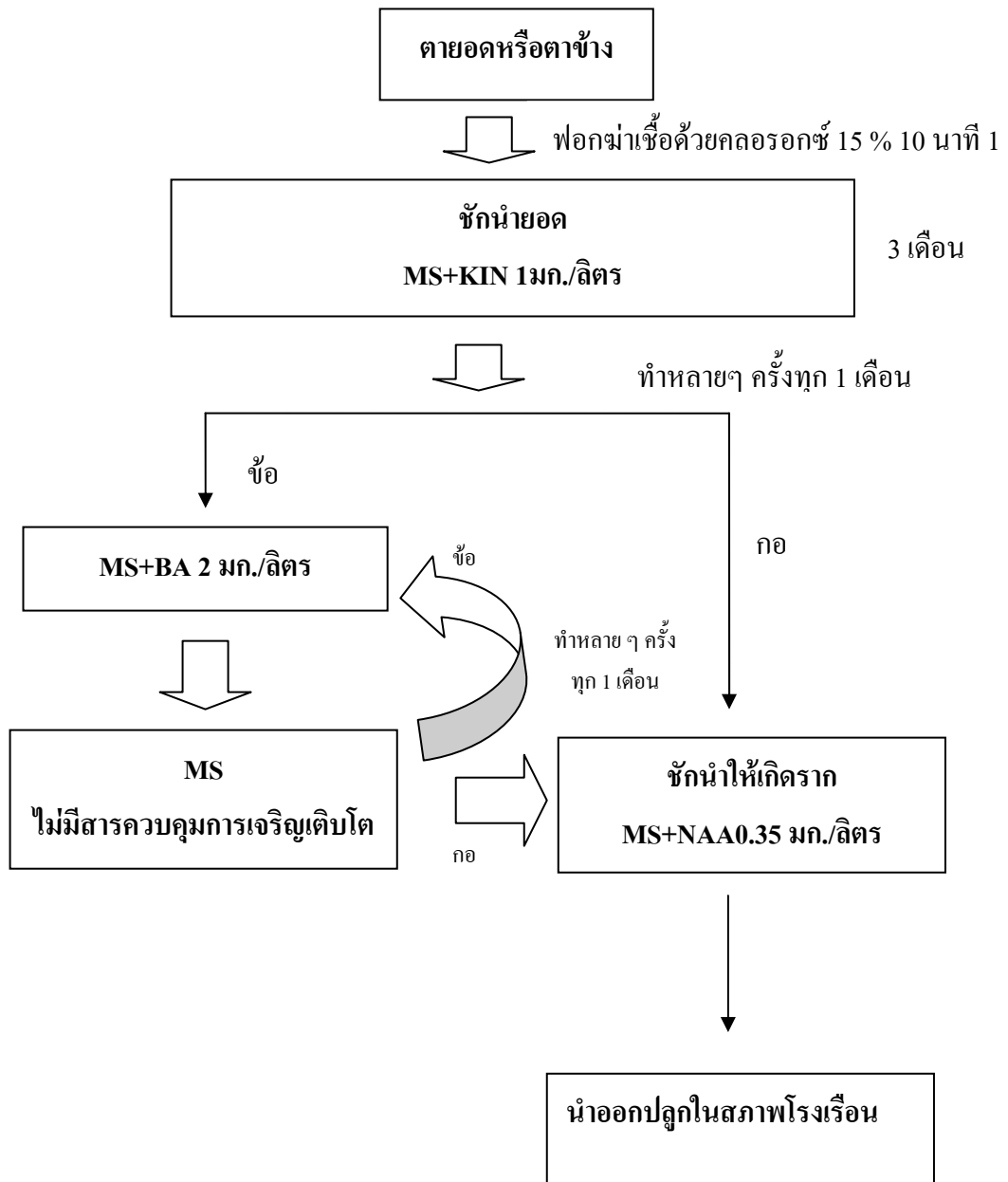
ชิ้นส่วนที่เป็นกอย้ายลงสูตรอาหาร MS + NAA 0.35 มก./ลิตร + น้ำตาล 60 กรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้ออกราก

ชิ้นส่วนที่เป็นข้อย้ายลงสูตรอาหาร MS+BA 0.2 มก./ลิตร + น้ำตาล 30 กรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้แตกกอที่มียอดจำนวนมาก

นำต้นอ่อนทำการตัดแต่งทำหลาย ๆ จนได้ปริมาณมากตามต้องการ

4. การชักนำรากและการย้ายปลูก เมื่อเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมากแล้วให้นำมาชักนำให้เกิดราก โดยตัดแต่งยอดเลี้ยงในอาหาร MS + NAA 0.35 มก./ลิตร + น้ำตาล 60 กรัม/ลิตร นำมาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

แผนภูมิการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง



ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง



1. คัดเลือกหน่อจากแม่พันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่มีลักษณะดี



4. ตัดแต่งแยกชิ้นส่วนตายอดและตาข้างออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ มีตาติดมาชิ้นละ 1 ตา ทำในตู้ปลอดเชื้อ



2. นำหน่อมาตัดเป็นชิ้น/ท่อนสั้น ๆ มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ล้างในแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว



3. นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 2 ครั้ง
ครั้งที่ 1 ฟอกด้วยคลอโรกซ์ 15 % นาน 20 นาที
ครั้งที่ 2 ฟอกด้วยคลอโรกซ์ 10% นาน 20 นาที
หยดสารจับใบประมาณ 3 หยดล้างด้วยน้ำกลั่นที่
นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆละ 3-5 นาที

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง



5. นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog 1962 (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต KIN 0.1 มก./ลิตร + NAA 0.05 มก./ลิตร และน้ำตาล 30 กรัมเพื่อชักนำยอดให้ย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือน



6. ประมาณเดือนที่ 3 เดือน ชิ้นส่วนตาจะถูกชักนำให้พัฒนาเป็นยอดอ่อนจำนวนมาก นำมาขยายเพิ่มปริมาณ

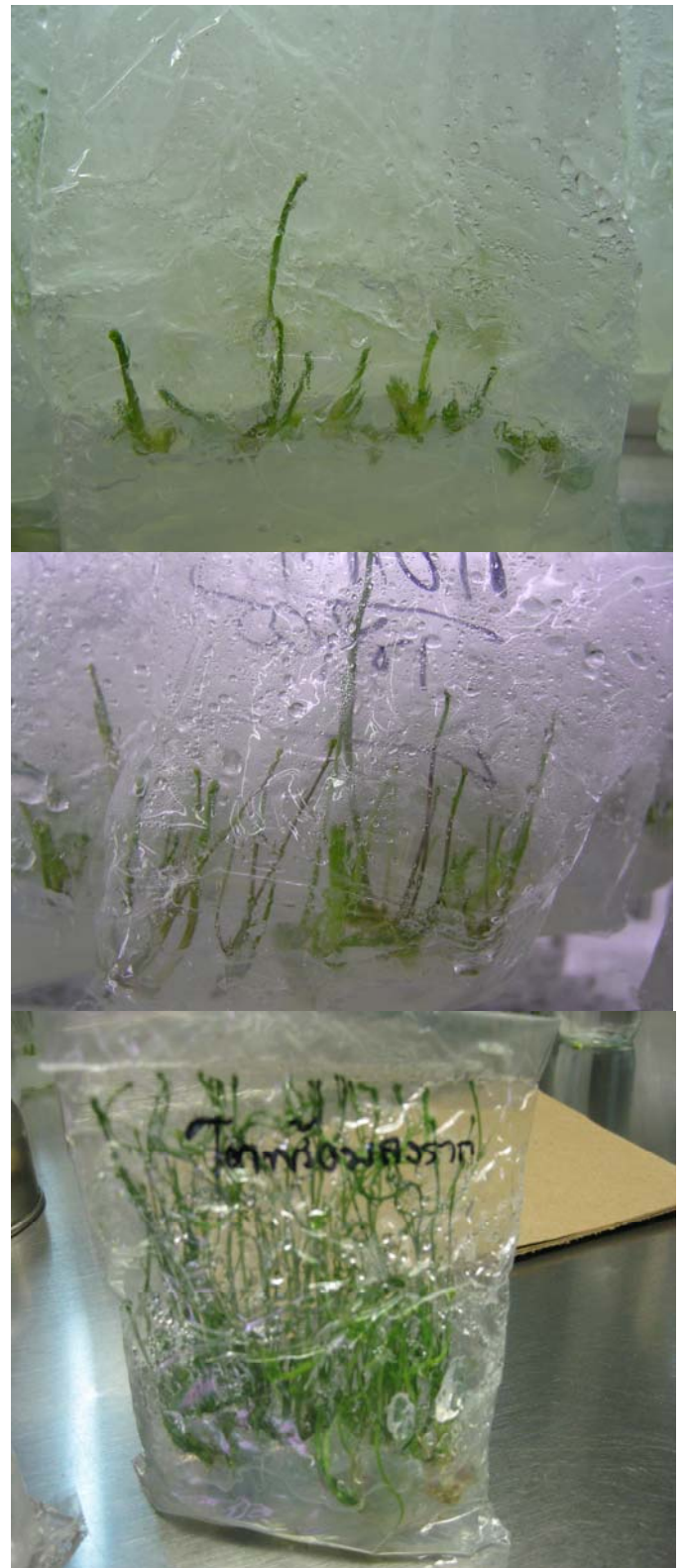


7. นำต้นอ่อนมาตัดเป็นท่อน/ข้อสั้น ๆ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โรยข้อลงในสูตรอาหาร MS + BA 2 มก./ลิตร

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง



8. นำข้อที่มีลักษณะบวมในอาหารสูตรอาหาร MS + BA 2 มก./ลิตร มาตัดแต่งแล้วย้ายลงในอาหารใหม่ สูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

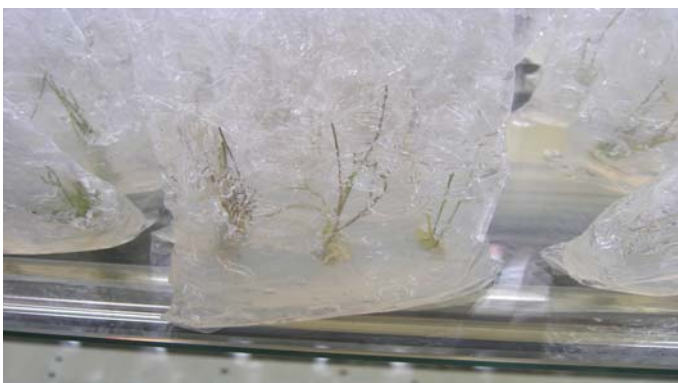


9. ข้อที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตจะพัฒนาเป็นกอที่มีต้นอ่อนจำนวนมาก

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง



10. นำต้นอ่อนจากข้อ 10 มาทำการตัดแต่งแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นกอให้ย้ายลงในสูตรอาหาร MS + NAA 0.35 มก./ลิตร + น้ำตาล 60 กรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้ออกราก และส่วนที่เป็นต้นอ่อนให้ตัดเป็นท่อน/ข้อสั้น ๆ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โรยข้อลงในสูตรอาหาร MS + BA 2 มก./ลิตร ทำซ้ำตั้งแต่ ข้อ 8 ถึง ข้อ 10 จนได้ปริมาณมากตามต้องการ



11. นำยอดที่ชักนำรากและพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ในสูตรอาหาร MS + NAA 0.35 มก./ลิตร น้ำตาล 60 กรัม/ลิตร มาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เบญจมาศ

บทนำ

เบญจมาศมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dendranthema grandiflora* อยู่ในวงศ์ Asteraceae และมีชื่อสามัญ Chrysanthemum เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่นเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 2000 ปี จึงยากที่จะทราบถึงบรรพบุรุษที่แน่นอนปัจจุบันนิยมปลูกกันในเชิงการค้าซึ่งพันธุ์ที่ปลูกเป็นพันธุ์ลูกผสมที่สลับซับซ้อนหลาย species แต่บรรพบุรุษที่สำคัญได้แก่ *C. indicum* และ *C. sinense*

เบญจมาศเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่นเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 2000 ปี จึงยากที่จะทราบถึงบรรพบุรุษที่แน่นอนปัจจุบันนิยมปลูกกันในเชิงการค้าซึ่งพันธุ์ที่ปลูกเป็นพันธุ์ลูกผสมที่สลับซับซ้อนหลาย species แต่บรรพบุรุษที่สำคัญได้แก่ *C. indicum* และ *C. sinense*

สำหรับประเทศไทยไม่มีหลักฐานที่แน่นอนว่ามีการนำเบญจมาศมาปลูกเมื่อใด แต่การปลูกเป็นไม้ตัดดอกนั้น มีการปลูกที่ถนนตก กรุงเทพมหานคร แต่ไม่ทราบสายพันธุ์ที่ปลูก จนกระทั่งประมาณ พ.ศ. 2509 คุณขาวซึ่งเป็นเจ้าของสวนกระแจะเกิดในซอยเอกมัยได้นำเบญจมาศจากประเทศญี่ปุ่นเข้ามาปลูกในประเทศไทยหลายสายพันธุ์ แต่พบว่ามีเพียงพันธุ์ดอกสีขาวพันธุ์เดียวที่สามารถเจริญได้ดีจึงเรียกเบญจมาศพันธุ์นี้ว่า ขาวกระแจะ จากนั้นเป็นต้นมาได้มีการนำเบญจมาศสายพันธุ์ต่างๆ จากประเทศ สหรัฐอเมริกา และประเทศญี่ปุ่น โดยคณาจารย์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นอกจากนี้โครงการหลวงยังได้นำพันธุ์ใหม่ๆ เข้ามาจากประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และอิสราเอลอย่างต่อเนื่อง(อดิศร,2535)

แหล่งผลิตที่สำคัญของโลกได้แก่ ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ แอฟริกา สเปน อิสราเอล สหรัฐอเมริกา แหล่งผลิตที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย หนองคาย อุตรดิตถ์ ขอนแก่น อุบลราชธานี นครราชสีมาพื้นที่รวมประมาณ 3,000 ไร่

เบญจมาศเป็นไม้ตัดดอกที่มีการซื้อขายปริมาณมากเป็นอันดับ 2 ในตลาดประมูลอัลเมีย ประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ของโลกได้แก่ เนเธอร์แลนด์ แอฟริกาใต้ สเปน อิสราเอล สหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น สำหรับประเทศไทยปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกเบญจมาศประมาณ 1,400 ไร่ นิยมปลูกเบญจมาศดอกช่อ มากกว่าดอกเดี่ยว เนื่องจากการดูแลรักษาง่ายกว่าสามารถผลิตเบญจมาศได้คุณภาพดีในช่วงฤดูการผลิตคือตั้งแต่เดือนกันยายน ถึงมีนาคม การผลิตนอกฤดูมักจะปลูกบนที่สูง หากปลูกในที่ราบ จะให้ผลผลิต ที่มีคุณภาพต่ำ ผลผลิตไม่ต่อเนื่องคุณภาพไม่สม่ำเสมอเป็นผลให้มีการนำเข้าเบญจมาศจากประเทศมาเลเซียในปริมาณมากในปัจจุบันนิยมขยายพันธุ์เบญจมาศโดยการปักชำจากต้นแม่พันธุ์ที่ปราศจากโรคและไวรัสโดยได้ต้นแม่พันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งจะทำให้ได้ต้นแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดีปราศจากโรคประเทศไทยสามารถผลิตเบญจมาศเพื่อการค้าที่มีคุณภาพสูงหากแต่จะต้องผลิตในพื้นที่ที่เหมาะสมการปลูกในที่ราบจะได้คุณภาพดีในช่วงฤดูหนาวเท่านั้นดังนั้นการผลิตเบญจมาศมีแนวโน้มเพิ่มพื้นที่การผลิตบนที่สูงมากขึ้นมีการพัฒนาทางด้านสายพันธุ์ใหม่ๆที่เหมาะสมและการผลิตต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพดีเพื่อให้ผลิตได้ต่อเนื่องตลอดปี

ประเภทพันธุ์เบญจมาศที่จำแนกตามรูปทรง

สามารถจำแนกได้ตามรูปทรง ซึ่งรูปทรงของเบญจมาศนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของกลีบดอก และการจัดเรียงของกลีบ แบ่งได้ 6 ลักษณะ ได้แก่ ซิงเกิล อนีโมน สไปเดอร์ ปอมปอน เดคเคอเรทีฟ และพวกดอกใหญ่

1. ซิงเกิล (singles) หรือดอกชั้นเดียว ลักษณะคล้ายดอกเดซี่ประกอบด้วยกลีบดอกชั้นนอก 1-2 ชั้น และกลีบดอกชั้นในแบนราบอยู่ส่วนกลางของดอก เช่น พันธุ์เรแกนไวท์ (Reagan White –สีขาว), โรสควีน (Rose Queen-ชมพู/สีเขียวย), จูโน (Juno-สีชมพู, โกลเด้นวาลังเกน (Golden van Langan-สีเหลือง) เป็นต้น
2. อนีโมน (anemones) ลักษณะคล้ายดอกชั้นเดียวแต่กลีบดอกชั้นในยาวกว่า โดยจะยืดออกและมีลักษณะเป็นหลอดทำให้ส่วนกลางของช่อดอกพองออก บางครั้งกลีบดอกชั้นในมีสีต่างออกไปจากดอกชั้นนอก เช่น พันธุ์ พิงเปโซโดเบิล (Pink peso Doble สีชมพู), ซันนี่ปума (sunny Puma-สีเหลือง)
3. สไปเดอร์ (spiders) หรือแมงมุมประกอบด้วยกลีบดอกชั้นนอกเป็นส่วนใหญ่ซึ่งมีลักษณะเรียวเล็ก และปลายโค้งคล้ายขาแมงมุมเช่น พันธุ์เวสต์แลนด์วินเทอร์ (Westland Winter-ขาว) และเวสต์แลนด์รีเกิล (Westland Regal-ชมพู) เป็นต้น
4. ปอมปอน (pompons) ดอกมีลักษณะกลมคล้ายลูกฟุตบอล ประกอบด้วยกลีบดอกชั้นนอกที่มีขนาดดอกเท่า ๆ กัน โดยไม่ปรากฏให้เห็นกลีบดอกชั้นใน เช่น พันธุ์ กรีนพี (Green Pea –สีเขียว)
5. เดคเคอเรทีฟ (decoratives) หรือดอกซ้อน มีลักษณะคล้ายปอมปอน เพราะประกอบด้วยกลีบดอกชั้นนอกเป็นส่วนใหญ่ แต่กลีบดอกชั้นนอก จะยาวกว่ากลีบดอกชั้นใน ทำให้ดอกดูแบนกว่า เช่น พันธุ์ ฟิจิไวท์ (Fiji White –สีขาว), ฟิจิดาร์ก (fiji Dark-สีชมพู)
6. พวกดอกใหญ่ (large flo) ดอกที่บานแล้วจะมีขนาดใหญ่กว่า 4 นิ้ว ส่วนใหญ่แล้วจะไม่เห็นกลีบดอกชั้นใน เช่น ไรวารี ไซขาว

พันธุ์ของเบญจมาศที่ตลาดต้องการมากที่สุดตามลำดับ ดังนี้

1. กลุ่มเรแกน (Reagan) เช่น เรแกน ซันนี่ (Reagan Sunny) เรแกนไวท์ (Reagan White) เรแกน อิมพูฟด์ (Reagan improved) เรแกนเรด (Reagan Red) และ เรแกนออเรนจ์ (Reagan Orange)
2. กลุ่มโพลาริส (Polaris) เช่น โพลาริสเหลือง (Golden Polaris) และ โพลาริส (Polaris)
3. กลุ่มสไปเดอร์ (Spider) เช่น ไวท์ สไปเดอร์ (White Spider) และเยลโล สไปเดอร์ (Yellow Spider)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sivakumar *et al.* (2005) ศึกษาพัฒนาสภาพที่เหมาะสมสำหรับที่จะผลิตขยายเบญจมาศโดยใช้ระบบ Bioreactor จากการทดลองเมื่อพิจารณาจากอัตราการขยายเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์พบว่าสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมากที่สุดและสามารถนำไปพัฒนาผลิตและขยายเบญจมาศในปริมาณที่มากขึ้น คือ อัตราส่วนระหว่าง $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ (20 : 40 mM) การถ่ายเทอากาศ 0.1 vvm min^{-1} ,

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, ความเข้มของแสง $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ จำนวนข้อของเบญจมาศ 40 ชิ้นที่ใส่ลงไป ในภาชนะ สำหรับเพาะเลี้ยง

Wang *et al.* (2000) ได้ปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศโดยนำส่วนยอดเบญจมาศมาทดลองเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีความแตกต่างกัน ของค่า pH และความแตกต่างกันระหว่างของอัตราส่วนของฮอร์โมนพืช ผลการทดลองพบว่าสูตรอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของ NAA 0.2 mg/L และ KT 0.1 -0.2 mg/L และมีค่า pH 5.8 และ 6.4 เหมาะต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสดีที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร $\frac{1}{2}$ MS+NAA 0.2 Mg/L. เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก

Miler and Zalewska. (2004) ศึกษาผลของแสงต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อเบญจมาศ โดยนำส่วนของข้อเบญจมาศมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชจากนั้นนำไปเลี้ยงภายใต้สภาพแสงที่แตกต่างกันคือ แสงสีแดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และขาว พบว่า แสงสีเขียวมีผลต่อความยาวของลำต้นและข้อและมีอัตราการขยายมากที่สุด แสงสีน้ำเงินมีผลทำให้ข้อและลำต้นสั้น ใบหนาหยาบ อัตราการขยายต่ำ และแสงสีแดงมีผลให้ไม่มีการเจริญของราก

Trifunovic *et al.* (2006) ศึกษาผลของความเย็นต่อการเจริญของเบญจมาศโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ปริมาตร 0.5 และ 0.1ml/L และนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4 และ 6 เดือน พบว่าอาหารทั้ง 2 สูตรสามารถทำให้เบญจมาศเกิดรากได้ดี และความเย็นไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญของรากเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต และเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญของรากได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

Xue *et al.* (2004) ศึกษาทดลองขยายพันธุ์เบญจมาศโดยนำกลีบดอกเบญจมาศมาเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยศึกษาสูตรอาหารที่เหมือนกัน แต่ขนาดของกลีบดอกต่างกัน และ ศึกษาสูตรอาหารแตกต่างกันแต่ขนาดของกลีบดอกเท่ากัน จากการศึกษาพบว่า สูตรอาหารทั้งหมดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส โดยสูตรอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของ KT 2 mg x L(-1) และ NAA 0.2 mg x L(-1) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด และสูตรอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของ KT 2 mg x L(-1) + NAA 0.2 mg x L(-1) และ AgNO₃ 5 mg x L(-1) สามารถชักนำทำให้การแตกตายออกมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการชักนำให้เกิดการเจริญของเนื้อเยื่อเบญจมาศจะใช้ส่วนของตาดอกมากกว่ากลีบดอก และการนำไปและส่วนต่างๆของพืชที่มีความแตกต่างกันจะมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์
2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
3. การทวี่จำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น
4. การชักนำรากและการย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์

ให้คัดเลือกแม่พันธุ์เบญจมาศจากต้นแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดี ตรงตามพันธุ์ ต้นสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง

2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.1 การเลือกชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชที่ใช้คือตายอดและตาข้างที่ได้จากนำต้นพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว โดยเด็ดกิ่งพันธุ์ให้มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตรจะมีตายอดและตาข้างติดมาประมาณ 4 ตา นำมาตัดแต่งเพื่อเอาใบออกซึ่งจะสะดวกต่อการปฏิบัติงานในขั้นต่อไป

2.2 การฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ทำโดยนำกิ่งพันธุ์ดังกล่าวมาในล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วนำมาทำการตัดแต่งเพื่อเอาใบออก และตัดแบ่งเป็น 2-3 ชิ้น มีความยาวเท่า ๆ กัน นำไปฟอกในสารละลายคลอโรกซ์ ที่ผสมสารจับใบ (tween 20) 2-3 หยด จำนวน 2 ครั้ง ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ในสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 15 % และฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ในสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อนาที่ เพื่อป้องกันสารละลายคลอโรกซ์ทำลายเนื้อเยื่อของพืช หลังจากนั้นให้นำชิ้นส่วนพืชมาเตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้นโดยนำมาตัดแต่งให้เหลือเฉพาะตายอดและตาข้างชิ้นละ 1 ตา ทำในตู้ปลอดเชื้อ นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog 1962 (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต KIN 0.1 หรือ 1 มก/ลิตร และน้ำตาล 30 กรัม เพื่อชักนำยอด

3. การทวีจำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น

สำหรับเบญจมาศสามารถทำการเพิ่มปริมาณยอดได้ โดยย้ายยอดอ่อนลงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยนำตายอด และตาข้างมาตัดเป็นท่อนสั้น ๆ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เมื่อครบ 1 เดือนให้นำต้นมาตัดตายอดและตาข้างย้ายลงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างจะพัฒนานำต้นอ่อนทำการตัดแต่งทำหลาย ๆ จนได้ปริมาณมากตามต้องการ

4. การชักนำรากและการย้ายปลูก

สำหรับเบญจมาศชิ้นส่วนพืชสามารถพัฒนาเป็นต้นที่มีออกรากได้ในในสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ใช้เพิ่มปริมาณยอด ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมากแล้ว สามารถนำมาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ

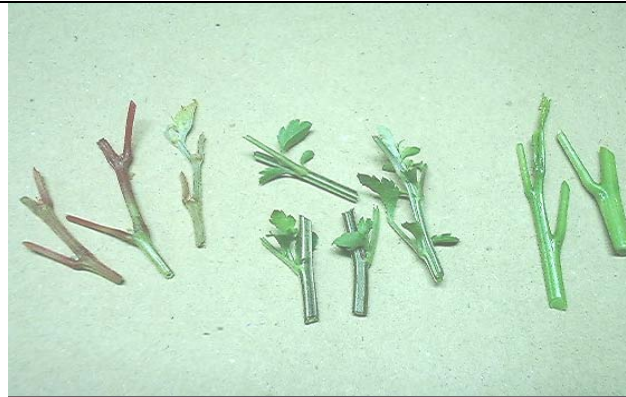


1. คัดเลือกแม่พันธุ์เบญจมาศที่มีลักษณะดี ตรงตามพันธุ์ ดันสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง เติบโตมีความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร



2. นำมาตัดแต่งเอาใบออกให้หมด แล้วจึงตัดชิ้นส่วนออกเป็น 2-3 ชิ้น เท่า ๆ กัน แต่ละชิ้นจะมีตาติดมาประมาณ 1-3 ตา

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ



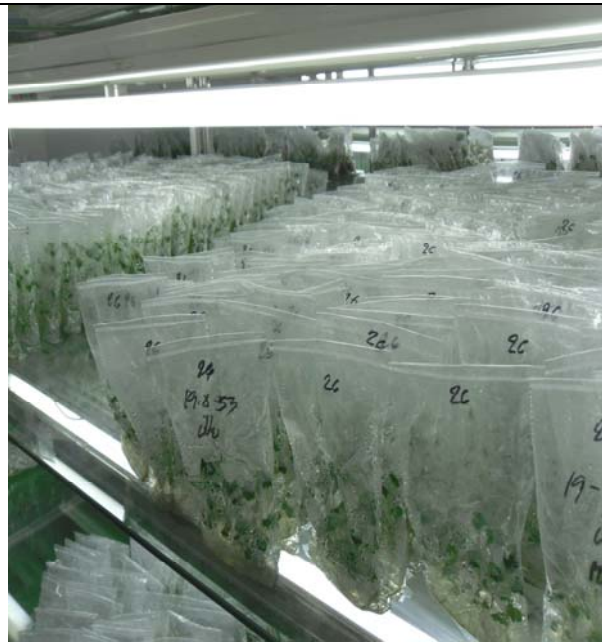
3. นำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 2-3 ครั้ง
ฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ จำนวน 2 ครั้ง
ครั้งที่ 1 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ 15 % นาน 20 นาที
และครั้งที่ 2 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ 10 % นาน 20
นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ
3-5 นาที เพื่อล้างสารเคมีออกให้หมดทำในตู้ปลอด
เชื้อ



5. เตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้นโดยนำชิ้นส่วนมาตัดแต่ง
ให้เหลือเฉพาะตายอดและตาข้างขึ้นละ 1 ตา ทำใน
ตู้ปลอดเชื้อ นำมาชักนำยอดโดยเลี้ยงบนสูตร
อาหารแข็งMSที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต
และน้ำตาล 20 กรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในห้องบ่ม
สภาพห้องที่ควบคุมที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้ม
แสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา
1 เดือน



เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ



8. ทำการเพิ่มปริมาณยอดโดยนำยอดมาตัดแต่งเป็นข้อเล็กๆ ย้ายลงอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาลซูโครส 20 กรัม/ลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน ทำหลาย ๆ ครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณยอดจนได้ปริมาณตามต้องการ

9. นำยอดที่ชักนำรากและพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ในสูตรอาหาร MS มก./ลิตร มาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

อ้อย

ความสำคัญและปัญหา

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย นอกจากเป็นพืชอาหารสำหรับบริโภคทั้งภายในประเทศ และส่งออกทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาทแล้ว ยังเป็นพืชอุตสาหกรรมที่จะใช้ทดแทนน้ำมันที่มีราคาแพง ดังนั้นอ้อยจะเป็นพืชที่มีความสำคัญมากยิ่งขึ้นในอนาคตอันใกล้นี้ ผลจากการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทำให้ภูมิภาคนี้กลายเป็นแหล่งผลิตอ้อยและน้ำตาลรายใหญ่ของประเทศ แม้จะมีผลผลิตเพิ่มขึ้นจากการขยายพื้นที่เพาะปลูกอ้อยเพิ่มขึ้น แต่ผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยพื้นที่กลับมีแนวโน้มลดลง ปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบต่อการผลิตอ้อยคือโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา(phytoplasma) หรือชื่อเดิมเรียกเชื้อไมโคพลาสมา(mycoplasma like organism-MLO)มีแมลงปากดูดเป็นพาหะช่วยแพร่กระจายโรค นับเป็นโรคที่มีความสำคัญเป็นอันดับหนึ่งของอ้อยที่ปลูกในวงการอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของประเทศไทย การระบาดของโรคนี้นำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง นอกจากทำให้ผลผลิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ถึงไม่สามารถเก็บผลผลิตได้แล้ว ยังก่อให้เกิดปัญหาต่อผลผลิตอ้อยในระยะยาว โดยทำให้เกิดการขาดแคลนท่อนพันธุ์ มีการสะสมของโรคทั้งในแปลงปลูกและท่อนพันธุ์ที่ใช้ปลูก จากการขยายฐานกำลังการผลิตโดยการเพิ่มพื้นที่ปลูก จึงทำให้เกิดภาวะการแย่งเชื้อท่อนพันธุ์และมีการขนย้ายท่อนพันธุ์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นท่อนพันธุ์ที่มีเชื้อแฝงอยู่เข้าไปยังเขตอื่นและกระจายไปยังทุกแหล่งปลูก ส่งผลให้การแพร่ระบาดของโรคต่อไปเป็นไปอย่างรวดเร็ว เมื่อนำส่วนต่างๆของท่อนอ้อยไปทำพันธุ์ก็จะมีเชื้อโรคติดไปด้วย ชาวไร่อ้อยส่วนใหญ่มักใช้อ้อยที่ค้างในไร่ไปปลูกต่อ ทำให้เนื้อที่ปลูกอ้อยมีการระบาดเพิ่มขึ้นและขยายวงกว้างขึ้นทุกปี เป็นการสะสมโรคเรื้อรังที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในระยะยาวและตลอดมา นอกจากนี้ต้นอ้อยที่ไม่แสดงอาการโรคที่ดูเหมือนปกติเมื่อเกษตรกรเพิ่มการให้น้ำปุ๋ยบำรุงก็จะมีอาการเจริญเติบโตอยู่ในเกณฑ์พอใช้เกษตรกรก็จะเก็บไว้ทำพันธุ์ต่อไปซึ่งจะเป็นแหล่งสะสมให้โรคแพร่ระบาดต่อไปไม่หยุดยั้ง

สถานการณ์ระบาด ตั้งแต่ปี 2495 พบมีการแพร่ระบาดของโรคใบขาวของอ้อยครั้งแรก ในประเทศไทย ที่จังหวัดลำปาง ต่อมาพบมีการแพร่ระบาดในพื้นที่จังหวัดอุดรดิษฐ์ ชลบุรี เพชรบุรี ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ กำแพงเพชร บุรีรัมย์ เลย และอุดรธานี ในปี 2524-2526 เกิดระบาดรุนแรงในจังหวัดชลบุรี จนต้องเผาทำลายไร่อ้อยทั้งเป็นพื้นที่หลายพันไร่เพื่อลดแหล่งแพร่เชื้อ ในปี 2532 พบมีพื้นที่ระบาดเสียหายรุนแรงที่จังหวัดบุรีรัมย์ประมาณ 50,000 ไร่ และจังหวัดเลยประมาณ 21,000 ไร่ สำหรับจังหวัดอุดรธานีเสียหาย ประมาณ 50,000 ไร่ความเสียหายคิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 255 ล้านบาท ในปีการผลิต2549/50 มีรายงานการระบาดของโรคใน 9 จังหวัด เป็นพื้นที่ประมาณ 1300,000 ไร่ ถึงจะมีความพยายามช่วยเหลือแนะนำวิธีการป้องกันกำจัดโดยหน่วยราชการที่เกี่ยวข้องให้ทำลายอ้อยในแหล่งระบาดและให้ใช้พันธุ์คุณภาพดีปลูกทดแทน แต่จากภาวะการขาดแคลนท่อนพันธุ์หรือท่อนพันธุ์ไม่เพียงพอต่อการเพาะปลูก จึงไม่มีท่อนพันธุ์คุณภาพดีใช้ปลูกได้ด้วยเหตุนี้โรคใบขาวจึงยังคงแพร่ระบาดต่อมาถึงปัจจุบันและพร้อมที่จะเกิดความรุนแรงเพิ่มขึ้นได้อีกทุกขณะ หากไม่มีมาตรการป้องกันที่ดีพอ

แนวทางแก้ไขปัญห

การใช้ต้นอ้อยปลอดโรค โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและผ่านกระบวนการอนุบาลจนถึงการผลิตต้นอ้อยเพื่อใช้เป็นท่อนพันธุ์ในแปลงปลอดโรค การตรวจแปลง และการตรวจรับรองความปลอดโรคสำหรับการเพาะปลูก ร่วมกับการควบคุมศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน(Integrated pest management) หรือ IPM หรือการควบคุมศัตรูพืชโดยใช้วิธีการหลายๆวิธี เป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นการควบคุมศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ ประหยัด และปลอดภัยที่สุดและใช้อย่างได้ผลสำหรับการลดการระบาดของความเสียหายทางเศรษฐกิจในประเทศที่เคยมีการระบาดของโรคใบขาว เช่น ประเทศไต้หวัน ประเทศที่มีการผลิตอ้อยและน้ำตาลรายใหญ่ของโลก เช่นบราซิล และออสเตรเลีย ซึ่งแม้จะมีการลงทุนค่อนข้างสูงแต่ก็ช่วยให้ผลผลิตต่อไร่ของประเทศเหล่านี้สูงกว่าประเทศไทยเกินกว่าเท่าตัว การส่งเสริมการใช้อ้อยพันธุ์ดีปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการควบคุมศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานเพื่อแก้ไขปัญหาโรคใบขาวของอ้อยอย่างต่อเนื่องเป็นระบบครบวงจร และเกิดผลอย่างจริงจัง โดยทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องต้องประสานงานเพื่อร่วมมือกันทั้งกรมวิชาการเกษตร สำนักงานอ้อยและน้ำตาล บริษัทหรือโรงงานน้ำตาล และสถาบันชาวไร่อ้อยทุกเขต เพื่อให้มีความเข้าใจที่ดีและตระหนักในบทบาทของกันและกันในการวางแผนการผลิตอย่างครบวงจร

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รรรอง และคณะ (2548) ศึกษาการพัฒนาวิธีการผลิตต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ โดยนำยอดอ้อย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ กพส 94-13, กพส 98-2-009, K84-200, K92-213 และ K92-80 มาตัดเนื้อเยื่อเจริญที่มีลักษณะคล้ายโดม ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ภายใต้อากาศสองตา นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำมะพร้าว ความเข้มข้น 15 % เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อชักนำ callus จากนั้นย้าย callus มาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเหลือ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อขยายปริมาณ callus และชักนำให้เกิดยอด จากนั้นเพิ่มปริมาณยอด โดยนำ callus เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไโคเนดิน ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำมะพร้าว ความเข้มข้น 15 % เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ากระจุยยอดมีการเพิ่มขนาดและแตกกอมากขึ้น จากนั้นศึกษาการยึดของยอด โดยนำกระจุยยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไโคเนดิน ความเข้มข้น 1-2 มิลลิกรัม/ลิตร IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร adenine sulfate 0.08 กรัม/ลิตร และน้ำมะพร้าว ความเข้มข้น 15 % เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ากระจุยสีเขียวมีการยึดตัวสูงขึ้น จึงชักนำให้ออกรากบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาล 20 กรัม/ลิตร แบ่ง callus บางส่วนและกระจุยยอดสีเขียวมาตรวจสอบโรคใบขาว โดยใช้เทคนิค Dot blot hybridization แบบ specific probe พบว่าสามารถผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาวได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ

Zucchi และคณะ (2002) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ด้วยเทคนิค RADP ในการตรวจสอบ โดยใช้เหง้าของอ้อยพันธุ์บราซิล RB83-5486 พบว่าอัตราการ

แพร่กระจายของตำแหน่งของยีนในโครโมโซม RAPD 98 คิดเป็นร้อยละ 6.93 นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญยังมีการประเมินผลเฉพาะกลุ่ม คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่เป็นช่วงเวลาจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้หลายรูปแบบ เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของอ้อยพันธุ์ RB83-5486 ในอาหารของพืชเป็นเวลานาน 10 วัน หลังจากนั้น เปลี่ยนอาหารใหม่ เพาะเลี้ยงอีกเป็นเวลานาน 5 วัน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารใหม่ของพืช ซึ่งการวิเคราะห์พืชอ้อย 2 พันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญในหลอดทดลอง พบว่า อ้อยพันธุ์ RB83-5486 ตรวจพบความไม่แน่นอนทางพันธุกรรมมากกว่าอ้อยพันธุ์ SP80-185

Cheema และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยจากตาขอดและตาข้าง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ HSF 240, SPF 213, SPF 234, CP43/33, CP77/400 CPF 237 โดยนำส่วนของเนื้อเยื่อเจริญปลายขอด ตาขอด และตาข้าง ขนาดประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วยไโคเนติน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (M1), BAP ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วยไโคเนติน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (M2), BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (M3), BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วยไโคเนติน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (M4), BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (M5) และ BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วยไโคเนติน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (M6) พบว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร M3 สายพันธุ์ SPF 234 และ CP77/400 มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด สายพันธุ์ SPF 213 สร้างรากยาวที่สุด เท่ากับ 3.20 เซนติเมตร หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 30 วัน

Mamun และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสายพันธุ์ที่สำคัญในบังคลาเทศ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Isd-28 และ Isd-29 โดยเพาะเลี้ยงใบบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่าอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรมีการชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด การพัฒนาเป็นยอดดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าการเกิดรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดเช่นกัน

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์
2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
3. การทวีสานหรือเพิ่มจำนวนต้น
4. การชักนำรากและการย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์

คัดเลือกต้นพันธุ์อายุไม่น้อยกว่า 12 เดือนจากต้นแม่ที่มีลักษณะดี ตรงตามพันธุ์ ต้นสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง

2. การเตรียมชิ้นส่วนพืช ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.1 การเลือกชิ้นส่วนพืช ใช้ชิ้นส่วนตาข้าง ทำโดยนำท่อนพันธุ์มาตัดเป็นท่อนละ 1 ข้อ ซ้ำลงในกระบะในยุมะพร้าว รดน้ำทุกวันๆละ 1 ครั้ง หลังปักชำประมาณ 2 สัปดาห์ ให้ตัดยอดที่แตกใหม่ตัดให้ชิดโคนยาวประมาณ 10 เซนติเมตร

2.2 การฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ทำโดย

นำยอดมาตัดเป็น 2 ส่วน เอาส่วนปลายยอดทิ้ง เหลือแต่ส่วนโคนยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2-3 ครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวฟอกฆ่าเชื้อ

หลังจากนั้นให้นำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ครั้งที่ 2 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งครั้งละ 3-5 นาที เพื่อล้างสารเคมีออกให้หมด

นำมาเตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) โดยนำมาลอกกาบออก นำมาตัดชิ้นเนื้อเยื่อจากจุดเจริญส่วนยอด (Apical meristem) ใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้ได้ขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.3 มิลลิเมตร

นำมาชักนำยอดโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตรา 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในห้องบ่มสภาพห้องที่ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 + 2 °C ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3. การทวีจำนวนหรือเพิ่มจำนวนต้น

เพิ่มปริมาณยอดทวีคูณโดยนำเนื้อเยื่อที่แตกเป็นกอมาตัดแต่งแบ่งเป็นกอขึ้นเล็ก ๆ แล้วจึงย้ายลงอาหารสูตรสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog 1962 (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตรา 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน ทำหลาย ๆ ครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณยอดจนได้ปริมาณตามต้องการ

4. การชักนำรากและการย้ายปลูก

เมื่อเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมากตามต้องการแล้ว ให้นำมาชักนำให้เกิดราก โดยตัดแต่งยอดเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA อัตรา 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมากแล้ว นำมาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เทคนิควิธีการผลิตขยายอ้อยปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



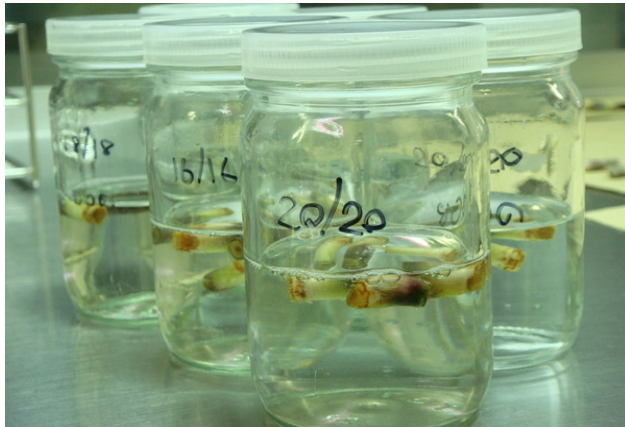
1. นำท่อนพันธุ์อ้อยมาตัดเป็นท่อนละ 1 ข้อ นำมาชำลงในกระบะในขุยมะพร้าว นานประมาณ 2 สัปดาห์



2. ตัดยอดที่แตกใหม่ให้ชิดโคน บรรจุในถุงพลาสติก เขียนชื่อพันธุ์ และวัน/เดือน/ปี



3. ตัดส่วนปลายยอดทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วนโคน
ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70
ครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ



4. ฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งครั้งละ 3-5 นาที



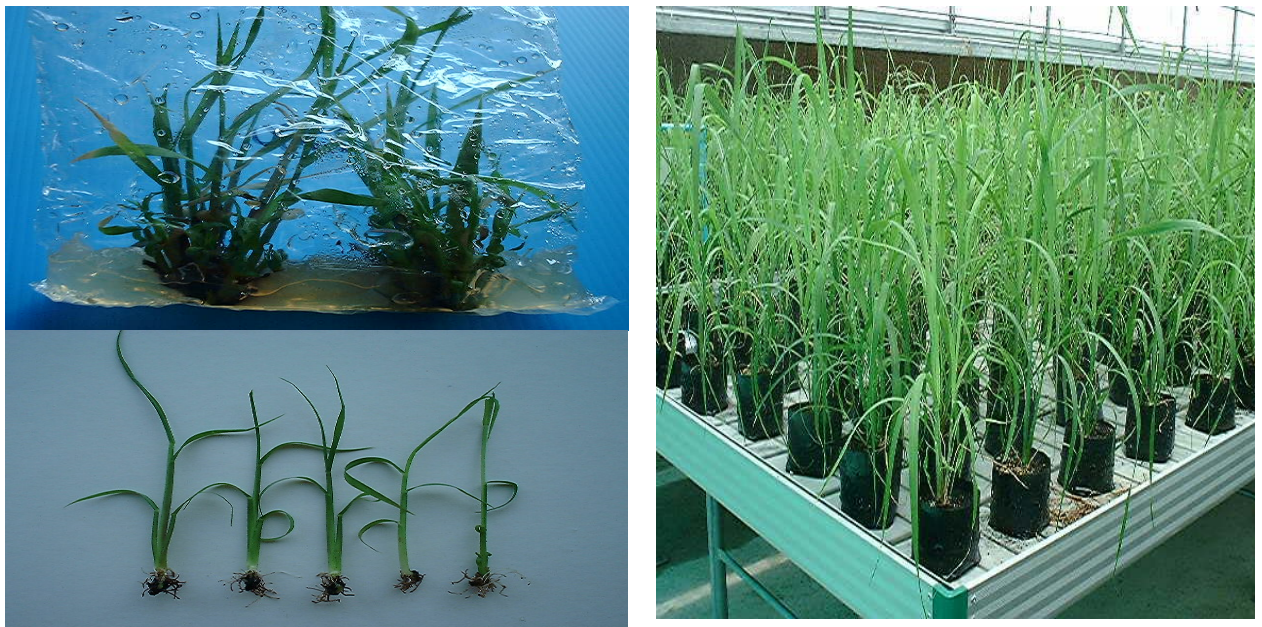
5. นำมาเตรียมแม่พันธุ์เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) โดยนำมาลอกกาบออก นำมาตัดชิ้นเนื้อเยื่อจากจุดเจริญส่วนยอดได้กลี้องุลทรรสน์ ให้ได้ขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.3 มิลลิเมตร



6. นำมาชักนำยอดโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตรา 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในห้องบ่มสภาพห้องที่ควบคุมที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน



7. ประมาณเดือนที่ 3 เดือน ขึ้นส่วนพืชจะพัฒนาเป็นยอดอ่อนจำนวนมาก นำมาขยายเพิ่มปริมาณโดยนำมาตัด แบ่งเป็นกอขึ้นเล็ก ๆ แล้วย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตรา 0.2 มก./ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน ทำหลาย ๆ ครั้งจนได้ปริมาณตามต้องการ



8. นำมาชักนำให้เกิดราก โดยตัดแต่งยอดเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA อัตรา 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมากแล้ว นำมาล้างอาหารวุ้นออก แล้วนำออกปลูกในโรงเรือนมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2551. การปลูกมันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ, สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 กรมวิชาการเกษตร, หน้า 3-15.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2537. รายละเอียดชี้แจงงบประมาณโครงการส่งเสริมและพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 47 หน้า.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. หน่อไม้ฝรั่ง. เอกสารวิชาการ, กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร, หน้า 10-11.
- กวิศร์ วานิชกุล, เบญจมาศ ศิลาชัย, นล่องชัย แบบประเสริฐ, จุลภาค กุ๋นวงศ์ และ ชำรง ช่วยเจริญ . 2536. การทดสอบและเปรียบเทียบศักยภาพของกล้วยพันธุ์การค้าที่ขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแหล่งปลูกต่างๆของประเทศไทย. รายงานการวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ,กรุงเทพฯ. 147 น.
- กรรณิกา เกรียงยะกุล. 2543.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่จากหน่อใบแคบและปลีอายุต่าง ๆ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กัลยาณี อรรถนัทร. 2536. การชักนำและการพัฒนาของแคลลัสจากใบอ่อนกล้วยหอมแกรนด์เนน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จิรพันธ์ ศรีทองกุล. 2546. ผลของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและวัสดุปลูกสำหรับกล้วยนวล. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .
- เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถสิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนีย์ อุ๋วานิชย์ ญัฐกฤต พัทธกัษ วัลลิกา สุชาโต สมศักดิ์ ทองศรี และดุลย์ อินทร์มพรรณ. 2547. อ้อย. เอกสารวิชาการ, สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. หน้า 6-12.
- นิตยศรี แสงเดือน และสัมพันธุ์ คัมภีรานนท์. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ . 266 หน้า.
- บุษราภรณ์ งามปัญญา. 2548. เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิคพื้นฐาน. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม. 111 หน้า.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 154 หน้า.
- ภาสตันด์ สารทูลพัฒ. 2540. การชักนำให้กล้วยไข่กลายเป็นพืชในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย colchicine และ oryzalin. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .
- มูจลินทร์ คินสิริสุข. 2538. การเจริญเติบโต ลักษณะที่แสดงและการให้ผลผลิตและการตอบสนองต่อระดับปุ๋ยไนโตรเจนของกล้วยในกลุ่มยีน AAบางพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- รณรงค์ วิเศษสุวรรณ. 2542. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน. งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กำแพงแสน. นครปฐม. 117 หน้า.
- รังสฤษฎ์ กาวิทัะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการคิดและเทคนิค**. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า.
- รังสี เจริญสถาพร อมรรักษ์ คัดใจเดียว และโอภาส บุญเส็ง. 2551. การสร้างมันสำปะหลังเตตราพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. สถาบันวิจัยพืชไร่ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร.
- วิภาดา ทองทักษิณ. 2545. **ความก้าวหน้าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ดอก**. รายงานการสัมมนาเรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 109 น.
- วัฒนศักดิ์ ชมพูนิช. 2549. การปลูกพันธุ์อ้อยปลอดโรคและดูแลรักษาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารวิชาการ, ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, หน้า 6-12.
- สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 127 หน้า.
- สุธนา เกตุมาโร. 2550. **การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิซิสในกล้วยน้ำว้า**. ปัญหาพิเศษปริญญาเอก. ภาควิชา พืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .
- สุธาทิพย์ อำนวยสิน. 2551. การศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด embryogenesis callus และการเกิดยอดทวีคูณในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50)
- สุภาพร แก้วสมพงษ์. 2532. **ผลของ 6-Benzylamiopurine ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่บนอาหารสังเคราะห์**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .
- อโนทัย ชุมสาย ณ อยุธยา, เกรียงไกร อังอำนวยศิริ. 2545. **ทิศทางการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในเชิงอุตสาหกรรม**. รายงานการสัมมนาเรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 109 น.
- อัมพา ว่องวิขกร, ปริญญรัตน์ ภูศิริ, วรรณัฐ ศรีพาเพลิน. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับงานขยายพันธุ์พืช**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 180 น.
- อุทัย จารณศรี. 2545. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเชิงพาณิชย์**. รายงานการสัมมนาเรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 109 น.

รกรอง หอมหวาน, มณฑา วงศ์ณีโรจน์, ศิริวรรณ นุรีคำ, ศิวิมล จวงจันทร์, และ กมลศรี สระทองพรม

2548. การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบเบญจมาศ.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 ; สาขาพืช,หน้า 705-712

รกรอง หอมหวาน มณฑา วงศ์ณีโรจน์ ศิริวรรณ นุรีคำ สุภาพร กลั่นคง และ เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2548.

วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. 19 (2) : 8-12.

อดิสร กระแสชัย. 2535. **เบญจมาศ**.โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร

อนูรัตน์ ศรีสุระ วิลาวัลย์ วงษ์เกษม และไกว้ว กล้าแข็ง. 2551. การผลิตมันสำปะหลัง ภายใต้โครงการจัดระบบพิเศษเฉพาะพื้นที่มันสำปะหลัง ปี 2550/51. เอกสารคำแนะนำ, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. หน้า 9-16.

Cheema, K.L. and Makhdoom, H. (2004). Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud. International Journal of Agriculture and biology. 6 (2) : 257-259.

Dasgupta, C., Mukhopadhyay, M.J. and Mukhopadhyay, S. (2003). Regeneration of a tetraploid clone from callus culture of *Asparagus officinalis* L. through somatic embryogenesis. Cytologia. 68 (3) : 219-223.

Guohua, M. 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54: 1–7.

Guohua, M. and Q. Xu. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 70: 281–288.

Mamiya, K. and Sakamoto, Y. (2000). Effect of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. Scientia Horticulture. 84 : 15-26.

Mamun, M.A., Sikdar, M.B.H., Paul, D.K., Rahman M.M. and Islam, M.R. (2004). In vitro micropropagation of some important sugarcane varieties of Bangladesh. Asian Journal of Plant Sciences. 3 (6) : 666-669.

Miler, N. and Zalewskam. 2004. The influence of light colour on micropropagation of chrysanthemum.

Proceedings of the Vth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultur Breeding :12-17.

Nahid, J. S., Shyamali, S. andKazumi, H. 2007. **Hight Frequency Shoot Regeneration from Petal Explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. In vitro.** Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (9) : 3356-3361.

- Sivakumar, G., Kim, S. J., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2005. **Optimizing Environmental Factors for Large-Scale Multiplication of Chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum*) in Balloon-type Bioreactor culture.** *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 41(6) : 822-825
- Sivakumar, G., S. J. Kim., E. J. Hahn and K. Y. Paek. 2005. Optimizing environmental factors for large-scale multiplication of chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum*) in balloon type bioreactor culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant** 41 (6) : 822-825.
- Trifunovic, M., Jevremovic, S., Nikolic, M., Subotic, A. and Radojevic, Lj. 2006. Micropropagation of Chrysanthemum Cultivars : Effect of cold storage on plant regeneration in vitro. **Proceeding of the International Symposium on Plant Biotechnology** : 13-19.
- Wang, K., Mao, Y., and X. Zhang. 2000. A preliminary study on tissue culture of stem apex of *chrysanthemum morifolium*. **Zhong-Yao-cai**. 23(3) : 125-127
- Umnouysin, S., Ngampanya, B. and Obsuwan, K. (2009). Study of BA and NAA on callus induction of cassava cv. Kasetsart (KU 50). The 21th Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology TSB 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, 24-25 September 2009. pp. 209-213.
- Stajner, N., Bohanec, B. and Jakse, M. (2002). *In vitro* propagation of *Asparagus maritimus* A rare Mediterranean salt-resistant species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70 (3) : 269-274.
- Santana, M.A., Romay, G., Villardon, J.L.V. and Demey, J.R. 2009. Simple and low cost strategy for micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Biotechnology*. 8 (16) : 3789-3897.
- Shalaby, T., Haneklaus, S. and Schnug, E. (2003). Influence of growth regulators and cultivar on callus and embryo induction in anther culture of asparagus (*Asparagus officinalis*). *Lanbauforschung Volkenrode*. 53 (4) : 217-221.
- Zucchi, M.I., Arizono, H., Morais, V.A., Fangaro, M.H.P. and Vieira, M.L.C. (2002). Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genetic and Molecular Biology*. 25 (1) : 91-96.
- Zur, J.P., Chang, W., Zhang, A.M. and Sheng W. 2004. Studies on petal tissue culture of the traditional Chinese medicine *chrysanthemum morifolium*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. 29(3) : 211-214.

ภาคผนวก

องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่าง ๆ

1. สูตร VW (Vacin & Went , 1949)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	โปแตสเซียมไนเตรด	KNO_3	525
2	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4	250
3	แอมโมเนียมซัลเฟต	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	500
4	แมงกานีสซัลเฟต	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7.5
5	แมกนีเซียมซัลเฟต	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	250
6	เฟอร์ริกคลอไรด์	$\text{Fe}_2 (\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	28
7	ไตรแคลเซียมฟอสเฟต	$\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$	200
8	ซูโครส	Sucrose	20 กรัม

2. สูตร MS (Murashige and Skoog , 1962)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	แอมโมเนียมไนเตรท	NH_4NO_3	1,650
2	โปแตสเซียมไนเตรด	KNO_3	1,900
3	แคลเซียมคลอไรด์	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
4	แมกนีเซียมซัลเฟต	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
5	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4	170
6	บอริกแอซิด	H_3BO_3	6.2
7	แมงกานีสซัลเฟต	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
8	ซิงค์ซัลเฟต	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
9	โปแตสเซียมไอโอไดด์	KI	0.83
10	โซเดียมโมลิบเดต	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
11	คอปเปอร์ซัลเฟต	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
12	โคบอลต์คลอไรด์	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
13	โซเดียม อีดีทีเอ	Na_2EDTA	37.25
14	เฟอร์รัสซัลเฟต	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
15	ไกลซีน	Glycine	2.0
16	นิโคตินิกแอซิด	Nicotinic acid	0.5
17	ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	Pyridoxine HCl	0.5
18	ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์	Thiamine HCL	0.1
19	มายโออินโนซิทอล	Myo -inositol	100
20	น้ำตาลซูโครส	Sucrose	30 กรัม

3. สูตร Hildebrandt (1962)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	แคลเซียมไนเตรท	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	800
2.	โปแตสเซียมคลอไรด์	KCL	130
3	โปแตสเซียมไนเตรด	KNO_3	160
4	แมกนีเซียมซัลเฟต	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	720
5	โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	132
6	โซเดียมซัลเฟต	Na_2SO_4	100
7	บอริกแอซิก	H_3BO_3	3.0
8	โปแตสเซียมไอโอไดด์	KI	0.375
9	แมงกานีสซัลเฟต	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.5
10	ซิงค์ซัลเฟต	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3.0
11	เฟอร์ริกตราเตท	$\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5.0
12	ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	Pyridoxine HCl	0.8
13	ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์	Thiamine HCL	0.1
14	ไกลซีน	Glycine	12.0
15	น้ำตาลซูโครส	Sucrose	20 กรัม

4. สูตร White (1963)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	โปแตสเซียมคลอไรด์	KCL	65
2.	แมกนีเซียมซัลเฟต	MgSO ₄ .7H ₂ O	720
3	โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	16.50
4	โปแตสเซียมไนเตรต	KNO ₃	80
5	โซเดียมซัลเฟต	Na ₂ SO ₄	20
6	แคลเซียมไนเตรต	Ca (NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	300
7	แมงกานีสซัลเฟต	MnSO ₄ .4H ₂ O	7.0
8	โปแตสเซียมไอโอไดด์	KI	0.75
9	สังกะสีซัลเฟต	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	3.0
10	บอริกแอซิก	H ₃ BO ₃	1.5
11	เฟอร์รัสซัลเฟต	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.5
12	ไกลซีน	Glycine	3.0
13	ซิสทีน	Cysteine	1.0
14	ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์	Thiamine HCL	0.1
15	ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	Pyridoxine HCl	0.1
16	นิโคตินิกแอซิด	Nicotinic acid	0.5
174	แคลเซียมแพนโททีเนต	Calcium pantothenate	0.1
18	น้ำตาลซูโครส	Sucrose	20 กรัม

5 สูตร Miller (1963)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	แอมโมเนียมไนเตรท	NH_4NO_3	1,000
2.	โปแตสเซียมไนเตรด	KNO_3	1,000
3	แคลเซียมไนเตรท	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	347
4	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4	300
5	แมกนีเซียมซัลเฟต	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	35
6	โปแตสเซียมคลอไรด์	KCL	65
7	แมงกานีสซัลเฟต	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.4
8	ซิงค์ซัลเฟต	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.5
9	บอริกแอซิด	H_3BO_3	1.6
10	โปแตสเซียมไอโอไดด์	KI	0.8
11	โซเดียมเฟอรัส อีดีทีเอ	$\text{Na} - \text{FeEDTA}$	32
12	นิโคตินิกแอซิด	Nicotinic acid	0.5
13	ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	Pyridoxine HCl	0.1
14	ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์	Thiamine HCL	0.1
15	น้ำตาลซูโครส	Sucrose	30 กรัม

6 . สูตร Eeuwens หรือ Y3 (1967)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	โปแตสเซียมไนเตรต	KNO_3	2,020
2.	โปแตสเซียมคลอไรด์	KCL	1,492
3	แอมโมเนียมคลอไรด์	NH_4Cl	535
4	โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	312
5	แคลเซียมคลอไรด์	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294
6	แมกนีเซียมซัลเฟต	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	247
7	แมงกานีสซัลเฟต	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	11.2
8	ซิงค์ซัลเฟต	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	83
9	บอริกแอซิก	H_3BO_3	7.2
10	โคบอลท์คลอไรด์	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.1
11	โซเดียมโมลิบเดต	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.24
12	คอปเปอร์ซัลเฟต	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.24
13	นิกเกิลคลอไรด์	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.16
14	เฟอร์รัส อิดีทีเอ	FeEDTA	0.024
15	โซเดียมเฟอร์รัส อิดีทีเอ	Na - FeEDTA	32.5
16	ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์	Thiamine HCL	100
17	ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	Pyridoxine HCl	0.5
18	แคลเซียมแพนโททีเนต	Calcium pantothenate	0.05
19	นิโคตินิกแอซิด	Nicotinic acid	0.05
20	ไบโอติน	Biotin	0.05
21	น้ำตาลซูโครส	Sucrose	30 กรัม

7 . สูตร Gamborg , B-5 (1970)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	แคลเซียมคลอไรด์	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150
2.	โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150
3	โปแตสเซียมไนเตรต	KNO_3	2500
4	แมกนีเซียมซัลเฟต	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
5	แอมโมเนียมซัลเฟต	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	134
6	บอริกแอซิด	H_3BO_3	3.0
7	โคบอลท์คลอไรด์	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
8	คอปเปอร์ซัลเฟต	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
9	โปแตสเซียมไอโอไดด์	KI	0.75
10	แมงกานีสซัลเฟต	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10
11	โซเดียมโมลิบเดต	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
12	ซิงค์ซัลเฟต	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.0
13	โซเดียมเฟอรัส อีดีทีเอ	$\text{Na} - \text{FeEDTA}$	28
14	มายโออินโนซิทอล	$\text{Myo} - \text{inositol}$	100
15	นิโคตินิกแอซิด	Nicotinic acid	1.0
16	ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	Pyridoxine HCl	1.0
17	ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์	Thiamine HCL	10
18	น้ำตาลซูโครส	Sucrose	20 กรัม

8 . สูตร WPM (Lloyd and McCown, 1980)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	มิลลิกรัม /ลิตร (mg/l)
1	แอมโมเนียมไนเตรท	NH_4NO_3	440
2.	แคลเซียมไนเตรท	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556
3	ไดโปแตสเซียมซัลเฟต	K_2SO_4	990
4	แมกนีเซียมซัลเฟต	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
5	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4	170
6	แคลเซียมคลอไรด์	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96
7	บอริกแอซิก	H_3BO_3	6.2
8	แมงกานีสซัลเฟต	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
9	ซิงค์ซัลเฟต	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
10	โซเดียม โมลิบเดต	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
11	คอปเปอร์ซัลเฟต	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
12	เฟอร์รัสซัลเฟต	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
13	โซเดียม อีดีทีเอ	$\text{Na}_2\text{FeEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
14	ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	Pyridoxine HCl	0.5
15	ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์	Thiamine HCL	1.0
16	นิโคตินิกแอซิด	Nicotinic acid	0.5
17	มายโออินโนซิทอล	Myo –inositol	100
18	น้ำตาลซูโครส	Sucrose	20 กรัม