จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน

รายงานผลการวิจัย

# การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชม

โดย

นางสาวเพชรรัตน์ จันทรทิณ
นายวีระเดช สุขเอียด

31 พฤษภาคม 2544

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะผู้บริหาร สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนด้านห้องปฏิบัติการตลอดจนครุภัณฑ์ในการวิจัย และเงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2543 ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณเผดิจ โตนวล เจ้าของสวนชวนชม ที่กรุณาให้ความรู้เรื่องพันธุ์ชวนชม รวมทั้งนักวิจัยและบุคลากรของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

**ชื่อโครงการวิจัย** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชม
**ชื่อผู้วิจัย** นางสาวเพชรรัตน์ จันทรทิณ และ นายวีระเดช สุขเอียด
**เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ** พฤษภาคม 2544

## บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดและตาข้างของชวนชมในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ปลายยอดให้จำนวนยอดมากกว่าตาข้าง จากนั้นนำไปศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA หรือ kinetin หรือ $GA_3$ ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่า อาหารสูตร MS ที่มี kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 7.5 ยอด รองลงมาคือ อาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.5 ยอด สำหรับการเพิ่มปริมาณยอดของชวนชม 3 พันธุ์คือ พันธุ์ที่มีดอกสีแดง ดอกสีขาว และดอกสีชมพู ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 2 สูตรดังกล่าว พบว่า พันธุ์ดอกสีแดงและสีชมพูเกิดยอดได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์ดอกสีขาวเกิดยอดได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำยอดที่ได้มาชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA หรือ IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากมากที่สุด เมื่อนำต้นชวนชมที่มีรากสมบูรณ์ออกปลูกในสภาพภายนอกมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ย 60 เปอร์เซ็นต์

**Project Title** Tissue Culture of *Adenium obesum*

**Name of the Investigators** Petcharut chuntaratin and Veeradech Sukeard

**Year** May 2001

## Abstract

Shoot tips and lateral buds of *Adenium obesum* were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various concentrations of BA from 0-0.5 mg/l. It was found that shoot tips explant gave the number of shoots better than lateral buds. The culture media which varied the concentrations of BA or kinetin or $GA_3$ , were tested for shoot multiplication. MS medium supplemented with kinetin at 1 mg/l gave the highest shoot number of 7.5 shoots while MS medium supplemented with BA at 0.5 mg/l gave shoot number of 5.5 shoots. Shoot multiplication for three varietes of *Adenium obesom*; red flower, white flower and pink flower were cultured on both media . The results showed that MS medium supplemented with kinetin at 1 mg/l is suitable for red flower and pink flower while MS medium supplemented with BA at 0.5 mg/l is suitable for white flower. Root induction was conducted on MS at 0-1 mg/l of IBA or IAA or NAA . MS supplemented with 0.1 mg/l IBA gave the highest percent of roots. The survival rate of plantlets were 60 percent after transplanting in nursery.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | iv |
| สารบัญ | v |
| รายการตารางประกอบ | vi |
| รายการภาพประกอบ | vii |
| บทนำ | 1 |
| การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 2 |
| วิธีการวิจัย | 4 |
| ผลการวิจัย | 8 |
| การอภิปรายผล | 21 |
| สรุป | 24 |
| เอกสารอ้างอิง | 25 |
| ส่วนผนวก | 27 |

# รายการตารางประกอบ


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | จำนวนยอดเฉลี่ยและการเกิดแคลลัสของชวนชมจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดและตาข้าง ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน | 8 |
| 2 | ความสูง ,จำนวนยอดเฉลี่ยและการเกิดแคลลัสของชวนชมจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอด ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ kinetin หรือ $GA_3$ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน | 11 |
| 3 | จำนวนยอดเฉลี่ยของชวนชมพันธุ์ดอกสีแดง สีขาว และสีชมพู จากการเพาะเลี้ยงยอด ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน | 13 |
| 4 | เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของชวนชมพันธุ์ต่างๆ และการเกิดแคลลัส ภายหลังการเพาะเลี้ยงยอดชวนชมในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA IBA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 เดือน | 17 |
| 5 | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชวนชม หลังจากย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 30 วัน | 19 |

# รายการภาพประกอบ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | การเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นปกคลุมยอดชวนชม | 9 |
| 2 | ยอดชวนชมที่เกิดจากการเลี้ยงปลายยอดในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่างๆ | 12 |
| 3 | ยอดที่เจริญมาจากการเลี้ยงส่วนยอดของชวนชมพันธุ์ดอกสีแดง สีชมพู ในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน | 14 |
| 4 | ยอดที่เจริญมาจากการเลี้ยงส่วนปลายยอดของชวนชมพันธุ์ดอกสีขาว ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน | 15 |
| 5 | การเกิดรากของชวนชมพันธุ์ต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน | 18 |
| 6 | ต้นชวนชมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังการนำออกปลูกสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 30 วัน | 20 |

# บทที่ 1

# บทนำ

ชวนชมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Adenium obesum* เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน เปลือกต้นบาง กิ่งกลมใหญ่หนา ในต้นและใบมียางมากและมีรสขม เนื่องจากสารไกลโคไซด์ ใบเป็นใบเดี่ยวหนา ขอบเรียบ ใบมน โคนใบแหลม ใบมักแตกเป็นกลุ่มตามปลายกิ่ง ดอกออกตามปลายกิ่งเป็นช่อ ช่อหนึ่งมี 5-10 ดอก ดอกเป็นรูปแตร ปลายดอกแบ่งออกเป็น 5 แฉก (Geaf, 1980) ชวนชมมีหลายชนิดซึ่งจะแตกต่างกันตามสีดอก ลักษณะใบและทรงต้น ได้แก่ *Adenium obesum* เป็นพันธุ์ที่มีดอกสีชมพู *Adenium obesum* ssp. Coetaneum ให้ลักษณะดอกสีแดง *Adenium obesum* ssp. multiforum ดอกมีสีขาวกลีบดอกสีชมพูเข้ม *Adenium obesum* spp. Oleofolium เป็นจำพวกที่มีโขดใต้ดินใหญ่ต้นมีขนาดใหญ่ และ *Adenium obesum* ssp. swazicum กลีบดอกสีชมพู คอดอกหรือกลีบดอกด้านในเป็นสีชมพู เป็นต้น (Brickell , 1990) การพัฒนาชวนชมในบ้านเรากระทำโดย นำพันธุ์ต่างๆข้างต้นมาผสมพันธุ์กัน ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะใหม่และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

สำหรับการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตพืชในเชิงการค้า สามารถประสบผลสำเร็จได้กับอุตสาหกรรมไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ (Chu, 1992 ; Huetteman และ Preece, 1993 ; Pierik, 1987) ซึ่ง Murashige (1974) ได้แบ่งขั้นตอนของการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็น 4 ขั้นตอน คือ การใช้เนื้อเยื่อที่ปราศจากโรคมาทำการเพาะเลี้ยง การเพิ่มปริมาณต้นพืช การชักนำให้เกิดราก และการย้ายปลูกสู่สภาพธรรมชาติ โดยปัจจัยที่สำคัญในการขยายพันธุ์พืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ประสบผลสำเร็จได้แก่ ชิ้นส่วนพืช อาหารและสภาพแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงพืช โดยปกติในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะจำพวกไม้เนื้ออ่อน การเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชโดยใช้ปลายยอด และตาข้าง จะสามารถชักนำให้พืชมีการพัฒนาได้สูงสุด (ประศาสตร์, 2538) และนิยมเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) ซึ่งนิยมใช้เป็นสูตรอาหารเริ่มต้นการเลี้ยงและการเพิ่มปริมาณพืช สูตรอาหารดังกล่าวจะประกอบด้วย ธาตุอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของพืช วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต จากรายงานการทดลองในพืชหลายชนิดพบว่า การพัฒนาการของพืชมักเกี่ยวข้องกับ ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ โดยมีรายงานพบว่า พืช *Rauwolfia micrantha* ซึ่งจัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับชวนชม เมื่อนำปลายยอด และส่วนปล้องของยอดอ่อน มาเพาะเลี้ยง

บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ BA (6-benzyladenine) และ NAA (α-naphthaleneacetic acid) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้ 77 % ภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ และสามารถชักนำให้เกิดรากได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA (Sudha และ Seeni , 1996) อย่างไรก็ตามปริมาณสารที่พืชต้องการ จะขึ้นอยู่กับ ปริมารสารที่มีอยู่แล้วในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อพืช ชนิดพืชและระยะการเจริญเติบโตของพืช (Skoog และ Miller, 1957)

นอกจากความสำคัญของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแล้ว สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ แสงและอุณหภูมิ ซึ่งส่วนใหญ่มักเพาะเลี้ยงพืชภายใต้สภาพที่มีความเข้มของแสงประมาณ 1000-5000 lux (Hussey,1980) และอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ที่เหมาะสมกับการพัฒนาของพืช ( Seabrook และ Cumming , 1982)

**การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

ในปัจจุบันวงการตลาดไม้ดอกและไม้ประดับมีแนวโน้มเข้ามามีบทบาทในการเพิ่มรายได้ให้กับประเทศ เพราะนอกจากจะปลูกเป็นงานอดิเรกเพื่อความสวยงามและมีความเพลิดเพลินแล้ว ยังสามารถปลูกเพื่อเป็นการค้าได้อีกด้วย ชวนชม (pink begonia, Impala lily, Desert rose) ถูกจัดว่าเป็นไม้ประดับชนิดหนึ่ง ที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับผู้นิยมต้นไม้ ทั้งนี้เนื่องจากชวนชมมีมากมายหลายพันธุ์ มีสีดอกสวยงามสะดุดตา และบางพันธุ์มีกลิ่นหอม นอกจากสีดอกที่สวยงามแล้ว ยังพบว่าชวนชมมีลำต้นสวยงามและเป็นที่นิยมในการทำบอนไซ ทำต้นยักษ์ และทำต้นแฟนซี เป็นต้น

ชวนชมมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา และมีการนำเข้ามาปลูกเลี้ยงในประเทศไทยเป็นเวลานานกว่า 40 ปี ชวนชมสามารถเจริญเติบโตได้ดีกับสภาพอากาศในบ้านเรา จึงนิยมปลูกเป็นไม้ประดับสวนตามสถานที่ต่างๆ เช่น สวนสาธารณะ เกาะกลางถนน บริเวณวัด โรงเรียน และที่พักอาศัยเป็นต้น เนื่องจากเราสามารถพบเห็นต้นชวนชมมีอยู่ทั่วไป จึงคิดว่าเป็นต้นไม้ที่ไม่มีราคา แต่ปัจจุบันได้มีการนำชวนชมลูกผสมจากต่างประเทศเข้ามาปลูกในประเทศไทย ทำให้ได้ชวนชมลักษณะใหม่ๆที่มีความหลากหลายทั้งสีดอกและรูปทรงต้น ซึ่งแตกต่างจากเดิมที่พบเห็นกันในรูปของดอกสีชมพูและมีทรงต้นที่คล้ายคลึงกัน จากความสวยงามของดอกและทรงต้นของชวนชมลูกผสมต่างประเทศนี้ ทำให้ชวนชมกลายเป็นต้นไม้ที่มีราคาและกำลังเป็นไม้เศรษฐกิจในกลุ่มไม้

ดอกไม้ประดับอีกชนิดหนึ่ง โดยสามารถส่งออกต้นชวนชมไปยังต่างประเทศได้แก่ สิงคโปร์ มาเลเซีย และฮ่องกงเป็นต้น โดยในปี 2534 มีมูลค่าการส่งออกเท่ากับ 823,253 บาท และในปี 2536 มีมูลค่าการส่งออกเท่ากับ 981,912 บาท (เปรมปรี, 2540)

จากมูลค่าการส่งออกที่เพิ่มมากขึ้น จะเห็นได้ว่าความนิยมปลูกเลี้ยงชวนชมลูกผสมใหม่ๆ มีเพิ่มขึ้น และมีการพัฒนาการปลูกเลี้ยงให้ได้ต้นที่โตไวและสามารถออกดอกได้ง่ายตลอดจนพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเมล็ด การตอนกิ่ง การปักชำ และการเสียบยอด สำหรับการขยายพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าวจะมีวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันไป ซึ่งถ้าหากมีการส่งสริมให้มีการเพาะปลูกพันธุ์ดีมากขึ้นและมองเห็นถึงแนวทางการเพิ่มศักยภาพในการผลิตชวนชมเพื่อเป็นการค้า การขยายพันธุ์วิธีตามปกติข้างต้นอาจได้ต้นที่มีปริมาณไม่เพียงพอ ดังนั้นการนำเอาวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ หรือการขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความสำคัญยิ่งในการเพิ่มปริมาณต้นให้ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว และพืชที่ได้มีลักษณะตรงตามพันธุ์เดิมมากที่สุด(Chu, 1992) เช่นเดียวกับความสามารถผลิตพืชด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับอุตสาหกรรมของวงการไม้ดอกไม้ประดับประเภทอื่นจนประสบผลสำเร็จแล้วนั้น และเนื่องจากงานวิจัยเพื่อส่งเสริมและสนับสนุนการพัฒนางานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชมยังมีไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษาถึงข้อมูลเบื้องต้นของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชมจึงเป็นสิ่งสำคัญ อีกทั้งยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของงานวิจัยทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ชวนชมเพื่อพัฒนาให้ได้พืชที่มีลักษณะดอก ใบ และรูปทรงต้น ให้เป็นที่ต้องการของตลาดต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณต้นชวนชมพันธุ์ดี
2. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากของต้นชวนชมพันธุ์ดี

# บทที่ 2

# วิธีการวิจัย

## 2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด

2.1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.1.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

2.1.4 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

## 2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ

2.2.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

2.2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.2.3 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว

## 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตร Murashige และ Skoog (MS)(1962)

2.3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

- BA (6 - benzyladenine)
- $GA_3$ (gibberellic acid )
- kinetin (6-furfuryl amino purine)
- IBA (indole-3-butyric acid)
- NAA ($\alpha$-naphthaleneacetic acid )
- IAA (indole-3-acetic acid)

2.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อและลดแรงตึงผิวได้แก่

- เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- คลอรอกซ์ (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25 เปอร์เซ็นต์)
- tween-20

**2.4 วัสดุที่ใช้ในการปลูก**

2.4.1 กระถาง และปุ๋ย

2.4.2 ดิน : ทราย : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1

2.4.3 ถุงพลาสติก

**2.5 พืชทดลอง**

สำรวจแหล่งปลูกชวนชมพันธุ์ดีที่บริเวณ อ. กำแพงแสน และ อ. สามพราน จ. นครปฐม นำเมล็ดชวนชมพันธุ์ดีจากบริเวณดังกล่าวมาเพาะในกระถางจนเกิดดอก และทำการคัดเลือกพันธุ์ดี 3 พันธุ์คือ พันธุ์ดอกสีแดง พันธุ์ดอกสีขาว และพันธุ์ดอกสีชมพู เพื่อใช้เป็นพืชทดลอง

**2.6 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ**

ตัดยอดชวนชมขนาดประมาณ 4-5 เซนติเมตร ตัดใบออกล้างด้วยน้ำให้สะอาด แล้วนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารจับใบ (tween-20) 1-2 หยด และเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 20 นาที และสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อในส่วนที่ถูกสารละลายคลอรอกซ์ทำลายออก และตัดชิ้นส่วนเป็นท่อนสั้นยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ย้ายลงเลี้ยงในอาหาร water agar เพื่อตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อแล้วไปใช้สำหรับการทดลองต่อไป

**2.7 การชักนำชวนชมให้เกิดยอด**

เลี้ยงปลายยอดและตาข้างของชวนชมที่ปลอดเชื้อแล้วที่ได้จากข้อ 2.6 บนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2$ องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดยอด และบันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทุก 2 สัปดาห์

**2.8 การเพิ่มปริมาณยอดชวนชม**

**2.8.1 ศึกษาหาระดับความเข้มข้นของ BA , kinetin และ $GA_3$ ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอด**

ภายหลังจากที่ชักนำชวนชมให้เกิดยอดแล้ว จึงทำการศึกษาสูตรอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณยอดชวนชมโดยการนำยอดที่ได้จากข้อ 2.7 เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA หรือ kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 , 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหาร MS ที่เติม $GA_3$ ระดับความเข้มข้น 0.5 , 1 , 2 , และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงในสภาพเช่นเดียวกับข้อ 2.7 บันทึกจำนวนยอดและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทุก 2 สัปดาห์

**2.8.2 การเพิ่มปริมาณยอดชวนชมพันธุ์ดี**

ภายหลังจากที่ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยอดชวนชมในข้อ 2.8.1 แล้วจึงนำยอดชวนชมพันธุ์ดี 3 พันธุ์คือ พันธุ์ดอกสีแดง พันธุ์ดอกสีขาว และพันธุ์ดอกสีชมพู ที่มาจากการสำรวจแหล่งปลูกในข้อ 2.5 และต้นเจริญสมบูรณ์ดี ตัดยอดมาทำการฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.6 และย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณยอดชวนชมตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 บันทึกจำนวนยอด

**2.9 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้ยอดชวนชมเกิดราก**

นำยอดชวนชมที่ได้จากข้อ 2.8 ยอดมีความสมบูรณ์แข็งแรงและมีความสูง 1-2 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก โดยใช้สูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA , IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงในสภาพเช่นเดียวกับข้อ 2.7 บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

**2.10 การย้ายต้นชวนชมออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก**

นำต้นอ่อนชวนชมที่แข็งแรงและมีรากสมบูรณ์ที่ได้จากข้อ 2.9 ออกจากขวด ล้างวุ้นออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด แช่ในน้ำยาป้องกันเชื้อรา ผึ่งให้แห้งปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาด 3 นิ้ว ที่บรรจุดิน ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปรับสภาพโดยคลุมถุงพลาสติกและปิดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายไปไว้ในเรือนทดลองที่มีการพ่นละอองน้ำให้ความชื้น เปิดปากถุงทิ้งไว้ 1 คืน และปิดปากถุงต่อไปอีก 3-5 วัน เอาถุงพลาสติกออก สังเกตว่าต้นอ่อนชวนชมแข็งแรงปรับตัวได้ จึงนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกโดยใช้วัสดุปลูกที่ผสมดิน : ทราย : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นชวนชมภายหลังการย้ายปลูก 1 เดือน

# บทที่ 3

# ผลการวิจัย

## 3.1 การชักนำชวนชมให้เกิดยอด

จากการชักนำให้เกิดยอดโดยการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดและตาข้างของชวนชมในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 , 0.1 , 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน พบว่าการใช้ BA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ซึ่งชิ้นส่วนปลายยอดมีการพัฒนาการเกิดยอดมากกว่าชิ้นส่วนตาข้าง นอกจากนี้พบแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่โคนต้นโดยจะเริ่มเกิดภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไป และแคลลัสจะเพิ่มปริมาณปกคลุมยอดอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 1) สำหรับชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มี BA พบการเกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่โคนต้นเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ยและการเกิดแคลลัสของชวนชมจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน

| ระดับ BA | ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง | | การเกิดแคลลัส [1] | |
|---|---|---|---|---|
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ยอด | ตาข้าง | ยอด | ตาข้าง |
| 0.00 | 1.00 | 1.00 | +++ | +++ |
| 0.10 | 2.30 | 1.15 | +++ | +++ |
| 0.25 | 2.50 | 2.00 | +++ | +++ |
| 0.50 | 4.50 | 2.50 | +++ | +++ |

[1] ระดับคะแนนของการเกิดแคลลัส

- \- ไม่เกิดแคลลัส
- \+ เกิดแคลลัสเล็กน้อย
- \+ + เกิดแคลลัสปานกลาง
- +++ เกิดแคลลัสมาก

ภาพที่ 1 การเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นปกคลุมยอดชวนชม

### 3.2 การเพิ่มปริมาณยอดชวนชม

#### 3.2.1 ผลการศึกษาหาระดับความเข้มข้นของ BA , kinetin และ $GA_3$ ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอด

จากการทดลองในข้อ 3.1 ส่วนปลายยอดสามารถเกิดยอดได้มากกว่าส่วนตาข้าง และในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นมากขึ้นมีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณยอดสูงขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเพิ่มความเข้มข้นของ BA และศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณยอดชวนชม โดยการเลี้ยงปลายยอดของชวนชมบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) ที่เติม BA หรือ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในข้อ 2.8 พบว่า หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ชิ้นส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ทุกระดับความเข้มข้น ยอดจะมีลักษณะบวมเกิดอาการฉ่ำน้ำเล็กน้อยและมีแคลลัสเกิดขึ้นปริมาณมากบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่สัมผัสอาหาร เมื่อเลี้ยงยอดเป็นระยะเวลา 1 เดือน แคลลัสมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นปกคลุมยอด ต่อมาแคลลัสเริ่มมีสีน้ำตาล ทำให้ยอดไม่เจริญเติบโต (ภาพที่ 2 a) ปลายยอดชวนชมที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม kinetin ทุกระดับความเข้มข้น เกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับการใช้ BA แต่เกิดปริมาณปานกลางและแคลลัสส่วนใหญ่ยังคงความมีสีเขียวอยู่ (ภาพที่ 2 b) ส่วนปลายยอดชวนชมที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม $GA_3$ ทุกระดับความเข้มข้นมีแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่สัมผัสอาหารเช่นเดียวกัน และเกิดในปริมาณน้อยกว่าการใช้ BA หรือ kinetin (ภาพที่ 2 c) หรือยอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ( control) (ภาพที่ 2 d) ในการเพิ่มปริมาณยอดชวนชม พบว่า อาหารสูตร MS ที่มี kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้มากที่สุดมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.5 ยอด รองลงมาคือ อาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.5 ยอด ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม $GA_3$ มีการเพิ่มจำนวนยอดน้อยมาก สำหรับความสูงของยอดพบว่าการใช้ $GA_3$ จะทำให้ยอดมีความสูงกว่าการใช้ BA หรือ kinetin การใช้ $GA_3$ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ความสูงของยอดลดลง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความสูง ,จำนวนยอดเฉลี่ยและการเกิดแคลลัสของชวนชมจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ kinetin หรือ $GA_3$ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน

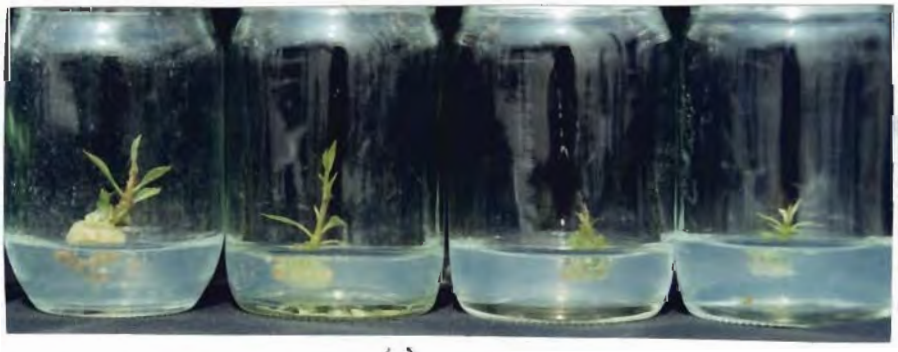
| ชนิดของฮอร์โมน | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ความสูง (เซนติเมตร) | จำนวนยอดเฉลี่ย | การเกิดแคลลัส[1] |
|---|---|---|---|---|
| control | 0 | 3.00 | 1.00 | ++ |
| BA | 0.5 | 1.50 | 5.50 | +++ |
| | 1 | 0.80 | 2.70 | +++ |
| | 2 | 0.50 | 1.25 | +++ |
| | 3 | 0.50 | 1.08 | +++ |
| | 4 | 0.50 | 1.00 | +++ |
| | 5 | 0.50 | 1.00 | +++ |
| kinetin | 0.5 | 1.30 | 3.50 | ++ |
| | 1 | 1.50 | 7.50 | ++ |
| | 2 | 0.50 | 3.08 | ++ |
| | 3 | 0.50 | 1.33 | ++ |
| | 4 | 0.50 | 1.25 | ++ |
| | 5 | 0.50 | 1.00 | ++ |
| $GA_3$ | 0.5 | 2.65 | 1.75 | + |
| | 1 | 2.65 | 1.00 | + |
| | 2 | 1.00 | 1.08 | + |
| | 4 | 1.00 | 1.00 | + |

[1] ระดับคะแนนของการเกิดแคลลัส

- \- ไม่เกิดแคลลัส
- \+ เกิดแคลลัสเล็กน้อย
- \+ + เกิดแคลลัสปานกลาง
- \+ + + เกิดแคลลัสมาก

(a)

(b)



(c)

(d)

ภาพที่ 2 ยอดชวนชมที่เกิดจากการเลี้ยงปลายยอดในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่างๆ

a) BA ความเข้มข้น 0.5 , 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ( จากซ้ายไปขวา )

b) kinetin ความเข้มข้น 0.5 , 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ( จากซ้ายไปขวา )

c) $GA_3$ ความเข้มข้น 0.5 , 1, 2, และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ( จากซ้ายไปขวา )

d) อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)

### 3.2.2 การเพิ่มปริมาณยอดชวนชมพันธุ์ดี

จากการทดลองในข้อ 3.2.1 ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยอด คือ อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชวนชมให้เพิ่มจำนวนยอดได้ ดังนั้นการทดลองจึงนำยอดชวนชมพันธุ์ลูกผสม 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ดอกสีแดง พันธุ์ดอกสีขาว และพันธุ์ดอกสีชมพู มาทำการฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการข้อ 2.6 และเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น พบว่า ชวนชมทุกสายพันธุ์จะเกิดแคลลัสขึ้นบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่โคนต้นภายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ขึ้นไป (ตารางที่ 3 , ภาพที่ 3 และ 4) ชวนชมพันธุ์ดอกสีขาวเกิดยอดได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 6.5 ยอด ส่วนชวนชมพันธุ์ดอกสีแดงและสีชมพูเกิดยอดได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.9 และ 6.84 ยอด ตามลำดับ การเพิ่มปริมาณยอดของชวนชมส่วนใหญ่ในอาหารทั้ง 2 สูตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากกว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนยอดเฉลี่ยของชวนชมพันธุ์ดอกสีแดง สีขาว และสีชมพู จากการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน

| สูตรอาหาร | พันธุ์ชวนชม | | | จำนวนยอดเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|
| | ดอกสีแดง | ดอกสีขาว | ดอกสีชมพู | |
| MS + BA 0.5 mg/l | 5.63 | 6.50 | 5.21 | 5.78 |
| MS + kinetin 1 mg/l | 7.90 | 6.27 | 6.84 | 7.00 |

(a)

(b)

ภาพที่ 3 ยอดที่เจริญมาจากการเลี้ยงส่วนปลายยอดของชวนชมในอาหาร สูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน

a ) ชวนชมพันธุ์ดอกสีแดง

b) ชวนชมพันธุ์ดอกสีชมพู

ภาพที่ 4 ยอดที่เจริญมาจากการเลี้ยงส่วนปลายยอดของชวนชมพันธุ์ดอกสีขาว ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน

### 3.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้ยอดชวนชมเกิดราก

จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช *Rauvolfia micrantha* และ *Rauvolfia tetraphylla* ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับชวนชม สามารถชักนำให้ออกรากได้ในอาหาร Murashige และ Skoog (MS) (1962) ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Patil และ Jayanthi, 1997) และ MS ที่เติม NAA (Sudha และSeeni , 1996 ; Sarma และคณะ, 1999 ) ดังนั้นการทดลองจึงใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน โดยนำยอดชวนชม 3 สายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 3.2 มาขยายเพิ่มปริมาณยอดและคัดเลือกยอดที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงมีความสูงของยอด 1-2 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดรากคือ สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ IAA , IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดชวนชมทุกสายพันธุ์ข้างต้นสามารถออกรากได้ในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( ภาพที่ 5 ) โดยใช้ระยะเวลาในการชักนำให้เกิดราก 40-50 วัน โดยชวนชมพันธุ์ดอกสีแดงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากมากที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ ชวนชมพันธุ์ดอกสีขาวและสีชมพูมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการเกิดรากมากกว่า 60 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 10 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ทุกระดับความเข้มข้นไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ นอกจากนี้พบว่าอาหาร MS ที่เติมสาร IAA IBA และ NAA รวมทั้งอาหาร MS ที่ไม่เติมสารดังกล่าวมีแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณโคนต้น การใช้ IBA ทำให้เกิดแคลลัสปริมาณน้อยกว่าการใช้ IAA และ NAA (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของชวนชมพันธุ์ต่างๆ และการเกิดแคลลัส ภายหลังการเพาะเลี้ยงยอดชวนชมในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA IBA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 เดือน

| ชนิดของสาร | ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | เปอร์เซ็นต์การเกิดราก [1] | | | การเกิดแคลลัส [2] |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ดอกสีแดง | ดอกสีชมพู | ดอกสีขาว | |
| control | 0.0 | 10 | 10 | 10 | +++ |
| IAA | 0.1 | 20 | 20 | 20 | +++ |
| | 0.2 | - | - | - | +++ |
| | 0.3 | - | - | - | +++ |
| | 0.4 | - | - | - | +++ |
| | 0.5 | - | - | - | +++ |
| | 1.0 | - | - | - | +++ |
| IBA | 0.1 | 60 | 50 | 50 | ++ |
| | 0.2 | - | - | - | ++ |
| | 0.3 | - | - | - | ++ |
| | 0.4 | - | - | - | ++ |
| | 0.5 | - | - | - | ++ |
| | 1.0 | - | - | - | ++ |
| NAA | 0.1 | - | - | - | +++ |
| | 0.2 | - | - | - | +++ |
| | 0.3 | - | - | - | +++ |
| | 0.4 | - | - | - | +++ |
| | 0.5 | - | - | - | +++ |
| | 1.0 | - | - | - | +++ |

[1] - หมายถึงไม่เกิดราก

[2] ระดับคะแนนของการเกิดแคลลัส

+ เกิดแคลลัสเล็กน้อย

+ + เกิดแคลลัสปานกลาง

+ + + เกิดแคลลัสมาก

(a)

(b)

(c)

ภาพที่ 5 การเกิดรากของชวนชมพันธุ์ต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

a) พันธุ์ดอกสีแดง

b) พันธุ์ดอกสีขาว

c) พันธุ์ดอกสีชมพู

**3.4 การย้ายต้นชวนชมออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก**

จากผลการทดลองในข้อ 3.3 เมื่อได้ต้นชวนชมที่สมบูรณ์และมีรากแล้วจำนวน 30 ต้น นำมาปรับสภาพต้นก่อนนำออกปลูกตามวิธีการข้อ 2.10 ให้ความชื้นสูงในระยะแรกโดยใช้ถุงพลาสติกคลุมกระถาง หลังจากนั้นค่อยๆ ลดความชื้นลง เมื่อต้นมีความแข็งแรงดี จึงทำการย้ายปลูก ในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน : ทราย : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 ภายหลังจากการย้ายปลูกเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นชวนชมจำนวน 18 ต้น สามารถเจริญเติบโตดีในสภาพแวดล้อมภายนอก คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 , ภาพที่ 6)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชวนชม หลังจากย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 30 วัน

| พันธุ์ | เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต |
|---|---|
| พันธุ์ดอกสีแดง | 50 |
| พันธุ์ดอกสีชมพู | 70 |
| พันธุ์ดอกสีขาว | 60 |
| เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ย | 60 |

ภาพที่ 6 ต้นชวนชมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังการนำออกปลูกสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 30 วัน

# บทที่ 4

## การอภิปรายผล

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดและตาข้างของชวนชมในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพื่อชักนำให้เกิดยอดพบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อดังกล่าวข้างต้นมีการพัฒนาเป็นแคลลัสที่บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับอาหาร คล้ายกับงานทดลองของ Sarker และคณะ (1996) ซึ่งเลี้ยงปลายยอดและตาข้างของ *Rauvolfia serpentina* เป็นพืชสมุนไพรที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับชวนชม ในอาหารสูตร MS ที่มี BA และเกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อเช่นเดียวกัน แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ จากการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของชวนชมมีการเพิ่มปริมาณแคลลัสอย่างรวดเร็วทั้งในส่วนรอยตัดเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับอาหารและรอยตัดเนื้อเยื่อด้านบนที่ไม่สัมผัสกับอาหารที่เกิดจากการตัดเนื้อเยื่อปลายยอดออกไปแล้ว ทำให้แคลลัสเกิดขึ้นปกคลุมตาข้างอย่างรวดเร็ว อาจมีผลไปขัดขวางการเกิดยอดใหม่ได้ ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดจะเกิดแคลลัสเฉพาะบริเวณรอยตัดเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับอาหารเท่านั้น และโอกาสที่จะเกิดยอดใหม่จึงมีมากกว่าตาข้าง ดังนั้นเนื้อเยื่อปลายยอดมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นสำหรับการขยายพันธุ์ชวนชมในสภาพปลอดเชื้อมากกว่าตาข้าง

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดชวนชมโดยการเลี้ยงปลายยอดชวนชมในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA kinetin และอาหารสูตร MS ที่เติม $GA_3$ ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่า การใช้ BA หรือ kinetin หรือ $GA_3$ พบแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับอาหารเช่นเดียวกับการไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสที่เกิดขึ้นมีทั้งลักษณะแข็ง (compact callus) และลักษณะที่เกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) อาหารสูตร MS ที่มี $GA_3$ มีแคลลัสเกิดขึ้นน้อยกว่าอาหารสูตร MS ที่มี BA และ kinetin แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ ในการทดลองพบว่าส่วนปลายยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดมากที่สุด รองลงมาคือ อาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คล้ายคลึงกับงานทดลองเพิ่มปริมาณยอดพืชในวงศ์เดียวกับชวนชมคือ *Rauvolfia tetraphylla* และ *R. micrantha* พบว่าสามารถเกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA (Patil และ Jayanthi ,1997) และงานทดลองเพิ่มปริมาณยอดของพืช *R. tetraphylla* พบว่า สามารถเกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.4-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1-0.2

มิลลิกรัมต่อลิตร ( Sarma และคณะ, 1999) ดังนั้นจากการวิจัยครั้งนี้การใช้ kinetin และ BA ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณยอดได้ โดยหลังจากเกิดยอดเล็กๆ จำนวนมากแล้ว ควรย้ายลงสู่อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารสูตร MS ที่เติม $GA_3$ ความเข้มข้นไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ยอดเจริญยืดยาวขึ้น

สำหรับการเพิ่มปริมาณยอดของชวนชมสายพันธุ์ดี 3 พันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหารสูตร MS ที่มี kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละพันธุ์ของชวนชมสามารถเพิ่มปริมาณยอดในสูตรอาหารแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดของชวนชมแต่ละพันธุ์ขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของปริมาณสารที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endogeneous substance) กับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชได้รับ (Gregory และคณะ , 1995 ; Krikorian และคณะ, 1987)

ในการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้ยอดชวนชมเกิดรากโดยเลี้ยงยอดชวนชมในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA หรือ IBA หรือ NAA พบว่า ยอดของชวนชมทุกพันธุ์สามารถเกิดรากได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ คล้ายคลึงกับงานทดลองของ Patil และ Jayanthi (1997) สามารถชักนำพืชสมุนไพรวงศ์เดียวกับชวนชมคือ *Rauvolfia tetraphylla* และ *R. micrantha* ให้เกิดรากได้ในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับยอดชวนชมที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากน้อยมากคือ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA หรือ IAA ความเข้มข้นอื่นๆ รวมทั้ง NAA ทุกระดับความเข้มข้นไม่เกิดราก นอกจากนี้พบว่ายอดชวนชมที่ไม่เกิดรากมีแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณโคนต้นปริมาณมากกว่ายอดชวนชมที่เกิดราก การเกิดแคลลัสนี้อาจไปขัดขวางการพัฒนายอดให้เกิดรากได้ หรืออาจเนื่องมาจากการเติมสารในกลุ่มออกซิน มีผลให้ปริมาณออกซินต่อไซโตไคนินภายในเนื้อเยื่ออยู่ในระดับที่สูงกว่าอัตราส่วนสมดุลย์ เนื้อเยื่อพืชจึงพัฒนาไปเป็นแคลลัสแทนการพัฒนาเป็นราก (Skoog และ Miller,1957)

การย้ายต้นชวนชมออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก ระยะแรกต้องปลูกในสภาพที่มีความชื้นสูงเพราะพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มีความชื้นสัมพัทธ์สูงมาก มีการสร้างชั้น cuticle น้อยมาก ถ้านำไปปลูกในที่มีความชื้นต่ำจะสูญเสียน้ำและตายได้ (Pierik , 1987) ในการย้ายต้น

ชวนชมออกปลูกครั้งแรกพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตค่อนข้างต่ำ จึงได้ปรับปรุงการย้ายปลูกโดยควบคุมความชื้นในเครื่องปลูกที่ใช้โดยให้เครื่องปลูกมีความชื้นแต่ไม่แฉะ ถ้าความชื้นสูงเกินไปทำให้รากเน่าได้ ความสำเร็จในการย้ายต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการได้แก่ วัสดุปลูก ความชื้น ลักษณะความแข็งแรงของต้นรวมทั้งความสามารถในการเจริญของราก (Kyte, 1990)

# บทที่ 5

# สรุป

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชมสรุปได้ดังนี้

1. ในการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดและตาข้างของชวนชมในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพื่อชักนำให้เกิดยอดพบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดเกิดยอดได้ดีกว่าตาข้าง

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดของชวนชมคืออาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 7.5 ยอด รองลงมาคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.5 ยอด

3. ในการเพิ่มปริมาณยอดของชวนชมพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ดอกสีแดง พันธุ์ดอกสีขาว และพันธุ์ดอกสีชมพู พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณยอดชวนชมจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพันธุ์ และ สารควบคุมการเจริญเติบโต

4. ยอดชวนชมสามารถเกิดรากได้ดีที่สุดเมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชวนชมทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากส่วนใหญ่ใกล้เคียงกัน

5. การย้ายต้นชวนชมออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการย้ายปลูกโดยเฉลี่ย 60 เปอร์เซ็นต์

# เอกสารอ้างอิง


ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2540. ชวนชมไม้งามนามมงคล. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์เคหะการเกษตร.

Brickell, C. 1990. The royal horticultural society. Gardener' s encyclopedia of plants and flowers. London : Dorling Kindersley.

Chu, l. Y. E. 1992. Perspectives of micropropagation industry, p. 55. cited in O. L. Gamborg ; and G. C. Phillips (eds.). Plant cell tissue and organ cult. Germany : Springer, 1995.

Geaf, A. B. 1980. Exotica series. 3 rd. 10 th ed. USA: Roehrs Company Inc.

Gregory, C. P. , John, F. H., and Elizabeth, E. H. 1995. Adventitious shoot proliferation. In O.L. Gamborg ; and G. C. Phillips(eds.) Plant cell tissue and organ cult. , pp. 55-79. Germany : Springer.

Huetteman, C. A. and Preece, J. E. 1993. Thiadizuron : a patent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant cell tissue and organ cult. 33 : 105-119.

Hussey, G. 1980. In vitro propagation, p. 331. Cited in Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. Clonal propagation. Plant tissue culture : theory and practice. Netherlands : Elsevier Science Publisers B. V. , 1983.

Krikorian, A.D.,K. Kelly and D.L. Smith. 1987. Hormonees in tissue culture and micropopagation, pp. 593-163. *In* P.J. Davies(ed.). Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Kyte, L. 1990. Plant from Test Tube. Timber Press, Portland. 130 p.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annu. Rev. of Plant Physiol. 25 : 135-166.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Patil, V.M. and Jayanthi M. 1997. Micropropagation of two species of *Rauvolfa* (Apocynaceae). Current Sci. 72 : (12) 961-965 .

Pierik, R. L. M. 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff : Dordrecht , p. 55. Cited in O.L. Gamborg ; and G. C. Phillips(eds.) Plant cell tissue and organ cult. , Germany : Springer. 1995.

Sarker, K.P. , Islam, A. , Islam ,R., Hoque , A. and Joarder , O.T. 1996. In vitro propagation of *Rauvolfia serpentina* through tissue culture. Planta Med. 62(4) : 358-359.

Sarma, D. , Sarma, S. and Baruah, A. 1999. Micropropagation and *in vitro* flowering of *Rauvolfia tetraphylla* ; a potent source of anti-hypertension drugs. Planta Med. 63(3): 277-278.

Seabrook, J. E. A. and Cumming, B. G. 1982. In vitro morphogenesis and growth of *Nacissus* in response to temperature. Scientia hort. 16 : 185-190

Skoog, F. and Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growyh and organ in fomation in plant tissue cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Bio. 11 : 118-131.

Sudha, C. G. and Seeni, S. 1996. In vitro propagation of Rauwolfia micrantha, a rare medicinal plant. Plant cell tissue and organ cult. 44 : 243 –248.

# ส่วนผนวก

สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)

| องค์ประกอบ | มิลลิกรัมต่อลิตร |
|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 1650 |
| $KNO_3$ | 1900 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 440 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 370 |
| $KH_2PO_4$ | 170 |
| $H_3BO_3$ | 6.2 |
| $MnSO_4.H_2O$ | 6.9 |
| $ZnSO_4.H_2O$ | 6.14 |
| KI | 0.83 |
| $NaMoO_4.2H_2O$ | 0.25 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.025 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0.025 |
| $Na_2$-EDTA | 37.25 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27.85 |
| Glycine | 2 |
| Nicotinic acid | 0.5 |
| Pyridoxine.HCl | 0.5 |
| Thiamine | 0.1 |
| Sucrose | 30,000 |
| pH | 5.7 |