การขยายพันธุ์ไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] ในหลอดทดลองโดยผ่านการเกิดแคลลัส

โดย
นางสาวศุภมาส วงษ์ศรีสังข์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การขยายพันธุ์ไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] ในหลอดทดลองโดยผ่านการเกิดแคลลัส

โดย
นางสาวศุภมาส วงษ์ศรีสังข์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

IN VITRO PROPAGATION OF BLACK BAMBOO [*PHYLLOSTACHYS NIGRA* (LODD. EX. LINDL.) MUNRO] VIA CALLUS CULTURE

By

MISS Supamas WONGSRISANG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (BIOLOGY)

Department of BIOLOGY

Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การขยายพันธุ์ไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] ในหลอดทดลองโดยผ่านการเกิดแคลลัส
โดย	นางสาวศุภมาส วงษ์ศรีสังข์
สาขาวิชา	ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณญิกา เส็งสาย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรงค์ ฉิมพาลี)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กุลนาถ อบสุวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณญิกา เส็งสาย)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม)

60303205 : ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : Phyllostachys nigra, ไผ่ดำ, การชักนำให้เกิดยอด, การชักนำให้เกิดแคลลัส, การขยายแคลลัส

นางสาว ศุภมาส วงษ์ศรีสังข์: การขยายพันธุ์ไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] ในหลอดทดลองโดยผ่านการเกิดแคลลัส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณญิกา เส็งสาย

การขยายพันธุ์ไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] ในหลอดทดลองโดยการนำตาข้างจากข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน บนอาหารสูตร Murashige & Skoog (MS) ที่เติม Thidiazuron (TDZ) เพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ 6-benzyladenine (BA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 2.8 ยอด มีความยาวยอด 1.3 เซนติเมตร และเมื่อเติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากขึ้นถึง 6.4 ยอด โดยมีความยาวยอดเฉลี่ย 1.5 เซนติเมตร เมื่อนำยอดที่ได้จากข้อมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D (3.0, 4.0, 5.0) ร่วมกับ BA (3.0, 2.0, 1.0) หรือ 2,4-D (3.0, 4.0, 5.0) ร่วมกับ BA (3.0, 2.0, 1.0) และ IBA (0.5) พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด คือสูตรที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดมีลักษณะเกาะตัวกันหลวมๆ มีสีขาวปนเหลืองและอาหารที่สามารถทำให้แคลลัสขยายตัวเพิ่มขึ้น คือ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะแคลลัสมีสีขาวปนเหลือง ทั้งนี้พบการเกิด embryogenic callus ในสูตรอาหารนี้ สำหรับการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสพบว่า เมื่อใช้ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 45 วัน จำนวนยอดเฉลี่ย 14.6 ยอด บริเวณแคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มและเกาะกันแน่นขึ้น เกิดรากจากกลุ่มยอดโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม 1-Naphthalene acetic acid (NAA), 3-indole-butyric acid (IBA) หรือ 1-indole-acetic acid (IAA) ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอรเซ็นต์ เป็นเวลา 90 วัน พบว่ากลุ่มยอดเกิดรากได้ดีที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร ½MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวน 3.0 รากต่อยอด เมื่อนำออกปลูกตามธรรมชาติมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร

60303205 : Major (BIOLOGY)
Keyword : Phyllostachys nigra, black bamboo, shoot initiation, callus induction, callus proliferation

MISS Supamas WONGSRISANG : *In vitro* propagation of black bamboo [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] via callus culture Thesis advisor : Assistant Professor Dr. Supanyika Sengsai

In vitro propagation of black bamboo [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] was carried out. Surface-sterilized lateral buds from nodes were cultured for 14 days on Murashige and Skoog (MS) medium added with different concentrations of Thidiazuron (TDZ) alone or in combination with 6-benzyladenine (BA). It was found that MS medium supplemented with 0.2 mg/L Thidiazuron induced the highest numbers of shoots (2.8 shoots with 1.3 cm long). Furthermore, when 5% coconut water was added, the numbers of shoot was up to 6.4 shoots with 1.5 cm long. Callus induction was induced on MS medium with supplemented in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) alone at different concentrations (0.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L) or 2,4-D (3.0, 4.0, 5.0 mg/L) in combination with BA (3.0, 2.0, 1.0 mg/L) or 2,4-D (3.0, 4.0, 5.0 mg/L) added with BA (3.0, 2.0, 1.0 mg/L) and IBA (0.5 mg/L). Callus was induced on MS medium with 2,4-D 5.0 mg/L and BA 1.0 mg/L. They were friable calli with containing white to yellow. Callus Proliferation was high on MS medium added with 2,4-D 5.0 mg/L. This medium induced embryogenic calli and some part of callus showed brown-black color. Shoot induction was induced on MS medium with BA 1.0 mg/L added with NAA 0.5 mg/L and 2,4-D 0.5 mg/L, in 45 days. Roots were induced from obtained shoot clumps by culturing on ½MS added with 1-Naphthalene acetic acid (NAA), 3-indole butyric acid (IBA) or 1-indole acetic acid (IAA) for 3 months. The highest percentage of rooted shoot clumps was 20% on ½MS medium added with 3.0 mg/L NAA providing 3.0 roots per shoot.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการกรุณาและความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณญิกา เส็งสาย และรองศาสตราจารย์ ดร. โชคพิศิษฐ์ เทพสิธา ที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตลอดจนให้คำสอนเพื่อพัฒนาตนเอง รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. กุลนาถ อบสุวรรณ และรองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม ที่ได้สละเวลามาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย เพื่อให้งานวิทยานิพนธ์สำเร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คุณประสาน สุขสุทธิ์ สำนักงานเกษตร จังหวัดสระแก้ว และวิสาหกิจชุมชนนวัตกรรมไผ่ บ้านเกาะรัง อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนอนุเคราะห์ตัวอย่างพืช เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้อง บิดา มารดา บุคลากรและเพื่อน ๆ ทั้งในและนอกห้องปฏิบัติการทุกคน ที่คอยสนับสนุนให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ และแลกเปลี่ยนความคิดเห็นเสมอมา จนทำให้งานวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ตามเป้าหมายที่วางไว้

นางสาว ศุภมาส วงษ์ศรีสังข์

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ..... ช

สารบัญ..... ซ

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่ 1 : บทนำ..... 1

บทที่ 2 : วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 3

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของไผ่ดำ..... 4

การขยายพันธุ์ไผ่..... 5

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่จากชิ้นส่วนต่าง ๆ..... 5

1.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ด..... 6

2.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ..... 8

3.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบ/ยอด..... 10

สารควบคุมการเจริญเติบโต (PGRs; Plant Growth regulators)..... 11

1.สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน..... 13

2.สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน..... 15

บทที่ 3 : วิธีการศึกษา..... 18

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี..... 18

ขั้นตอนการทดลอง..... 20

การฟอกชิ้นส่วนข้อแขนงของไผ่ดำ..... 20

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บไผ่ดำในระยะเวลา 1 ปี..... 21
การทดลองที่ 1.2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ 21
การทดลองที่ 2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของยอด 23
การทดลองที่ 3 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการขยายกลุ่มแคลลัส 24
การทดลองที่ 4 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส 25
การทดลองที่ 5 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอดเพาะเลี้ยง 26
บทที่ 4 : ผลการทดลอง..... 28
การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บไผ่ดำในระยะเวลา 1 ปี..... 28
การทดลองที่ 1.2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ 31
การทดลองที่ 2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของยอด . 36
การทดลองที่ 3 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการขยายกลุ่มแคลลัส 40
การทดลองที่ 4 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส 44
การทดลองที่ 5 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดเพาะเลี้ยง..... 49
บทที่ 5 : วิจารณ์ผลการทดลอง..... 53
การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บไผ่ดำในระยะเวลา 1 ปี..... 53
การทดลองที่ 1.2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ 53
การทดลองที่ 2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของยอด . 55
การทดลองที่ 3 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการขยายกลุ่มแคลลัส..... 57
การทดลองที่ 4 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส 58
การทดลองที่ 5 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอดเพาะเลี้ยง 60
สรุปผลการทดลอง..... 63
ภาคผนวก..... 64

รายการอ้างอิง..... 66

ประวัติผู้เขียน..... 74

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บชิ้นส่วนข้อไผ่ดำในรอบ 1 ปี..... 29

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยการปนเปื้อนของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นไผ่ดำในช่วงปี 2561-2562..... 29

ตารางที่ 3 ผลของ TDZ เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับ BA ในอาหารสูตร MS ต่อการเกิดยอดจากตาข้างของข้อไผ่ดำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน..... 32

ตารางที่ 4 ผลของน้ำมะพร้าวในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดยอดจากตาข้างของข้อไผ่ดำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน..... 35

ตารางที่ 5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ IBA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอด เป็นเวลา 30 วัน..... 37

ตารางที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ Kn ต่อการขยายแคลลัส เป็นเวลา 30 วัน..... 41

ตารางที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว หรือ TDZ ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน..... 45

ตารางที่ 8 ผลของ NAA, IBA และ IAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 90 วัน..... 50

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะลำต้นและใบของไผ่ดำ....3

รูปที่ 2 ลักษณะต่าง ๆ ของต้นไผ่ดำ....4

รูปที่ 3 การกระจายพันธุ์ของไผ่ดำ [Phyllostachys nigra (Lodd. Ex. Lindl.) Munro]....5

รูปที่ 4 การสังเคราะห์ออกซินและไซโทไคนิน (Jones & Ljung, 2011)....12

รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนออกซิน....13

รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนไซโทไคนิน....16

รูปที่ 7 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของไผ่ดำ....20

รูปที่ 8 แผนภาพขั้นตอนการทดลอง....27

รูปที่ 9 การปนเปื้อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ดำ....30

รูปที่ 10 การเจริญเติบโตของยอดจากข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียวและ TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (สเกล = 1 เซนติเมตร)....34

รูปที่ 11 ลักษณะกลุ่มของยอดของไผ่ดำที่เกิดจากตาที่ข้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ชนิดเดียวหรือร่วมกับ BA หรือน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน....35

รูปที่ 12 การเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวและ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (สเกล = 2 มิลลิเมตร)....39

รูปที่ 13 การเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวและ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ Kn ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (สเกล = 1 มิลลิเมตร) 42

รูปที่ 14 แคลลัสที่เกิดจากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร....43

รูปที่ 15 การเจริญเติบโตของแคลลัสและยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว หรือ TDZ ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ NAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน (สเกล = 1 มิลลิเมตร)....46

รูปที่ 16 แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอด....47

รูปที่ 17 embryogenic callus ที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 48

รูปที่ 18 การชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอด บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เติม IAA, IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน 51

รูปที่ 19 รากที่เกิดจากการชักนำในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 52

รูปที่ 20 รากที่เกิดจากกลุ่มยอด 52

รูปที่ 21 ต้นไผ่ดำที่เลี้ยงในธรรมชาติเป็นเวลา 3 ปี หลังจากการชักนำให้เกิดรากผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 53

รูปที่ 22 ลำต้นไผ่ดำที่เลี้ยงในธรรมชาติเป็นเวลา 3 ปี หลังจากการชักนำให้เกิดรากผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 54

รูปที่ 23 ช่อดอกไผ่ดำ ในระยะเวลา 6-8 เดือน 52

รูปที่ 24 กลไกการเกิดแคลลัส (Ikeuchi et al., 2013) 56

รูปที่ 26 กลไกการทำงานของไซโทไคนินและออกซินในการชักนำให้เกิดรากและแคลลัส 61

บทที่ 1 : บทนำ

Phyllostachys nigra (Lodd. Ex. Lindl.) Munro หรือชื่อทั่วไปเรียกว่า ไผ่ดำ เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Poaceae (Royal horticultural society, 2002) ซึ่งลักษณะเด่นของไผ่ชนิดนี้คือลำไผ่มีสีดำมันอมม่วง มีความสวยงาม จึงนิยมปลูกไว้เป็นไม้ประดับตกแต่งตามอาคารบ้านเรือน หน่อของไผ่ดำไม่นิยมนำมารับประทานเนื่องจากหน่ออ่อนมีรสขมจัด (นายเกษตร, 2557) อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนประกอบต่าง ๆ ของไผ่ดำ เช่น ราก ลำต้น และใบ สามารถนำไปใช้รักษาอาการต่าง ๆ ได้ เช่น ลดไข้ (ส่วนใบ น้ำจากลำไผ่ หรือราก) บรรเทาอาการไอ (ใบ) เลือดกำเดาไหล (ใบ หรือน้ำจากลำไผ่) และสามารถนำรากรักษา/ สมานแผลได้ (Fern, 2016) ปัจจุบันไผ่ดำเป็นพืชที่ตลาดมีความต้องการมากขึ้น ประกอบกับการขยายพันธุ์ด้วยวิธีทางธรรมชาติทำได้ยากและให้จำนวนที่ไม่เพียงพอ ทำให้ไผ่ดำราคาสูงขึ้น โดยมีราคาขายต่อลำมีราคาตั้งแต่ 200-700 บาท (Nanagarden, 2014) นอกจากนี้ยังพบว่าการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด มีโอกาสเกิดต้นที่มีความแปรผันทางพันธุกรรม อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาการปลูกยาวนาน ดังนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถือได้ว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ไผ่ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้ได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนต้นแม่พันธุ์ทุกประการในปริมาณมากและใช้ระยะสั้น ต้นที่ได้อยู่ในสภาพปลอดโรค อีกทั้งยังสามารถขยายพันธุ์ได้ทุกฤดูกาล ทำให้สามารถร่นเวลาในการปลูก และลดพื้นที่ในการเพาะปลูกได้และยังสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และเก็บรักษาพันธุ์พืชได้ (Hussain and Tyagi, 2006)

ไผ่เป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เพราะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย มีรายงานการขยายพันธุ์ไผ่หลายชนิดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ประสบความสำเร็จ เช่น การเพาะเลี้ยงในไผ่สกุล *Bambusa* และ *Dendrocalamas* เป็นต้น (Venkatachalam et al., 2015; Lin and Chang, 1998; Ramanayake and Yakandawala, 1997; Chaturvedi et al., 1993; Chambers et al., 1991; Saxena, 1990) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ *Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro ยังมีการศึกษาและฐานข้อมูลการเพาะเลี้ยงค่อนข้างน้อย

การกระจายพันธุ์ของไผ่ดำกระจายอยู่ทั่วทุกมุมโลก ส่วนใหญ่พบได้มากที่ประเทศจีน ซึ่งในประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้น (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2566) เป็นประเทศแห่งการเพาะปลูกที่มีความอุดมสมบูรณ์ หากสามารถพัฒนาการขยายพันธุ์ไผ่ดำด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นได้ จะเป็นประโยชน์ต่อการตลาดของประเทศนำไปสู่การส่งออกนอกประเทศ

งานวิจัยนี้ได้จัดทำเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับการขยายพันธุ์ของไผ่ดำผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอด ราก และ

แคลลัสจากข้อของไผ่ดำ ซึ่งในธรรมชาติขยายพันธุ์ได้ยาก เนื่องจากข้อมูลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ดำยังมีผู้ศึกษาน้อย (Ogita, 2005; ธิดารัตน์ และคณะ, 2562) นอกจากนี้งานวิจัยฉบับนี้ยังเป็นฐานข้อมูลในการขยายพันธุ์ไผ่ในสกุล *Phyllostachys*

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนข้อ
2. เพื่อหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่ยอด
3. เพื่อหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดออกจากกลุ่มแคลลัส
4. เพื่อหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด และราก

สมมุติฐานของการศึกษา

การขยายพันธุ์ไผ่ดำโดยใช้ส่วนข้อของกิ่งแขนงจากลำต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยผ่านการเกิดแคลลัส สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างที่ส่วนข้อ บนอาหาร 13 สูตร
2. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนใบที่ยอด บนอาหาร 10 สูตร
3. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการขยายกลุ่มแคลลัส บนอาหาร 6 สูตร
4. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส บนอาหาร 8 สูตร
5. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก 4 สูตร

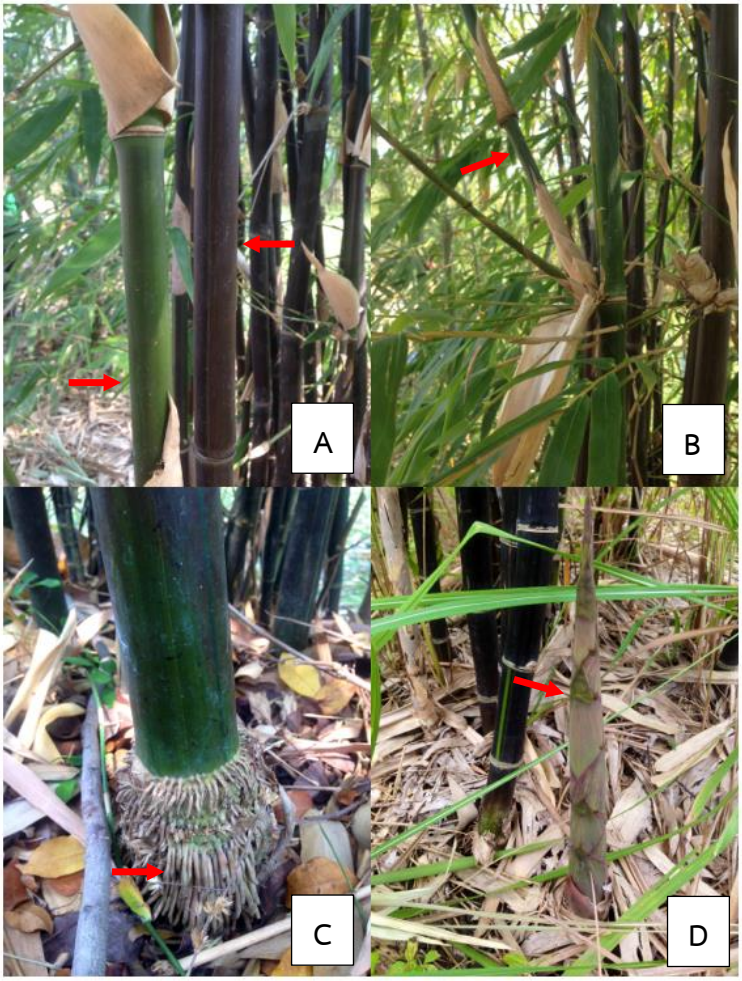
บทที่ 2 : วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ไผ่เป็นพืชที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (Zachariah et al., 2016) ซึ่งมีประโยชน์ทางด้านเศรษฐกิจเพราะไผ่สามารถเป็นได้ทั้งไม้ประดับ เนื่องจากมีความสวยงามบางชนิดมีลำที่มีสี เช่น ไผ่ซางเหลือง (*Dendrocalamus latiflorus*) มีลำสีเหลือง, ไผ่ดำ (*Phyllostachys nigra*) มีลำสีดำอมม่วง เป็นต้น นอกจากนี้ระบบรากของไผ่ยังช่วยยึดเกาะหน้าดินอีกด้วย (Ben et al., 2005) หน่อของไผ่บางชนิดสามารถนำไปรับประทานได้ ส่วนลำไผ่ที่มีความแข็งแรงคงทน แต่ยืดหยุ่นนั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ ทำเฟอร์นิเจอร์หรือเครื่องสานต่าง ๆ ใบของไผ่สามารถนำไปสกัดเพื่อทำการรักษามะเร็ง (Seki and Maeda, 2010) นอกจากจะมีค่าทางด้านเศรษฐกิจ ไผ่นั้นมีประโยชน์อย่างมากต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากไผ่เป็นแหล่งผลิตออกซิเจนที่มีประสิทธิภาพ นั่นคือสามารถปล่อยออกซิเจนออกสู่ชั้นบรรยากาศได้มากถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (Bamboo Botanicals, 2023) ไผ่ถือเป็นพืชเมืองร้อน แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกทวีป ยกเว้นทวีปยุโรป ขั้วโลกเหนือและขั้วโลกใต้ ซึ่งในประเทศไทยพบไผ่ 16 สกุล 85 ชนิด (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2560) ขึ้นกระจายตามป่าเบญจพรรณหรือป่าผสมผลัดใบ และป่าดิบชื้น (ปรัชญา และ ระวี, 2557) โดยลักษณะทั่วไปของไผ่ เป็นไม้ยืนต้น ลำต้นกลวงตรงกลาง มีแขนงจำนวนมาก ใบแตกต่างกันไปตามชนิด ที่พบเห็นส่วนใหญ่ใบเรียวยาว นอกจากนี้สีของลำต้นแตกต่างกันตามสายพันธุ์ เหง้าคือส่วนของลำต้นที่อยู่ใต้ผิวดิน ทำหน้าที่ค้ำจุนและสะสมอาหาร ข้างเหง้าจะมีตาอยู่ซึ่งต่อไปจะพัฒนาไปเป็นหน่อและลำไผ่

รูปที่ 1 ลักษณะลำต้นและใบของไผ่ดำ

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของไผ่ดำ

ไผ่ดำ หรือ ไผ่เสฉวน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex Lindl.) Munro อยู่ในวงศ์ Poaceace มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีน มีลักษณะเป็นไผ่ประดับ แตกกอเป็นพุ่มแน่นสูง 1-2 เมตร ลำผอมขนาดประมาณ 2 นิ้ว ปล้องยาว (รูปที่ 1) ผิวเกลี้ยง ลำไผ่ยังไม่แก่จะมีสีเขียว และจะเปลี่ยนเป็นสีดำอมม่วงเมื่อลำมีอายุมากขึ้น (รูป 2A) ใบเรียบเรียวเล็กกว้าง 1 นิ้ว ยาว 5 นิ้ว ระบบรากเหง้าลำเดี่ยว (รูป 2C) การกระจายพันธุ์พบการกระจายพันธุ์ทั่วโลก พบได้มากที่ประเทศจีน (GBIF Secretariat, 2022) (รูปที่ 3)



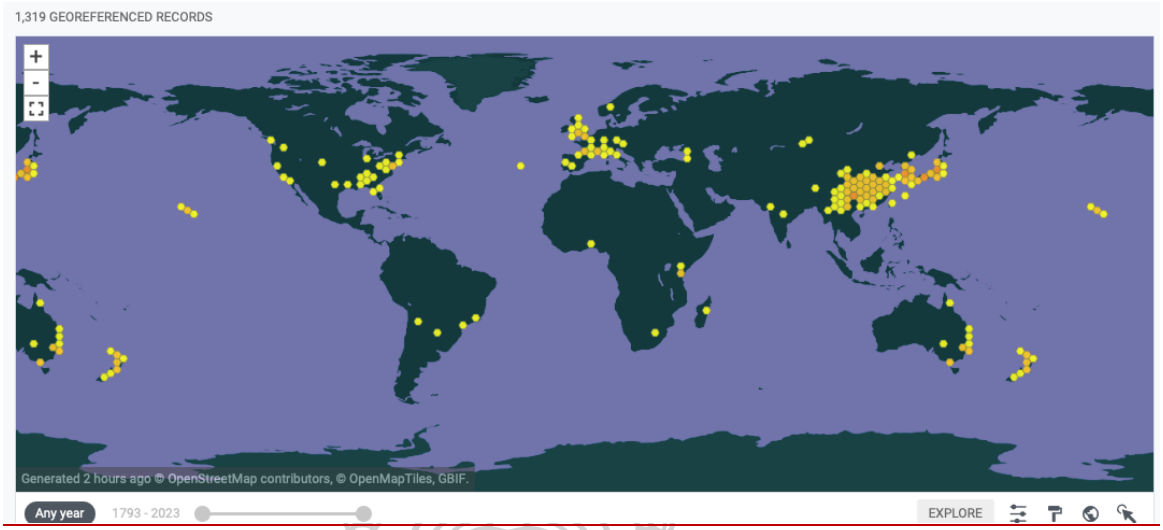
รูปที่ 2 ลักษณะต่าง ๆ ของต้นไผ่ดำ

A) ลำต้นของไผ่ดำที่อายุน้อย (ลำซ้าย) และอายุมาก (ลำขวา)

B) กิ่งแขนงของไผ่ดำ

C) รากของไผ่ดำ

D) หน่อที่แตกมาจากเหง้าของไผ่ดำ



รูปที่ 3 การกระจายพันธุ์ของไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] (GBIF Secretariat, 2022)

การขยายพันธุ์ไผ่

การขยายพันธุ์ไผ่ในธรรมชาติมีหลายวิธี คือ การขยายพันธุ์ด้วยการใช้เมล็ด การขยายพันธุ์โดยการใช้ส่วนเหง้า หรือใช้ส่วนกิ่งแขนงหรือลำ แต่ในการขยายพันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้นนั้นใช้ระยะเวลานาน อีกทั้งยังได้จำนวนน้อย การเพาะด้วยเมล็ดสามารถทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมและมีอัตราการงอกของเมล็ดต่ำ (Yang et al., 2019) นอกจากนี้การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดไม่เพียงพอต่อความต้องการ อีกทั้งการเพาะปลูกไผ่ต้องใช้พื้นที่กว้าง (Larekeng et al., 2020) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้ต้นปริมาณมาก ๆ และมีลักษณะเหมือนแม่พันธุ์ ในระยะเวลาอันสั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์ไผ่นั้นมีรายงานการศึกษาในไผ่สกุลต่าง ๆ เช่น สกุล *Bambusa* และ *Dendrocalamus* อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไผ่สกุล *Phyllostachys* ยังมีอยู่น้อยมาก (Hassan and Debergh, 1987; Otiga, 2005; Otiga et al., 2008; Yuan et al., 2013; Sood et al., 2014; ธิดารัตน์ และคณะ, 2562)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่จากชิ้นส่วนต่าง ๆ

มีผู้รายงานผลการชักนำให้เกิดยอด ยอดทวีคูณ ราก และการชักนำให้เกิดแคลลัสในไผ่หลายชนิด โดยใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่แตกต่างกัน เช่น เมล็ด ข้อ และใบ อาหารสังเคราะห์สูตรที่นิยมใช้เพื่อชักนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของไผ่ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ร่วมกับ

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (Goyal and Sen, 2016) สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสและขยายแคลลัส นิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Rahayu et al., 2016) เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงนำมาชักนำให้เกิดยอดและรากต่อไป

1.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ด

จากรายงานการศึกษาของ Saxena และ Dhawan ในปี 1999 ซึ่งนำเมล็ดของไผ่ซาง (*Dendrocalamus strictus)* มาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 6.6 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วย้ายลงอาหารที่มี 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kinetin (Kn) 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร และ indole-3 butyric acid (IBA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้เติม Polyvinylpyrrolidone (PVP) 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อลดปริมาณ Phenolic ที่เกิดขึ้นจากความเครียดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ด้วยการเลี้ยงในที่มืดบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 1-Naphtaleneacetic acid (NAA) 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นที่นำออกปลูกมีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดยังสามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้ (Arya et al., 1999) ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Benzyladenine (BA) 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดทวีคูณ 15-16 เท่าในไผ่ตง (*D. asper*)

Devi และคณะ (2012) นำเมล็ดของไผ่เป๋าะ (*Dendrocalamus giganteus* Munro) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin (Kn) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดสีขาว แคลลัสมีลักษณะเป็น compact และ nodular หลังจากนั้นย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติม Naphthalene acetic acid (NAA) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดรากได้มากถึง 86% บนอาหาร ½MS ที่เติม indole-3-butyric acid (IBA) 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการใช้เมล็ดในสกุล *Phyllostachys* มีการศึกษาไว้ในหลายสายพันธุ์ ดังนี้ *P. meyeri , P. heterocycle var. pubescens* (Mazel ex J. Houz.) Ohwi และ *P. pubescens* (Otiga et al., 2008; Yuan et al., 2013; Sood et al., 2014)

ในไผ่ *Phyllostachys meyeri* เมล็ดถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดยอดและราก เมื่อได้ต้นจากการเพาะเลี้ยงแล้ว นำต้นอ่อน (seedlings) ที่ได้ออกปลูกเป็นเวลา 9 เดือน นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดบางส่วนเพาะเลี้ยงต่อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำข้อที่ได้จากเพาะเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งและเหลว สูตร ½MS พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอด

ได้ดีกว่า เมื่อเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร ½MS เป็นเวลา 90 วัน สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ 29.7 เปอร์เซ็นต์ (Ogita et al., 2008)

ในไผ่โมโซ (Moso bamboo) หรือ *Phyllostachys heterocycle* var. pubescens (Mazel ex J. Houz.) Ohwi มีการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสตลอดจนการชักนำให้เกิดยอดและราก โดยนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS, NB, N6, B5 และ CC ร่วมกับ 2.4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรในทุกสูตรอาหาร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่าอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด คือสูตรอาหาร MS สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากถึง 50.34 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสังเคราะห์นี้สามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ 5.97 เปอร์เซ็นต์ นำแคลลัสมาขยายด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2.4-D ตั้งแต่ความเข้มข้น 0-6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ 2.4-D ที่ช่วงความเข้มข้น 3.0-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นช่วงความเข้มข้นที่สามารถขยายแคลลัสได้ดี และเมื่อใช้ 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Zeatin ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casein hydrolysate (CH) 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการเกิดของแคลลัส 50 เปอร์เซ็นต์ และการสามารถชักนำให้เกิด Embryogenic callus ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะแคลลัสเป็นกลุ่มก้อนสีขาว และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ด้วยการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Zeatin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (Yuan et al., 2013)

Sood et al. (2014) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการใช้เมล็ดของไผ่ *Phyllostachys pubescens* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเริ่มต้นจากการชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อน (Seedlings) หลังจากนั้นนำข้อที่ได้มาชักนำให้เกิดยอดทวีคูณด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) Kinetin (Kn) และ Benzyladenine (BA) ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้ดีที่สุด คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด 8.6 ยอด มีความยาวยอด 5.24 เซนติเมตร และชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ indole-3-butyric acid (IBA) ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำออกปลูกในธรรมชาติพบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์

2.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ

มีงานวิจัยการชักนำให้เกิดยอดจากข้อของไผ่รวก (*Thyrsostachys siamensis*) โดยใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม Benzyladenine (BA) 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 13.5 ยอดต่อตาข้าง และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin (Kn) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดแคลลัส มีขนาดใหญ่ที่สุด 0.62 เซนติเมตร ภายในระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลา 12 สัปดาห์เกิดยอดมากถึง 27 ยอดต่อกลุ่มแคลลัส และสามารถชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอด ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ โดยใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (อภิศักดิ์, 2549)

Godbole et al. (2002) ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด somatic embryo ในไผ่หก (*Dendrocalamus hamiltonii*) โดยชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย Benzyladenine (BA) ร่วมกับ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้นแต่ละสาร 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลาต่อมา นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA สูงขึ้น พบว่าที่ความเข้มข้นของ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เป็นเวลา 21 วัน พบว่าสามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำออกปลูกมีอัตราการรอดชีวิต 78 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาผลของ Thidiazurron (TDZ) ต่อการพัฒนาแคลลัสไปเป็น somatic embryo

ใน 2004 Lin et al. นำชิ้นส่วนข้อของไผ่ *Bambusa edulis* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย Thidiazuron (TDZ) 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์เพื่อชักนำให้เกิด embryogenic callus ต่อมานำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยพบการเกิดดอกแต่ไม่มีเมล็ด

ในไผ่ *Bambusa arundinacea* (Retz.) มีการศึกษาความเข้มข้นที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด ด้วยการใช้ 6-benzyl amino purine (BAP) และ Kinetin (Kn) ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0) ร่วมกับออกซิน 3 ชนิด ได้แก่ indole-3-butyric acid (IBA), Naphthyl acetic acid (NAA) และ indole-3-acetic acid (IAA) โดยใช้ชิ้นส่วนข้อมาทดลอง ผลการทดลองที่ใช้ BAP ร่วมกับออกซิน 3 ชนิด พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี

ที่สุด คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 87.20 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดต่อข้อ 24.2 ยอด และผลการทดลองที่ใช้ Kn ร่วมกับออกซิน 3 ชนิด พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม Kn 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอด 81.25 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดต่อข้อ 11.4 ยอด นอกจากนี้การชักนำให้เกิดยอดจากข้อจะมีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อเติมน้ำมะพร้าว 4 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดยอด 89.50 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดต่อข้อ 86.9 ยอด สำหรับการชักนำให้เกิดรากใน *B. arundinacea* (Retz.) พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงที่สุด คือ 72.40 เปอร์เซ็นต์ 9.25 รากต่อขวด ความยาวราก 5.33 เซนติเมตร และการใช้ IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Silver nitrate ($AgNO_3$) 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้เกิดรากสูงสุด 85.15 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนราก 9.34 รากต่อขวด ความยาวราก 7.40 เซนติเมตร (Venkatachalam et al., 2015)

ในการชักนำให้เกิดยอดและการขยายแคลลัสใน *Drepanostachyum luodianense* ด้วยการใช้ชิ้นส่วนข้อ พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการนำมาชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 6-benzyladenine (BA) 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้ด้วยการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kn 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้ 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดแคลลัส 65.6 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับออกซิน 2 ชนิด ได้แก่ NAA (2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ IBA (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Lin et al., 2018)

จากการเพาะเลี้ยงด้วยการใช้ชิ้นส่วนข้อจากกิ่งแขนงของไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] พบว่าสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม Thidiazuron (TDZ) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดสูงสุด 4.5 ยอดต่อข้อ ยอดไผ่มีสีเขียวยาวเสมอกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และนำยอดที่ได้มาชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ พบว่าในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้ดีที่สุด ยอดที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง มีจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นจากกลุ่มยอดเดิมที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ 4.7 ยอด (ธิดารัตน์ และคณะ, 2562)

3.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบ/ยอด

สุธิดา ได้มีการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดใน *Schizostachyum brachyandam* (ไผ่ทอง) และ *Bambusa blumeana* ไผ่สีสุก พบว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่แคลลัสไม่เจริญพัฒนาไปเป็น embryogenic callus (สุธิดา, 2534) นอกจากนี้ยังพบรายงานการวิจัยที่ใช้ความเข้มข้นของ 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาการเกิดแคลลัสในไผ่ 4 สายพันธุ์ *ได้แก่ Bambusa oldhamii* Munro, *B. multipex* (Loureiro) Raeuschell, *Sasa pygmaea* (Miquel) E. G. Camus และ *Phyllostachys aurea* A. & C. โดยใช้ยอดเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์, white vitamin, glycine, inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด พบว่าสกุล *Bambusa* เกิดแคลลัสที่เรียงตัวกันอย่าง หลวมๆ (friable callus) และในไผ่ *Sasa pygmaea* (Miquel) E. G. Camus และ *Phyllostachys aurea* A. & C. เกิดแคลลัสที่มีลักษณะกลม (granular) สีของแคลลัสมีสีขาวครีม สำหรับการชักนำให้เกิดยอดในไผ่ทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่า สกุล *Bambusa* อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แต่ในไผ่ *P. aurea* ต้องใช้ความเข้มข้นของ BA สูงถึง 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจึงเกิดยอด (Huang, 1983)

สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดในไผ่ *Phyllostachys viridis* (Young) McClure มีการศึกษาด้วยการใช้ชิ้นส่วนใบ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นได้ย้ายยอดลงในอาหารเหลวสูตร MS เลี้ยงบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเกิดการพัฒนาไปเป็นต้น (Hassan and Debergh, 1987)

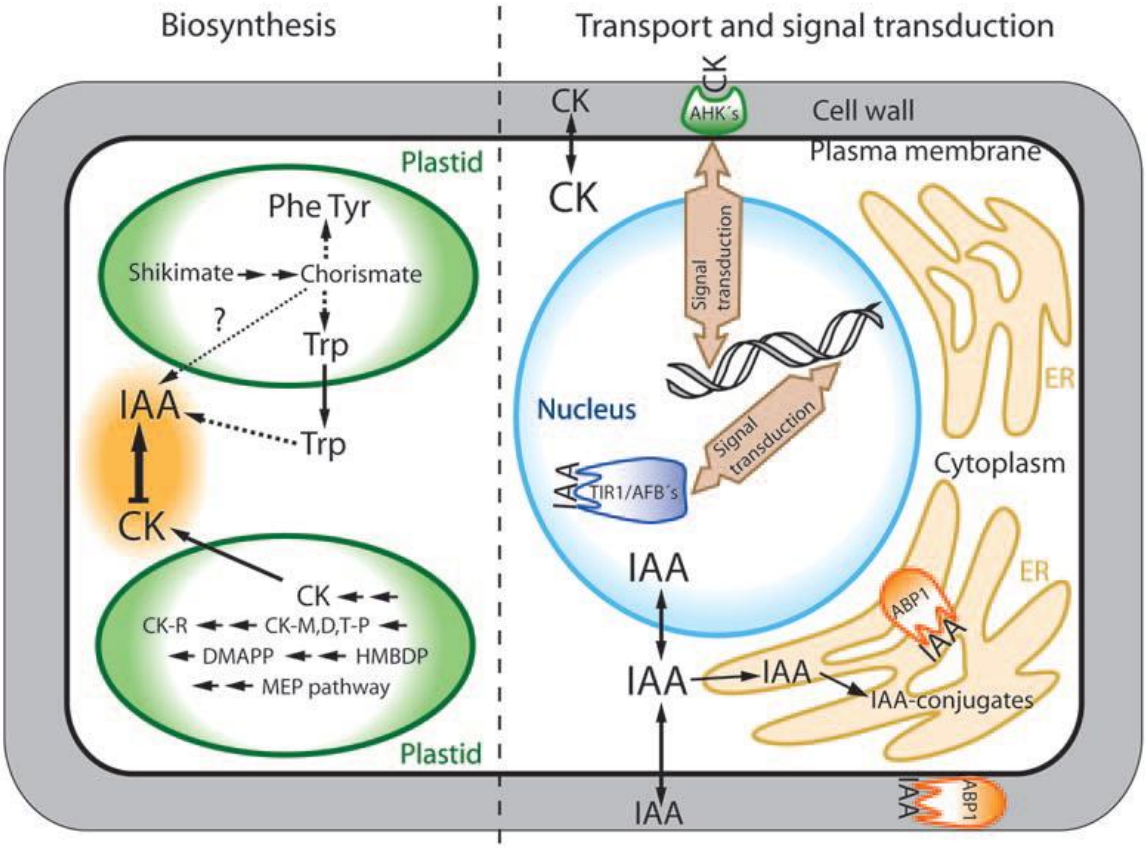
สำหรับในไผ่ดำ (*Phyllostachys nigra* Munro var. *Henonis*) มีการศึกษากรดอะมิโนอิสระในแคลลัส โดยการชักนำแคลลัสจากยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.65 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในแคลลัสมีกรดอะมิโนชนิด glutamine, g-aminobutyric acid และ alanine เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ asparagine and tyrosine ที่พบมากในยอดกลับมีปริมาณน้อยในก้อนแคลลัสที่เกิดขึ้น (Ogita, 2005) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกรดอะมิโนชนิด glutamine จัดเป็นสารที่ส่งเสริม การเติบโตของพืชเพาะเลี้ยง โดย glutamine ภายในพืช และ/หรือภายนอกพืชที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงมีบทบาทสำคัญในการเกิดและและการพัฒนา somatic embryo (Ogita, 2005)

สารควบคุมการเจริญเติบโต (PGRs; Plant Growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสารที่มีการออกฤทธิ์เหมือนกับฮอร์โมนพืช ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการงอกของเมล็ด การชักนำให้เกิดเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถพัฒนาพืชให้ออกดอกออกผล (Schaller et al., 2015) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อ ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองกลุ่ม (ออกซินและไซโทไคนิน) เป็นฮอร์โมนที่จำเป็นต่อเนื้อเยื่อในการเจริญพัฒนาของพืช (Moubayidin et al., 2009; Su et al., 2011) โดยออกซิน (auxin) เป็นฮอร์โมนที่สร้างขึ้นจากกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด ก่อนถูกลำเลียงไปยังเซลล์เป้าหมาย มีหน้าที่กระตุ้นเซลล์ให้เกิดการขยายตัว นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญของตาข้าง และตอบสนองต่อแสงและแรงโน้มถ่วงของพืช สำหรับไซโทไคนิน (cytokinin) เป็นสารที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ส่งเสริมการเจริญของตาข้าง การงอกของเมล็ด และช่วยป้องกันการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) (คัดคณัฐ, 2019)

การผลิตสารออกซินและไซโทไคนินในพืช มีกลไกการสังเคราะห์ดังรูปที่ 4 ซึ่ง Jones และ Ljung (2011) ได้กล่าวถึงการทำงานของออกซินและไซโทไคนินในอะราบิดอปซิส (Arabidopsis) ถึงกระบวนการทางเคมี (metabolism) การเคลื่อนย้าย และ การส่งสัญญาณ

การสังเคราะห์ IAA และ CK (IAA and CK biosynthesis) จากกรดอะมิโนที่มีทริปโตเฟน (tryptophan) ในพลาสติด (plastid) IAA ถูกสังเคราะห์ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ส่วน CK ถูกสังเคราะห์ในพลาสติด แล้วเคลื่อนย้ายไปยังไซโทพลาสซึม โดย IAA เมื่อสร้างขึ้นแล้วจะลดการสร้าง CK ในขณะกลับกัน CK ส่งเสริมให้ IAA ถูกสังเคราะห์ สำหรับการเคลื่อนย้ายและการส่งสัญญาณของ IAA และ CK IAA เข้าจับกับตัวรับ (IAA receptors: TIR1/AFB's) ที่นิวเคลียส (nucleus) ในเวลาต่อมาถูกย่อยสลายด้วย 26s proteasome complex จะเข้าสู่กระบวนการ gene transcription โดย AUXIAA protein เข้าจับกับ ARF transcription factors ในขณะเดียวกัน IAA receptor (ABP1) ที่อยู่บริเวณพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) และ endoplasmic reticulum (ER) เข้าจับกับ IAA ที่ไม่ได้ถูกจับกับ TIR1/AFB's สำหรับ CK เข้าจับคู่กับ CK receptors (AHKs) ที่บริเวณพลาสมาเมมเบรนและถูกเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสด้วย AHP และ ARR protein โดยทั้ง IAA และ CK ถูกขนส่งไปผ่านพลาสมาเมมเบรน

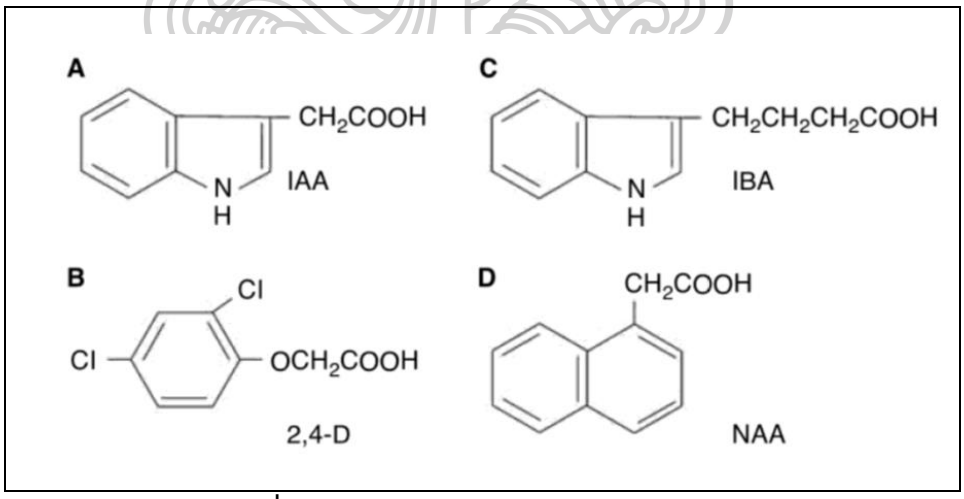


รูปที่ 4 การสังเคราะห์ออกซินและไซโทไคนิน (Jones & Ljung, 2011)
(ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/Subcellular-localization-of-auxin-iaa-and-cytokinin-cK-metabolism-transport-and_fig1_51099588)

1.สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน

ออกซินเป็นฮอร์โมนที่พบมากในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ โดยตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ออกซินได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญปลายราก สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ออกซินในพืช คือ กรดอะมิโนทริปโตแฟน (trytophan) หน้าที่ของฮอร์โมนออกซิน ได้แก่ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ (cell division) การชักนำให้เกิดราก (root initiation) การเปลี่ยนไปของมัดท่อลำเลียง (Vascular tissue differentiation) ตายอดข่มตาข้าง (Apical dominance) เป็นต้น (Kumar et al., 2016) ออกซินที่พืชสร้างมีแบบอิสระ (สามารถเคลื่อนที่ได้) และแบบไปจับกับสารอื่น โดยออกซินธรรมชาติ ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA) และ indole-3-butyric acid (IBA) ออกซินสังเคราะห์ที่สังเคราะห์มาเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1-Naphthalene acetic acid (NAA) และ picloram

ออกซินถูกนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดรากและแคลลัส (Saini et al., 2013; Kazan, 2013; Schaller et al., 2015) ออกซินธรรมชาติตัวแรก ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA) ในเวลาต่อมาพบ indole-3-butyric acid (IBA) และมีการพัฒนาออกซินสังเคราะห์ ที่ทำหน้าที่คล้ายกับออกซินจากธรรมชาติ ได้แก่ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (Schaller et al., 2015) (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนออกซิน

A) indole-3-acetic acid (IAA)

B) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

C) indole-3-butyric acid (IBA)

D) 1-naphthaleneacetic acid (NAA)

(ที่มา : https://www.scitechnol.com/peer-review)

1.1 IAA (indole-3-acetic acid)

IAA เป็นฮอร์โมนตัวแรกที่ค้นพบในพืช โดย Charles Darwin และ Francis Darwin ฮอร์โมนนี้จะอยู่บริเวณปลายยอดและปลายราก IAA มีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การยืด และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เป็นต้น นอกจากนี้ ยังกระตุ้นการข่มตาข้าง และตอบสนองต่อแสงและแรงโน้มถ่วง กระตุ้นการเกิดราก ป้องกันการร่วงของใบ/ ผล (Byjus, 2023a) เมื่อ IAA ทำงานร่วมกับออกซินตัวอื่น ๆ หรือ สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ จะส่งเสริม/ ยับยั้งการทำงานได้ เช่น การใช้ความเข้มข้นของออกซินต่อไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อชักนำให้เกิดยอดหรือราก

1.2 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

2,4-D ถูกนำมาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืช (herbicide) เนื่องจากแสดงฤทธิ์ออกซินสูง เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมอย่างมากในการนำมาใช้เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (Yasuda and Yamada, 1971) ร่วมกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยหน้าที่ของ 2,4-D คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ โดยกระตุ้นให้เซลล์สร้างผนังเซลล์มากขึ้น เกิดการขยายตัวของเซลล์อย่างรวดเร็ว และเพิ่มการผลิตเอทิลีนในพืช นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์โปรตีน (Byjus, 2023b) อย่างไรก็ตามการใช้ปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ จะสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชได้ ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของไผ่สกุล *Phyllostachys* พบว่าการใช้ 2,4-D ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยปริมาณการเกิดแคลลัสค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น จนเมื่อถึงที่ความเข้มข้น 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การเกิดแคลลัสลดลงในไผ่ *Phyllostachys heterocycle* var. pubescens (Mazel ex J. Houz.) Ohwi (Yuan et al., 2013)

1.3 IBA (indole-3-butyric acid)

สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดนี้ถูกนิยมนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดราก ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช IBA ถูกนำมาใช้ร่วมกับออกซินชนิดอื่น ๆ (CliniSciences, 2023a) หรือใช้เพียง IBA เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะสามารถชักนำให้เกิดรากได้ ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดรากในไผ่ *Phyllostachys pubescens* ใช้ความเข้มข้นของ IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ (Sood et al., 2014) และในไผ่ *B. vulgaris* ‘Striata’ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดเมื่อใช้ IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ramanayake et al., 2006) นอกจากนั้น IBA ยังทำหน้าที่ในการพัฒนายอด โดยการเปลี่ยนแปลง

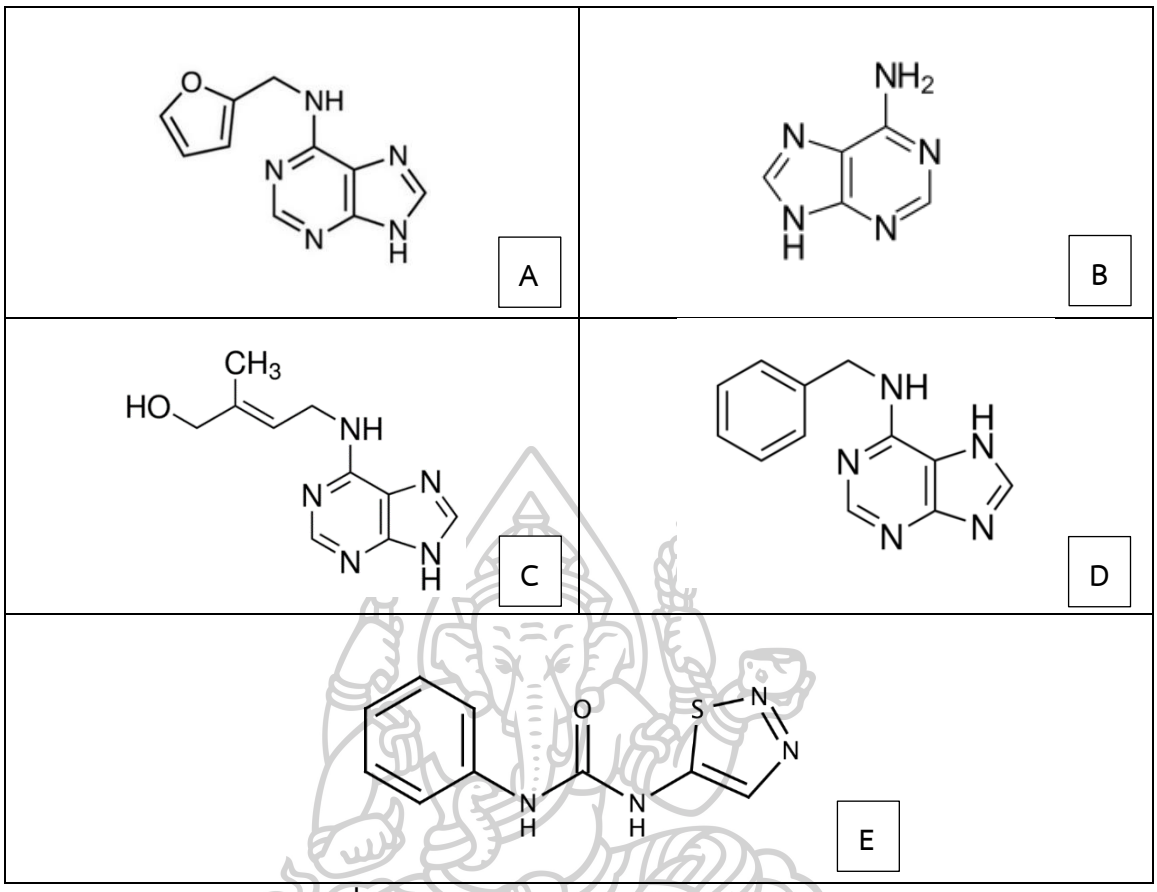
ของ IBA เป็น IAA (ออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับ IAA) กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ ส่งผลให้ยอดขยายตัว (Frick and Strader, 2018) นอกจากนี้การทำงานของ IBA ร่วมกับสารไซโทไคนินตัวอื่น ๆ สามารถช่วยพัฒนาการเกิดยอดได้ในไผ่ *Bambusa arundinacea* (Venkatachalam et al., 2015)

1.4 NAA (1-Naphthalene acetic acid)

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่สังเคราะห์ขึ้นมา โดยมีหน้าที่เช่นเดียวกันกับ IAA และ IBA ซึ่งเป็นฮอร์โมนออกซินธรรมชาติ นิยมใช้ NAA เนื่องจากออกซินธรรมชาติสลายตัวได้ง่าย (วรภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) นอกจากจะนำมาชักนำให้เกิดรากแล้วยังถูกใช้เพื่อชักนำให้เกิดยอดร่วมกับน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ในกล้วยไม้ (Mukarlina et al., 2010; Hartati et al., 2017) สำหรับการใช้ NAA เพื่อชักนำให้เกิดรากในไผ่ *Phyllostachys heterocycle* var. pubescens (Mazel ex J. Houz.) พบว่า NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด (Yuan et al., 2013) นอกจากนี้เมื่อใช้ NAA เมื่อทำงานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น เช่น 2,4-D และ TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในไผ่ *Bambusa ventricose* (Wei et al., 2015)

2.สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน

มีรายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มนี้ ทำหน้าที่ในการแบ่งเซลล์ (cell division) การแบ่งเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะไปกระตุ้นพัฒนาการเกิดยอด เกิดการพัฒนาสัณฐาน (morphogenesis) กล่าวคือ ทำให้เนื้อเยื่อเปลี่ยนรูปร่างหรือเข้าสู่กระบวนการ Differentiation และ Development นอกจากนี้ยังมีหน้าที่กระตุ้นการแตกตาข้าง (adventitious budding) การเปิดปากใบ (stomatal opening) และการขยายใบ (leaf expansion) เป็นต้น (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552; Kumar et al., 2016) เมื่อใช้ไซโทไคนินที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการพัฒนาของราก (Schaller et al., 2015) สารไซโทไคนินธรรมชาติ คือ Kinetin (Kn) และ Zeatin (ZT) โดยในสภาพธรรมชาติจะมีอนุพันธ์ของอะดินีน (Adenine) (รูปที่ 6) สารทั้งสองชนิดนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมไปถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นไซโคนินสังเคราะห์ ได้แก่ 6-benzyladenine (BA)/ 6-benzyl amino purine (BAP) และ thidiazuron (TDZ)



รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนไซโทไคนิน

A) kinetin (Kn)

B) adenine

C) zeatin (ZT)

D) benzyladenine (BA)

E) thidiazuron (TDZ)

ที่มา : https://www.britannica.com/science/hormone/The-hormones-of-plants#ref594238

2.1 Kinetin (Kn)

ไคเนติน เป็นไซโทไคนินที่ถูกค้นพบเป็นชนิดแรกในพืช มีส่วนประกอบของอะดินีน ทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ไคเนตินนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย (CliniSciences, 2023b) โดยนิยมใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งจะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับออกซินตัวอื่น นอกจากนี้ยังสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จากชิ้นส่วนของเมล็ดและข้อ

ตัวอย่างเช่น ในไผ่ *P. pubescens* Mazel ex H. De Lehale และ *B. arundinacea* (Sood et al., 2014; Ventachalam et al., 2015)

2.2 Zeatin (ZT)

ซีเอติน ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายตัวของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในพืช พบมากในน้ำมะพร้าว (trans-zeatin) ซึ่งทำให้น้ำมะพร้าวถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาในพืช (Yong et al., 2009) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการขยายแคลลัส ในไผ่ *Phyllostachys heterocycle* var. pubescens (Mazel ex J. Houz.) Ohwi เมื่อใช้ Zeatin ร่วมกับ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จากเมล็ด และบางส่วนของแคลลัสเกิดเป็น embryogenic callus ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ต่อไป (Yuan et al., 2013)

2.3 Benzyl adenine (BA)

ไซโตไคนินเป็นกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์และมีผลต่อ การเจริญของตาข้าง (Brault and Maldiney, 1999) โดย BA เป็นสารที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดยอด โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หากกล่าวถึงการชักนำให้เกิดยอด/ ยอดทวีคูณ งานวิจัยพืชในหลายงานวิจัยมักใช้ BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต เนื่องจากหาซื้อได้ง่าย และราคาไม่แพง ในไผ่ *B.vulgaris* ‘Striata’ ใช้ BA เพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ramanayake et al., 2006) และเมื่อใช้ BA ร่วมกับสารควบคุมการเจริญตัวอื่นสามารถทำให้เกิดการชักนำให้เกิดยอดได้ดีขึ้น เช่น ในไผ่ *B. arundinacea* (Retz.) ชักนำให้เกิดยอดได้ดี เมื่อใช้ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 87.2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 24.2 ยอด (Venkatachalam et al., 2015)

2.4 Thidiazuron (TDZ)

Thidiazuron หรือ TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม phenylurea มีฤทธิ์คล้ายสารกลุ่มไซโทไคนิน (Shan et al., 2000) เมื่อใช้สารที่ความเข้มข้นต่ำจะช่วยส่งเสริมการพัฒนาของพืช สามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสได้ (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) การใช้ TDZ ในการชักนำจะมีผลต่อเมตาบอลิซึมในเซลล์พืช โดยพืชที่ใช้สารนี้ในการชักนำให้เกิดยอดยอดมักไม่ยืดตัว ซึ่งอาจเข้าไปรบกวนการทำงานของฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ทำให้พืชไม่เจริญพัฒนาหรือมีการพัฒนาที่ผิดแปลกไป เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไผ่ *Bambusa edulis* พบว่าเมื่อใช้ TDZ ไผ่ออกดอกหลังจากทำการปลูก (Lin et al., 2004) อย่างไรก็ตาม Thidiazuron นั้นสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งออกซินและไซโทไคนิน (Guo et al., 2011)

บทที่ 3 : วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1.พืชที่ใช้ในการทดลอง : ต้นไผ่ดำ

(ใช้ส่วนข้อไผ่จากแปลงไผ่ของวิสาหกิจชุมชนนวัตกรรมไผ่บ้านเกาะรัง อำเภอเขาฉกรรณ์ จังหวัดสระแก้ว)

2.สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร

2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร

1) MS (Murashige and skoog, 1962)

2) Gelrite (SIGMA, USA. Cat. No. 043K0095)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

1) Thidiazuron (TDZ)

2) Benzyladenine (BA)

3) Kinetin (Kn)

4) Indole-3-acetic acid (IAA)

5) 3-Indolebutylric acid (IBA)

6) Naphthyl acetic acid (NAA)

7) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

2.3 สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ

1) Ethyl alcohol 95%

2) Mercuric chloride

3) Tween 20

4) ไฮเตอร์ (6% Sodium hypochlorite)

3. เครื่องมือ

3.1 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับใช้เตรียมอาหาร

1) เครื่องชั่งแบบละเอียดและหยาบ

2) เครื่องวัดความเป็น กรด-เบส

3) หม้อนึ่งความดันไอ

4) hot air ovens

5) กระบอกตวง

6) ปิเปต

7) ช้อนตักสารเคมี

8) บีกเกอร์ขนาดใหญ่

9) ภาชนะบรรจุอาหารพร้อมฝาปิด

10) แท่งแก้วคนสาร

3.2 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับตัดและถ่ายเนื้อเยื่อ

1) ตู้ปลอดเชื้อ

2) ตะเกียงแอลกอฮอล์

3) จานแก้ว

4) ด้ามมีดเบอร์ 4 และ7 พร้อมใบมีดเบอร์ 11 และ24

5) ปากคีบ

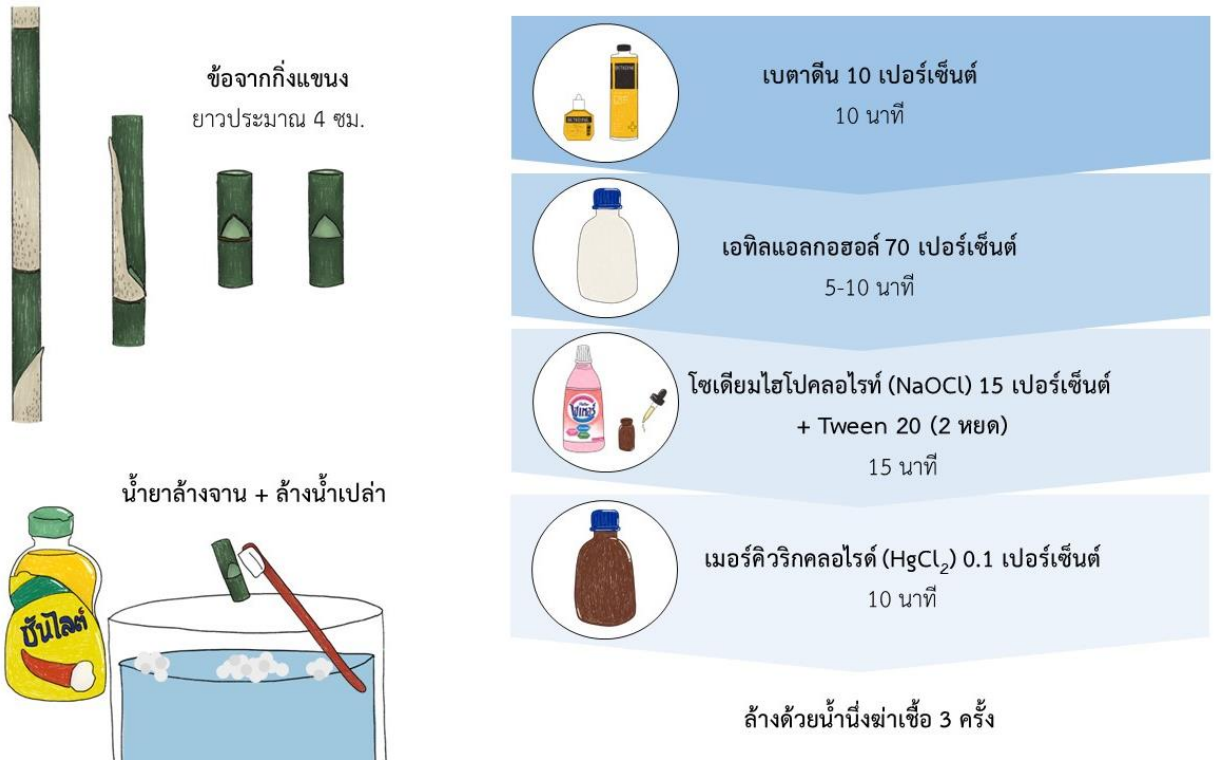
6) ขวดแช่เครื่องมือ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ขั้นตอนการทดลอง

การฟอกชิ้นส่วนข้อแขนงของไผ่ดำ

นำชิ้นส่วนข้อจากกิ่งแขนงที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4-0.8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำสบู่ หรือน้ำยาล้างจาน และล้างน้ำเปล่าให้สะอาด นำข้อที่สะอาดแช่ลงในเบตาดีน 10 เปอร์เซ็นต์ 10 นาที เมื่อครบเวลาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นจุ่มข้อในเอทิลแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5-10 นาที โดยเขย่าเบา ๆ ทุก 1 นาที ย้ายข้อลงในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 15 เปอร์เซ็นต์ หยด tween20 2 หยด เป็นเวลา 15 นาที และล้างน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นย้ายข้อลงในเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที เขย่าทุก 1 นาที ล้างน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



รูปที่ 7 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของไผ่ดำ

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บไผ่ดำในระยะเวลา 1 ปี

เก็บชิ้นส่วนข้อแขนงของต้นไผ่ดำจากจังหวัดสระแก้ว ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ.2561 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2562 โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เก็บผลการทดลองเมื่อครบ 14 วัน

บันทึกผลผลการทดลอง

1.เดือนและฤดูที่เก็บผล

2.อุณหภูมิ (◦C)

3.ปริมาณน้ำฝน (มิลลิเมตร)

4.จำนวนชิ้นตัวอย่าง

5.จำนวนข้อที่ปนเปื้อน

6.เปอร์เซ็นการปนเปื้อน

7.จำนวนข้อที่แตกยอดจากชิ้นตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อน

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ

นำข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัด ให้มีขนาด 2 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลงที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว หรือ TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ รวมจำนวน 13 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 10 MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 11 MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 12 MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 13 MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยอาหาร 13 สูตร ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น (Gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.6 นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ 35-40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 10 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเมื่อครบ 14 วัน

จากการทดลองที่ 1 เมื่อได้สูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอด นำสูตรอาหารที่ดีสุดไปเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองสูตรอาหารละ 10 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเมื่อครบ 14 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1.เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนข้อที่เกิดยอดจากตาข้าง

2.จำนวนยอดที่เกิดจากตาข้าง

3.ความยาวยอด (เซนติเมตร)

4.ลักษณะการเจริญเติบโตของยอด

5.วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ โดย Dancan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทดลองที่ 2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของยอด

นำยอดจากส่วนข้อที่มีความสูง 2.0 เซนติเมตรขึ้นไป ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารแข็งสูตร MS จากสูตรที่ดีที่สุดในการทดลองที่ 1 มาตัดความขวาง ให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 13 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 MS + 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 10 MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 11 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 12 MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 13 MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยอาหาร 13 สูตร ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น (Gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 10 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1.เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เกิดแคลลัส

2.การเจริญเติบโตของแคลลัสโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

3.ลักษณะของแคลลัส

4.วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Dancan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการขยายกลุ่มแคลลัส

นำแคลลัสที่มีขนาด 0.2 - 0.5 เซนติเมตร และมีลักษณะเป็น fiable callus (จับตัวกันอย่างหลวม ๆ สามารถแยกออกจากกันได้ง่าย) ที่ได้จากสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 8 สูตร เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส มีดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + 2.4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 MS + 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหาร 8 สูตร ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น (Gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 5 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1.เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนแคลลัสเริ่มต้นที่มีการเติบโต

2.การขยายขนาดของแคลลัสโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

3.ลักษณะของแคลลัส

4.วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Dancan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 4 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส

นำแคลลัสที่มีลักษณะ friable callus เรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ สามารถแยกออกจากกันได้ง่าย เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงสูตรที่ดีที่สุด จากการทดลองที่ 3 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 MS + TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 10 MS + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหาร 10 สูตร ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น (Gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่ความเข้มแสงประมาณ 35-40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 5 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเป็นเวลา 45 วัน เปลี่ยนอาหารทุก 14 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1.เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดในอาหารสูตรต่าง ๆ

2.จำนวนยอด

3.ลักษณะของยอด

4.การเจริญเติบโตของแคลลัส

5.วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Dancan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 5 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอดเพาะเลี้ยง

นำกลุ่มยอดที่จากการทดลองที่ 1 ที่มีอายุมากกว่า 3 สัปดาห์ ความยาว 6-10 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง 4 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 1/2MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 1/2MS + NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 1/2MS + IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 1/2MS + IAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหาร 4 สูตร ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น (Gelrite) 2.2 กรัมต่อลิตร และเติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่ความเข้มแสงประมาณ 35-40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 10 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเป็นเวลา 90 วัน

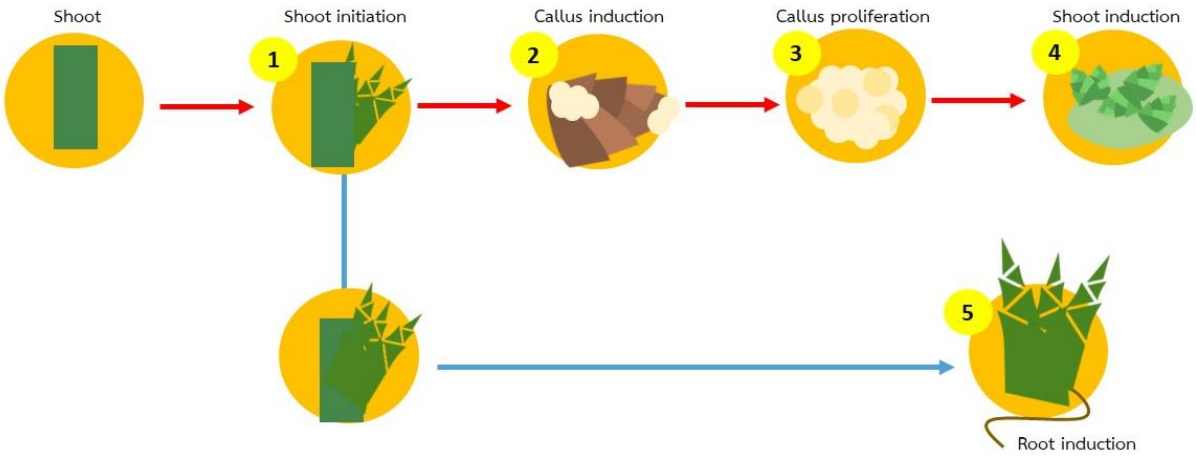
การบันทึกผลการทดลอง

1.เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มยอดที่เกิดราก

2.จำนวนรากและความยาวรากจากกลุ่มยอด

3.ลักษณะการเจริญเติบโตของราก

4.วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Dancan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 8 แผนภาพขั้นตอนการทดลอง

1) การชักนำให้เกิดยอดจากข้อ

2) การชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอด

3) การขยายแคลลัส

4) การชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส

5) การชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4 : ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บไผ่ดำในระยะเวลา 1 ปี

ผลการศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บไผ่ดำเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะเวลา 1 ปี จากการเก็บตัวอย่างไผ่ดำจากจังหวัดสระแก้วในแต่ละเดือน ตั้งแต่ช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562 โดยนำชิ้นส่วนข้อไผ่ดำที่มีความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีการ aseptic technic (รูปที่ 7) และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน พบว่าฤดูที่พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียมากที่สุด (รูปที่ 9) คือ ฤดูฝน (ปลายพฤษภาคม-กลางตุลาคม, ตารางที่ 1) เกิดการปนเปื้อนเฉลี่ยสูงที่สุด (63.20%, ตารางที่ 2) โดยในอุณหภูมิช่วงฤดูฝนอยู่ที่ 19-40 องศาเซลเซียส และมีปริมาณน้ำฝน 128.8-361.3 มิลลิเมตร และฤดูที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียน้อยที่สุด คือ ฤดูหนาว (กลางพฤศจิกายน-กลางกุมภาพันธ์, ตารางที่ 1) พบการปนเปื้อนเฉลี่ยเพียง 29.32% (ตารางที่ 2) ซึ่งในฤดูหนาวมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 10-37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณน้ำฝน 20.0-46.1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยกว่าในช่วงฤดูฝน และการศึกษาการปนเปื้อนของไผ่ดำในช่วงฤดูร้อน พบการปนเปื้อน 33.50% (ตารางที่ 2) นอกจากนี้การแตกยอดจากข้อของไผ่ดำในฤดูหนาวให้การแตกยอดสูงสุด 42.58% รองลงมา ได้แก่ ฤดูร้อน (29.66%) และฤดูฝน (28.49%) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

นอกจากนี้พบว่ามีการแตกยอดสูงในช่วงฤดูฝน แม้ว่าในฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2561 - มกราคม 2562) จะให้เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำที่สุดใน 1 ปี แต่มีจำนวนการแตกยอดที่น้อยกว่าในฤดูฝน (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามในเดือนมกราคม 2562 ให้จำนวนการแตกยอดจากข้อสูงที่สุด ดังนั้นฤดูที่เหมาะสมสำหรับการเก็บชิ้นส่วนข้อแขนงของไผ่ดำ คือ ฤดูหนาว และควรเก็บในช่วงเดือนมกราคม

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บชิ้นส่วนข้อไผ่ดำในรอบ 1 ปี

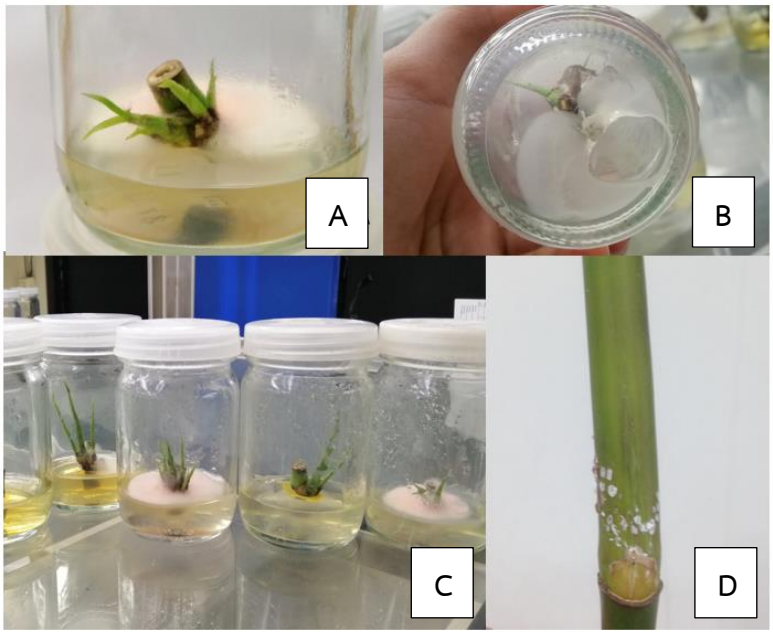
ปี	เดือน	ฤดู	อุณหภูมิ[1/] (°C)	ปริมาณน้ำฝน[1/] (มิลลิเมตร)	จำนวนชิ้นตัวอย่าง	จำนวนข้อที่ปนเปื้อน	% การปนเปื้อน	จำนวนข้อที่แตกยอด
2561	พฤษภาคม	ฝน	19.2-40.0	128.8	124	97	78.23	25
	กรกฎาคม	ฝน	20.0-40.0	264.6	152	85	55.92	38
	สิงหาคม	ฝน	20.0-37.0	256.6	92	62	67.39	24
	กันยายน	ฝน	20.3-38.1	361.3	91	43	47.25	43
	ตุลาคม	ฝน	20.0-37.0	215.6	189	127	67.20	30
	พฤศจิกายน	หนาว	12.5-37.4	46.1	109	21	19.27	35
	ธันวาคม	หนาว	11.3-26.4	20.0	200	53	26.50	85
2562	มกราคม	หนาว	10.8-28.1	26.0	128	54	42.19	68
	กุมภาพันธ์	ร้อน	20.0-40.0	40.5	115	33	28.70	47
	พฤษภาคม	ร้อน	20.0-43.0	35.3	141	54	38.30	26

[1/] ข้อมูลจากกรมอุตุนิยมวิทยา (www.tmd.go.th)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยการปนเปื้อนของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นไผ่ดำในช่วงปี 2561-2562

ฤดู	อุณหภูมิ (°C) ต่ำสุด/สูงสุด[1/]	ปริมาณน้ำฝน (มิลลิเมตร) ต่ำสุด/สูงสุด[1/]	% การปนเปื้อน[1/]	% การแตกยอด[1/] (จากข้อที่ปลอดเชื้อ)
ฝน	19-40	128.8-361.3	63.20	28.49
หนาว	10-37	20.0-46.1	29.32	42.58
ร้อน	20-43	35.3-40.5	33.50	29.66

[1/] ค่าเฉลี่ยจากตารางที่ 1



รูปที่ 9 การปนเปื้อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ดำ

A) การปนเปื้อนของเชื้อรา

B) การปนเปื้อนของแบคทีเรีย

C) การปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียบนอาหารสูตร MS ที่มีการแตกตาข้าง

D) ชิ้นส่วนข้อไผ่ที่มีเพลี้ยเกาะ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อไผ่ดำ โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เพียงอย่างเดียว หรือ TDZ ร่วมกับ BA รวม 13 สูตร เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.8 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 1.3 เซนติเมตร ยอดมีลักษณะเรียวเล็ก (ตารางที่ 2; รูป 10C) และพบความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความยาวยอดเฉลี่ย 2.1 เซนติเมตร (ตารางที่ 2; รูป 10E) ลักษณะของยอดเรียวเล็ก เมื่อใช้ TDZ ร่วมกับ BA พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น ยอดที่เกิดขึ้นมีอาการฉ่ำน้ำ เจริญเติบโตไม่ดี อวบและยอดมีสีขาว (albino) ไม่สามารถนำไปใช้ในการทดลองถัดไปได้ รวมไปถึงบริเวณกาบยอดมีสีน้ำตาล (รูป 10J-10M)

ในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ TDZ ในช่วง 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว พบว่าจำนวนยอดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น จนถึงที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.1$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยมีจำนวนยอดอยู่ในช่วง 2.3-2.8 ยอด จากนั้นจำนวนยอดลดลงเมื่อความเข้มข้นของ TDZ เพิ่มขึ้นเป็น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.6 ยอด) และมีค่าเฉลี่ยความยาวอยู่ในช่วง 1.0-1.7 เซนติเมตร เมื่อใช้ TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น พบว่า BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดมีลักษณะเรียวเล็ก แต่ยอดเริ่มอวบที่ TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดอยู่ในช่วง 1.4-2.5 ยอด ซึ่งลดลงเมื่อเทียบกับการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นจากข้อยังมีลักษณะอวบและฉ่ำน้ำ ยอดไม่สมบูรณ์ เมื่อพิจารณาจากจำนวนยอดและลักษณะของยอด สูตรอาหารที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ BA ที่ความเข้มข้นเหมาะสม คือ อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของสารทั้งสองเพิ่มขึ้น ความยาวของยอดลดลงอยู่ในช่วง 1.0-1.4 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามการชักนำให้ยอดในไผ่ดำด้วยการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว หรือ TDZ ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เกิดยอดจากข้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

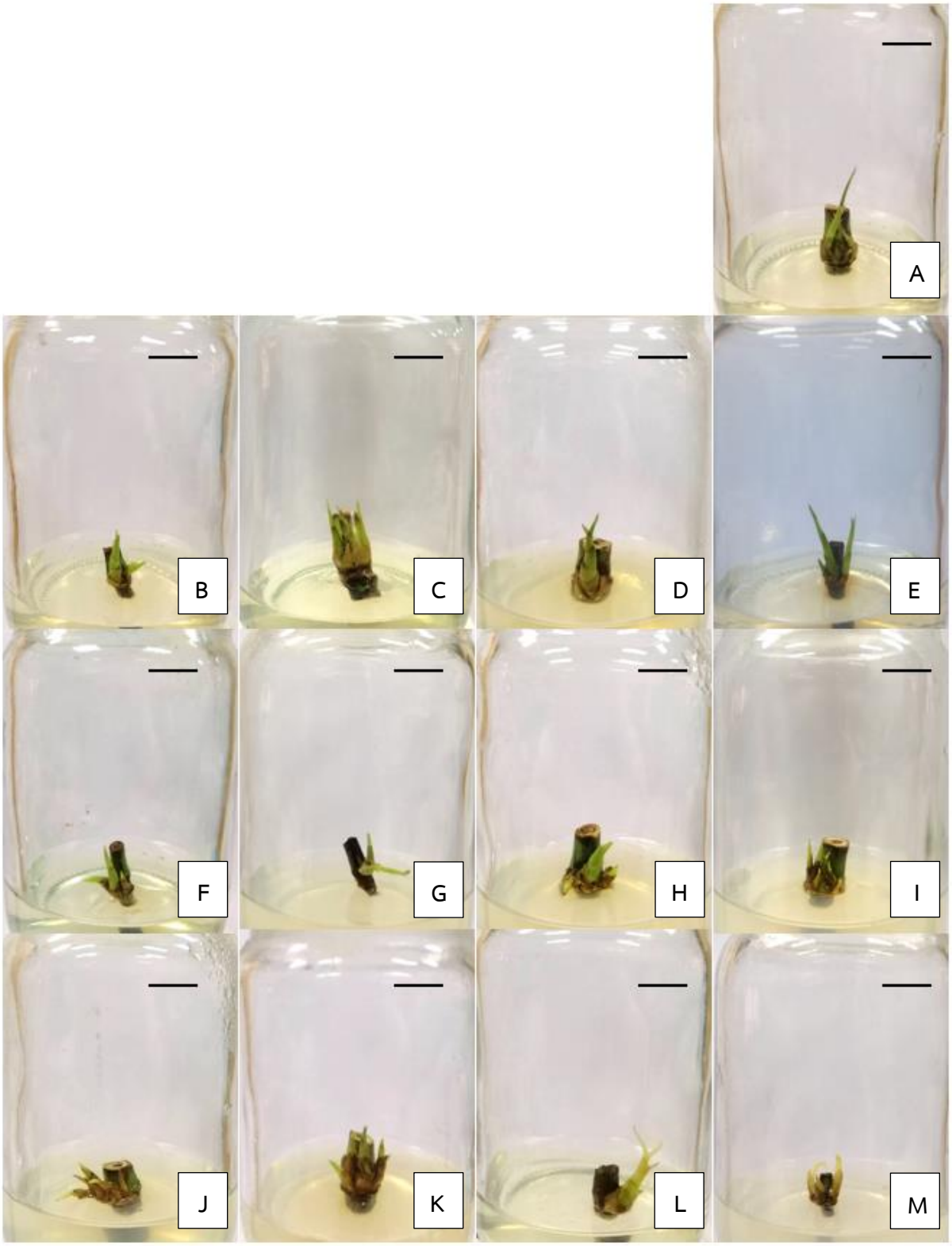
ทั้งนี้เมื่อทำการทดลองเพิ่มเติม เพื่อเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดยอดด้วยการใช้น้ำมะพร้าวร่วมกับสูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด, ตารางที่ 2) พบว่าการเพิ่มน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ

0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากขึ้นถึง 6.4 ยอด (ตารางที่ 3; รูป 11C) เป็นจำนวนยอดสูงสุงอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.05) ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดจากข้อของไผ่ดำ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ผลของ TDZ เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับ BA ในอาหารสูตร MS ต่อการเกิดยอดจากตาข้างของข้อไผ่ดำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

สูตรที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		% การเกิดยอด	การเจริญเติบโตของยอดจากส่วนข้อ [1/]		
	TDZ	BA		จำนวนยอด	ความยาวยอด (ซม.)	ลักษณะยอด
1	-	-	100	2.3 ± 0.4^{ab}	1.3 ± 0.2^{b}	เรียวเล็ก
2	0.1	-	100	2.5 ± 0.3^{ab}	1.0 ± 0.1^{b}	เรียวเล็ก
3	0.2	-	100	2.8 ± 0.4^{a}	1.3 ± 0.3^{b}	เรียวเล็ก
4	0.3	-	100	1.6 ± 0.3^{ab}	1.7 ± 0.4^{ab}	เรียวเล็ก
5	0.1	1.0	100	2.5 ± 0.5^{ab}	2.1 ± 0.5^{a}	เรียวเล็ก
6	0.2	1.0	100	2.6 ± 0.6^{ab}	1.0 ± 0.1^{b}	เรียวเล็ก
7	0.3	1.0	100	2.0 ± 0.3^{ab}	1.0 ± 0.3^{b}	เรียวเล็ก
8	0.1	2.0	100	2.4 ± 0.5^{ab}	1.1 ± 0.2^{b}	เรียวเล็ก
9	0.2	2.0	100	2.6 ± 0.4^{ab}	1.4 ± 0.2^{b}	เรียวเล็ก
10	0.3	2.0	100	2.4 ± 0.5^{ab}	1.1 ± 0.2^{b}	อวบ
11	0.1	3.0	100	2.5 ± 0.6^{ab}	1.4 ± 0.2^{b}	อวบ ฉ่ำน้ำ
12	0.2	3.0	100	1.4 ± 0.2^{b}	1.2 ± 0.4^{b}	อวบ ฉ่ำน้ำ
13	0.3	3.0	100	1.8 ± 0.3^{ab}	1.4 ± 0.2^{b}	อวบ ฉ่ำน้ำ

[1/] ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± SE ที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.1$) วิเคราะห์โดย DMRT


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M

รูปที่ 10 การเจริญเติบโตของยอดจากข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียวและ TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (สเกล = 1 เซนติเมตร)

A) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ชุดควบคุม)

B) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

D) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

E) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

F) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

G) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

H) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

I) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

J) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

K) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

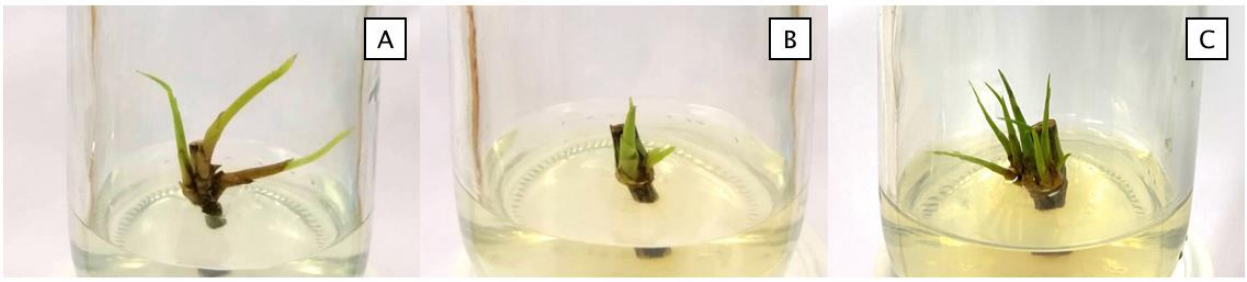
L) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

M) ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4 ผลของน้ำมะพร้าวในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดยอดจากตาข้างของข้อไผ่ดำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

MS + TDZ 0.2 มก/ล	จำนวนยอด[1/]	ความยาวยอด[1/]	ลักษณะยอด
ไม่ได้เติมน้ำมะพร้าว	2.8 ± 1.32[a]	1.3 ± 0.9[a]	เขียว เรียวยาว
เติมน้ำมะพร้าว 5%	6.4 ± 0.52[b]	1.5 ± 0.2[a]	เขียว เรียวยาว ยอดแตกจากกอจำนวนมาก
Sig. (T-test)	0	0.43	

[1/] ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± SE ที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) วิเคราะห์โดย DMRT



รูปที่ 11 ลักษณะกลุ่มของยอดของไผ่ดำที่เกิดจากตาที่ข้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ชนิดเดียวหรือร่วมกับ BA หรือน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

A) อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

B) อาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) อาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของยอด

ผลการศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนยอดเป็นเวลา 30 วัน โดยใช้ชิ้นส่วนยอดจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ยอดไผ่มาตัดเป็นท่อน ยาว 0.5 เซนติเมตรวางบนอาหารในแนวนอนและเพาะเลี้ยงในที่มืด พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีขนาดแคลลัส 0.191 เซนติเมตร (ตารางที่ 4) ลักษณะแคลลัสเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) สีของแคลลัสมีสีขาว-เหลือง (รูป 12E) จากตารางพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้น มีผลให้การเจริญของแคลลัสเพิ่มขึ้นตามลำดับ (เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น ได้แก่ 0%, 30%, 40% และ 100%) แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D มีค่าสูงสุด (6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้การเจริญของแคลลัสเริ่มลดลง

จากการใช้ 2,4-D ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ ได้แก่ 2,4-D ร่วมกับ BA [(3.0, 3.0), (4.0, 2.0), (5.0, 1.0)] และ 2,4-D ร่วมกับ BA และ IBA [(3.0, 3.0, 0.5), (4.0, 2.0, 0.5), (5.0, 1.0, 0.5)] พบว่าแคลลัสสามารถเจริญได้ดี ในอาหารที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมติอลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาด 0.206 เซนติเมตร และมีลักษณะเป็น friable callus มีสีขาว-เหลือง (ตารางที่ 4; รูป 12I) เช่นเดียวกันกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) และในอาหารสังเคราะห์ทั้งสองสูตรนี้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการเกิดแคลลัสเกิดจากส่วนปลายตัดยอด (รูป 12H และ 12I) และบริเวณโคน (รูปที่ 12C-12F และ 12L) รวมไปถึงแคลลัสเกิดบริเวณรอยผ่ากลางยอด (รูปที่ 12B, 12C, 12D, 12F, 12G และ12K) แคลลัสบางส่วนอยู่ใต้กาบทำให้เห็นเป็นลักษณะคล้าย compact callus (รูปที่ 12D และ 12E) แต่เมื่อนำส่วนกาบออกและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมแคลลัสมีลักษณะเป็น friable callus อย่างไรก็ตามแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสของไผ่ดำคืออาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกนำไปใช้ในการทดลองการขยายแคลลัส เนื่องจากอาหารสังเคราะห์ทั้งสอง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และผลทางสถิติไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้แคลลัสไม่แตกต่างกัน (เป็น friable callus)

ตารางที่ 5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ IBA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอด เป็นเวลา 30 วัน

สูตรที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)			% การเกิดแคลลัส	การเจริญเติบโตแคลลัส[1/]		
	2,4-D	BA	IBA		เส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	ลักษณะแคลลัส	สี
1	-	-	-	0	0.000 ± 0.000^{d}	ไม่เกิด	-
2	2.0	-	-	30	0.060 ± 0.033^{cd}	Friable callus	Yel.-br.
3	3.0	-	-	40	0.055 ± 0.024^{cd}	Friable callus	Yel.-br.
4	4.0	-	-	100	0.178 ± 0.016^{a}	Friable callus	Wh.-Yel.
5	5.0	-	-	100	0.191 ± 0.029^{a}	Friable callus	Wh.-Yel.
6	6.0	-	-	100	0.178 ± 0.017^{a}	Friable callus	Wh.-Yel.
7	3.0	3.0	-	40	0.049 ± 0.021^{cd}	Friable callus	Yel.-br.
8	4.0	2.0	-	50	0.043 ± 0.016^{cd}	Friable callus	Yel.-br.
9	5.0	1.0	-	100	0.206 ± 0.022^{a}	Friable callus	Wh.-Yel.
10	3.0	3.0	0.5	10	0.010 ± 0.010^{cd}	Friable callus	Yel.-br.
11	4.0	2.0	0.5	30	0.080 ± 0.047^{bc}	Friable callus	Yel.-br.
12	5.0	1.0	0.5	100	0.099 ± 0.009^{b}	Friable callus	Wh.-Yel.

[1/] ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± SE ที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) วิเคราะห์โดย DMRT

***หมายเหตุ** Wh. = White (แคลลัสที่มีสีขาว)

Yel. = Yellow (แคลลัสที่มีสีอมเหลือง)

Br. = Brown (แคลลัสที่มีสีน้ำตาล)

Bl. = Black (แคลลัสที่มีสีดำ)

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

รูปที่ 12 การเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวและ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (สเกล = 2 มิลลิเมตร)

A) อาหารสูตร MS (ชุดควบคุม)

B) อาหารสูตร MS + 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) อาหารสูตร MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

D) อาหารสูตร MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

E) อาหารสูตร MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

F) อาหารสูตร MS + 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

G) อาหารสูตร MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

H) อาหารสูตร MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

I) อาหารสูตร MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

J) อาหารสูตร MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

K) อาหารสูตร MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

L) อาหารสูตร MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 3 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการขยายกลุ่มแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 2 จากสูตรอาหาร MS ที่เติม 2.4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงมาแล้วเป็นเวลา 30 วันโดยนำ friable callus (เรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ สามารถแยกออกจากกันได้ง่าย) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว (4.0 หรือ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA [(3.0, 10), (6.0, 5.0), (6.0, 10.0)] หรือ 2,4-D ร่วมกับ Kn [(3.0, 2.0), (6.0, 1.0)] เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วันในที่มืด

เมื่อนำแคลลัสมาเพาะบนอาหารสังเคราะห์รวม 8 สูตรดังกล่าว พบว่าเมื่อผ่านไป 14 วัน แคลลัสบางส่วนมีสีน้ำตาลแก่ (browning) (รูป 14A) ยังคงมีลักษณะเป็น friable callus เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าแคลลัสที่มีสีน้ำตาลกลายเป็นแคลลัสสีที่เข้มขึ้น (ดำ-น้ำตาลเข้ม) (รูปที่ 13) โดยสูตรอาหารที่ชักนำให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้น (+) มากที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (0.161 เซนติเมตร) ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 13H โดยสูตรอาหารนี้สามารถขยายแคลลัสได้ดีที่สุดและแตกต่างจากสูตรอาหารอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่เกิดบนอาหารสูตรนี้บางส่วนได้เปลี่ยนแปลงไปเป็น embryogenic callus (แคลลัสเกาะกลุ่มกันแน่นขึ้น แต่ไม่ใช่ลักษณะของ compact callus) (รูป 14B) เมื่อนำขวดอาหารที่มีกลุ่มแคลลัสที่ขยายกลุ่มแล้ววางบนชั้นที่มีแสง พบว่าแคลลัสบางส่วนเปลี่ยนแปลงจากที่มีสีขาว-เหลืองไปเป็นแคลลัสสีเขียว (รูป 13H) สูตรอาหารขยายกลุ่มแคลลัสสูตรอื่นเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 วัน พบว่าแคลลัสมีสีน้ำตาล-ดำ และมีการขยายแคลลัสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตารางที่ 5) (รูป 13A-13F)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายแคลลัสของไผ่ดำ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ Kn ต่อการขยายแคลลัส เป็นเวลา 30 วัน

สูตรที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)			% การขยายขนาดแคลลัส	การเจริญเติบโตแคลลัส[1/]			
	2,4-D	BA	Kn		ขนาด (+/0)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	ลักษณะของแคลลัส	สี
1	-	-	-	100	0	0.000 ± 0.000[b]	Friable callus	Br.-Bl.
2	3.0	-	2.0	100	+	0.033 ± 0.019[b]	Friable callus	Yel.-Br.
3	3.0	1.0	-	100	+	0.058 ± 0.033[b]	Friable callus	Yel.-Br.
4	6.0	-	1.0	100	+	0.010 ± 0.010[b]	Friable callus	Yel.-Br.
5	6.0	5.0	-	100	+	0.060 ± 0.033[b]	Friable callus	Yel.-Bl.
6	6.0	10.0	-	100	+	0.032 ± 0.027[b]	Friable callus	Yel.-Bl.
7	4.0	-	-	100	+	0.050 ± 0.018[b]	Friable callus	Yel.-Br.
8	5.0	-	-	100	+	0.161 ± 0.041[a]	Friable callus /Embryogenic callus	Wh.-Yel.-Gr.

[1/] ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± SE ที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) วิเคราะห์โดย DMRT

***หมายเหตุ** Wh. = White (แคลลัสที่มีสีขาว)

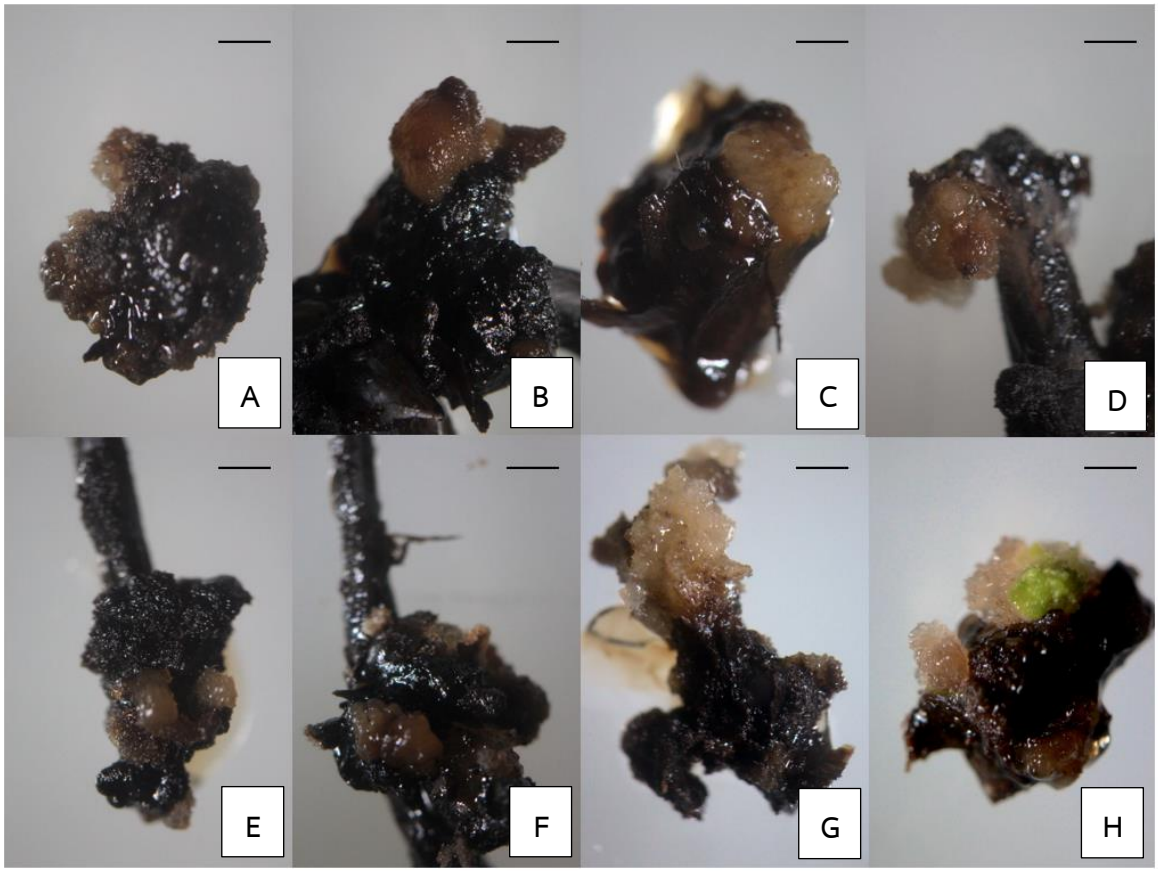
Yel. = Yellow (แคลลัสที่มีสีอมเหลือง)

Br. = Brown (แคลลัสที่มีสีน้ำตาล)

Bl. = Black (แคลลัสที่มีสีดำ)

+ = มีการเพิ่มขึ้น/ ขยายตัวของกลุ่มแคลลัส

0 = ไม่มีการเพิ่ม/ ขยายตัวของกลุ่มแคลลัส



รูปที่ 13 การเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวและ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ Kn ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (สเกล = 1 มิลลิเมตร)

A) อาหารสูตร MS (ชุดควบคุม)

B) อาหารสูตร MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) อาหารสูตร MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

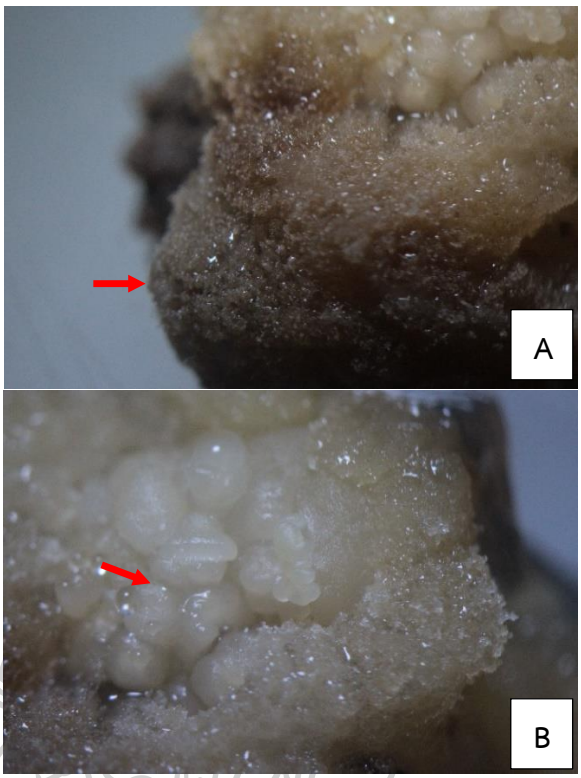
D) อาหารสูตร MS + 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

E) อาหารสูตร MS + 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

F) อาหารสูตร MS + 2,4-D 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

G) อาหารสูตร MS + 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

H) อาหารสูตร MS + 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 14 แคลลัสที่เกิดจากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
A) friable callus ที่เริ่มเปลี่ยนสี จากสีขาวอมเหลืองเปลี่ยนเป็น สีน้ำตาลอ่อน (browning)
B) embryogenic callus ที่เกิดขึ้นบนก้อนแคลลัส

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทดลองที่ 4 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส

เมื่อนำแคลลัสขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ, BA, NAA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในที่มีแสง เป็นระยะเวลา 45 วัน

พบว่าแคลลัสที่นำมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ เพียงอย่างเดียว ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 0 (ตารางที่ 6) แคลลัสมีสีคล้ำขึ้น (สีน้ำตาลเข้ม-ดำ) (รูป 15A-15D) และอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ (0.1-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าที่ความเข้มข้นของ TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอด 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 15.2 ยอด ความยาวยอด 0.027 เซนติเมตร (ตารางที่ 6) ยอดที่ยืดยาว สีเขียว (รูป 15F) สำหรับแคลลัสที่เกิดขึ้นมามีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (friable callus เกาะตัวกันแน่นขึ้น หรือบางส่วนเปลี่ยนแปลงไปเป็น embryogenic callus) และแคลลัสบางส่วนเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลแก่-ดำ

สำหรับการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยเกิดยอด 14.6 ยอด และมีความยาวเฉลี่ยสูงสุด 0.074 เซนติเมตร (ตารางที่ 6) ลักษณะของยอดมีสีเขียวอ่อน-สีเขียวเข้ม แคลลัสบางส่วนมีสีเขียว(รูป 16B) และมีบางส่วนที่ตายไป (เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแก่-ดำ) (รูป 15I)

จากการเก็บผลการทดลองในระยะเวลา 21 วัน พบว่ากลุ่มแคลลัสที่ได้นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสในช่วง 10-15 วัน โดยแคลลัสมีลักษณะ friable callus เรียงตัวอย่างหลวม ๆ บางกลุ่มก้อนมีการเกาะกลุ่มแน่นขึ้น (รูป 16D) นอกจากนี้เมื่อสังเกตในก้อนแคลลัสพบว่าปรากฏยอดเล็ก ๆ หรือก้อนแคลลัสกลมที่มีสีเขียว ขนาดไม่เกิน 0.1 มิลลิเมตร (รูป 16C) เมื่อแคลลัสถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20-30 วัน พบว่ากลุ่มก้อนแคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนสีเขียวเริ่มให้ใบชัดเจนขึ้น (รูป 16B) และนอกจากนี้ในอาหารสูตร TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่เกิดขึ้นจากแคลลัสบางส่วนมีลักษณะฉ่ำน้ำ แคลลัสมีลักษณะเป็น friable callus สามารถแยกออกจากกันได้ง่าย (รูป 16A)

อย่างไรก็ตามพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสได้ดีที่สุด

ตารางที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว หรือ TDZ ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

สูตรที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				% การเกิดยอด	การเจริญเติบโตยอด[1/]		การเจริญเติบโตแคลลัส[1/]		
	TDZ	BA	NAA	2,4-D		จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	ขนาด (0/+)	ลักษณะแคลลัส	สี
1	-	-	-	-	0	0.00 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0	Friable	Br.-Bl.
2	0.2	-	-	-	0	0.00 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0	Friable	Br.-Bl.
3	0.3	-	-	-	0	0.00 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0	Friable	Br.-Bl.
4	0.4	-	-	-	0	0.00 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0	Friable	Br.-Bl.
5	0.1	1.0	-	-	0	0.00 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	+	Friable	Br.-Bl.
6	0.2	1.0	-	-	40	15.20 ± 7.504[a]	0.027 ± 0.014[b]	+	Embryogenic	Yel-Br.
7	0.3	1.0	-	-	0	0.00 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0	Friable	Br.-Bl.
8	0.4	1.0	-	-	0	0.00 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0	Friable	Br.-Bl.
9	-	1.0	0.5	0.5	60	14.60 ± 5.671[a]	0.074 ± 0.047[a]	+	Embryogenic	Yel.-Gr.
10	-	1.0	0.5	1.0	10	1.90 ± 1.900[b]	0.007 ± 0.007[b]	+	Embryogenic	Yel.-Gr.

[1/] ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± SE ที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.05) วิเคราะห์โดย DMRT

***หมายเหตุ** Wh. = White (แคลลัสที่มีสีขาว)

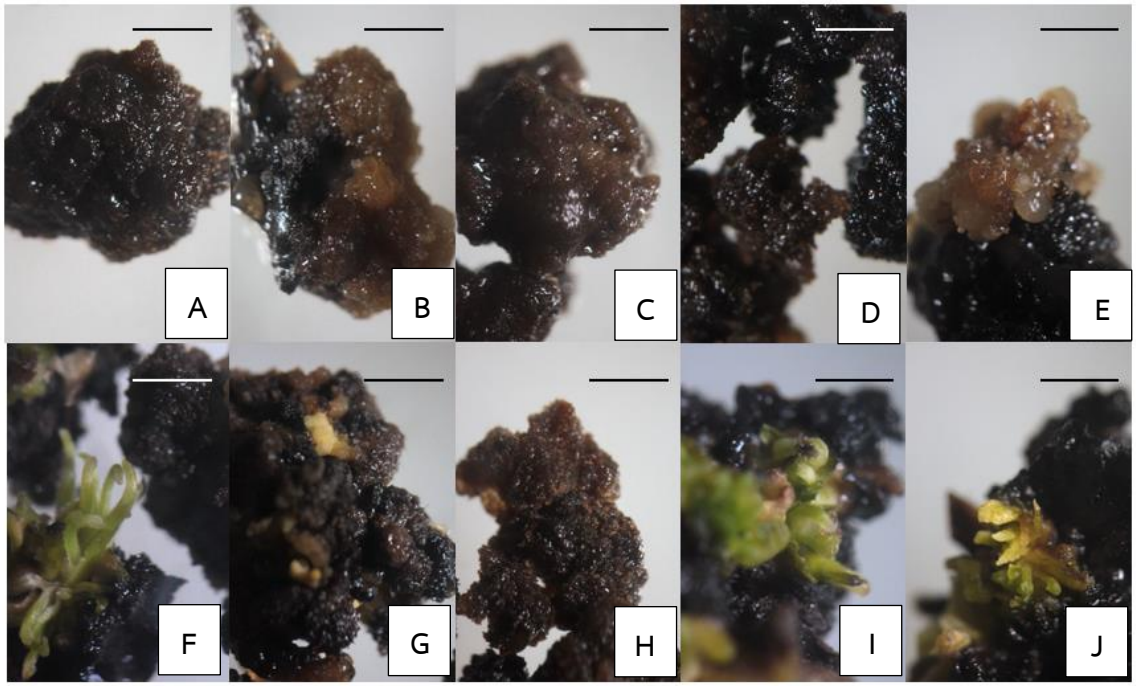
Yel. = Yellow (แคลลัสที่มีสีอมเหลือง)

Br. = Brown (แคลลัสที่มีสีน้ำตาล)

Bl. = Black (แคลลัสที่มีสีดำ)

+ = มีการเพิ่มขึ้น/ ขยายตัวของกลุ่มแคลลัส

0 = ไม่มีการเพิ่ม/ ขยายตัวของกลุ่มแคลลัส



รูปที่ 15 การเจริญเติบโตของแคลลัสและยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว หรือ TDZ ร่วมกับ BA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA และ NAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน (สเกล = 1 มิลลิเมตร)

A) อาหารสูตร MS (ชุดควบคุม)

B) อาหารสูตร MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) อาหารสูตร MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

D) อาหารสูตร MS + TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

E) อาหารสูตร MS + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

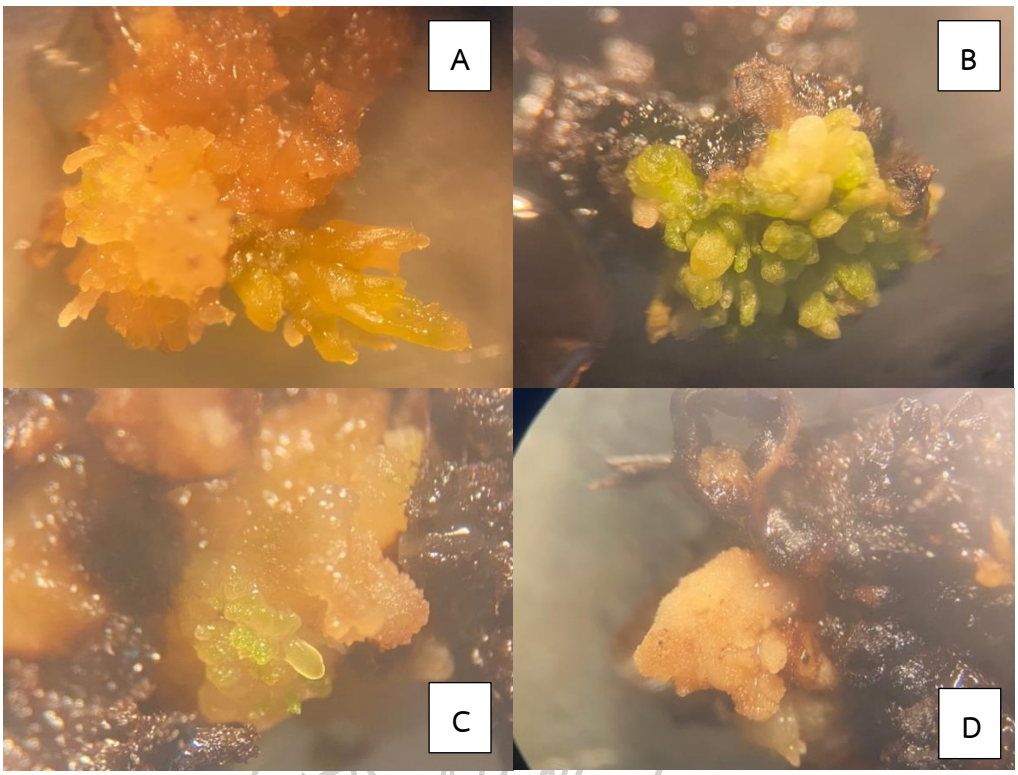
F) อาหารสูตร MS + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

G) อาหารสูตร MS + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

H) อาหารสูตร MS + TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

I) อาหารสูตร MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

J) อาหารสูตร MS + 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 16 แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอด

A) แคลลัสที่อวบน้ำ และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง กลุ่มก้อนแคลลัสเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ

B) แคลลัสที่สมบูรณ์ มีสีเขียว เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง กลุ่มก้อนแคลลัสเกาะกันแน่น

C) แคลที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เริ่มมีสีเขียวปรากฏ และกลุ่มก้อนแคลลัสเรียงตัวอย่างหลวม ๆ

D) แคลลัสที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ

ในการทดลองนี้ได้ลองนำกลุ่มแคลลัสที่เป็น embryogenic callus ที่ได้จากการการขยายแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูป 17A) มาเลี้ยงบนอาหารสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสทั้งก้อน เกิดยอดยืดยาว และแคลลัสมีการเกิดใหม่อย่างรวดเร็ว (รูป 17B และ 17C) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 7 วัน พบว่ายอดที่เกิดและแคลลัสบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเหลือง-น้ำตาลอ่อนและตายไป (รูป 17D)

รูปที่ 17 embryogenic callus ที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

A) embryogenic callus ที่เกิดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

B) ยอดและแคลลัสที่นำมาชักนำให้เกิดยอด บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) ยอดที่ยืดยาว บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

D) ยอดและแคลลัสที่เปลี่ยนสี เมื่อครบ 7 วัน

การทดลองที่ 5 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดเพาะเลี้ยง

การชักนำให้เกิดรากใช้กลุ่มยอดที่ได้จากสูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดมากที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ สูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IAA, IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองพบว่าอาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติม NAA และ IAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ (ตารางที่ 8) โดยพบการเกิดรากจากยอดที่เกิดขึ้นใหม่บริเวณโคนของกลุ่มยอดเก่า (รูป 18B และ 18D) และเมื่อรากเริ่มเจริญลงในอาหารแข็ง จะเกิดขนรากจำนวนมาก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในตอนแรกรากเจริญออกมาจากยอดที่มีสีเขียวมีลักษณะรากเป็นสีขาว และมีหมวกรากที่เห็นได้ชัดเจน เมื่อความยาวของรากเพิ่มมากขึ้น พบรากแขนงจำนวนมากที่มาจากรากที่เจริญออกมาก่อนในตอนแรก โดยสูตรอาหารที่เกิดรากแขนงจำนวนมาก คือ อาหารสูตร ½MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ อาหารสูตร ½MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดราก 20 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนรากต่อ 1 กลุ่มยอด 3 ราก ที่มีความยาวเฉลี่ย 6.23 เซนติเมตร โดยพบว่าในกลุ่มยอดที่เกิดรากเป็นกลุ่มยอดที่มียอดสีเขียวที่เกิดขึ้นมาใหม่ (ตารางที่ 8; รูป 18B, 18C และรูปที่ 19) โดยรากที่เกิดขึ้นแทรกออกมาจากรอยผ่าบริเวณโคนยอด (รูปที่ 20) เมื่อสังเกตกลุ่มยอดพบว่าเมื่อนำกลุ่มยอดที่มี 3 ยอดขึ้นไป มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่ากลุ่มยอดที่มียอดน้อยกว่า 3 ยอด โดยพบยอดที่แตกออกมาใหม่ (รูปที่ 18) และเมื่อนำยอดที่เกิดใหม่ผ่าบริเวณโคนตามแนวยาว พบว่าสามารถเกิดรากได้

ทั้งนี้เมื่อนำต้นที่เกิดรากออกปลูกในธรรมชาติและติดตามผลจำนวน 3 ต้น โดย 2 ต้นจากอาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติม NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 ต้น จากอาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติม IAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 22)

ตารางที่ 8 ผลของ NAA, IBA และ IAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 90 วัน

สูตรที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)			% การเกิดรากจากกลุ่มยอด	การเจริญเติบโตของราก[1/]			ลักษณะต้น
	NAA	IBA	IAA		จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)	ลักษณะราก	
1	-	-	-	0	-	-	-	ตาย
2	3	-	-	20	3.0	6.23	รากเกิดจากยอดสีเขียว มีรากแขนง	ยอดเก่าตาย แต่มียอดเกิดใหม่ขึ้น
3	-	3	-	0	-	-	-	ตาย
4	-		3	10	1.0	7.7	รากเกิดจากยอดสีเขียว มีรากแขนงมาก	ยอดเก่าตาย แต่มียอดเกิดใหม่ขึ้น

[1/] จากการทดลอง 10 ซ้ำ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รูปที่ 18 การชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอด บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เติม IAA, IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน

A) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม)

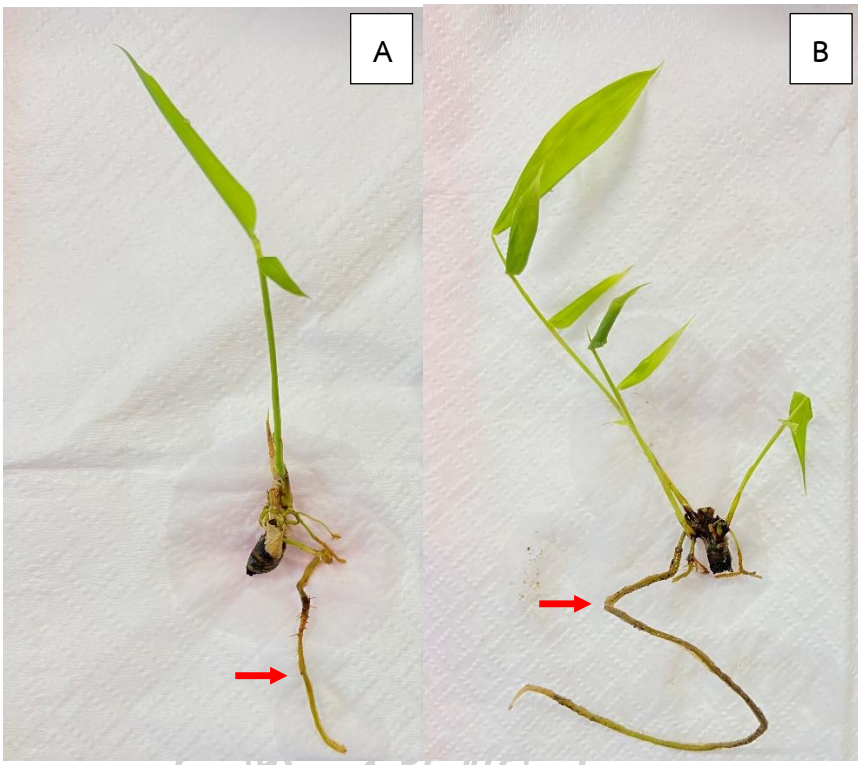
B) IAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

D) NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

* บริเวณลูกศรชี้ (สีแดง) คือ รากที่เกิดขึ้นจากกลุ่มยอดที่เกิดใหม่ในขวดการทดลอง

** บริเวณลูกศรชี้ (สีน้ำเงิน) คือ กลุ่มยอดเก่าที่ตายไป



รูปที่ 19 รากที่เกิดจากการชักนำในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

A) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

B) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

* บริเวณลูกศรชี้ คือ รากที่เกิดขึ้นจากกลุ่มยอดที่เกิดใหม่ในขวดการทดลอง

รูปที่ 20 รากที่เกิดจากกลุ่มยอด

* บริเวณลูกศรชี้ คือ รากที่เจริญออกมาจากรอยผ่าบริเวณโคนยอด

หลังจากการนำต้นไผ่ดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ร่วมกับ NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ร่วมกับ IAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดรากได้สำเร็จ เมื่อนำต้นมาปรับอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเตรียมสำหรับการนำไปเพาะปลูกในลำดับต่อไป พบว่าต้นไผ่ดำที่เกิดรากสามารถนำมาปลูกเลี้ยงในสภาพธรรมชาติได้ ลักษณะลำไผ่มีสีดำอมม่วง ใบเรียวยาว แตกหน่อได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลา 3 ปี นอกจากนี้พบว่าลำต้นของไผ่ดำที่เกิดจากอาหารทั้งสองสูตรบริเวณลำไผ่มีสีเขียวแซม พบมากในลำต้นไผ่ดำที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ร่วมกับ IAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 21) และลำต้นไผ่ดำจากอาหารทั้งสองสูตรมีลำต้นที่ค่อนข้างเล็กแคระแกรนกว่าลำต้นแม่ที่เก็บจากจังหวัดสระแก้ว (รูปที่ 22) อย่างไรก็ตามบริเวณลำต้นของไผ่ดำที่มีสีเขียวแซมถูกพบในลำต้นของต้นแม่เช่นกัน

รูปที่ 21 ต้นไผ่ดำที่เลี้ยงในธรรมชาติเป็นเวลา 3 ปี หลังจากการชักนำให้เกิดรากผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
A) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ร่วมกับ NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
B) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ร่วมกับ IAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 22 ลำต้นไผ่ดำที่เลี้ยงในธรรมชาติเป็นเวลา 3 ปี หลังจากการชักนำให้เกิดรากผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

A) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ร่วมกับ NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

B) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ร่วมกับ IAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

C) ต้นไผ่ดำ (ต้นแม่) จากจังหวัดสระแก้ว

รูปที่ 23 ช่อดอกไผ่ดำ ในระยะเวลา 6-8 เดือน

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 5 : วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการปนเปื้อนจากการเก็บไผ่ดำในระยะเวลา 1 ปี

จากการบันทึกการปนเปื้อนที่เก็บตัวอย่าง (ชิ้นส่วนข้อแขนงของไผ่ดำ) ระหว่างปี 2561-2562 เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการวางแผนการเก็บตัวอย่าง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสิ่งที่เป็นปัญหาที่พบเจอได้บ่อย คือ การปนเปื้อน สาเหตุของการปนเปื้อนเกิดได้จากการทำความสะอาดชิ้นเนื้อตัวอย่าง ความเข้มข้นของการฟอก นอกจากนั้นช่วงเวลาของการเก็บชิ้นส่วนข้อของไผ่ดำก็มีผลเช่นกัน จากการเก็บผลการทดลองในช่วงฤดูฝน (ปี 2561-2562) ซึ่งเป็นช่วงที่มีการปนเปื้อนสูงสุด (ตารางที่ 2) การปนเปื้อนที่พบมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ดำพบว่ามีการปนเปื้อนมากที่สุดในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2561 (ตารางที่ 1) ฤดูฝนจะทำให้ข้อตัวอย่างของไผ่ดำนั้นมีน้ำค้างจากฝนอยู่บริเวณตาข้าง มีเพลี้ยจำนวนมากอาศัยอยู่ตามขอบตาข้าง/ภายในตาข้างของข้อไผ่ดำ (รูป 9D) ทำให้ไม่สามารถทำความสะอาดเข้าถึงได้

สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อในไผ่มีการใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 70 หรือ 75 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ตั้งแต่ 0.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.05-0.2 เปอร์เซ็นต์ (Ma et al., 2023) หากต้องการให้ได้ปริมาณชิ้นส่วนข้อเพื่อนำมาชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง ควรใช้สารเหล่านี้ อย่างไรก็ตามการฟอกฆ่าเชื้อควรใช้สารที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับชิ้นตัวอย่าง เพราะการใช้ความเข้มข้นสูงอาจทำลายเนื้อเยื่อ ทำให้เนื้อเยื่อไม่เจริญพัฒนาหรือเกิดยอดได้

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ

ในการชักนำให้เกิดกลุ่มยอดจากตาข้างที่ข้อสามารถชักนำให้เกิดยอดได้โดยลักษณะยอดที่เกิดมีสีเขียว ยอดเรียวเล็ก ยอดที่เกิดสมบูรณ์ไม่ฉ่ำน้ำ แต่เมื่อใช้ TDZ ร่วมกับ BA พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น ตั้งแต่ช่วงความเข้มข้นของ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ยอดเกิดอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) และมีสีเขียวอ่อนจนถึงมีสีขาวซีด อวบอ้วน มีลักษณะไม่สมบูรณ์ไม่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงในการทดลองถัดไปได้ การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นหากใช้ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยก็เพียงพอที่จะกระตุ้นให้พืชมีการเจริญพัฒนา แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสูงเกินไป จะมีผลลดการเจริญเติบโต ทำให้ยอดมีการเจริญพัฒนาลดลง มีงานวิจัยรายงานว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากข้อของไผ่ดำได้ดี เมื่อใช้ TDZ (0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ IBA (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) บนอาหารกึ่งแข็ง มีความยาวยอดเฉลี่ย 2.22 เซนติเมตร จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อ 4.5 ยอด และในอาหารเหลว TDZ (0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความยาวยอด 3.91 เซนติเมตร

จำนวนยอดต่อข้อ 4.7 ยอด โดยอาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารกึ่งแข็ง และการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโตระหว่าง TDZ และ IBA ส่งเสริมกันในการกระตุ้นการชักนำให้เกิดยอด (ธิดารัตน์ และคณะ, 2562) อย่างไรก็ตามจากการทดลองการชักนำให้เกิดยอดจากข้อของไผ่ดำในการทดลองนี้ สูตรอาหารที่สามารถชักนำได้ดีที่สุดคือ MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับกลไกการทำงานของ TDZ ร่วมกับ BA มีรายงานว่าการทำงานของ TDZ และ BA เข้าจับกับ cytokinin receptor ซึ่งจะมีด้านจับกับ BA (อนุพันธ์ของอะดินีน) และอีกด้านที่จับกับ cytokinin (ชนิดฟีนิลยูเรีย; TDZ) หาก BA จับกับ receptor ก่อน จะไม่มีการจับกับ TDZ อีกกรณีคือ TDZ เข้าจับกับ receptor ก่อน แล้วอนุพันธ์อะดีนินตัวอื่นเข้าจับกับ BA และ cytokinin ได้น้อยลง ทำให้การแสดงผลของไซโทไคนินในเซลล์พืชลดลง (วราภรณ์, 2552) ทำให้เมื่อใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวไม่เกิดอาการฉ่ำน้ำในพืช ในกรณีกลับกันการใช้ TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่เกิดใหม่มีอาการฉ่ำน้ำ ยอดไม่สมบูรณ์ มีสีขาวเผือก (รูปที่ 7K-7M)

นอกจากนี้มีรายงานการใช้ TDZ ร่วมกับสารกลุ่มไซโทไคนินชนิดอื่น ซึ่งพบว่า TDZ ส่งผลทางอ้อมโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytokinin oxidase/dehydrogenase ทำให้ฤทธิ์ของไซโทไคนินลดลง โดยการทดลองในไผ่ปักกิ่ง (*Dendrocalamus* sp.) ซึ่งใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ TDZ ร่วมกับไซโทไคนินชนิดอื่น (นันทิกา และ โชคพิศิษฐ์, 2562) ทั้งนี้มีรายงานว่า TDZ ส่งผลทางตรงโดยเข้าไปจับกับ receptor ของไซโทไคนิน และกระตุ้นการทำงานของไซโทไคนินภายในพืช ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนมากขึ้น (Nisler et al., 2016; Nisle, 2018) ในตารางที่ 2 จากการทดลองเห็นได้ว่า TDZ ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีลักษณะเรียวเล็กได้มากที่สุด แต่ความยาวเฉลี่ยของยอดนั้นพบว่าเมื่อใช้ TDZ ร่วมกับ BA ให้ความยาวได้มากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันเมื่อใช้ความเข้มข้นของ BA ที่สูงเกินไป (3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้ยอดเจริญพัฒนาไม่ดี (อวบ ฉ่ำน้ำ) ชี้ให้เห็นว่าการใช้สารทั้ง 2 ร่วมกันที่ความเข้มข้นเหมาะสม จะสามารถส่งเสริมกันทำให้ยอดมีการเจริญพัฒนาได้ดียิ่งขึ้น

จากการทดลองเมื่อใช้สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจากข้อของไผ่ดำมาทดลองต่อเพื่อเปรียบเทียบ กับอาหารสูตรเดิมที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงในสูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซึ่งเป็นสูตร

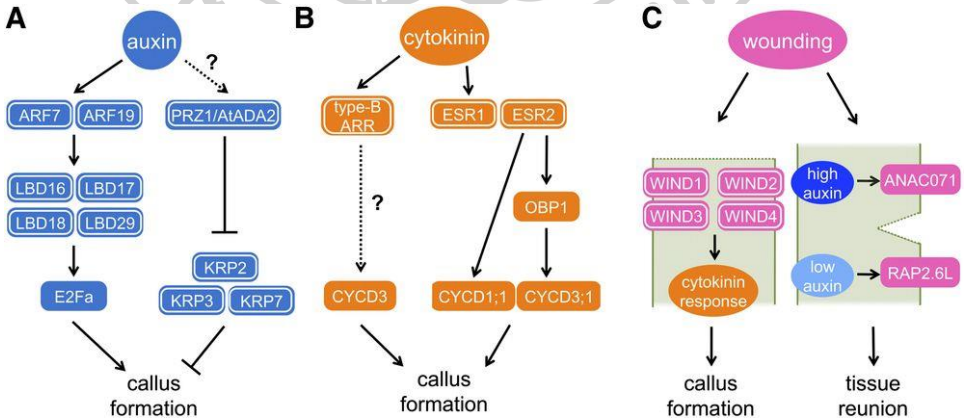
อาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ, ตารางที่ 3; รูป 11C) สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้ดีกว่า เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีทั้งสารไซโทไคนิน (มีอนุพันธ์ของไซโทไคนิน) และออกซิน (Yong et al., 2009) ดังนั้นเมื่อเติมน้ำมะพร้าวลงในสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้อยู่แล้วนั้น น้ำมะพร้าวจะส่งเสริมการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น มีผลทำให้เกิดการเจริญพัฒนาของยอด รวมไปถึงการแบ่งเซลล์อีกด้วย เช่นเดียวกันกับการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไผ่ *Bambusa Arundinacea* (Retz.) พบว่าเมื่อใช้น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้มากที่สุดถึง 90.5 ยอด (Venkatachalam et al., 2015)

การทดลองที่ 2 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของยอด

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนยอดของไผ่ดำ (*P. nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้นช่วง 4.0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นในช่วงความเข้มข้นนี้มีลักษณะเป็น friable callus เรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ สามารถเขี่ยหรือแยกกลุ่มแคลลัสออกจากกันได้ง่าย (รูปที่ 12D-12F) ซึ่งที่ความเข้มข้น 2,4-D 4.0, 5.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยยาว 0.191 เซนติเมตร ลักษณะแคลลัสเกิดเป็นก้อนหลวม ๆ (Friable callus) มีสีขาวปนเหลือง (ตารางที่ 4, รูป 12D, 12E, 12F) ซึ่งช่วงของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสอยู่ในช่วงเดียวกันกับการชักนำแคลลัสในไผ่โมโซ [*Phyllostachys heterocycla* var. pubescens (Mazel ex J. Houz.) Ohwi] (Yuan et al., 2013) ซึ่งช่วงความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในไผ่สกุลนี้อยู่ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เติมลงในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงในไผ่ *P. Nigra* Munro var. Henonis ใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Ogita, 2005) แต่ในขณะเดียวกันพบว่าการใช้ 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.206 เซนติเมตร เกิดแคลลัสสีขาว-เหลืองเกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ (ตารางที่ 4, รูป 12I) ซึ่งในไผ่ซางหม่น ‘นวลราชินี’ (*Dendrocalamus sericeus* Munro) ใช้ 2,4-D ร่วมกับ Kinetin และ IBA พบว่ามีการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดแคลลัส 0.83 เซนติเมตร แต่แคลลัสเกาะตัวกันแน่น (compact callus) (ดวงฤทัย และคณะ, 2562) ในไผ่รวก (*Thyrsostachys siamensis*) ก็ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิดนี้เช่นกัน (2,4-D, Kn และ IBA) เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (อภิศักดิ์,

2549) การใช้ออกซินร่วมกันอาจทำให้แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้นและทำให้เกิด embryogenic callus ได้ ซึ่งในเวลาต่อมาสามารถพัฒนาให้เกิดเป็นยอดและรากต่อไปได้

การเกิดแคลลัสที่พบในการทดลองนี้มีลักษณะเป็น friable callus ซึ่งสามารถพัฒนาต่อให้เกิดเป็นต้นและรากได้ กลุ่มแคลลัสที่ได้เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าชิ้นส่วนยอดที่ตัดเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลเข้ม นอกจากนั้นยังปล่อยสารสีน้ำตาล (phenolic) บนอาหารเพาะเลี้ยงจำนวนมาก ซึ่งสารประกอบ phenolic ที่ปล่อยออกมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ส่งผลให้เกิด การยับยั้งการเจริญพัฒนาในไผ่ (เพ็ญนภา และคณะ, 2562) เช่นเดียวกันในไผ่ดำเมื่อพืชเกิดความเครียดจากการถูกตัดจึงปล่อยสาร phenolic ทำให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส สำหรับยอดที่ได้จากการทดลองการชักนำให้เกิดยอดจากข้อของไผ่ดำถูกนำมาตัดให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร นอกจากนั้นทำการผ่าแนวยาวตามชิ้นยอดเพื่อสร้างบาดแผล กระตุ้นการเกิดแคลลัสของพืช (Ikeuchi et al., 2013) (รูป 23C) เพราะการเกิดแคลลัสเกิดได้จากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน/ ไซโทไคนิน (รูป 23A และ 23B) แต่การช่วยให้พืชทำงานได้ดียิ่งขึ้น (ชักนำให้เกิดแคลลัส) จะต้องเกิดการกระตุ้นเล็กน้อย จากการสร้างบาดแผล เช่น บาดแผลจากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ หรือ การกรีดตามแนวยาวของยอด (รูปที่ 12B, 12E, 12I และ 12K) ผลของการเกิดบาดแผลนั้นจะกระตุ้นการสังเคราะห์ไซโทไคนิน ซึ่งช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น และเกิดแคลลัส (Bidabadi and Jain, 2020) เมื่อ 2,4-D ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มออกซินเข้าไปกระตุ้นเซลล์พืชอีกครั้ง (Yasuda and Yamada, 1971) ให้มีการแบ่งเซลล์ จึงเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้น ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นเช่นกัน (ตารางที่ 4)



รูปที่ 24 กลไกการเกิดแคลลัส (Ikeuchi et al., 2013)

A กลไกการเกิดแคลลัสจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนออกซิน

B กลไกการเกิดแคลลัสจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนไซโทไคนิน

C กลไกการกระตุ้นการเกิดแคลลัสผ่านการสร้างบาดแผล

การทดลองที่ 3 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการขยายกลุ่มแคลลัส

เมื่อนำกลุ่มแคลลัสมาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายขนาด โดยใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร MS พบว่าอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดของกลุ่มแคลลัสเพิ่มขึ้น และมีการเกิดของแคลลัสใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่าแคลลัสเปลี่ยนจากสีขาว-เหลือง (รูป 13C-13G) เป็นสีเขียวบางส่วน (รูป 13H) และมีแคลลัสบางส่วนที่ตายไปหรือเปลี่ยนเป็นน้ำตาล-ดำ (รูป 13A, 13B และ 13H) การเปลี่ยนสีของแคลลัสเกิดจากการปล่อยสารประกอบฟีโนลิก แคลลัสมีการเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ และในบางส่วนของกลุ่มแคลลัสมีการจับตัวกันแน่นขึ้น อย่างไรก็ตามในไผ่ชนิดอื่น ๆ เมื่อใช้ 2,4-D ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว เช่น ในไผ่ซางหม่น (*D. sericeus*) การใช้ 2,4-D ร่วมกับ Kn สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ (ดวงฤทัย และคณะ, 2019) และในไผ่ *Drepanostachyum luodianense* สามารถขยายแคลลัสได้มากขึ้นเมื่อใช้ 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสที่เกิดสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นยอดได้ (Lin et al., 2018) ในไผ่ *Phyllostachys heterocycle* var. pubescens (Mazel ex J. Houz.) Ohwi เมื่อนำแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดมาขยายต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ zeatin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นมีการเจริญพัฒนาไปเป็น embryogenic callus สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากต่อไปได้ (Yuan et al., 2013)

การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้เกิดแคลลัสนิยมใช้ 2,4-D ซึ่งในไผ่สกุล *Dendrocalamus* สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ด้วยการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA, Kn หรือ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Devi et al., 2012; Zang et al., 2016; ดวงฤทัย และคณะ, 2562) นอกจากนี้มีรายงานการใช้ 2,4-D ร่วมกับออกซินชนิดอื่น เช่น IBA เพื่อขยายกลุ่มแคลลัส (Saxena and Dhawan, 1999) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ พบว่าการใช้ 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดการขยายแคลลัสได้ดีที่สุด (ตารางที่ 5; รูป 13H)

นอกจากนี้มีรายงานการชักนำให้เกิดแคลลัสในไผ่ *Phyllostachys nigra* กล่าวว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและขยายแคลลัสด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ร่วมกับ 2,4-D โดยแคลลัสเจริญได้สูงถึงระยะที่ 3 โดยในระยะที่ 1 (callus induction1) แคลลัสไม่มีการตอบสนอง เมื่อ

ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) แคลลัสเริ่มเกิดขึ้น ระยะที่ 2 (callus induction2) แคลลัสเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล สำหรับระยะสุดท้าย (callus proliferation) แคลลัสเริ่มตาย และมีแคลลัสที่เกิดขึ้นใหม่ นอกจากนี้ในระยะนี้มีการเกิดราก (root primordia) (Otiga, 2005) สำหรับแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนรูปไปเมื่อเกิดความเครียดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากเซลล์พืช สามารถเปลี่ยนไป (เข้าสู่กระบวนการ embryogenesis) (Ikeuchi et al., 2016) (รูป 14B)

การทดลองที่ 4 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส

สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสของไผ่ดำสูงที่สุด ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งชักนำให้เกิดยอด เท่ากับ 14.60 ± 5.671 ยอด (ตารางที่ 6, รูป 15I) การชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัส โดยใช้ NAA และ BA ร่วมกันสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการชักนำให้เกิด TDZ เนื่องจาก TDZ ออกฤทธิ์รุนแรงแม้เพียงใช้ที่ความเข้มข้นน้อย จึงทำให้กลุ่มแคลลัสตาย จากแคลลัสสีขาวเหลืองกลายเป็นสีน้ำตาล-ดำ จากผลการทดลองมีข้อสังเกตว่าควรใช้ความเข้มข้นของ NAA และ BA ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากแคลลัสที่เกิดขึ้นในการทดลองบอบบางและเกิดความเครียดได้ง่าย (สังเกตจากสารประกอบฟีโนลิกที่ถูกปล่อยออกมาจากก้อนแคลลัส) การเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นกระเกิดแคลลัสจากกลุ่มแคลลัสได้ (ตารางที่ 6) และพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ BA (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ช่วยส่งเสริมการทำงานของพืชโดยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคสลัสได้ (รูป 15F, 15I และ 15J) การศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคสลัสในไผ่ *Dendrocalamus hamiltonii* พบว่าการเกิดยอดจากกลุ่มแคสลัสจะมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตลดลง เมื่อความเข้มข้นของ NAA > Kn > BA (โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสในไผ่ชนิดนี้ คือ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kn 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Zang et al., 2016) จากผลการทดลองนี้พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินต่อไซโทไคนินอัตราส่วน 1:1 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสได้ดีที่สุด โดยใช้ BA (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่มีความเข้มข้นมากกว่า NAA และ 2,4-D โดย NAA และ 2,4-D มีความเข้มข้นเท่ากัน (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 6; รูป 15J)

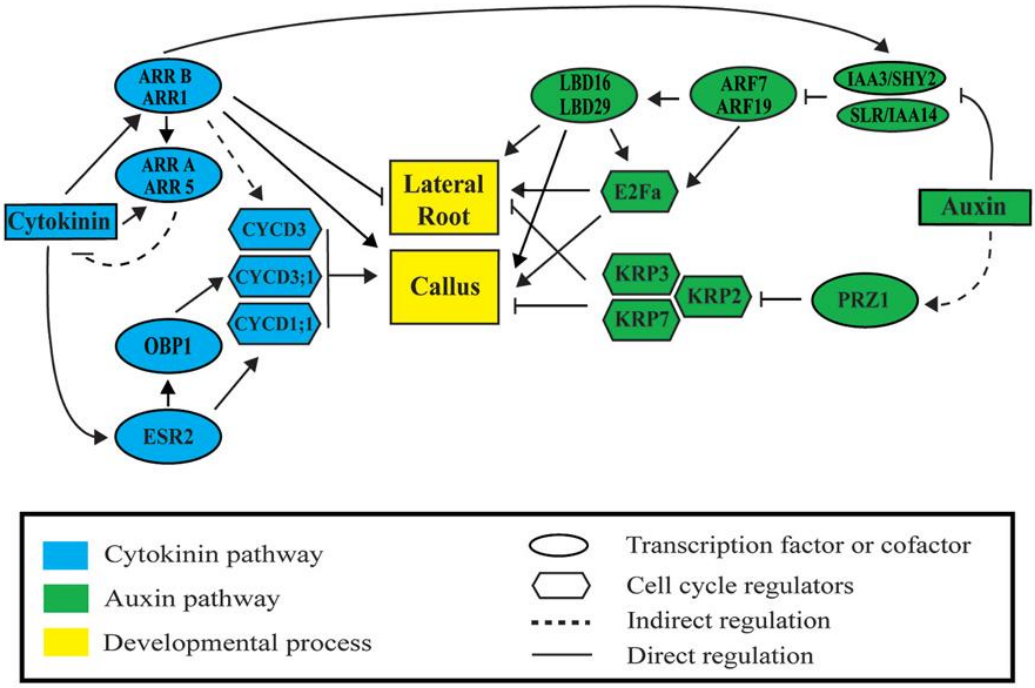
จากการนำ embryogenic callus ที่ได้จากการขยายแคลลัส (การทดลองที่ 4; รูป 17A) มาวางลงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอด พบว่าเกิดยอดยืดยาว สีเขียวอมเหลือง และมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ภายใน 7 วัน (รูป 17B และ 17C) เช่นเดียวกันกับงานวิจัยในไผ่โมโซ (Yuan et al., 2013) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D และ zeatin พบว่า embryogenic callus เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 3-5 วัน และสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ สำหรับ embryogenic callus ของไผ่ดำ เมื่อครบ 7 วัน ยอดและแคลลัสบางส่วนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีที่คล้ำขึ้น (รูป 17 D) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไผ่ดำปล่อยสารประกอบฟีโนลิกมาก ทำให้ลดการเจริญเติบโตของยอดและแคลลัส ทำให้มีสีคล้ำขึ้น และตายไป

การเกิด embryogenic callus ในการทดลองเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ ยีน สภาพแวดล้อมจำเพาะของพืชนั้น ๆ รวมไปถึงอายุของชิ้นตัวอย่าง ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไป (Godbole et al., 2002) สำหรับการเกิดยอดในกลุ่มแคลลัสนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มออกซิน (NAA และ IBA) และกลุ่มไซโทไคนิน (TDZ, zeatin, BA และ Kn) พบว่าที่ความเข้มข้นของไซโทไคนินสูงกว่าออกซินจะสามารถชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสได้ (Lin et al., 2012) อย่างไรก็ตามในสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจาแคลลัสของไผ่ดำ ใช้ความเข้มข้นของไซโทไคนินต่อออกซิน ในสัดส่วนที่เท่ากัน หากเปรียบเทียบการทำงานระหว่าง BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำงานส่งเสริมกันโดยช่วยชักนำให้เกิดยอดได้ดี และการใช้ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรช่วยให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วจึงเกิดแคลลัสใหม่และเจริญพัฒนาเป็นยอดต่อไปได้

นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอด การทำให้เกิดบาดแผลจะกระตุ้นการแสดงออกของยีน (WIND1-4 expression) เพื่อส่งเสริมให้มีการตรวจว่าบริเวณใดเกิดบาดแผลและส่งสัญญาณต่อเพื่อให้ auxin/ cytokinin ทำงาน โดยเมื่อไซโทไคนินเกิดการกระตุ้นแล้ว เซลล์จะเข้าสู่การเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นยอด โดย CUC2 แสดงออก ทำให้ STM และ PIN1 เป็นตัวควบคุมการก่อตัวของเนื้อเยื่อเจริญ (meristems) (Ikeuchi et al., 2016) (รูป 24C) อย่างไรก็ตามการสร้างบาดแผลในไผ่ดำทำให้ก้อนแคลลัสปล่อยสารประกอบฟิโนลิกที่ยับยั้งการทำงานของเซลล์พืช สังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารเพาะเลี้ยง โดยบนอาหารจะมีสีน้ำตาลอ่อน-น้ำตาลแก่

การทดลองที่ 5 การศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอดเพาะเลี้ยง

การชักนำให้เกิดรากของไผ่ดำจากกลุ่มยอดที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้กลุ่มยอดที่มีอายุ 21 วัน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำให้รากได้แก่ อาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติม NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ โดยรากที่ได้ยาวกว่าสูตรอาหารที่เติม IAA และมีปริมาณรากมากกว่า (ตารางที่ 7; รูป 18D และ 19B) โดยทั่วไปในการชักนำให้เกิดรากนิยมใช้สารกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA, NAA และ IAA ทั้งนี้มีรายงานว่ายีนหลาย ๆ ยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและทำหน้าที่เฉพาะถูกควบคุมด้วย auxin response factors (AFREs) (Chapman and Estelle, 2009) การแสดงออกเกิดจากยีน NPH4/ARF7 แล้วส่งสัญญาณต่อกระตุ้นการทำงานของยีน LBD16 และ LBD29 ทำให้เกิดการสร้างราก (lateral root formation) (Perianez-Rodriguez et al., 2014) (รูปที่ 26) ในไผ่สกุล *Phyllostachys* มีงานวิจัยรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดรากโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร MS (Sood et al., 2014) และการเติม NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้เช่นเดียวกันในไผ่สกุล *Phyllostachys* (Yuan et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามอาหารสูตร ½MS ก็สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2008 อีกทั้งการเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่าอาหารเหลวสูตร ½MS สามารถชักนำให้เกิดราก (29.7%) ได้ดีกว่าอาหารเหลวสูตร MS (21.2%) (Ogita et al., 2008) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคู่ด้วย ซึ่งการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะทำให้ยอดของพืชที่ทำการทดลองได้รับการสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงทั่วชิ้น นอกจากนี้การเขย่าเป็นการช่วยเพิ่มออกซิเจนในอาหาร ทำให้มีการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (นิตยา และ สุภาพร, 2559)



รูปที่ 25 กลไกการทำงานของไซโทไคนินและออกซินในการชักนำให้เกิดรากและแคลลัส (Perianez-Rodriguez et al., 2014)

มีรายงานการชักนำให้เกิดรากในไผ่ *D. giganteus* โดยการใช้ IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ coumarin 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ramanayake & Yakandawala, 1997) และใน *B. vulgaris* สามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA ข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ramanyake et al., 2006) อย่างไรก็ตามในไผ่ดำ (*P. nigra*) ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากเมื่อใช้ IBA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจาก IBA เป็นออกซินธรรมชาติมีอัตราการสลายไปสูงกว่า NAA ทำให้ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดรากลดลง (วรภรณ์, 2552) จากการทดลองการชักนำให้เกิดรากของไผ่ดำ พบว่า NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารแข็งสูตร ½MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 20 เปอร์เซ็นต์

หากเปรียบเทียบการทำงานของออกซินทั้ง 3 ชนิด มีรายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าการชักนำให้เกิดรากโดยการเติม NAA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพดีกว่า IBA (Islam and Rahman, 2005) ส่วน IAA เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเอง ซึ่งแตกต่างจากสารสังเคราะห์ทั้งสองข้างต้นมักใช้ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นต่ำ เพื่อส่งเสริมการทำงานร่วมกัน เช่นในงานวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Dendrocalamus farinosus* พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (Hu et al., 2011) อย่างไรก็ตามในงานวิจัย

นี้พบว่าประสิทธิภาพของออกซินที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดของไผ่ดำ คือ NAA และ IAA โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน IBA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ในการทดลองพบว่ากลุ่มยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ มีการสร้างสารประกอบฟีโนลิก สารนี้จะถูกสร้างขึ้นเมื่อพืชเกิดความเครียด สารฟีโนลิกจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Park and Jhon, 2010) ทำให้การเกิดรากในไผ่ดำเกิดได้ยาก เนื่องจากเมื่อตัดกลุ่มยอดที่ได้จากข้อมาลงอาหารเพาะเลี้ยงพืชเกิดบาดแผลขนาดใหญ่ รวมไปถึงการกรีดบริเวณยอดเพื่อสร้างบาดแผล (รูปที่ 19) กระตุ้นการเจริญพัฒนาในพืช ทำให้กลุ่มยอดไผ่ดำสร้างสารประกอบฟีโนลิก จำนวนมาก โดยสังเกตจากอาหารพบว่ามีสารสีน้ำตาล-น้ำตาลแก่จำนวนมาก (รูปที่ 18)

ปัญหาในการชักนำให้เกิดรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ อาจเกิดจากความเหมาะสมของสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการที่ไผ่นั้นมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม phenolic compounds และ flavonoids สูง (เพ็ญนภา และคณะ, 2562) เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะมีการหลั่งสารเคมีออกมา (phenolics, terpenoids และ allkaoids) (Keski-Saari et al., 2008) สารกลุ่มนี้จะเข้าไปยับยั้งการทำงานต่างๆในพืชเพื่อป้องกันตัวพืช ทำให้การชักนำของรากเกิดได้ยาก ในไผ่สกุลอื่น ๆ เช่น *Bambusa* และ *Dedrocalamus* มีแนวโน้มการเกิดรากต่ำเช่นเดียวกัน (Ramanayake et al., 2008)

นอกจากนี้พบว่าเมื่อนำต้นไผ่ดำมาเพาะปลูกในดินธรรมชาติ ในช่วงหนึ่งปีแรก ต้นไผ่สามารถเจริญเติบโตได้ดี หน่อใหม่เกิดขึ้นตลอดและพบว่าต้นไผ่ดำที่เพาะเลี้ยงจากอาหารกึ่งแข็งสังเคราะห์สูตร ½MS ร่วมกับ NAA และ IAA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดช่อดอก (รูปที่ 23) การเกิดช่อดอกบนต้นไผ่ดำอาจเกิดได้จากสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ระหว่างการทดลอง เนื่องจากในช่วงการชักนำให้เกิดยอดของไผ่ดำด้วยชิ้นส่วนข้อใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ TDZ อาจทำหน้าที่บางอย่างในการแสดงออกของพืช เช่น การออกดอกที่ผิดปกติ เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยของ Guo และคณะในปี 2011 ได้ให้ความเห็นเกี่ยวกับหน้าที่ของ TDZ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชไว้ว่า TDZ แสดงออกเหมือนสารออกซินและไซโตไคนินในพืช โดยการใช้ TDZ ในพืชนั้นอาจทำให้เซลล์บางส่วนได้รับการกระตุ้นและเปลี่ยนแปลงไปทางสรีรวิทยา/ชีวเคมี อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบรูปแบบการทำงานของ TDZ อย่างแน่ชัด อย่างไรก็ตามอาจเกิดจากการออกดอกที่ผิดปกติเช่นเดียวกับ *Phyllostachys edulis* (Ge et al., 2017)

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณผ่านการเกิดแคลลัสของไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl) Munro] พบว่าเมื่อใช้ชิ้นส่วนข้อจากกิ่งแขนงของต้นไผ่ดำมาชักนำให้เกิดยอด ในอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 14 วัน สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้จำนวนยอดสูงสุด 6.5 ยอด มีความยาวยอด 1.5 เซนติเมตร นำยอดที่เกิดมาชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D สูงขึ้น ตั้งแต่ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ สำหรับสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัส ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดขึ้นมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.206 เซนติเมตร โดยมีการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการขยายแคลลัสสูตรอาหารที่เหมาะสม คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว เกิด friable callus และเริ่มมีสีเขียวในกลุ่มก้อนแคลลัส เมื่อนำแคลลัสที่ขยายได้ ไปชักนำให้เกิดยอด พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากกลุ่มแคลลัสได้ดีที่สุด ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 60 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชักนำให้เกิดยอดมากถึง 14.6 ยอด สำหรับการชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอดบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เกิดรากของไผ่ดำได้ดีที่สุด คือ NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก

สารอาหารเข้มข้นของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) แบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม

สารอาหารเข้มข้นที่ 1 (stock solution1) ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		
1. NH_4NO_3	16.5	กรัม
2. KNO_3	19.0	กรัม
3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4.4	กรัม
4. KH_2PO_4	1.7	กรัม
ปริมาตรที่นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร = 100 มิลลิลิตร		

สารอาหารเข้มข้นที่ 2 (stock solution 2) ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		
1. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	37.0	กรัม
ปริมาตรที่นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร = 10 มิลลิลิตร		

สารอาหารเข้มข้นที่ 3 (stock solution 3) ความเข้มข้น 1,000 เท่า ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		
1. H_3BO_4	6.20	กรัม
2. KI	0.83	กรัม
3. $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	กรัม
4. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	กรัม
ปริมาตรที่นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร = 1 มิลลิลิตร		

สารอาหารเข้มข้นที่ 4 (stock solution 4) ความเข้มข้น 1,000 เท่า ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		
1. $CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.025	กรัม
2. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	กรัม
3. $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	16.9	กรัม
ปริมาตรที่นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร = 1 มิลลิลิตร		

สารอาหารเข้มข้นที่ 5 (stock solution 5) ความเข้มข้น 200 เท่า ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		
1. Na_2EDTA	7.45	กรัม
2. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.56	กรัม

ปริมาตรที่นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร = 5 มิลลิลิตร

สารอาหารเข้มข้นที่ 6 (stock solution 6) ความเข้มข้น 1,000 เท่า ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		
1. Glycine	2.0	กรัม
2. Thiamine•HCl	0.5	กรัม
3. Pyridoxine•HCl	0.1	กรัม
4. Nicotinic acid	0.5	กรัม

ปริมาตรที่นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร = 1 มิลลิลิตร

สารอาหารเข้มข้นที่ 7 (stock solution 7) ความเข้มข้น 500 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร		
Myo-inositol	5	กรัม

ปริมาตรที่นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร = 2 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

Arya, S., Sharma, S., Kaur, R., & Dev Arya, I. (1999). Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. *Plant cell reports* 18, 879-882.

Bamboobotanicals. (2023). *Bamboo Variety: Bamboo Plants and AnatomyBamboo Variety: Bamboo Plants and Anatomy*. Retrieved April 15 from https://www.bamboobotanicals.ca/

Ben-Zhi, Z., Mao-Yi, F., Jin-Zhong, X., Xiao-Sheng, Y., & Zheng-Cai, L. (2005). Ecological functions of bamboo forest: research and application. *Journal of Forestry Research*, 16(2), 143-147.

Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants*, 9(6), 702.

Brault, M., & Maldiney, R. (1999). Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(5), 403-412.

Byjus. (2023a). *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*. Retrieved May 28 from https://byjus.com/neet/24-dichlorophenoxyacetic-acid/

Byjus. (2023b). *IAA hormone*. Retrieved May 28 from https://byjus.com/neet/iaa-hormone/

Chambers, S. M., Heuch, J. H. R., & Pirrle, A. (1991). Micropropagation and in vitro flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 45-48.

Chapman, E. J., & Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual review of genetics*, 43, 265-285.

Chaturvedi, H. C., Sharma, M., & Sharma, A. K. (1993). In vitro regeneration of *Dendrocalamus strictus* Nees through nodal segments taken from field-grown culms. *Plant Science*, 91, 97-101.

Clinisciences. (2023a). *Plant Growth Regulators-Auxins-Indole-3-butyric acid (IBA)*. Retrieved May 29 from https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-plant-growth-regulators-auxins-4822.html

Clinisciences. (2023b). *Plant Growth Regulators-Cytokinis-Kinetin*. Retrieved May 29 from

https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-plant-growth-regulators-cytokinins-4829.html

Devi, W. S., Bengyella, L., & Sharma, G. J. (2012). In vitro seed germination and micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using seeds. *Biotechnology*, 11(2), 74-80.

El Hassan, A. A., & Debergh, P. (1987). Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (Young) McClure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10, 73-77.

Fern, K. (2016). *Temperate Plants Database of Phyllostachys nigra*. Retrieved March 23 from http://temperate.theferns.info

Frick, E. M., & Strader, L. C. (2018). Roles for IBA-derived auxin in plant development. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 169-177.

GBIF Secretariat. (2022). *Phyllostachys nigra (Lodd. ex Lindl.) Munro*. GBIF Backbone Taxonomy. Retrieved May 25 from https://www.gbif.org/species/5290171

Ge, W., Zhang, Y., Cheng, Z., Hou, D., Li, X., & Gao, J. (2017). Main regulatory pathways, key genes and micro RNA s involved in flower formation and development of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plant biotechnology journal*, 15(1), 82-96.

Godbole, S., Sood, A., Thakur, R., Sharma, M., & Ahuja, P. S. (2002). Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, Dendrocalamus hamiltonii Nees et Arn. Ex Munro. *Current Science*, 885-889.

Goyal, A. K., & Sen, A. (2016). *In vitro* regeneration of bamboos, the "Green Gold": An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 15(1), 9-16.

Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L., & Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984-9000.

Hartati, S., Arniputri, R. B., Soliah, L. A., & Cahyono, O. (2017). Effects of organic additives and naphthalene acetid acid (NAA) application on the *in vitro* growth of Black orchid hybrid (*Coelogyne pandurata* Lindley). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23(6), 951-957.

Hu, S., Zhou, J., Cao, Y., Lu, X., Duan, N., Ren, P., & Chen, K. (2011). *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots

in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et H.L. Fung. *African Journal of Biotechnology*, 10(16), 3210-3215.

Huang, L. C., & Murashige, T. O. S. H. I. O. . (1983). Tissue culture investigations of bamboo. *Bot Bull Acad Sin*, 24, 31-52.

Hussain, Z., & Tyagi, R. K. (2006). In vitro corm induction and genetic stability of regenerated plants in taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 535-542.

Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143(9), 1442-1451.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*, 25(9), 3159-3173.

Islam, N. M., & Rahman, M. (2005). Micro-cloning in commercially important six bamboo species for mass propagation and at a large-scale cultivation. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 15, 103-111.

Janzen, D. H. (1976). Why bamboos wait so long to flower. *Annual Review of Ecology and systematics*, 7(1), 347-391.

Jones, B., & Ljung, K. (2011). Auxin and cytokinin regulate each other's levels via a metabolic feedback loop. *Plant signaling & behavior*, 6(6), 901-904.

Kazan, K. (2013). Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Annals of botany*, 112(9), 1655-1665.

Keski-Saari, S., Ossipov, V., Julkunen-Tiitto, R., Jia, J., Danell, K., Veteli, T., Guiquan, Z., Yaowu, X., & Niemelä, P. (2008). Phenolics from the culms of five bamboo species in the Tangjiahe and Wolong Giant Panda Reserves, Sichuan, China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(10), 758-765.

Kumar, S., Singh, R., Kalia, S., Sharma, S. K., & Kalia, R. K. (2016). Recent advances in understanding the role of growth regulators in plant growth and development in vitro-I. conventional growth regulators. *Indian Forester*, 142(5), 459-470.

Larekeng, S. H., Gusmiaty, G., & Nadhilla, D. (2020). *In-Vitro Shoot Induction of Pring Tutul (Bambusa maculata) through in Various Plant Growth Regulators (PGR)* IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Gedung Pasca Sarjana, Indonesia.

Lin, C. S., & Chang, W. C. (1998). Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. *Plant Cell Reports*, 17, 617-620.

Lin, C. S., Lin, C. C., & Chang, W. C. (2004). Effect of Thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76, 75-82.

Lin, S., Liu, G., Guo, T., Zhang, L., Wang, S., & Ding, Y. (2018). Shoot proliferation and Callus regeneration from nodular buds of *Drepanostachyum luodianense*. *Journal of Forestry Research*, 30(1), 1997–2005.

Lin, X., Huang, L., & Fang, W. (2012). Bamboo regeneration via embryogenesis and organogenesis. *Embryogenesis. Rijeka: INTECH*, 359-372.

Ma, S., Li, J., Chen, J. Y., Mei, R. M., Cui, K., & Lan, L. (2023). Research Progress and a Prospect Analysis of Asexual Bamboo Reproduction. *Horticulturae*, 9(6), 685.

Moubayidin, L., Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in plant science*, 14(10), 557-562.

Mukarlina, M., Listyawati, A., & Mulyani, S. (2010). The effect of coconut water and naphthalene acetic acid (NAA) application on the in vitro growth of *Paraphalaeonopsis serpentilingua* from West Kalimantan. *Nusantara bioscience*, 2(2).

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Nanagarden. (2014). *Price of black bamboo*. Retrieved March 23 from https://www.nanagarden.com/tag/ไผ่ดำ

Nisler, J. (2018). TDZ: Mode of Action, Use and Potential in Agriculture. In *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator* (pp. 37-59). Singapore.

Nisler, J., Kopečný, D., Končitíková, R., Zatloukal, M., Bazgier, V., Berka, K., Zalabák, D., Briozzo, P., Strnad, M., & Spíchal, L. (2016). Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Plant molecular biology*, 92(1-2), 235-248.

Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology* 22(2), 119-125.

Ogita, S., Kashiwagi, H., & Kato, Y. (2008). In vitro node culture of seedlings in bamboo

plant, *Phyllostachys meyeri* McClure. *Plant Biotechnology*, 25(4), 381-385.

Park, E. J., & Jhon, D. Y. (2010). The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 655-659.

Park, W. J., Kang, Y. M., Min, J. Y., Park, D. J., Kim, Y. D., Karigar, C. S., & Choi, M. S. (2004). In vitro Propagation of Junos Orange (*Citrus junos* Sieb.) through Nucellar Polyembroid Cultures. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 12(5), 384-390.

Perianez-Rodriguez, J., Manzano, C., & Moreno-Risueno, M. A. (2014). Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? *Frontiers in plant science*, 5, 219.

Rahayu, S., Roostika, I., & Bermawie, N. (2016). The effect of types and concentrations of auxins on callus induction of *Centella asiatica*. *Nusantara bioscience*, 8(2), 283-287.

Ramanayake, S. M. S. D., Maddegoda, K. M. M. N., Vitharana, M. C., & Chaturani, G. D. G. (2008). Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. *Scientia Horticulturae*, 118(3), 270-273.

Ramanayake, S. M. S. D., Meemaduma, V. N., & Weerawardene, T. E. (2006). In vitro shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). *Scientia Horticulturae*, 110(1), 109-113.

Ramanayake, S. M. S. D., & Yakandawala, K. (1997). Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Science*, 129(2), 213-223.

Royal Horticultural society. (2002). *Phyllostachys nigra*. Retrieved November 17 from https://www.rhs.org.uk/plants/details?plantid=1451

Saini, S., Sharma, I., Kaur, N., & Pati, P. K. (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports*, 32, 741-757.

Saxena, S. (1990). In vitro propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. *Plant Cell Reports*, 9, 431-434.

Saxena, S., & Dhawan, V. (1999). Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees.) through somatic embryogenesis. *Plant Cell*

Reports, 18(5), 438-444.

Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The plant cell*, 27(1), 44-63.

Seki, T., & Maeda, H. (2010). Cancer preventive effect of Kumaizasa bamboo leaf extracts administered prior to carcinogenesis or cancer inoculation. *Anticancer research*, 30(1), 111-118.

Shan, X., Li, D., & Qu, R. (2000). Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(3), 207-210.

Sood, A., Nadha, H. K., Sood, S., Walia, S., & Parkash, O. (2014). Large scale propagation of an exotic edible bamboo, *Phyllostachys pubescens* Mazel ex H. De Lehale (Moso Bamboo) using seeds. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52(7), 755-758.

Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, 4(4), 616-625.

Swamy, R. D., Rao, N. S., & Chacko, E. K. (1983). Tissue-culture propagation of banana. *Scientia Horticulturae*, 18(3), 247-252.

Venkatachalam, P., Kalaiarasi, K., & Sreeramanan, S. (2015). Influence of plant growth regulators (PGRs) and various additives on in vitro plant propagation of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild: A recalcitrant bamboo species. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 193-200.

Wei, Q., Cao, J., Qian, W., Xu, M., Li, Z., & Ding, Y. (2015). Establishment of an efficient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122, 1-8.

Yang, Z., Chen, L., Kohnen, M. V., Xiong, B., Zhen, X., Liao, J., Oka, Y., Zhu, Q., Gu, L., Lin, C., & Liu, B. (2019). Identification and characterization of the PEBP family genes in moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

Yasuda, T., & Yamada, Y. (1971). The effect of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid on the basicity of proteins during callus induction. *FEBS letters*, 18, 115-117.

Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144-5164.

Yuan, J.-L., Yue, J.-J., Wu, X.-L., & Gu, X.-P. (2013). Protocol for callus induction and

somatic embryogenesis in Moso bamboo. *Plos One*, 8(12), 1-6.

Zachariah, E. J., Sabulal, B., Nair, D. N. K., Johnson, A. J., & Kumar, C. S. P. (2016). Carbon dioxide emission from bamboo culms. *Plant Biology*, 18(3), 400-405.

Zang, Q., Zhou, L., Zhuge, F., Yang, H., Wang, X., & Lin, X. (2016). Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. *SpringerPlus*, 5(1), 1-7.

เพ็ญนภา การะเวก, โชคพิศิษฐ์ เทพสิธา, สุพรรณญิกา เส็งสาย, & ศรัณยพร มากทรัพย์. (2562). การวิเคราะห์สารฟลาโวนไกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ซางหม่น “นวลราชินี” ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC. *Veridian E-Journal*, 6(5), 84-94.

คัดคณัฐ ชื่นวงศ์อรุณ. (2562). ฮอร์โมนพืช (*Plant Hormone)*. Retrieved 27 พฤษภาคม from https://ngthai.com/science/25895/plant-hormone/

ดวงฤทัย ปราสาททอง, โชคพิศิษฐ์ เทพสิธา, & สุพรรณญิกา เส็งสาย. (2562). การชักนำให้เกิดคัลลัสจากชิ้นส่วนข้อในไผ่ซางหม่น “นวลราชินี”(*Dendrocalamus sericeus* Munro). *Veridian E-Journal*, 6(4), 64-80.

ธิดารัตน์ ธัญญศรีรัตน์, สุพรรณญิกา เส็งสาย, & โชคพิศิษฐ์ เทพสิธา. (2562). การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนข้อของไผ่ดำ [*Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro]. *Veridian E-Journal*, 6(5), 19-32.

นันทิกา ดีล้อม, & โชคพิศิษฐ์ เทพสิธา. (2562). การเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ปักกิ่ง (*Dendrocalamus* sp.) โดยการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ. *Veridian E- Journal*, 61(1), 62-76.

นายเกษตร. (2557). ลักษณะทางกายวิภาคของไผ่ดำ. Retrieved 3 พฤศจิกายน from https://www.thairath.co.th/content/457104

นิตยา สุขวรรณา, & สุภาพร ภัสสร. (2559). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก. *Thai Science and Technology Journal*, 24(1), 64-75.

วราภรณ์ ฉุยฉาย. (2552). บทบาทของ Thidiazuron ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสาร มหาวิทยาลัย ราชภัฏยะลา, 4(2), 123-135.

สุธิดา ฉันทานุรักษ์. (2534). การเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่: ผลของ 2, 4-*D, NAA,* และ *BAP* ต่อการเกิดแคลลัส และยอด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์]. คณะเกษตร.

อภิศักดิ์ ดวงมณี. (2549). การขยายพันธุ์ไผ่รวก (*Thyrostachys siamensis)* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Publication Number 66) มหาวิทยาลัยศิลปากร].

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวศุภมาส วงษ์ศรีสังข์
วัน เดือน ปี เกิด	24 ธันวาคม 2537
สถานที่เกิด	ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2559 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์ยัณฑิต (วท.บ.) วิชาเอก ชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม พ.ศ.2560 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ วิชาเอก ชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	111/320 หมู่ 6 ต.บางรักพัฒนา อ.บางบัวทอง จ.นนทบุรี 11110
ผลงานตีพิมพ์	การนำเสนอผลงาน เรื่อง การขยายพันธุ์ไผ่ดำ [Phyllostachys nigra (Lodd. Ex. Lindl.) Munro] ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2 ประจำปี 2563 ในวันที่ 1 พฤษภาคม 2563 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ จังหวัดนครปฐม

มหาวิทยาลัยศิลปากร