

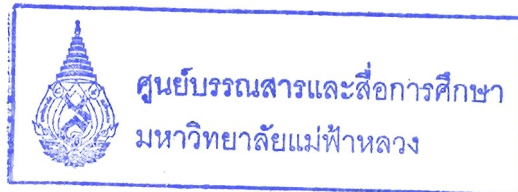
การชักนำรากชาจีนในสภาพปลอดเชื้อ
In vitro Root Induction of *Camellia sinensis* L.

จินดณี ยมภักดี

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2548



การชักนำรากชาจีนในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Root Induction of *Camellia sinensis* L.

จินตณี ยมภักดี

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2548

การชักนำรากชาจีนในสภาพปลอดเชื้อ
In vitro Root Induction of *Camellia sinensis* L.

จินตณี ยมภักดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้ นับว่าเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
2548

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รศ. ดร. พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์) ประธานกรรมการ

.....
(อาจารย์ ดร. สยามรัฐ ป่านภูมิ) กรรมการ

.....
(อาจารย์ จันทารักษ์ ไตรวานนท์) กรรมการ

.....
(อาจารย์ สมฤดี อันโต) กรรมการ

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์โดยได้รับคำแนะนำ คำปรึกษาและการให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุก ๆ ด้านของการทำวิจัย รวมถึงช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จากอาจารย์ ดร. สยามรัฐ ป้านภูมิ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพีใจ อาภาวัชรุตม์ ที่กรุณาให้ความรู้คำแนะนำ และแนวคิดที่มีคุณค่ายิ่ง ตลอดจนอาจารย์ จันทราภักษ์ ไทวรานนท์ และอาจารย์ สมฤดี อันโต ที่ได้ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณะผู้บริหารมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่ได้กรุณาจัดสรรงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานวิจัย ตลอดจนจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

จินตณี ยมภักดี

Title *In vitro* Root Induction of *Camellia sinensis* L.

Author Mrs. Jindanee Yompakdee

Degree Master of Science (Biotechnology)

Supervisory Committee

Lecturer. Dr. Sayamrat Panpoom	Chairman
Lecturer. Jantrararuk Tovanonte	Member
Lecturer. Somrudee Onto	Member

ABSTRACT

Shoots of *Camellia sinensis* L. (1.5–2.5 cm in length) derived from sterile plantlets were cultured on MS medium containing BA at 0, 1, 2, 3, 4 mg/l combined with IBA at 2, 4, 6, 8 mg/l and activated charcoal (6 g/l). Before culturing, The shoots were dipped in a solution containing 500 mg/l IBA for 1 min. The shoots were cultured for a period of 3 months with the first 2 weeks in darkness and then 10 weeks in light conditions.

The result showed root formation occurred in that most of the medium combinations BA and IBA at the ratio of 0:2, 0:6 and 2:8 mg/l yielded 100% root induction. However, the number and length of roots varied among the three media. The medium containing BA and IBA at the ratio of 0:2, 0:6 and 2:8 mg/l gave the average root number at 13.0, 16.6 and 15.5 roots/shoot and the average length of roots at 1.9, 1.2 and 1.8 cm respectively.

Keyword : *Camellia sinensis* L. / Tissue Culture / Root Induction

ชื่อเรื่อง การชักนำรากชาจีนในสภาพปลอดเชื้อ

ผู้เขียน นางจินตณี ยมภักดี

หลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.สยามรัฐ ป่านภูมิ	ประธานกรรมการ
อาจารย์ จันทราภักษ์ โตรวานนท์	กรรมการ
อาจารย์ สมฤดี อันโต	กรรมการ

บทคัดย่อ

เมื่อนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อขนาด 1.5-2.5 เซนติเมตร จากยอดหรือหน่อชาจีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 6 กรัมต่อลิตร โดยก่อนการเพาะเลี้ยงจุ่มฐานรอยตัดของเนื้อเยื่อในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาพมืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง พบว่าอาหารเกือบทุกส่วนผสมสามารถชักนำรากได้ โดยอาหารที่เติม BA ร่วมกับ IBA ในอัตราส่วน 0:2, 0:6 และ 2:8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้จำนวนรากและความยาวรากแตกต่างกันกล่าวคือ อาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ในอัตราส่วน 0:2, 0:6 และ 2:8 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ย 13.0, 16.6 และ 15.5 รากต่อยอด และให้ความยาวรากเฉลี่ย 1.9, 1.2 และ 1.8 เซนติเมตรต่อยอดตามลำดับ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน

คำสำคัญ : ชาจีน / เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ / การชักนำราก

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)จ	
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญแผนภาพ	ฎ
อักษรย่อ	ฏ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย1	
1.2 ขอบเขตของการวิจัย3	
2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและแนวคิดในการศึกษา	
2.1 แหล่งกำเนิดและประวัติของชา	4
2.2 อนุกรมวิธานของชา	7
2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา	10
2.4 การจำแนกพันธุ์ชา	13
2.5 องค์ประกอบทางเคมีของชา	15
2.6 ประโยชน์ของชา	16
2.7 โทษของชา	17
2.8 การปลูกชาในทางอุตสาหกรรม	17
2.9 การขยายพันธุ์ชา	21
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชา	26
2.11 ทฤษฎีหรือกรอบแนวคิดของงาน	29

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3 อุปกรณ์และวิธีการ	
3.1 วัสดุพันธุ์พืช	34
3.2 สารเคมี	34
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	35
3.4 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)	36
3.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรพื้นฐาน MS	38
3.6 การเตรียมสารละลายฆ่าเชื้อ	39
3.7 การฆ่าเชื้ออุปกรณ์และตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ	39
3.8 วิธีวิจัย	40
3.9 การเก็บรวบรวมผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ	46
4 ผลการศึกษา	47
5 การวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	67
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก	72
ประวัติผู้เขียน	76

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกใบชาและผลิตภัณฑ์	2
1.2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าใบชาและผลิตภัณฑ์	3
2.1 สถิติการปลูกชารายจังหวัด ปีการเพาะปลูก 2546	5
2.2 ส่วนประกอบโดยประมาณของยอดชาสด	15
2.3 ส่วนประกอบของใบชาสดและชาแห้ง	16
3.1 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS	36
3.2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS	37
3.3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์สูตร MS	37
3.4 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเกลือในอาหารสูตร MS	38
3.5 แสดงอาหารสูตรชักนำรากที่ประกอบด้วยอาหาร MS ร่วมกับ BA และ IBA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	46

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 การแพร่กระจายพันธุ์ชาในภูมิภาคต่าง ๆ	5
2.2 <i>Camellia japonica</i> L.	8
2.3 <i>Camellia sasanqua</i> Thunb.	9
2.4 <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> Mast.	9
2.5 <i>Camellia sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	10
2.6 การจัดเรียงตัวของใบแบบ alternate	11
2.7 ลักษณะดอก <i>Camellia sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	12
2.8 ผลแบบแคปซูล	12
2.9 เมล็ด <i>Camellia sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	13
2.10 <i>Camellia sinensis</i> var. <i>indo-china</i>	14
2.11 การขยายพันธุ์โดยการเสียบกิ่ง	24
2.12 การขยายพันธุ์โดยเมล็ด	25
2.13 การขยายพันธุ์โดยการปักชำ	25
3.1 ชาจีน อายุ 2 ปี ในสภาพปลอดเชื้อ	41
3.2 เนื้อเยื่อชาจีนที่ถูกตัดแบ่งเป็นท่อนก่อนการนำไปเพาะเลี้ยง	43
4.1 ใบเลี้ยงของชาที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	48
4.2 การเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	48
4.3 การเริ่มพัฒนาของแคลลัสจากใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	49
4.4 การพัฒนาของแคลลัสในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	50
4.5 การพัฒนาเป็นต้นอ่อนโดยตรงผ่านเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	51
4.6 การเจริญเติบโตของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	52

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพ	หน้า
4.7 แคลลัสส์ชิมพูกัมแดงบริเวณฐานรอยตัดของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร MS ร่วมกับBA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร	53
4.8 แคลลัสส์เหลืองกัมเขียวบริเวณฐานรอยตัดของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร MS ร่วมกับBA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร	53
4.9 การพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	54
4.10 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 90 วัน ก) ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร	56
4.11 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ เป็นเวลา 90 วัน ก) ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร	59
4.12 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการใช้ Quick Dip Method ก) ผสม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) ผสม IBA เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ค) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	61
4.13 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ การใช้ผงถ่านกัมมันต์และ Quick Dip Method ก) ผสม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) ผสม IBA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ค) ผสม IBA เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ง) ผสม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	64

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพ	หน้า
4.14 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการใช้ ผงถ่านกัมมันต์และ Quick Dip Method ในอาหารที่มี BA และ IBA ก) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ค) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ง) ผสม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	65
4.15 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการใช้ ผงถ่านและ Quick Dip Method ในอาหารที่มี BA และ IBA ความเข้มข้นสูง ก) ผสม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) ผสม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ค) ผสม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ง) ผสม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	66

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพ

หน้า

3.1 ขั้นตอนโดยสรุปของการดำเนินงานวิจัย

44



อักษรย่อ

ออกซิน

- IAA : (3-Indoleacetic acid)
 IBA : (3-Indolebutyric acid)
 NAA : (1-Naphthaleneacetic acid)
 2, 4-D : (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

ไซโตไคนิน

- BA : (N⁶-Benzyladenine)
 BAP : (N⁶-Benzylaminopurine)
 2iP : (N⁶- γ,γ -Dimethylallylamino purine)
 kinetin : (N⁶-Furfurylamjnopurine)

สูตรอาหาร

- MS : Murashige and Skoog medium (1962)
 WPM : Woody Plant Medium
 B₅ : Gamborg *et al.* medium (1968)
 SH : Schenk and Hildebrandt medium (1972)

อื่น ๆ

- ค.ศ. : คริสตทศวรรษ
 ซม : เซนติเมตร
 กก : กิโลกรัม
 ก/ล : กรัมต่อลิตร
 มก/ล : มิลลิกรัมต่อลิตร
 % : เปอร์เซ็นต์
 DNA : deoxyribonucleic acid
 RNA : ribonucleic acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย

ตามชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Dodd, 1944) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เป็นเครื่องดื่มประจำชาติของจีน ต่อมาได้แพร่หลายไปทั่วโลกสำหรับประเทศไทยต้นชามีแหล่งกำเนิดตามภูเขาของประเทศ แหล่งปลูกชากระจายอยู่หลายจังหวัดในภาคเหนือ ที่สำคัญคือ จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย (กรมวิชาการเกษตร, ม.ป.ป.) โดยมีหน่วยงานของรัฐเป็นกำลังสำคัญในการส่งเสริมให้จังหวัดเชียงรายสนับสนุนประชาชนปลูกชา เนื่องจากสภาพทั่วไปเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต และชาเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับปลูกในบริเวณพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมบนที่สูง ซึ่งเกิดจากการบุกรุกทำลายป่า เพื่อใช้เป็นที่ทำกินของราษฎรนอกจากนี้ชาเป็นพืชที่มีระบบรากลึกเหมาะที่จะปลูกเป็นพืชอนุรักษ์ดินและน้ำ เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ทดแทน การทำไร่ฝิ่นของชาวเขาเผ่าต่างๆ (นพดล, 2535)

สถานการณ์การบริโภคชาและผลิตภัณฑ์จากชาของคนไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการแข่งขันทางการค้าและการพัฒนาอุตสาหกรรมชาภายในประเทศ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ชาที่มีปริมาณและคุณภาพตามความต้องการของตลาด ปัจจุบันประเทศไทยสามารถส่งไปชาและผลิตภัณฑ์เป็นสินค้าออกทำรายได้ต่อปีมากกว่าร้อยละล้านบาท แต่ยังขาดดุลการค้ากับต่างประเทศปีละหลายสิบล้านบาท เมื่อเทียบกับการนำเข้าต้นกล้าพันธุ์ดีและผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ (ตารางที่ 1.1, 1.2) ทั้งนี้เนื่องจากประสบปัญหาหลายด้านที่ส่งผลให้ไปชาสดมีคุณภาพต่ำและพันธุ์ไม่ดี ปัญหาสำคัญประการหนึ่ง คือ เกษตรกรส่วนใหญ่ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดและปักกิ่งชำ ซึ่งการเพาะเมล็ดต้องใช้เวลา 18-24 เดือน จึงจะได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์แข็งแรงพร้อมที่จะนำไปปลูก นอกจากนี้โดยธรรมชาติชาเป็นพืชผสมข้ามทำให้ต้นชาที่ได้จากการเพาะเมล็ดกลายพันธุ์ ส่วนการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปักชำนั้น กิ่งปักชำมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากต่ำ เกิดโรคในดินสูง จึงทำให้ต้องเปลี่ยนวัสดุชำทุกปีและเมื่อนำต้นกล้าไปปลูกจะได้ต้นชาที่มีระบบรากไม่แข็งแรง อาจมีปัญหาต่อการโค่นล้ม (สันต์, 2532)

แนวทางหนึ่งในการพัฒนาและแก้ไขปัญหาดังกล่าวคือ ศึกษาหาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ต้นกล้าชาพันธุ์ดี เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการในทางการค้าโดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาพัฒนาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ดังกล่าว เนื่องจากต้นพืชที่ถูกกระตุ้นขึ้นมาจากเนื้อเยื่อที่เลี้ยงไว้จะมีพันธุ์กรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ และสามารถเพิ่มจำนวนของสายพันธุ์พืชที่ถูกคัดเลือกอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้น (คำณูน, 2542)

ปัจจุบันการนำเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการพัฒนาอุตสาหกรรมชาด้านการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์มีน้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งภายในประเทศเนื่องจากไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรในขั้นตอนการชักนำราก มีรายงานงานการวิจัยว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อของชาอัสสัม แต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของชาจีน (นพดล, 2535) และกิ่งยอดชาจีนที่เกิดใหม่ในสภาพปลอดเชื้อเกิดรากในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และเฉพาะเนื้อเยื่อที่เกิดรากนั้นบางชิ้นส่วนมีรากงอกจากแคลลัสคนละตำแหน่งกับจุดที่เจริญเป็นกิ่งยอด จึงทำให้ไม่สามารถย้ายปลูกลงดินได้ (ทิพย์มณี, 2530)

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จึงได้ศึกษาถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดและเทคนิคบางประการที่จะสามารถชักนำการเกิดรากของชาจีนให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกใบชาและผลิตภัณฑ์

ปี พ.ศ.	ใบชา		ผลิตภัณฑ์	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2541	219.62	17.97	26.93	22.82
2542	403.47	23.50	401.83	26.68
2543	561.86	33.98	273.31	27.99
2544	1,254.18	86.62	497.22	40.69
2545	1,689.28	102.83	383.39	44.27
2546 (ม.ค.-พ.ย.)	669.28	56.52	409.24	46.17

ที่มา = กรมศุลกากร (2546)

ตารางที่ 1.2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าใบชาและผลิตภัณฑ์

ปี พ.ศ.	ใบชา		ผลิตภัณฑ์	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2541	445.22	44.04	38.30	21.39
2542	424.50	36.68	73.91	23.14
2543	444.51	45.68	65.82	35.67
2544	574.64	62.12	292.05	113.94
2545	827.47	96.24	626.21	124.94
2546 (ม.ค.-พ.ย.)	1,407.64	75.46	3,408.63	141.69

ที่มา = กรมศุลกากร (2546)

1.2 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของอาหารสูตร MS, BA, IBA, ผงถ่านและ Quick Dip Method ต่อการชักนำรากจากกิ่งยอดหรือหน่อของชาจีนที่เกิดใหม่ในสภาพปลอดเชื้อ

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและแนวคิดในการศึกษา

2.1 แหล่งกำเนิดและประวัติของชา

2.1.1 แหล่งกำเนิดของชา

แหล่งกำเนิดชาตามธรรมชาติอยู่ใกล้ต้นน้ำอริสวัสดิประเทศจีน จีนเป็นชนชาติแรกที่รู้จักการนำใบชามาใช้ประโยชน์ในรูปของเครื่องดื่มจนกลายเป็นเครื่องดื่มประจำชาติ จากนั้นจึงแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของโลก ทั้งในทวีปอเมริกา ยุโรป เอเชียและในบางประเทศของทวีปแอฟริกา ลักษณะคล้ายรูปพัด (ภาพที่ 2.1) ทั้งในเขตร้อนและกึ่งร้อนเกือบทั่วทุกทวีปจากเส้นละติจูดที่ 29-11 องศาเหนือและลองจิจูด 95-120 องศาตะวันออก

ปัจจุบันแหล่งปลูกชาที่สำคัญของโลก กระจายอยู่เกือบทั่วทุกทวีปจากเส้นละติจูดที่ 40 องศาเหนือถึง 33 องศาใต้ แหล่งปลูกชาที่สำคัญๆ ได้แก่ ประเทศจีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม ศรีลังกา มาลาวี โรดเซีย คาเมอรูน เคนยา เปรู บราซิล อาร์เจนตินา อิหร่าน รัสเซีย ตุรกีและอังกฤษ

สำหรับประเทศไทย ต้นชามีแหล่งกำเนิดอยู่ตามภูเขาทางภาคเหนือของประเทศ แหล่งปลูกชาที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่

จังหวัดแม่ฮ่องสอน : อำเภอเมือง ขุนยวม ปายและกิ่งอำเภอมะฝ้า

จังหวัดเชียงใหม่ : อำเภอดอยสะเก็ด แม่ริม แม่แตง สะเมิง เชียงดาว ฝาง
สันกำแพงและพร้าว

จังหวัดน่าน : อำเภอเมืองและปัว

จังหวัดลำปาง : กิ่งอำเภอเมืองปาน

จังหวัดแพร่ : อำเภอเมือง

จังหวัดตาก : อำเภอเมือง

จังหวัดเชียงราย : อำเภอเมือง แม่จัน แม่สรวย เวียงป่าเป้า เทิงและป่าแดด

ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สถิติการปลูกชารายจังหวัด ปีการเพาะปลูก 2546

จังหวัด	พื้นที่ปลูก (ไร่)			ผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่)	ผลผลิตรวม (ตัน)
	ให้ผลแล้ว	ยังไม่ให้ผล	รวม		
1. เชียงราย	39,653	7,130	46,783	515	20,404
2. เชียงใหม่	20,020	45	20,065	432	8,646
3. แพร่	2,600	0	2,600	1,850	4,810
4. แม่ฮ่องสอน	841	14	855	1,574	1,323
5. ลำปาง	4,193	560	4,753	1,944	8,150
รวมทั้งประเทศ	67,307	7,749	75,056	644	43,333

ที่มา : ศูนย์ส่งเสริมสารสนเทศการเกษตร



ภาพที่ 2.1 การแพร่กระจายพันธุ์ชาในภูมิภาคต่างๆ

2.1.2 ประวัติความเป็นมาของชา (สันต์, 2535)

การดื่มชาได้เริ่มขึ้นในประเทศจีนคาดว่าไม่น้อยกว่า 2,167 ปีก่อนคริสตกาล ตำนานการเริ่มต้นของการดื่มชามีหลายตำนาน อาทิเช่น

จักรพรรดิเลนหนาง (Shen Nung) ของจีนค้นพบวิธีชงชาโดยบังเอิญ กล่าวคือ เมื่อพระองค์ทรงต้มน้ำดื่มใกล้ๆ กับต้นชา ขณะรอคอยให้น้ำเดือดใบชาได้หล่นลงในหม้อชา เมื่อพระองค์เอา ใบชาออกแล้วทรงชิมดูพบว่า มีรสชาติที่แปลกใหม่ ต่อมาทรงค้นพบสรรพคุณของชาที่มีประโยชน์หลายประการ นอกจากนี้พระองค์ทรงค้นคว้าและทดสอบสมุนไพรชนิดต่างๆ มากกว่า 200 ชนิด ชาวจีนจึงนับถือพระองค์ว่าเป็นบิดาแห่งแพทยศาสตร์ นับแต่นั้นเป็นต้นมาชาจึงเป็นที่นิยมดื่มกันโดยทั่วไปจนแพร่หลายเป็นเครื่องดื่มประจำชาติตลอดจนเป็นที่นิยมบริโภคของคนทั่วโลกเช่นเดียวกับกาแฟและโกโก้

นอกจากนี้ยังมีอีกตำนานหนึ่งเล่าขานกันว่า ในสมัยหนึ่งได้เกิดอหิวาตกโรคระบาดในเมืองจีนผู้คนล้มตายเป็นจำนวนมาก เกียอุยชินแสพบว่าสาเหตุใหญ่ของการเกิดโรคเกิดจากการที่ผู้คนพากันต้มน้ำสกปรกจึงแนะนำให้ชาวบ้านต้มน้ำดื่มและเพื่อให้ชาวบ้านเชื่อ จึงเสาะหาใบไม้มาอังไฟให้หอมเพื่อใส่ลงไปในน้ำดื่ม เกียอุยชินแสพบว่า มีพืชชนิดหนึ่งที่ให้กลิ่นหอมมากเป็นพิเศษ มีรสฝาดเล็กน้อยและแก้อาการท้องร่วงได้ จึงเผยแพร่วิธีการนี้ให้ชาวบ้านได้ทำตามซึ่งพืชที่มีกลิ่นหอมและรักษาอหิวาตกโรคนั้นคือ ต้นชานั่นเอง

ในคริสต์ศตวรรษที่ 8 พระภิกษุชาวจีนได้นำชาจากประเทศจีนไปยังประเทศญี่ปุ่นนับแต่นั้นมาชากลายเป็นที่นิยมของชาวญี่ปุ่น แหล่งกำเนิดชาในญี่ปุ่นอยู่ตามป่าทางใต้ของเมือง Kanto ชาวจีนเรียกบริเวณดังกล่าวว่าภูเขาชา (Yamocha) ต่อมา มีพระชาวจีนจำนวนหนึ่งที่เดินทาง มาประเทศจีนกับเรือคณะทูตเพื่อมาศึกษาคำสอนทางพุทธศาสนาและได้นำเมล็ดชากลับไปปลูก ที่ซิงกาเคน (Shingaken) ซึ่งก็ประสบผลสำเร็จ

ค.ศ. 1192 และ 1196 พระชาวจีนชื่ออีไซ (Eisai) ได้ไปเยือนจีนและได้เขียน หนังสือเกี่ยวกับการรักษาสุขภาพโดยการดื่มชา (Preserving Health in Drinking Tea) เป็นหนังสือเล่มแรกเกี่ยวกับชาที่เกิดขึ้นในญี่ปุ่น จึงทำให้เกิดประเพณีการดื่มชาในประเทศญี่ปุ่นซึ่งต่อมาได้พัฒนาขึ้นเป็นประเพณีการชงชาของญี่ปุ่นมาจนถึงปัจจุบันนี้

ศตวรรษที่ 17 ชาวยุโรปได้นำชาจากประเทศจีนไปยังประเทศของตนเพื่อใช้เป็นเครื่องดื่มและสกัดทำด้วยยาโดยมีอังกฤษเป็นประเทศแรกที่รู้จักนำใบชามาใช้ประโยชน์

ค.ศ. 1802 ชาจีนถูกนำมาปลูกที่ปีนัง ประเทศมาเลเซีย

ค.ศ. 1822 เริ่มปลูกที่สิงคโปร์ โดยสิงคโปร์จัดซื้อต้นชาเพิ่มจากประเทศจีนและอินเดีย

ค.ศ. 1818-1834 มีการขยายอุตสาหกรรมชาที่ประเทศอินเดียด้วยความช่วยเหลือเมล็ดพันธุ์จากประเทศจีน

ค.ศ. 1824 ประเทศอินโดนีเซียนำเข้าเมล็ดพันธุ์ชาจีนจากญี่ปุ่นมาปลูกโดยการเผยแพร่ของชาวดัตช์ จนกระทั่ง ค.ศ.1878 จึงได้มีการนำชาพันธุ์อัสสัมมาปลูก

ค.ศ. 1847 ประเทศรัสเซียปลูกชาครั้งแรกที่สวนพฤกษศาสตร์ซัคคัม (Sukhum Botanic Gardens) บนฝั่งทะเลดำ

ค.ศ. 1850 ทวีปแอฟริกาเริ่มปลูกชาที่สวนพฤกษศาสตร์เดอร์บัน (Durban Botanic Gardens)

ค.ศ. 1870 ประเทศศรีลังกาเริ่มปลูกชาอย่างจริงจัง

ต่อมาในศตวรรษที่ 19 ชากลายเป็นเครื่องดื่มที่แพร่หลายไปทั่วโลก

สำหรับประเทศไทยไม่ปรากฏหลักฐานการนำชาจีนเข้ามาในประเทศ แต่พบว่ามีหลักฐานที่มีการแลกเปลี่ยนวัฒนธรรมกับจีน คนไทยได้มีการดื่มน้ำชากันและปลายปี พ.ศ. 2483 กระทรวงเกษตรได้รับนโยบายจากรัฐบาลให้จัดตั้งสถานีทดลองเกี่ยวกับชา ณ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยมอบให้กองพืชพรรณกรมเกษตรเป็นผู้ดำเนินการ

ประเทศไทยนับเป็นแหล่งชาเก่าแก่แห่งหนึ่งของโลก โดยแต่เดิมมานานในเขตภาคเหนือตอนบนของไทยได้มีชาป่าเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติอย่างมากมาย ประชาชนชาวเหนือได้นำมาผลิตเป็นเมี่ยงไว้บริโภคกันอย่างแพร่หลาย ต่อมาเมื่อชาวจีนเคลื่อนย้ายเข้ามาอยู่ในเขตพื้นที่ดังกล่าว การผลิตชาจึงได้เริ่มเปลี่ยนแปลงไป โดยในระยะเริ่มแรกได้มีการผลิตเป็นชาใบหรือชาจีนและในระยะหลังได้มีการผลิตเป็นชาผงหรือชาฝรั่งจากชาอัสสัม

ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาในอดีตการผลิตชาใบและชาผงของไทยได้รับการพัฒนายกระดับคุณภาพให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องมาเป็นลำดับ โดยการปรับปรุงพันธุ์ชาและการปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตจนกระทั่งปัจจุบันใบชาและผลิตภัณฑ์ชาของไทยได้กลายเป็นหนึ่งในชาที่มีคุณภาพของโลก

2.2 อนุกรมวิธานของชา

ชาเป็นพืชใบเลี้ยงคู่จัดอยู่ในวงศ์ Theaceae ซึ่งประกอบด้วยพืช 20 สกุล (genera) และ 200 ชนิด (species) พืชในวงศ์นี้มีทั้งไม้ยืนต้น (tree) และไม้พุ่ม (shrubs) สกุล (genera) ที่สำคัญของพืชในวงศ์นี้ได้แก่ *Camellia* L. ซึ่งมีโครโมโซม $2n = 30$ (Dodd, 1944)

สำหรับทวีปเอเชียชนิดพรรณไม้ที่สำคัญของสกุลนี้ได้แก่

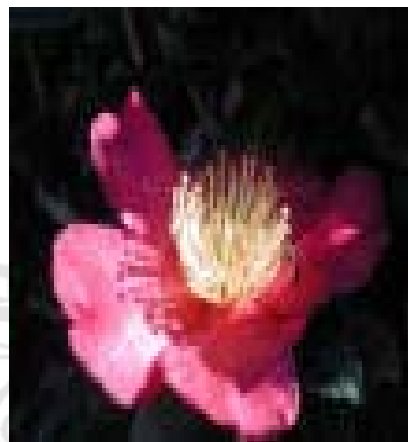
1. *Camellia sinensis* O. Ktze ชาที่ปลูกเป็นการค้าทั่วโลก
2. *Camellia japonica* L. ชาประดับ (ภาพที่ 2.2)

3. *Camellia sasanqua* Thunb. ชาที่ปลูกมากในประเทศจีนและญี่ปุ่นเพื่อใช้เมล็ดผลิตน้ำมัน (สันต์, 2535: ภาพที่ 2.3)

สำหรับประเทศไทยชาพันธุ์เมืองที่พบเป็นสายพันธุ์ *Assamica* (*Camellia sinensis* var. *assamica* : ภาพที่ 2.4) มีชื่อไทยว่าเมี่ยงหรืออาจเรียกว่าชาอัสสัม (Assam Tea) ส่วนชาที่นำเข้ามาจากประเทศจีนหรือไต้หวันและปลูกเพื่อใช้ใบในอุตสาหกรรมคือสายพันธุ์ *Camellia sinensis* var. *sinensis* (ศุภนารถ, 2541: ภาพที่ 2.5)



(ก) ลักษณะดอก



(ข) ลักษณะดอก



(ค) ลักษณะลำต้น

ที่มา : ระบบออนไลน์

ภาพที่ 2.2 *Camellia japonica* L.

(ก) ลักษณะดอก



(ข) ลักษณะเมล็ด



ที่มา : ระบบออนไลน์

ภาพที่ 2.3 *Camellia sasanqua* Thunb.



ภาพที่ 2.4 *Camellia sinensis* var. *assamica*



ภาพที่ 2.5 *Camellia sinensis* var. *sinensis*

2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา

2.3.1 ระบบราก

ต้นชาที่เพาะจากเมล็ดจะมีรากแก้วที่ยังเล็กแข็งแรง และมีรากฝอยหาอาหาร แต่ไม่มี root hair บริเวณรากพบ endotrophic mycorrhiza เจริญร่วมอยู่ด้วย รากที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1–2 มิลลิเมตร จะปรากฏชั้นเซลล์คอร์ก (corky layer) ทำหน้าที่ป้องกันการผ่านเข้าออกของน้ำ และมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตไว้ในรูปของแป้งซึ่งการแตกยอดใหม่ (flushing) ของต้นชาขึ้นอยู่กับ การลำเลียงคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปต้นชาที่งอกจากเมล็ดจะมีรากหยั่งลึกในดินเฉลี่ยประมาณ 1.5 เมตร และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราก 7.5 เซนติเมตร แต่อาจมีความยาวถึง 3 เมตรหรือมากกว่า ขึ้นอยู่กับชนิดของต้นชาและสภาพดิน

2.3.2 ใบ

ใบเป็นใบเดี่ยว การจัดเรียงตัวของใบเป็นแบบ alternate (ภาพที่ 2.6) โดยพัฒนา จากตาที่มุมใบ มีปลายใบแหลม แผ่นใบหนาเหนียว หน้าใบเป็นมันวาว ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ใบยาวเฉลี่ย 7.5 เซนติเมตร ใต้ใบมีขนอ่อนปกคลุม ปากใบพบมากบริเวณใต้ใบ กลุ่มใบชาจีนมีขนาดเล็กกว่า กลุ่มชาอัสสัม ใบชาอัสสัมจะมีใบสีอ่อนขนาดใหญ่ ส่วนชาจีนมีใบแคบ และสีค่อนข้างคล้ำกว่า ชาอัสสัม

2.3.3 ดอก

เกิดบริเวณตำแหน่งตาข้างของกิ่ง มีทั้งดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ (2-4 ดอก) ก้านดอกสั้น ดอกมีกลิ่นหอม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก 2.5-4.0 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 5-7 กลีบ กลีบดอก 5-7 กลีบ มีสีขาวหรือขาวแกมเหลือง ลักษณะโค้งเว้าเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้จำนวนมากยาว 8-12 มิลลิเมตร อับเรณูสีเหลืองมี 2 ช่อง ก้านชูเกสรตัวเมียสั้น (ภาพที่ 2.7)

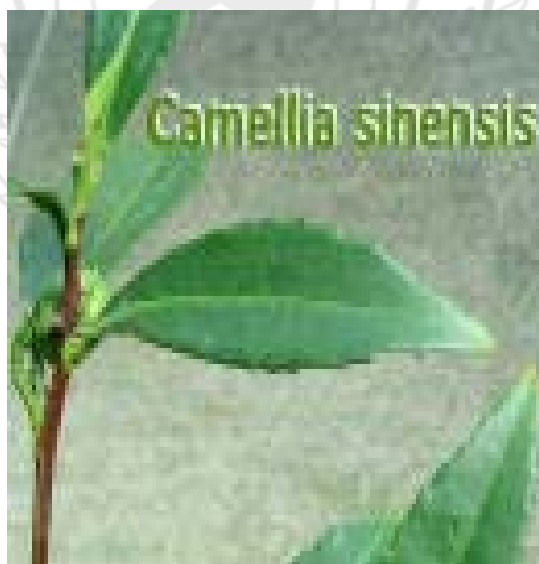
2.3.4 ผล

ผลเป็นแบบแคปซูล (capsule) ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อเริ่มแก่ผลมีเปลือกหนา สีน้ำตาลแกมเขียว แบ่งเป็นช่องขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-2.0 เซนติเมตร ใช้เวลาจากเริ่มติดผลจนผลแก่เต็มที่ 9-12 เดือน เมื่อผลแก่เปลือกจะมีลักษณะขรุขระ ผลที่แก่เต็มที่แห้งและแตก โดยเริ่มแตกจากปลายผลเป็น 3 ส่วน ทำให้เมล็ดหล่นลงดินได้ (ภาพที่ 2.8)

2.3.5 เมล็ด

ในผลมี 1-3 เมล็ดต่อช่องผลเมล็ดมีลักษณะรูปร่างกลม แต่มีอีกด้านหนึ่งแบน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเมล็ด 1.0-1.5 เซนติเมตร ผนังเมล็ดแข็งหนาเชื่อมติดกับเปลือกหุ้มเมล็ด (testa) ซึ่งมีลักษณะเปลือกเมล็ดบางสีน้ำตาลอ่อน (ภาพ 2.9) ไม่มี endosperm มีใบเลี้ยง 2 ใบอวบหนา เต็มไปด้วยน้ำมัน (<20%) หุ้มต้นอ่อนไว้ ต้นอ่อนตั้งตรงในเมล็ด เมล็ดจะงอกภายใน 2-3 สัปดาห์ ในผล 1 กิโลกรัมจะมีเมล็ดชา 400-600 เมล็ด

(สันห์, 2535 ; ระบบออนไลน์)



ภาพที่ 2.6 การจัดเรียงตัวของใบแบบ alternate



ภาพที่ 2.7 ลักษณะดอก *Camellia sinensis* var. *sinensis*



ภาพที่ 2.8 ผลแบบแคปซูล



ภาพที่ 2.9 เมล็ด *Camellia sinensis* var. *sinensis*

2.4 การจำแนกพันธุ์ชา

ชาที่ปลูกเป็นการค้าทั่วโลกจัดแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ

2.4.1 กลุ่มพันธุ์ชาอัสสัม (Assam Tea) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Camellia sinensis* var. *assamica* (Mast.)

มีลักษณะลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 6-18 เมตร ใบมีขนาดใหญ่ ดอกออกเป็นช่อช่อละ 2-4 ดอก สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ทนแล้ง ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของเขตร้อนได้ดี ชาอัสสัมสามารถแบ่งเป็นพันธุ์ย่อยได้ 5 สายพันธุ์ (jats)* คือ

1. พันธุ์อัสสัมใบจาง (Light - leaved Assam jat) ต้นมีขนาดเล็ก ลักษณะใบเป็นมันวาว ยอดและใบมีสีเขียวอ่อน ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ ให้ผลผลิตต่ำและคุณภาพไม่ดี ปลูกกันมากบริเวณภูเขา Naga ในประเทศอินเดีย

2. พันธุ์อัสสัมใบเข้ม (Dark - leaved Assam jat) ยอดและใบมีสีเขียวเข้ม ใบนุ่มเป็นมัน มีขนปกคลุม ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี ปลูกมากบริเวณหุบเขาบรามาปรูตา (Brahmaputra)

3. พันธุ์มานิปุรี (Manipurjat) เป็นพันธุ์ที่แข็งแรงให้ผลผลิตสูง ใบมีสีเขียวเข้ม เป็นประกาย ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ทนแล้งได้ดี

4. พันธุ์พม่า (Burma jat) ใบมีสีเขียวเข้ม ใบแก่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน ใบกว้างแผ่นใบรูปไข่ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีมาก

5. พันธุ์ลูโซ (Lushai jat) มีลำต้นสูง 18 เมตร ขนาดใบกว้าง 15 เซนติเมตร ยาว 36 เซนติเมตร ขอบใบหยักลึก ปลายใบเห็นชัด มีแหล่งกำเนิดบริเวณเทือกเขาลูโซ (Lushai) แถวพรมแดนแคว้นแคชเชอร์ (Cachar)

หมายเหตุ: jat หมายถึง ถิ่นกำเนิด หรือแหล่งปลูก หรือการแยกต้นชาด้วยลักษณะใบ

2.4.2 กลุ่มพันธุ์ชาจีน (China Tea) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Camellia sinensis* var. *sinensis*

มีลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 2-3 เมตร ใบมีสีเขียวเข้มตั้งตรง แข็งกระด้าง ขนาดเล็กยาวแคบ ขนาดใบยาว 3.8-6.4 เซนติเมตร เส้นใบมองเห็นไม่ชัดมีอยู่ 6-8 คู่ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบมีรูปไม่แน่นอน ข้อถี่ ปล้องสั้น ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำและสภาพแวดล้อมที่ผันแปรได้ดี ผลผลิตต่ำ เมื่อเทียบกับกลุ่มพันธุ์ชาอัสสัม ชาพันธุ์นี้ปลูกมากในประเทศจีนทางแถบตะวันออกและตะวันตกเฉียงใต้ของจีนและญี่ปุ่น สายพันธุ์ที่นิยมปลูกจะแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น

2.4.3 กลุ่มพันธุ์ชาเขมร (Indo-china, Cambodia Teas) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Camellia sinensis* var. *indo-china*

มีลักษณะลำต้นเตี้ยสูง ประมาณ 5 เมตร ใบแข็งเป็นมัน ใบยาว ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย แผ่นใบมีขนเป็นรูปคล้ายตัววี ก้านใบสีแดง ในฤดูแล้งใบจะมีสีแดงเรื่อๆ ยอดอ่อนรสฝาดจัด มีแทนนินสูง ทนแล้งได้ดี (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 *Camellia sinensis* var. *indo-china*

2.5 องค์ประกอบทางเคมีของชา

ลัทธิ (2535) รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของยอดชาสด เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งว่า ส่วนประกอบที่สำคัญและมีมากที่สุด คือ โพลีฟีนอล (polyphenols) ประมาณ 20-35% ซึ่งมีผลต่อรสฝาด รองลงมาคือโปรตีน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ไพโรจน์ (2532) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของใบชาตลอดจนองค์ประกอบทางเคมีของสารละลายชาที่ได้จากการชงชา ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบโดยประมาณของยอดชาสด

ส่วนประกอบ	% ของน้ำหนักแห้งรวม *
โปรตีน	15
เส้นใยและกาก	26
เม็ตลี (คลอโรฟิลล์และแคโรทีน)	2
ไขมัน	7
คาเฟอีน	4
โพลีฟีนอล (Catechin I-IV)	30
กรดอะมิโน	4
แร่ธาตุ	5
คาร์โบไฮเดรต	7
สารให้กลิ่น	น้อยมาก

* ปริมาณความชื้นของยอดชาสดมีประมาณ 78% โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของใบชาสดและชาแห้ง

สาร	ใบชาสด ^A (%)	ใบชาแห้ง ^B (%)
เซลล์ลูโลสและกาก	34	34
โปรตีน	17	16
คลอโรฟิลล์และสารสีต่างๆ (ไม่ละลายน้ำ)	1.5	1
แป้ง	1.5	0.25
แซนแทนิน	25	13
สารแทนนิน	–	4
สารแทนนินที่ผ่านการออกซิไดซ์แล้ว	4	4
คาเฟอีน	8	9
กรดอะมิโน (ละลายน้ำ)	3	4
ยางและน้ำตาล	3–4	3–4
แร่ธาตุ	5.5	5.5
เถ้าถ่าน	–	น้อยมาก
น้ำมันหอมระเหย (สารให้กลิ่น)		

^A: ใบชาสดมีความชื้นประมาณ 70–80%

^B: ใบชาแห้งมีความชื้นประมาณ 3–4

2.6 ประโยชน์ของชา

จากการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ พบว่าชามีสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบต่างๆ อยู่หลายชนิด ปริมาณของสารประกอบเหล่านั้นมีปริมาณมากพอเพียงที่จะให้ประโยชน์ต่อร่างกายโดยสรุปดังนี้ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) คือ

1. คาเฟอีน กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ช่วยให้การตัดสินใจ และ การทำงานเร็วขึ้น
2. EGCG (epigallocatechin gallet) ช่วยลดน้ำตาลในเลือด กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง

3. อีโอบีรอนแซนทีน (theophylline xanthine) ช่วยขยายหลอดลม รักษาโรคหอบหืด ช่วยในการขับปัสสาวะโดยการขยายหลอดเลือดที่มารวไต

4. เมทไธโอนีน (methionine) ช่วยส่งเสริมเมตาบอลิซึม (metabolism) ในการย่อยไขมัน

5. แคทีชิน (catechins) ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็ง (antioxidant) เช่น ช่วยป้องกันมะเร็งปอดมะเร็งเต้านม ผิวน้ำ กระเพาะอาหาร ตับ ลำไส้เล็ก สถาบันมะเร็งแห่งนครเซี่ยงไฮ้ ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนและสถาบันมะเร็งของสหรัฐอเมริกา ได้ทำการวิจัยจากคนดื่มชา 900 คน ในเซี่ยงไฮ้และ 11,500 คน ในอเมริกาพบว่าคนที่ดื่มชาเขียวเป็นประจำนานๆ โอกาสเป็นมะเร็งในกระเพาะอาหารจะน้อยลง โดยจะลดลงในเพศชาย 20% ในเพศหญิง 50% เนื่องจากเพศหญิงไม่มีปัจจัยเสริมในการเป็นมะเร็ง เช่น การดื่มเหล้าหรือสูบบุหรี่ และการวิจัยยังพบว่าผลดีของชาเขียวจะลดลงถ้าดื่มชาร้อนจัด

6. สารให้กลิ่น (aromatic) ช่วยย่อยอาหารและระงับกลิ่นปาก

7. หมอนที่มีกากใบชาแทนนิน ช่วยคลายเครียดทำให้อ่อนหลับสบาย

8. ชาผงใช้ในการแต่งกลิ่นอาหาร

9. แทนนิน (tanine) ช่วยฆ่าเชื้อโรคบางชนิด เช่น โรคท้องเสียที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

2.7 โทษของชา

1. การดื่มน้ำชาที่เข้มข้นมากทำให้ท้องผูก

2. คาเฟอีนมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางทำให้อ่อนไม่หลับ

3. การดื่มน้ำชาเข้มข้นในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง หรือโรคหัวใจ หรือผู้สูงอายุ ทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้น ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น อาจเป็นอันตรายแก่ชีวิตอย่างฉับพลัน

4. การดื่มน้ำชาเข้มข้นในสตรีที่กินยาคุมกำเนิด ทำให้ประสิทธิภาพของยาคุมกำเนิดลดลงซึ่งเป็นผลมาจากสารแทนนินในน้ำชา

2.8 การปลูกชาในทางอุตสาหกรรม

ชาเจริญเติบโตได้ดีในลักษณะภูมิประเทศต่างๆ สามารถเจริญได้ไม่ว่าอากาศจะร้อนหรือหนาว ยกเว้นในพื้นที่ที่มีน้ำแข็ง ในการปลูกเพื่อการค้า ถ้าคัดเลือกชาจากต้นที่ให้ผลผลิตสูงจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนลดน้อยลง มีข้อควรคำนึงในการปลูกชาดังต่อไปนี้ (สัณห์, 2535)

2.8.1 การคัดเลือกลักษณะต้นชาที่ดีไว้ทำพันธุ์ ควรมีลักษณะดังนี้

1. สามารถให้ผลผลิตได้เร็ว
2. การแพร่กระจายรากของต้นชาดี
3. แผ่กิ่งก้านสาขาดี มีจำนวนใบมาก
4. ข้อไม่สั้นเกินไป
5. มีหน่อที่ชะงักการเจริญเติบโตน้อย
6. ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพ
7. มีความต้านทานต่อโรคและแมลง
8. หลังจากตัดแต่งกิ่งแล้ว มีกิ่งก้านมาก และเจริญได้ดี

2.8.2 ปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตที่ควรคำนึงถึง ได้แก่

1. ดิน ชาเจริญงอกงามในดินร่วนที่มีการระบายน้ำได้ดี หน้าดินมีอินทรีย์วัตถุสูง มีธาตุไนโตรเจนมากและเป็นกรดเล็กน้อย มีค่า pH 4.5-6.0 ความลาดชันไม่ควรเกิน 45 องศา

2. ความชื้นและปริมาณน้ำฝน พื้นที่ที่ปลูกควรเป็นพื้นที่ที่มีฝนตกสม่ำเสมอตลอดปี ปริมาณน้ำฝนอย่างต่ำ 40-50 นิ้วต่อปี หรือ 1,140-1,270 มิลลิเมตรต่อปี เพราะถ้าขาดน้ำทำให้ต้นชาชะงักการเจริญเติบโต ไม่แตกยอด ทำให้ผลผลิตลดลง

3. อุณหภูมิ ชาสามารถเจริญได้ ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และหากมีอุณหภูมิต่ำกว่าช่วงนี้จะส่งผลให้ชาสร้างยอดใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง

4. ความสูงจากระดับน้ำทะเล ชาที่ปลูกในพื้นที่สูงตั้งแต่ 1,000 เมตรขึ้นไปที่มีอากาศเย็นจะทำให้ผลผลิตใบชาที่ได้มีคุณภาพสูง ใบชาจะมีกลิ่นและรสชาติดี ส่วนการปลูกชาในที่ต่ำปริมาณผลผลิตที่ได้จะสูงแต่คุณภาพต่ำกว่าชาที่ปลูกในที่สูง

2.8.3 ปัจจัยที่ไม่เหมาะสมในการปลูกชา

ปัจจัยที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของชาประกอบด้วยลักษณะต่างๆดังนี้

1. ดินชั้นล่างเป็นหินหรือลูกรังทำให้ชาหยั่งรากลงไปหาอาหารได้ต้น
2. เป็นพื้นที่ที่ไม่มีการระบายน้ำ เช่น หนอง บึง และบริเวณที่ ๆ มีน้ำขังตลอด
3. เป็นพื้นที่ที่มีหินปูนและมี pH เกินกว่า 6.0
4. พื้นที่ที่มีความลาดชันมาก
5. ดินที่มีอินทรีย์วัตถุน้อยและไม่สามารถเก็บความชุ่มชื้นได้
6. บริเวณที่มีลมแรงจนไม่สามารถทำที่บังลมได้
7. เป็นแหล่งที่มีไล่เดือนฝอยระบาดมาก

2.8.4 ธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของชา

ชามีความต้องการธาตุอาหารต่างๆในช่วงการเจริญเติบโต ดังนี้

ไนโตรเจน มีบทบาทต่อการสร้าง คลอโรฟิลล์ (chlorophyll), นิวคลีโอไทด์ (nucleotide), ฮอร์โมน (hormone), วิตามิน (vitamine) ฯลฯ ต้นชามีความต้องการไนโตรเจนมากกว่าธาตุอื่นๆ ต้นชาตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจนเร็วมาก โดยทำให้ผลผลิตใบชาแปรผันเป็น 2 เท่าจาก 4 เป็น 8 กิโลกรัมต่อการให้ไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ 1 กิโลกรัม โดยทั่วไปปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้จะอยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย ในต้นชาที่แข็งแรงสมบูรณ์จะมีระดับไนโตรเจนคงที่ในใบชา ประมาณ 4.5-5 % ของน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อปริมาณไนโตรเจนที่ต้องการลดลงน้อยกว่า 3% ของน้ำหนักแห้ง ต้นชาจะแสดงอาการขาดไนโตรเจนทำให้ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โตช้า ใบขนาดเล็ก ยอดน้อย ขนาดยอดเล็กลง ขอบปล้องสั้นลงและใบร่วงในที่สุด

ฟอสฟอรัส มีบทบาทในการสร้างระบบรากทำให้รากแข็งแรงและมีปริมาณมากโดยทั่วไปในใบชาจะมีฟอสฟอรัสประมาณ 0.3-0.9% ของน้ำหนักแห้ง ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ดีพบได้มากในส่วนยอดอ่อนและใบอ่อน ลักษณะการขาดธาตุฟอสฟอรัส เมื่อปริมาณธาตุฟอสฟอรัสในต้นชามีน้อยกว่า 0.4% จะทำให้การเจริญเติบโตของต้นหยุดชะงัก การเจริญของรากช้าลง ใบมีสีเข้ม ใบดำน ขนาดใบเล็กกว่าปกติ ลำต้นอ่อน ใบร่วงและกิ่งตายในที่สุด ธาตุฟอสฟอรัสที่เหมาะสมจะอยู่ในรูปของหินฟอสเฟต

โปแตสเซียม มีบทบาทในการสร้างโครงสร้างที่แข็งแรงให้กับทุกส่วน การควบคุมน้ำในเซลล์ การแบ่งเซลล์ ลักษณะการขาดธาตุโปแตสเซียม จะทำให้ขอบใบเปลี่ยนเป็นสีแดง ใบร่วง ยอดไม่เจริญเติบโต กิ่งและยอดอ่อนมีน้อย ลำต้นลีบเล็ก ไม่ตอบสนองต่อการตัดแต่งกิ่ง ผลผลิตลดลง

แมกนีเซียม เป็นธาตุอาหารที่ต้องการเพียงเล็กน้อย ใบชามีปริมาณแมกนีเซียมประมาณ 0.22% ของน้ำหนักแห้ง ลักษณะการขาดแมกนีเซียมทำให้ใบแก่เหลืองและเกิดจุดสีน้ำตาล ในระหว่างเส้นใบและขยายใหญ่ขึ้นจำนวนใบอ่อนไม่ลดแต่สีใบผิดปกติ

กำมะถัน ในใบชามีปริมาณธาตุกำมะถันประมาณ 0.08-0.2% ของน้ำหนักแห้ง ลักษณะของการขาดธาตุกำมะถัน ใบจะมีสีเหลือง แต่เส้นใบยังมีสีเขียว ยอดใหม่มีขนาดเล็กลง ปล้องสั้นลง อัตราการเจริญเติบโตลดลง

แคลเซียม ช่วยในการสร้างผนังเซลล์ซึ่งธาตุอาหารอื่นไม่สามารถทดแทนได้ในใบชาจะมีแคลเซียมประมาณ 0.3-0.9% ของน้ำหนักแห้ง ลักษณะอาการขาดธาตุแคลเซียมคือใบจะแก่มีสภาพกรอบเปราะ ใบอ่อนสีซีดจาง บริเวณขอบใบจะเกิดสีน้ำตาล แต่ถ้าได้รับแคลเซียมมากเกินไปทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง ใบอ่อนมีสีเหลืองใบม้วนเข้าด้านใน ขอบและปลายใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำแล้วร่วงในที่สุด

เหล็ก การขาดธาตุเหล็กจะมีผลต่อการสร้างคลอโรฟิลล์ในใบชา

แมงกานีส ใบชาเมื่อแก่ขึ้นจะมีปริมาณแมงกานีสเพิ่มมากขึ้น การขาดแมงกานีสจะพบมากในชาที่เจริญเติบโตในดินที่เป็นกรดเข้มข้นทำให้เมื่อใบเริ่มแก่จะกรอบเปราะ ขอบใบมีสีเหลืองและมีจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้นแทรกบนใบ

โบรอน การขาดโบรอนทำให้เมตาโบลิซึมลดลง เปลือกต้นชาแตกง่าย ต้นและใบจะมีรูปร่างผิดปกติและตายได้ การสร้างดอกและผลผิดปกติ อาการขาดโบรอนจะเกิดมากในชาที่ปลูกบนพื้นที่ที่เป็นดินเหนียวหรือช่วงฤดูแล้ง

ทองแดง ช่วยในการเจริญเติบโตของใบให้เป็นปกติ

อลูมิเนียม ช่วยลำเลียงธาตุฟอสฟอรัสและกระตุ้นการเจริญเติบโต

สังกะสี อาการขาดธาตุสังกะสีทำให้ปล้องสั้น ชะงักการเจริญเติบโตเปลี่ยนสีเขียวและทำให้ใบโค้งงอเป็นรูปเคียว

2.8.5 ลักษณะของต้นกล้าที่เหมาะสม มีลักษณะดังต่อไปนี้

1. มีลำต้นโตขนาดเท่าดินสอด่า
2. มีความสูงเกินกว่า 45 เซนติเมตร
3. อายุประมาณ 1-2 ปี

2.8.6 ฤดูปลูกที่เหมาะสม

การปลูกควรปลูกในช่วงฤดูฝน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม ในวันที่มีอากาศร้อนหรือฝนตกต้นชาจะตั้งตัวได้เร็ว

2.8.7 การให้น้ำ

เมื่อปลูกใหม่ ถ้าฝนไม่ตกควรให้น้ำทันทีหลังจากนั้นจะให้น้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2.8.8 การปฏิบัติดูแลรักษา

มีข้อควรคำนึงในการปฏิบัติดูแลรักษา ดังนี้

1. ควรหมั่นดูแลกำจัดวัชพืชที่แย่งน้ำและอาหารรอบๆ โคนต้นและหลุมปลูกออก
2. คลุมโคนต้นด้วยหญ้าแห้ง ฟางข้าว เพื่อลดการระเหยน้ำจากดิน
3. ต้นชาที่แห้งตายหรือใบร่วงหมดให้ปลูกซ่อมใหม่
4. การใส่ปุ๋ย หลังปลูก 3 เดือนควรให้ปุ๋ยเร่งการเจริญเติบโต เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต

ต้นละ 1 ช้อนชา โรยรอบๆอย่าให้ชิดโคนต้น แล้วพรวนกลบ

5. ต้นอายุ 1 ปี ควรใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 20-10-10 ต้นละ 1 ช้อนชา และใส่ทุกๆ 3 เดือน
6. ต้นอายุ 2 ปี ควรใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 20-10-10 ต้นละ 1 ช้อนชา และใส่ทุกๆ 4 เดือน
7. ต้นอายุ 3 ปี ควรใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ต้นละ 2 ช้อนแกง โดยโรยรอบๆรัศมีพุ่ม

และใส่ทุกๆ 4 เดือน

8. ต้นอายุ 4 ปี ควรใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 30-10-10 และ 10-10-20 อย่างละครึ่งหนึ่งหรือ สลับกันอัตรา 2 ช้อนแกงต่อต้น โดยโรยรอบๆ รัศมีพุ่มและใส่ทุกๆ 4 เดือน

ปีต่อๆ ไปถือเกณฑ์เช่นเดียวกันนี้ หลังจากมีการเก็บผลชาติแก่และสมบูรณ์สำหรับ นำไปขยายพันธุ์ในเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม ช่วงปลายเดือนตุลาคม ควรใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ต้นละ 1 ช้อนช ะ โรยรอบๆ อย่าให้ชิดโคนต้น แล้วพรวนดินกลบเพื่อบำรุงต้นให้สมบูรณ์ปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก ควรใส่ทุกปีอย่างน้อยต้นละ 1-2 ปุ๋นกี

2.9 การขยายพันธุ์ชา

วิธีการขยายพันธุ์ชาสามารถทำได้ 5 วิธี (สันท์, 2535 ; ระบบออนไลน์) คือ

1. การติดตาต่อกิ่ง (bud grafting)
2. การต่อกิ่งโดยการเสียบกิ่ง (cleft grafting)
3. การขยายพันธุ์โดยเมล็ด (seedling propagation)
4. การปักชำใบที่มีตาติด (leaf-bud cutting)
5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture)

ปัญหาประการหนึ่งของการพัฒนาอุตสาหกรรมชาในประเทศไทยคือ ปริมาณต้น กล้าที่มีคุณภาพให้ผลผลิตสูงและตรงตามพันธุ์ไม่เพียงพอต่อการปรับปรุงสวนชาเก่าของ เกษตรกรและผู้ประกอบการรายใหม่ เนื่องจากการขยายพันธุ์แบบปกติทั่วไปมีปัญหาหลายด้าน กล่าวคือ

2.9.1 การขยายพันธุ์ด้วยการติดตา

การขยายพันธุ์ด้วยการติดตาต่อกิ่ง สามารถทำได้กับกิ่งปักชำโดยใช้ตา พันธุ์ดี ติดบนต้นตอ วิธีนี้เหมาะสำหรับชาพันธุ์ที่อ่อนแอ แต่มีข้อเสียคือ เปอร์เซนต์การรอดต่ำ (60%) ค่าใช้จ่ายสูง

2.9.2 การต่อกิ่งโดยการเสียบกิ่ง

การขยายพันธุ์ด้วยการเสียบกิ่งจะทำการขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ เมื่อต้องการ เปลี่ยนพันธุ์ชาในแปลงปลูกโดยเฉพาะต้นชาที่มีอายุหลายปีและมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2.11)

โดยทั่วไปการขยายพันธุ์ชาที่นิยมทำกันส่วนใหญ่ในทางการค้ามีอยู่ด้วยกัน 2 วิธีคือ การเพาะเมล็ดและการปักกิ่งชำ

2.9.3 การขยายพันธุ์โดยเมล็ด

การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดเป็นวิธีการที่นิยมมากในประเทศไทย เหมาะสำหรับขยายพันธุ์ข้าอัสสัมและชาเขมร ต้นชาที่เพาะจากเมล็ดจะมีระบบรากแข็งแรง มีรากแก้วสามารถทนความแห้งแล้งได้ดี เหมาะสำหรับปลูกในพื้นที่บนภูเขาของประเทศไทย โดยทั่วไปเมล็ดชาเริ่มแก่ราวปลายเดือนมิถุนายนถึงเดือนธันวาคม

ขั้นตอนและวิธีการ (ภาพที่ 2.12)

1. เก็บผลชาที่แก่จัดเต็มที่ มีสีน้ำตาลและยังติดบนต้น ไม่ควรเก็บเมล็ดชาที่ร่วง
 2. ก่อนเพาะเมล็ดชา ควรนำเมล็ดที่ได้แช่น้ำไว้ 12-24 ชั่วโมง เมล็ดชาที่เสียจะลอยน้ำให้ตักทิ้งใช้แต่เมล็ดที่จมน้ำ
 3. นำมากระเทาะเปลือกออกหรือนำมาใส่กระดังหรือกระຈาดฝึ้งทิ้งไว้ในที่ร่มผลชาจะแห้งและแตกเอง ภายใน 2-3 วัน
- ทั้งนี้หลังการเก็บเมล็ดต้องรีบนำเมล็ดชาที่ได้ไปเพาะ เนื่องจากเมล็ดชาที่มีปริมาณน้ำมันภายในเมล็ดสูงทำให้มีอัตราการสูญเสียความงอกเร็วมาก

ข้อดีของการขยายพันธุ์โดยเมล็ด

1. ต้นชาที่มีระบบรากแก้ว รากสามารถหาอาหารน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. ไม่มีปัญหาในการโค่นล้ม

ข้อเสียของการขยายพันธุ์โดยเมล็ด

1. เปอร์เซนต์ความงอกจากการเพาะเมล็ดมีเพียง 50%
 2. ต้นชาที่ได้จากการเพาะเมล็ดมักกลายพันธุ์ เนื่องจากชาเป็นพืชผสมข้าม
- โดยธรรมชาติ
3. ต้นชาที่มีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน เป็นปัญหาต่อการดูแลรักษาในแปลง
 4. ต้นชาที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีลักษณะตายอดข่มตาข้าง (appical dominance) สูง ทำให้ปริมาณยอดชามีน้อยผลผลิตต่ำ
 5. ใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากต้นกล้าที่ปลูกจากเมล็ดย้ายไปปลูกในสวนได้เมื่ออายุ 18-24 เดือน

2.9.4 การขยายพันธุ์โดยการปักชำ

การขยายพันธุ์โดยการปักชำ (ภาพ 2.13) เป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ให้ลักษณะตรงตามสายพันธุ์เดิม เหมาะสำหรับการขยายพันธุ์ชาพันธุ์ดีหรือพันธุ์ชาจีน แต่การขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ประสบปัญหาหลายประการ (นพดลและสันห์, 2535) คือ

1. ต้นพันธุ์ชาจีนบางต้น ที่ให้ผลผลิตดีคุณภาพดี ขยายพันธุ์ด้วยการปักชำ จะไม่ออกรากโดยไม่ทราบสาเหตุ

2. อัตราการอยู่รอดของกิ่งปักชำต่ำมาก จากเชื้อ *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schernk

3. ต้องเปลี่ยนวัสดุปักชำทุกปี

4. เปอร์เซนต์การเกิดโรคสูง

5. ไม่มีรากแก้ว เป็นปัญหาต่อการโค่นล้มง่าย



ขั้นตอนการเสียบกิ่ง



ที่มา : ศุภนารถ, 2541

ภาพที่ 2.11 การขยายพันธุ์โดยการเสียบกิ่ง



ที่มา : ศุภนารถ, 2541

ภาพที่ 2.12 การขยายพันธุ์โดยเมล็ด



ที่มา : ศุภนารถ, 2541

ภาพที่ 2.13 การขยายพันธุ์โดยการปักชำ

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชา

การนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์ มาใช้ขยายพันธุ์พืช เป็นที่รู้จักกันมานานแล้ว โดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณจำนวนอย่างรวดเร็วของสายพันธุ์พืช หลายชนิดที่ถูกคัดเลือกอย่างรวดเร็วเพื่อใช้ในการค้า และเป็นวิธีการหนึ่งที่ส่งผลให้ได้ ต้นพันธุ์จำนวนมาก ปลอดโรค ตรงตามพันธุ์ และมีความสม่ำเสมอของขนาดและการเจริญเติบโต

จากการตรวจสอบเอกสาร พบว่าได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชามานาน กว่า 3 ทศวรรษ โดย

นิตยา (2525) ทดลองเพาะเลี้ยงใบชา (*Camellia sinensis* L.) พบว่าอาหารสูตร Linsmaier and Skoog ดัดแปลง สามารถเหนี่ยวนำใบชาให้เกิดแคลลัสได้เมื่อแยกแคลลัสไปเลี้ยง พบว่าไม่สามารถเจริญต่อไปได้

ทิพย์มณี (2530) รายงานว่า เนื้อเยื่อชาสามารถเจริญเติบโตได้ดี ในอาหารทุกสูตร ที่ทำการทดลองแต่ความสามารถที่เนื้อเยื่อแต่ละชนิดของชาจะตอบสนองต่ออาหารแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังนี้

เนื้อเยื่อปลายยอด เจริญเป็นยอดใหม่ได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงและมีการเจริญเติบโต ที่แข็งแรงดีมากเมื่อเลี้ยงในอาหารพื้นฐานสูตร MS ผสม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรหรืออาหารสูตร B₅ ผสม 2iP 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อ ลิตรหรือผสม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มีการเจริญในอาหาร MS ผสม 2iP และ IAA ที่ทดลองหรือในอาหารสูตร SH ผสม 2iP และ NAA หรือเจริญได้น้อย

ส่วนเนื้อเยื่อใบสามารถเกิดแคลลัสได้ดีมาก เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ผสม ไคเนติน 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 2, 4-D 1.0-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นอาหารที่ ยับยั้งการเจริญของปลายยอด แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารสูตร B₅ ผสม 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีอยู่ 3% ของเนื้อเยื่อใบที่เกิดรากจากแคลลัส แต่มี 5% ของเนื้อเยื่อใบ เกิดรากโดยตรงจากบริเวณรอยตัดของเส้นกลางใบหรือเส้นใบอื่นๆ

สำหรับเนื้อเยื่อลำต้น มีการเกิดยอดจากบริเวณข้อโดยตรงหรือจากแคลลัสและ สามารถชักนำให้เกิดรากจากแคลลัสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร B₅ ผสม 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือชักนำให้เกิดรากจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงโดยตรงเมื่อเลี้ยงใน อาหารสูตร B₅ ผสม IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีถึง 50% ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดราก จากบริเวณปลายตัด โดยมี 1 - 2 รากต่อชิ้น

เนื้อเยื่อราก มีการเกิดยอดโดยตรงจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ผสม BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือในอาหารสูตร B₅ ผสม 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือผสม 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เปอร์เซ็นต์ต่ำมากคือ มีเพียง 1% ของเนื้อเยื่อรากที่เพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดเท่านั้น

เนื้อเยื่อใบเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดรากจากแคลลัสได้ ถ้าเลี้ยงในอาหารสูตร MS ผสม BA 5.0-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อาหาร MS สูตรดัดแปลง ผสมไคเนติน 0.1 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D 2.0 - 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนๆ มีสีเหลืองหรือขาวขุ่นหรือเขียวอ่อน โดยจะออกจากพื้นผิวของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ผสม BA 0.5-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหารสูตร MS ดัดแปลงผสม BA 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.5-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ B₅ ผสม 2iP 1.0-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ IAA 0.2-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเกิดต้นอ่อนจากผิวของเนื้อเยื่อโดยตรงเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร B₅ ผสม 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดขึ้นเพียง 10% ของชิ้นส่วนที่เลี้ยง

จากการศึกษา พบว่ากิ่งชาติตัดมาจากไร่มีการปนเปื้อนของเชื้อสูงมากและยากต่อการกำจัด นอกจากนี้เนื้อเยื่อชาไม่ว่าจะเป็น ใบ ยอด หรือ ตาข้าง จะไวต่อความเป็นพิษของสารเคมีมากโดยเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปอย่างรวดเร็ว ยกเว้นเฉพาะส่วนของลำต้นเท่านั้นที่จะไวต่อสารเคมีน้อยกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ

ส่วนการศึกษาผลของน้ำตาลทราย พบว่ามีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของตาข้างที่มีอยู่เดิมและที่จะเกิดขึ้นมาใหม่ เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญยิ่งในการสังเคราะห์แสง เพราะถ้าไม่มีน้ำตาลเลยเนื้อเยื่อไม่มีการเจริญ จำนวนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่ออาหารที่เติมน้ำตาลได้ดีที่สุดคือ 30 กรัมต่อลิตร แต่ถ้ามีน้ำตาลมากเกินไปคือ 6-10% เนื้อเยื่อมีการเจริญน้อยมากหรือไม่เจริญเลย

สำหรับการศึกษาผลของน้ำมะพร้าวในอาหารสูตร MS ดัดแปลง พบว่าอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าว ชิ้นส่วนจากข้อของชาจีน สามารถตอบสนองต่ออาหารได้ดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้ พบว่าน้ำมะพร้าวมีผลช่วยลดเปอร์เซ็นต์ของเนื้อเยื่อที่ผลิตกระจุยยอด (multiple shoots) ต่อมา Phukan and Mitra (1984) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของข้อในอาหารที่ผสม NAA และ BAP ร่วมกับน้ำมะพร้าวและ yeast extract แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดอวัยวะ

ทิพย์มณี (2530) รายงานว่าหากเติมวิตามินซี (ascorbic acid) ลงไปในอาหารจะช่วยป้องกัน พิษจากโพลีฟีนอลได้และหากเติมผงถ่านลงไปในการเพาะเลี้ยงจะช่วยเพิ่มสมรรถนะการดูดซับสารพิษ

การชักนำให้เกิดรากจากกิ่งซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของชา พบว่าการเกิดรากจากกิ่งยอดที่เกิดใหม่มีเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำมากเฉลี่ยประมาณ 10% และบางชิ้นจะมีรากงอกออกจากแคลลัสคนละตำแหน่งกับจุดที่เจริญเป็นกิ่งยอดซึ่งไม่สามารถจะย้ายปลูกลงดินได้ กิ่งชาที่เกิดรากนั้นเป็นชาจีนทั้งสิ้น ส่วนชาอัสสัมไม่แสดงการตอบสนองต่อปัจจัยทดลอง จึงได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดรากจากกิ่งยอดที่เกิดใหม่ ด้วยการตัดเอากิ่งยอดที่เจริญจากชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงยอด 2 เดือน การใช้ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้กิ่งทดลองเกิดรากได้เฉลี่ย 1-2 ราก ส่วน 2, 4-D ไม่มีผลโดยตรงในการทำให้เกิดราก

ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเนื้อเยื่อชา ได้แก่ อาหารสูตรพื้นฐาน MS โดยใช้ Difco bacto agar 0.7% และปรับค่า pH เป็น 5.7 - 5.8 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

นพมณี (2534) ขยายพันธุ์ชาลูกผสมจากตาข้างกิ่งชาจีนและชาอัสสัม ในอาหาร MS (1962) และ Heller (1953) ร่วมกับ BA เข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ kinetin เข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นให้เกิดต้นในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ พันธุ์ ฤดูกาล ตำแหน่งตาและวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ ส่วนปัจจัยสำคัญในการเพิ่มจำนวนต้น ได้แก่ ชนิด ความเข้มข้นและความสมดุล ของสารเร่งการเจริญเติบโต ที่เติมลงในสูตรอาหาร (อ้างโดย นพดล, 2535)

Forrest (1969) และ Ogutuga, Northcote (1970) ศึกษาการสังเคราะห์คาเฟอีนของชาในสภาพปลอดเชื้อ

Doi (1980), Wu *et al.* (1981), Kato (1985-1986), Arulpragasam and Latiff (1986) และ Chen and Liao (1990) รายงานว่าสามารถชักนำใบเลี้ยง ลำต้นและอับละอองเรณูของชาในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดแคลลัสได้ แต่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของชาดังกล่าวสามารถเกิดรากแต่ไม่สามารถเกิดยอดได้

Shervington *et al.* (1977) ศึกษาการสังเคราะห์คาเฟอีนและอีโอบีรอนินของ *Camellia sinensis* พบว่าสามารถชักนำชิ้นส่วนของใบให้เกิดรากได้ในอาหารสูตร MS ร่วมกับ IAA เข้มข้น 5.7 ส่วนในล้าน และเมื่อนำใบมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D เข้มข้น 4.5 ส่วนในล้าน ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.45 ส่วนในล้าน สามารถชักนำชิ้นส่วนของใบให้เกิดแคลลัสได้ และเมื่อนำแคลลัสและรากดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2, 4-D เข้มข้น 4.5 ส่วนในล้าน ทำให้สามารถสังเคราะห์คาเฟอีนและอีโอบีรอนินได้

Zegoskina *et al.* (1990) และ Zapionictor *et al.* (1993) ศึกษาการสังเคราะห์ลิกนิน (lignin) และโพลีฟีนอลจากเซลล์แขวนลอย

Wachira and Ogada (1993) รายงานการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยงขา (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) ว่าสามารถพัฒนาการเจริญเติบโตเป็นเอ็มบริโอได้ 60% ในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์ และเอ็มบริโอดังกล่าวมีการเจริญเติบโตซ้ำในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการควบคุมการเจริญเติบโต แต่เมื่อทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ร่วมกับโคเคนติน เข้มข้น 1.8 mg/l และ BAP เข้มข้น 1 g/l จะเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจาก 53% เป็น 60%

Dodd (1994) ได้สรุปผลงานวิจัยด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากนักวิจัยหลายท่านว่า ชิ้นส่วนของขาที่สามารถนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้นั้น มีหลายส่วน เช่น เมล็ด ใบเลี้ยง ลำต้นและอับละอองเรณู ฯลฯ อาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากที่สุดคือ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และ สูตร MS ดัดแปลง ส่วนวิตามินที่ช่วยในการเจริญเติบโตที่สำคัญคือ thiamine, nicotinic acid และ pyridoxine นอกจากนี้การควบคุมการเจริญเติบโตที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ BA และโคเคนติน ซึ่งมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ส่วน IBA เป็นออกซินที่มีบทบาทสำคัญในการชักนำราก

Das *et al.* (1996) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นของ *Camellia sinensis* CV. *Nandaevi* พบว่า 90% ของเนื้อเยื่อสามารถตอบสนองต่ออาหาร 1/2 MS+BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ใน 1/4 MS + IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

Joung Oh *et al.* (n.d.) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่มีส่วนประกอบของ น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 mg/l และ IBA เข้มข้น 0.5 mg/l สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของขา (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) เกิดยอดได้ 4-6 ยอดต่อเนื้อเยื่อ

Yabukita and Fujimiduni [n.d.] สามารถชักนำรากขาได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยการใช้ IBA แต่ไม่มีรายงานความเข้มข้นที่ใช้

2.11 ทฤษฎีหรือกรอบแนวคิดของงาน

จากการตรวจสอบรายงานวิจัยสรุปได้ว่า

ขา (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) เหมาะสำหรับการเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่ว่าจะเป็นด้านการเกิดแคลลัส การเกิดกระจุกยอด หรือการเกิดเอ็มบริโอและต้นใหม่ ในการขยายพันธุ์ให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการนั้น การใช้เทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาขยายพันธุ์ เพื่อให้ได้ต้นกล้าขาพันธุ์ดีมากกว่าการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการอื่น ๆ

ปัจจุบันการขยายพันธุ์ชาจีนพันธุ์ดีด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ในขั้นตอนการชักนำรากจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจหากจะหาวิธีการชักนำให้ยอดเกิดรากอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในสภาพปลอดเชื้อ

เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA และ IBA เป็นสารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เพราะ BA เป็นไซโตไคนินสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติที่สำคัญในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ โดยเป็นตัวเพิ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และ อาร์เอ็นเอ (RNA) ส่งผลให้การแบ่งเซลล์ดีขึ้น ช่วยเร่งให้แตกตาข้าง ตลอดจนส่งผลให้ชักนำยอดได้มากขึ้น (Stem, 1994)

ส่วน IBA เป็นออกซินสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ กระตุ้นให้ขึ้นส่วนของเนื้อเยื่อเกิดรากและการเจริญของรากจึงนิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสังเคราะห์

บทบาทของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ

1. ออกซิน ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม จะส่งเสริมให้ขึ้นส่วนของพืช ที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส
2. ยับยั้งการเจริญเติบโตของตาข้าง
3. สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดรากโดยเฉพาะ IBA เป็นสารที่แสดงผลของออกซินค่อนข้างต่ำ เคลื่อนย้ายได้ช้ามาก สลายตัวได้เร็ว จึงไม่เกิดพิษกับเนื้อเยื่อจึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเร่งราก

Murashige and Skoog (1962) รายงานว่าการกระตุ้นให้เกิดรากและต้นนั้นถูกควบคุมโดยปฏิกริยาระหว่างฮอร์โมน 2 ชนิด และขึ้นอยู่กับสัดส่วนระหว่างไซโตไคนินกับออกซินเป็นเบื้องต้น โดยที่เขาได้ทดลองกับแคลลัสของยาสูบ พบว่าความเข้มข้นของออกซินสูงจะกระตุ้นให้เกิดรากและยับยั้งการเกิดต้นในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของไซโตไคนินสูงจะกระตุ้นให้เกิดต้นและยับยั้งการเกิดราก เป็นที่ยอมรับว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหากเติมไซโตไคนินร่วมกับออกซิน ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีผลทำให้การเจริญของเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ไซโตไคนินหรือออกซินอย่างใดอย่างหนึ่งแต่เพียงอย่างเดียวซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานวิจัยต่อไปนี้

อรุณี (2534) ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะยางพาราพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอและทวีจำนวนต้นตอโดยวิธีไมโครคัตติง พบว่าการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS อาหารที่มี BA เพียงอย่างเดียวทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้สร้างยอดรวมได้สูงสุดถึง 95.69%

บุญสิทธิ์ (2535) ศึกษาผลของ NAA และ IBA ต่อการเกิดแคลลัสของส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนพบว่า อาหารแข็งสูตร Murashige และ Tucker (1969) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นจาก 5.56 เป็น 13.89%

ปิยะนันท์ (2538) ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลและ BA ต่อ morphogenic callus ของเฟินใบหนัง พบว่าน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตรและ BA ความเข้มข้น 0 ไมโครโมลต่อลิตร ทำให้แคลลัสมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด

วรรณพร (2541) ศึกษาผลของ BA และพาโคลบิวทราโซล ต่อการเจริญเติบโตของหงส์เหินในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร 1/2 MS (1962) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ BA และพาโคลบิวทราโซลเพิ่มขึ้น โดยที่ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับพาโคลบิวทราโซล เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ความสูงของต้นลดลงแต่จำนวนหน่อเพิ่มขึ้นและมีใบมากขึ้น

บัณฑิต (2542) เลี้ยงตาข้างของ sandalwood ในอาหาร Woody Plant Medium (WPM) พบว่า WPM ที่เติม BA ให้ผลดีกว่าโคเนดินในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากและเมื่อนำยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่เติม IBA หรือ NAA ยอดของ sandalwood เกิดราก 20% เฉพาะอาหารที่เติม IBA เข้มข้น 20 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้นสูง ส่งผลให้ใบและยอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้งและตายในที่สุดโดยที่ความเข้มข้นอื่นไม่ทำให้เกิดรากได้

ศิริกานต์ (2544) ศึกษาระดับความเข้มข้นของ IBA และ BA ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของชาปัญจชันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าระดับความเข้มข้นของ IBA และ BA ไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดยอดและความยาวยอดของชาปัญจชันธุ์ และไม่มีปฏิกริยาร่วมกันของทั้งสองปัจจัย ความเข้มข้นที่ให้จำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุดคือ การเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติมเฉพาะ BA ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

รัตนารักษ์และฤดีภรณ์ (2546) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวนหลายชนิด โดยใช้ BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตดังนี้

เพาะเลี้ยงขิงแดง (Red Ginger) จากตาข้างและตายอด บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) พบว่าอาหารที่เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประมาณ 2 เดือนตายอดและตาข้างสามารถพัฒนาเป็นต้นได้

เพาะเลี้ยงดาหลา (*Nicolaia elatior* Horan) จากตาข้างและตายอด ขนาด 0.5-1 เซนติเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าประมาณ 2 เดือน ตายอดและตาข้างจะงอกเป็นต้น

เพาะเลี้ยงว่านแสงอาทิตย์และว่านนางค่อม (*Haemanthus multiflorus* Martyn) จากหัวและนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหัว ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สามารถงอกเป็นต้นจำนวนมากภายในเวลา 2 เดือน

เพาะเลี้ยงสับปะรดประดับ (*Ananas comosus* L. Merr. cv. *Variegatus*) และหมากผู้หมากเมีย (*Cordyline fruticosa* L.) จากตาข้างและตายอด บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าตาข้างและตายอดสามารถงอกเป็นต้นได้ภายในระยะเวลา 2 เดือน

สูตรารณ (2546) เพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากตาของเปลือก บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2-3 สัปดาห์ ตาเจริญเป็นต้นใหม่ และเมื่อทำการย้ายต้นมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลือกจะเริ่มงอก และออกรากภายในเวลา 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังได้รายงานการเพาะเลี้ยงขนุนจากยอดโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดแตกใบข้างใช้เวลา 2 เดือนและเมื่อย้ายยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ประมาณ 6 สัปดาห์ก็เกิดราก

รัชณี (2546) เพาะเลี้ยงมะละกอ (*Carica papaya* L.) จากเมล็ดพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรอะดีนีนซัลเฟต (adenine sulfate) เข้มข้น 80-120 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 170 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำ ยอดและเพิ่มปริมาณยอดได้และเมื่อแยกยอดมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดจะยึดตัว หลังจากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำรากได้

สมชาย (2546) เพาะเลี้ยงคัพภะมะพร้าวกะทิในอาหารเหลวสูตร Y3 และเมื่อเติมฮอร์โมน NAA หรือ IBA เข้มข้น 7-10 ส่วนต่อล้าน ลงในอาหารจะกระตุ้นให้ต้นกล้าเกิดราก ได้มากและยาวกว่าไม่ใช้ฮอร์โมน ภายหลังจากนำลงเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำรากในเวลา 6-8 สัปดาห์

สุภาพร และชมพู (2546) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับประรดจากหน่อข้างจุก ตะเกียงและหน่ออัมลูก (hapa) พบว่าสามารถกระตุ้นชักนำให้เกิดตาหรือแตกกอได้ โดยใช้อาหาร สูตรพื้นฐาน MS ที่เติม BA เข้มข้น 1 ส่วนต่อล้าน และสามารถชักนำรากได้ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 0.5 ส่วนต่อล้าน

สุภาภรณ์ และคณะ (2546) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลา (*Vanilla fragrans* Ames) จากลำต้น พบว่าอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA เข้มข้น 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 1-2 เดือน ตาจะเริ่มแตกยอดอ่อน และเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน

อนึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่า การลดความเข้มข้นของ แสงและการจุ่มแช่ต้นกล้าในสารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มออกซินความเข้มข้นสูงเป็น ระยะเวลาสั้นก่อนการย้ายเลี้ยงในอาหารชักนำรากจะส่งเสริมการสร้างรากเร็วขึ้น ดังรายงานการ ทดลองต่อไปนี้

วิสุทธิ (2538) ศึกษาการเกิดเอ็มบริอยด์และต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์ม น้ำมัน พบว่าการเติม BA ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในสูตรอาหาร MS ช่วยให้เอ็มบริโอ เจริญเติบโตได้ดีที่สุดแต่ไม่เกิดราก แต่เมื่อใช้ผงถ่าน 0.05 ร่วมกับในอาหารมีผลทำให้เกิดรากได้

สมปอง (2538) จุ่มแช่ปลายยอดยางพาราในสารละลาย BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ 100% และได้จำนวนกับความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด ภายในเวลา 5 วัน

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ถ้าจะศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ ในอาหารสูตรพื้นฐาน MS (1962) เพราะเป็นอาหารที่มีผู้นำมาใช้ในการศึกษามากที่สุด เนื่องจากมีส่วนประกอบของเกลือแร่ในปริมาณสูง พืชส่วนใหญ่จะตอบสนองต่ออาหารสูตรนี้ได้ดีมาก และเป็นอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตของยอดและกระจุกยอดได้ และเมื่อนำมาใช้ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์และเทคนิค Quick Dip Method ในขั้นตอนการชักนำรากคาดหวังว่าคงส่งผลให้กิ่งยอดของชาจีนเกิดรากได้อย่างมีประสิทธิภาพ



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุพันธุ์พืช

การทดลองครั้งนี้ใช้เนื้อเยื่อพืชสำหรับทดลองจาก 2 แหล่ง คือ

3.1.1 ชิ้นส่วนยอดและลำต้นของชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) ในสภาพปลอดเชื้อจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย

3.1.2 เมล็ดชาจากไร่ชาสุวิรุฬห์ ตำบลปากอ้อม อำเภอแม่ลาว จังหวัดเชียงราย

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่

3.2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของสูตรอาหาร MS

3.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ได้แก่ BA (6-Benzylaminopurine), IBA (3-Indolebutyric acid)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อโรค ได้แก่ sodium hypochlorite, ethyl alcohol 70% และ 95%, teepol

3.2.4 ผงวุ้น (Bacto Agar Difco : ตูภาคผนวก)

3.2.5 น้ำตาลทราย (sucrose)

3.2.6 น้ำกลั่น (sterile distilled water)

3.2.7 ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

3.2.8 สารเคมีที่ใช้ปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง ได้แก่ 1 N ของ NaOH และ 1 N ของ HCl

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีดังนี้

3.3.1 เครื่องชั่งชนิดหยาบ ทศนิยม 2 ตำแหน่งและชนิดละเอียด (analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.3.3 เครื่องกวนสารเคมี (hot plate stirrer)

3.3.4 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น กรวยแก้ว กระบอกตวง แท่งแก้วคน ปิเปตต์ จานเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดแก้วสำหรับใส่อาหารพร้อมฝาปิด ฯลฯ

3.3.5 หม้อ (ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารปริมาณมากๆ)

3.3.6 เตามิโครเวฟหรือเตาแก๊ส

3.3.7 ตู้เย็น (refrigerator)

3.3.8 เครื่องกลั่นน้ำและกรองน้ำ (water distiller and deionizer)

3.3.9 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

3.3.10 ตู้อบแห้ง (hot air oven)

3.3.11 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow)

3.3.12 ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture shelf)

3.3.13 เครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ คีมมีดผ่าตัดเบอร์ 3 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10, 11 ปากคีบ (forceps) กรรไกร

3.3.14 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น แผ่นอลูมิเนียม (aluminum foil) กระดาษทิชชู แอลกอฮอล์ ตะเกียงหลอดหยด ขวดใส่สารละลายเข้มข้น ช้อนตักสาร ฯลฯ

3.3.15 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งควบคุมแสงและอุณหภูมิ

3.3.16 อุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.3.17 ไม้บรรทัด

3.3.18 กระดาษกราฟ

3.3.19 กล้องจุลทรรศน์สามมิติ (stereo microscope)

3.4 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

3.4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก (macro nutrients)

การเตรียมสารละลายธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร MS ความเข้มข้น 10 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ละลายสารที่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายเข้มข้นใส่ขวดปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตารางที่ 3.1 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสาร ในอาหาร (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลาย เข้มข้น 10 x (ก/ล)	ปริมาณสารละลาย เข้มข้นที่ใช้
ธาตุอาหารหลัก			
KNO ₃	1,900	190	สารละลายรวมใช้ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
NH ₄ NO ₃	1,650	165	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	37	
KH ₂ PO ₄	170	17	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	44	

3.4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง (micro nutrients)

เตรียมสารละลายธาตุอาหารรอง สูตร MS เข้มข้น 100 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2 ละลายสารที่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายเข้มข้นใส่ขวดปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตารางที่ 3.2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในอาหาร (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลาย เข้มข้น 100 x (ก/ล)	ปริมาณสารละลาย เข้มข้นที่ใช้
<u>ธาตุอาหารรอง</u>			
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.0025	ใช้ 10 มิลลิลิตร ในอาหาร 1 ลิตร
KI	0.83	0.083	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	0.860	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	2.230	
H ₃ BO ₃	6.20	0.620	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.025	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0025	

3.4.3 การเตรียมสารประกอบอินทรีย์ (organic additives)

การเตรียมวิตามินสูตร MS เข้มข้น 100 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 ละลายสารทีละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายเข้มข้นใส่ขวด ปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตารางที่ 3.3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์สูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในอาหาร (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลาย เข้มข้น 100 x (ก/ล)	ปริมาณสารละลาย เข้มข้นที่ใช้
<u>สารประกอบอินทรีย์</u>			
Glycine	2.00	0.20	ใช้ 10 มิลลิลิตร ในอาหาร 1 ลิตร
Thiamine.HCl	0.25	0.025	
Pyridoxine.HCl	0.25	0.025	
Nicotinic acid	0.25	0.025	
Myo-inositol	100.00	10.00	

3.4.4 การเตรียมสารละลายเหล็ก (iron sources)

เตรียม FeEDTA สูตร MS ซึ่งประกอบด้วย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 100 เท่า ทำการเตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.4 ละลายสารที่ละชนิดในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายเข้มข้นใส่ขวด ปิดฝา หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียม เก็บในตู้เย็น

ตารางที่ 3.4 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเหล็กสูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในอาหาร (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลาย เข้มข้น 100 x (ก/ล)	ปริมาณสารละลาย เข้มข้นที่ใช้
<u>สารละลายเหล็ก</u>			
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	2.78	ใช้ 10 มิลลิลิตร
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	3.73	ในอาหาร 1 ลิตร

3.4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

3.4.5.1 การเตรียม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขั้นตอนดังนี้

ชั่ง BA 100 มิลลิกรัม ละลายใน 1N NaOH เล็กน้อยเพียงพอให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวด หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียม เก็บไว้ในตู้เย็น

3.4.5.2 การเตรียม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขั้นตอนดังนี้

ชั่ง IBA 100 มิลลิกรัม ละลายใน absolute ethanol เล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวด หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียม เก็บในตู้เย็น

3.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรพื้นฐาน MS (1962)

ขั้นตอน/วิธีการ (อาหาร 1 ลิตร)

3.5.1 ใส่ น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรที่มีขนาด 1,000 มิลลิลิตรประมาณ 1/3 ของขวด

3.5.2 ใส่น้ำยาเข้มข้น (ตารางที่ 3.1, 3.2, 3.3 และ 3.4) ที่ละชนิดตามลำดับ เขย่าขวด ให้สารละลายผสมกันทุกครั้งที่ได้เติมน้ำยาเข้มข้นแต่ละชนิด

3.5.3 ละลายน้ำตาล 30 กรัม ใส่รวมกันในสารละลายอาหาร

3.5.4 ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต (BA, IBA) ในปริมาณตามที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

3.5.5 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.5.6 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl เข้มข้น 1 N ให้ค่า pH เป็น 5.7-5.8

3.5.7 ใส่วุ้น 0.7% (น้ำหนักต่อปริมาตร: ส่วนประกอบวุ้นในภาคผนวก) ลงไปในอาหาร

3.5.8 ใส่ผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณตามที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

3.5.9 นำไปต้ม คนจนกระทั่งวุ้นละลาย

3.5.10 เทอาหารลงในขวดแก้วให้มีปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อขวด

3.5.11 ปิดฝาขวด ตัดฉลาก

3.5.12 จัดเรียงขวดแก้วลงในตะกร้า นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.13 นำอาหารออกจากหม้อนึ่งความดัน ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บไว้ในที่สะอาด

3.6 การเตรียมสารละลายฆ่าเชื้อ

การเตรียมแอลกอฮอล์ 70% (โดยปริมาตร) มีขั้นตอนดังนี้คือ

เตรียมโดยใช้แอลกอฮอล์ 95% ใส่ลงในกระบอกตวง 70 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 95 มิลลิลิตร

3.7 การฆ่าเชื้ออุปกรณ์และตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

การทำให้เครื่องมือและอุปกรณ์ปราศจากเชื้อมีวิธีการดังนี้

3.7.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.7.1.1 นำอุปกรณ์ทุกชิ้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ปากคีบ มีดผ่าตัด ขวดบรรจุน้ำกลั่น จานเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดเพาะเลี้ยง ฯลฯ ซึ่งล้างทำความสะอาดแล้ว ห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียม

3.7.1.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.7.2 ตู๋ถ่ายเนื้อเยื่อ

เช็ดพื้นตู๋ด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วเปิดแสง U.V. (ultraviolet light) ประมาณ 30 นาที ก่อนใช้และเมื่อใช้ตู๋เสร็จเรียบร้อยแล้วต้องเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% อีกครั้ง

3.8 วิธีวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน (แผนภาพที่ 3.1) คือ

1. การเตรียมเนื้อเยื่อพืชทดลอง

ก่อนดำเนินการทดลองทำการเตรียมเนื้อเยื่อพืชทดลอง ดังนี้

1.1 การเตรียมพืชทดลองจากเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

เพื่อปรับสภาพเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและกำจัดระยะพักตัว ก่อนนำไปชักนำเพิ่มปริมาณยอดในขั้นตอนที่ 1.3 ดำเนินการดังนี้

1.1.1 นำเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 3.1) ออกจากขวดเพาะเลี้ยง

1.1.2 ตัดแต่งส่วนฐานของต้นกล้าเพื่อกำจัดส่วนที่เป็นสีดำหรือเนื้อเยื่อที่ตายทิ้งไป

1.1.3 ตัดใบและก้านใบทิ้งให้เหลือเฉพาะบริเวณที่มีเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้าง

1.1.4 ตัดแบ่งเนื้อเยื่อออกเป็นส่วนๆ ได้แก่ ส่วนของกิ่งยอดให้มีความสูง 1.5-2.5

เซนติเมตร โดยนับจากปลายยอดลงมาถึงลำต้นและในส่วนของลำต้นที่มีตาข้างติดอยู่ตัดให้มีขนาด 1.5-2.5 เซนติเมตร

1.1.5 นำชิ้นส่วนของพืชที่ตัดแบ่งไว้เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทิพย์มณี, 2530) เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 3.1 ซากิน อายุ 2 ปี ในสภาพปลอดเชื้อ

1.2 การเตรียมพืชทดลองจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด

เพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดก่อนการนำต้นพันธุ์ที่ออกไปเพิ่มจำนวนยอด ในขั้นตอนที่

1.3 ดำเนินการวิจัย ดังนี้

1.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ด

1.2.1.1 นำผลซาที้แก่มาล้างน้ำผสมสบู่เหลวให้สะอาด คัดเลือกเอาแต่

เมล็ดซาที้จมน้ำ

- 1.2.1.2 ล้างน้ำให้สะอาด
- 1.2.1.3 แกะเปลือกที่มีสีเขียวแถมน้ำตาลออก
- 1.2.1.4 นำเมล็ดมาพอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 10% NaOCl เป็นเวลา 15 นาที
- 1.2.1.5 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 1.2.1.6 นำเมล็ดจุ่มใน 95% ethanol แล้วเผาด้วยเปลวไฟ
- 1.2.1.7 แกะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกเพื่อนำเมล็ดไปเลี้ยงบนอาหาร

สังเคราะห์

หมายเหตุ ขั้นตอนที่ 4-7 ทำในสภาพปลอดเชื้อ

- 1.2.2 นำเมล็ดมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐาน MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทิพย์มณี, 2530)
- 1.2.3 ภายหลังการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

โดยเพิ่มปริมาณยอดใหม่ให้เพียงพอต่อการนำไปทดลองในขั้นตอนชักนำให้ต้นพืชออกราก ดำเนินการดังนี้

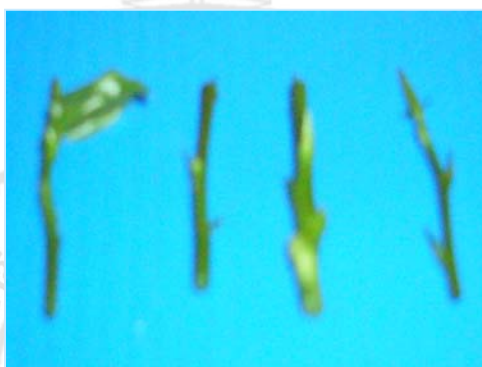
- 1.3.1 คัดเลือกชิ้นส่วน โดยเลือกใช้กิ่งยอดที่มีความสูงนับตั้งแต่ตายอดลงมา 2-5 เซนติเมตร และมีใบตั้งแต่ 2 ใบขึ้นไป มีกิ่งยอดหรือหน่อที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงพร้อมที่จะสามารถเพิ่มปริมาณได้
- 1.3.2 ตัดใบส่วนบนสุดของยอดที่เพาะเลี้ยงออก ตัดใบที่บริเวณด้านข้างลำต้น และก้านใบทิ้ง โดยตัดให้เหลือเฉพาะบริเวณที่มีเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้าง จากนั้นจึง ตัดแต่งส่วนฐานของหน่อ เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นสีดำหรือเนื้อเยื่อที่ตายทิ้งไป
- 1.3.3 ตัดแบ่งเนื้อเยื่อขาออกเป็นส่วนๆ ดังนี้คือ ส่วนของกิ่งยอดตัดให้มีความสูง 1.5-2.5 เซนติเมตร โดยนับจากปลายยอดลงมาถึงลำต้น และในส่วนของลำต้นที่มีตาข้างติดอยู่นั้นตัดเป็นท่อนๆ ขนาด 1.5-2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.2)
- 1.3.4 เนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตเป็นยอดกระจุก ทำการตัดแบ่งให้เป็นกระจุกเล็กๆ กระจุกละ 2-3 ต้น
- 1.3.5 นำส่วนของพืชที่ตัดไว้ มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทิพย์มณี, 2530)
- 1.3.6 หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านไป 6 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อเพิ่มจำนวนทุก 8 สัปดาห์ จนกระทั่งได้ปริมาณกิ่งยอดที่เกิดใหม่ตามจำนวนที่ต้องการ

ในกรณีที่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพัฒนาการเจริญเติบโตเป็นแคลลัส นำแคลลัสมาชักนำให้พัฒนาเป็นยอด ดังนี้

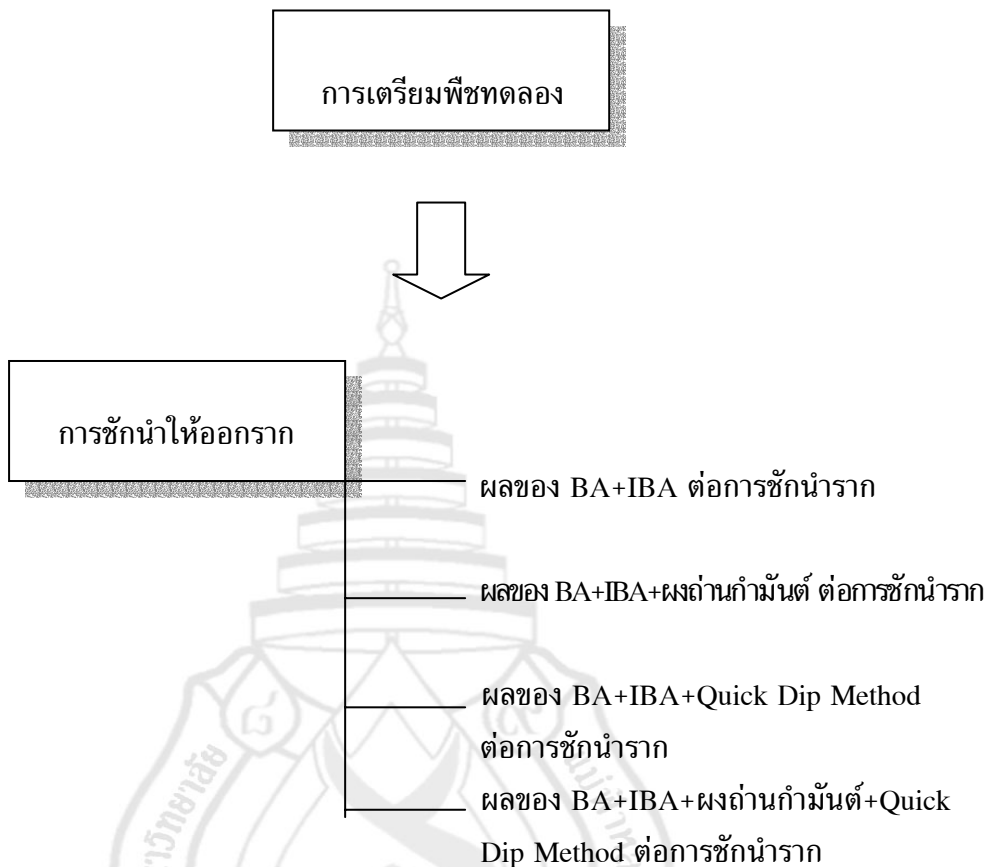
1. ย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทิพย์มณี, 2530)

2. หลังการเพาะเลี้ยงแคลลัส 8 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อชักนำยอด

อาหารทุกสูตรมีการเติมซูโครส 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เดิมวัน 0.7% (ทิพย์มณี, 2530; Dodd, 1994) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7-5.8 (ทิพย์มณี, 2530 ; Francis, 1995) ในกรณีที่เป็แคลลัสเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 14 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ส่วนยอดหรือกระจุกยอดเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 54 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 8-16 ชั่วโมงต่อวัน (Das, 1996) อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส (Francis, 1995; Das, 1996)



ภาพที่ 3.2 เนื้อเยื่อชาจีนที่ถูกตัดแบ่งเป็นท่อนก่อนการนำไปเพาะเลี้ยง



แผนภาพที่ 3.1 ขั้นตอนโดยสรุปของการดำเนินงานวิจัย

2. การชักนำให้เกิดราก

การทดลองนี้ประกอบด้วย 4 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ผลของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการชักนำราก

ขั้นตอน/วิธีการ

1. ตัดกิ่งยอดหรือหน่อขาที่เจริญมาจากชั้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง โดยเลือกยอดเดี่ยวที่สม่ำเสมอ มีความแข็งแรงสมบูรณ์ มีใบสีเขียวตั้งแต่ 2 ใบขึ้นไป มีความสูงประมาณ 2-3.5 เซนติเมตร โดยนับจากปลายยอดลงมาถึงลำต้น
2. นำส่วนของพืชที่ตัดไว้มาเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 4 ระดับคือ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

เพื่อชักนำให้เกิดราก (ตารางที่ 3.5) ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 54 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

บันทึกผลโดยนับจำนวนราก วัดความยาวรากและหาเปอร์เซ็นต์การเกิดรากภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน

ตารางที่ 3.5 แสดงกรรมวิธีชักนำรากที่ประกอบด้วยอาหารสูตร MS (1962) ร่วมกับ BA และ IBA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BA (มก/ล) \ IBA (มก/ล)	0	1	2	3	4
2	T1	T5	T9	T13	T17
4	T2	T6	T10	T14	T18
6	T3	T7	T11	T15	T19
8	T4	T8	T12	T16	T20

หมายเหตุ T เป็นสัญลักษณ์ที่ใช้แทนอาหารแต่ละส่วนผสม

การทดลองที่ 2.2 ผลของ BA, IBA และผงถ่านกัมมันต์ ต่อการชักนำรากขา

การทดลองนี้ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 แต่อาหารทุกสูตรผสมผงถ่านกัมมันต์ 6 กรัมต่อลิตร [Goncalves, *et al.* (n.d.)].

บันทึกผลโดยนับจำนวนราก วัดความยาวรากและหาเปอร์เซ็นต์การเกิดรากภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน

การทดลองที่ 2.3 ผลของ BA, IBA และ quick dip method ต่อการชักนำรากขา

การทดลองนี้ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 แต่จุ่มปลายตัดส่วนโคนของกิ่งขาในสารละลาย IBA เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 นาที [Quick Dip Method: Goncalves, *et al.* (n.d.)] ก่อนปักโคนลงในอาหารสังเคราะห์

บันทึกผลโดยนับจำนวนราก วัดความยาวรากและหาเปอร์เซ็นต์การเกิดราก
ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน

การทดลองที่ 2.4 ผลของ BA, IBA และ Quick Dip Method ต่อการชักนำรากขาในอาหาร
ที่มีผงถ่านกัมมันต์

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.2 แต่จุ่มปลายตัดส่วนโคนของกิ่งใน
สารละลาย IBA เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 นาที ก่อนปักโคนลงในอาหารที่เติมผง
ถ่านกัมมันต์

บันทึกผลโดยนับจำนวนราก วัดความยาวราก และหาเปอร์เซ็นต์การเกิดราก
ภายหลังการเพาะเลี้ยง 90 วัน

3.9 การเก็บรวบรวมผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ

มีขั้นตอนดังนี้

3.9.1 เก็บรวบรวมผลการวิจัยในรูปของตัวเลขและภาพถ่าย

3.9.2 นำข้อมูลที่วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์มาวิเคราะห์ค่า
ความแปรปรวน (ANOVA)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชทดลอง

ผลการนำเมล็ดชาพะละี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใบเลี้ยงซึ่งมีสีขาวยุ่น (ภาพที่ 4.1) จะบวมพองตัวออก เกิดต้นอ่อนแทรกขึ้นมาระหว่างใบเลี้ยงทั้งสอง (ภาพที่ 4.2) ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์และเมื่อทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใบเลี้ยงส่วนใหญ่เจริญเติบโตเป็นแคลลัส (compact callus) โดยเริ่มเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง สีเขียวแกมเหลืองและสีเขียวตามลำดับ (ภาพที่ 4.3) นอกจากนี้พื้นผิวของแคลลัสบางส่วนได้พัฒนาเป็นเอ็มบริอยด์ (ภาพที่ 4.4) จากนั้นสามารถพัฒนาต่อเป็นต้นที่สมบูรณ์ นอกจากนี้เมล็ดบางเมล็ดที่นำมาเพาะสามารถเกิดเป็นต้นโดยตรงผ่านเอ็มบริโอ (ภาพที่ 4.5)

ส่วนผลการนำชิ้นส่วนปลายยอดและลำต้นที่มีตาข้างติดอยู่มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่เกิดขึ้นมีความสมบูรณ์แข็งแรงต่อการตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ และสามารถนำไปกระตุ้นชักนำรากในขั้นตอนต่อไปได้ (ภาพที่ 4.6) แต่บางชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงมีแคลลัส (compact callus) สีชมพูแกมแดง (ภาพที่ 4.7) สีเขียวแกมเหลือง (ภาพที่ 4.8) เกิดขึ้นบริเวณฐานรอยตัด จากนั้นเมื่อนำแคลลัสดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสสามารถเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 4.9)



(ก) ใบเลี้ยงจากเมล็ดเมื่อเริ่มทดลอง



(ข) ใบเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

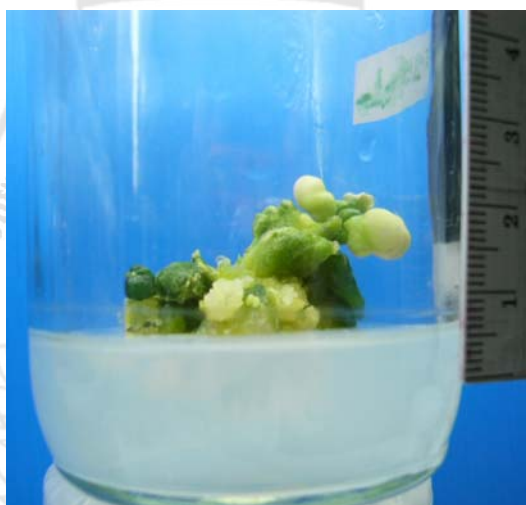
ภาพที่ 4.1 ใบเลี้ยงของเมล็ดชาที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.2 การเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

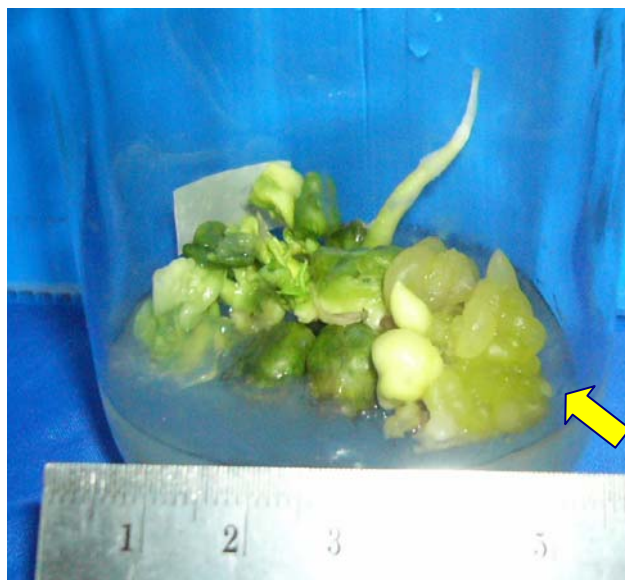


(ก) อายุ 8 สัปดาห์

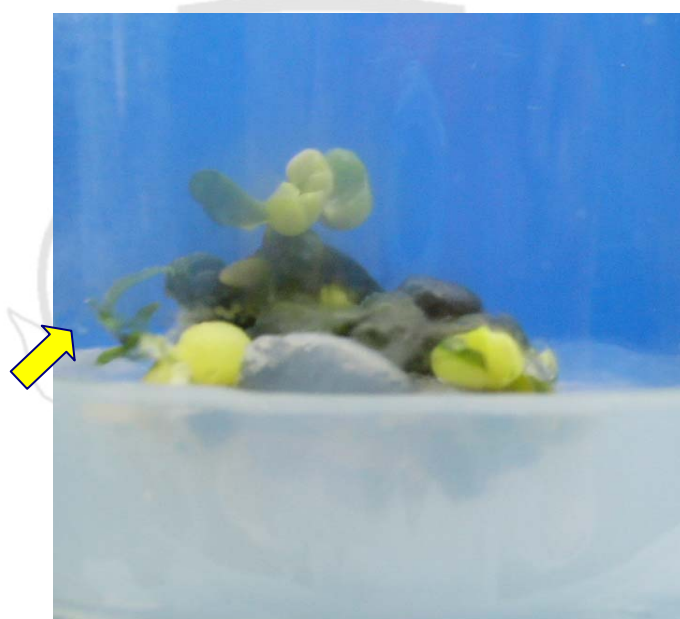


(ข) อายุ 12 สัปดาห์

ภาพที่ 4.3 การเริ่มพัฒนาของแคลลัสจากใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



(ก) เอ็มบริอยด์ระยะ globular stage



(ข) เอ็มบริอยด์ที่พัฒนาจนมีใบ

ภาพที่ 4.4 การพัฒนาของแคลลัสในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



(ก) อายุ 4 สัปดาห์

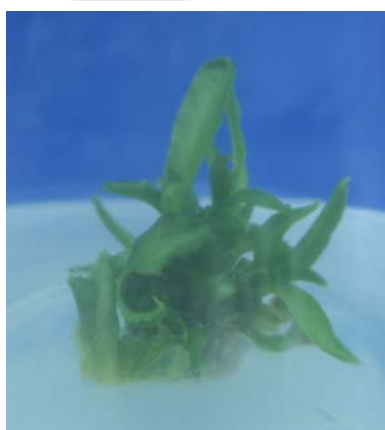


(ข) อายุ 12 สัปดาห์

ภาพที่ 4.5 การพัฒนาเป็นต้นอ่อนโดยตรงผ่านเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



(ก) อายุ 4 สัปดาห์



(ข) อายุ 8 สัปดาห์



(ค) อายุ 12 สัปดาห์

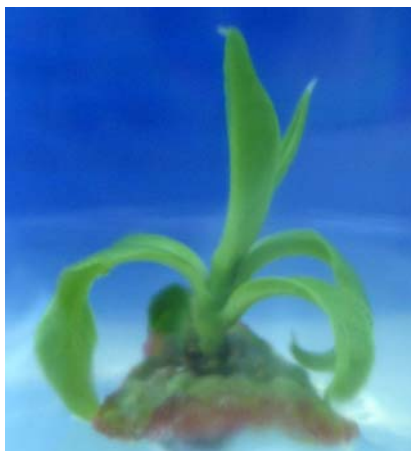
ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.7 แคลลัสสีชมพูแกมแดงบริเวณฐานรอยตัดของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.8 แคลลัสสีเขียวแกมเขียวบริเวณฐานรอยตัดของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.9 การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 การชักนำให้เกิดราก

4.2.1 ผลของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการชักนำราก

จากตารางที่ 4.1 พบว่าสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดรากในอาหารเพาะเลี้ยง 5 กรรณวิธี ได้แก่ เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารส่วนผสมที่ 2, 3, 6, 8 และ 10 (ภาพที่ 4.10, 4.11) โดยอาหารส่วนผสมที่ 2 มีผลต่อการเกิดรากมากที่สุด คือ 60% รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 6 และ 8 มีเนื้อเยื่อเกิดราก 50%

นอกจากนี้พบว่า จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละส่วนผสมแตกต่างกันคือ อาหารส่วนผสมที่ 8 มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 8 รากต่อยอด รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 10 มีจำนวนรากเฉลี่ย 7 รากต่อยอด อันดับสามได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 6 มีจำนวนรากเฉลี่ย 6 รากต่อยอด ซึ่งจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอดในทุกส่วนผสมอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 (ภาคผนวก) ส่วนอาหารที่มีผลต่อความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดมากที่สุดได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 6 ความยาวรากเฉลี่ย 2.53 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 3 ความยาวรากเฉลี่ย 1.12 เซนติเมตร อันดับสามได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 10 มีความยาวรากเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตร

โดยสรุปยอดที่นำมาเลี้ยงสามารถออกรากได้ในอาหารที่มี IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใช้ BA ร่วมด้วย หรือใช้ร่วมกับ BA 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่หากใช้ IBA ระดับสูงถึง 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้องใช้ BA ร่วมด้วย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.1 ผลการเกิดรากของยอดข่าจีนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ในอาหาร MS ร่วมกับ BA และ IBA

กรรมวิธี	ความเข้มข้น มก/ล (BA:IBA)	จำนวนเนื้อเยื่อที่ไม่มีการ ปนเปื้อน ^{1/}	จำนวนเนื้อเยื่อ ที่เกิดราก	การเกิดราก (%)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อยอด ^{2/}	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม) ^{2/}
T1	0:2	6	0	0.00	–	–
T2	0:4	10	6	60.00	5.50	0.22
T3	0:6	9	2	22.22	3.00	1.12
T4	0:8	4	0	0.00	–	–
T5	1:2	6	0	0.00	–	–
T6	1:4	2	1	50.00	6.00	2.53
T7	1:6	8	0	0.00	–	–
T8	1:8	2	1	50.00	8.00	0.79
T9	2:2	4	0	0.00	–	–
T10	2:4	8	2	25.00	7.00	0.85
T11	2:6	10	0	0.00	–	–
T12	2:8	6	0	0.00	–	–
T13	3:2	4	0	0.00	–	–
T14	3:4	10	0	0.00	–	–
T15	3:6	8	0	0.00	–	–
T16	3:8	7	0	0.00	–	–
T17	4:2	5	0	0.00	–	–
T18	4:4	9	0	0.00	–	–
T19	4:6	6	0	0.00	–	–
T20	4:8	8	0	0.00	–	–

^{1/} จากการทดลอง 10 ซ้ำ

^{2/} จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ย คัดเฉพาะต้นที่เกิดราก



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.10 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 90 วัน
 ก) ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร
 ข) ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

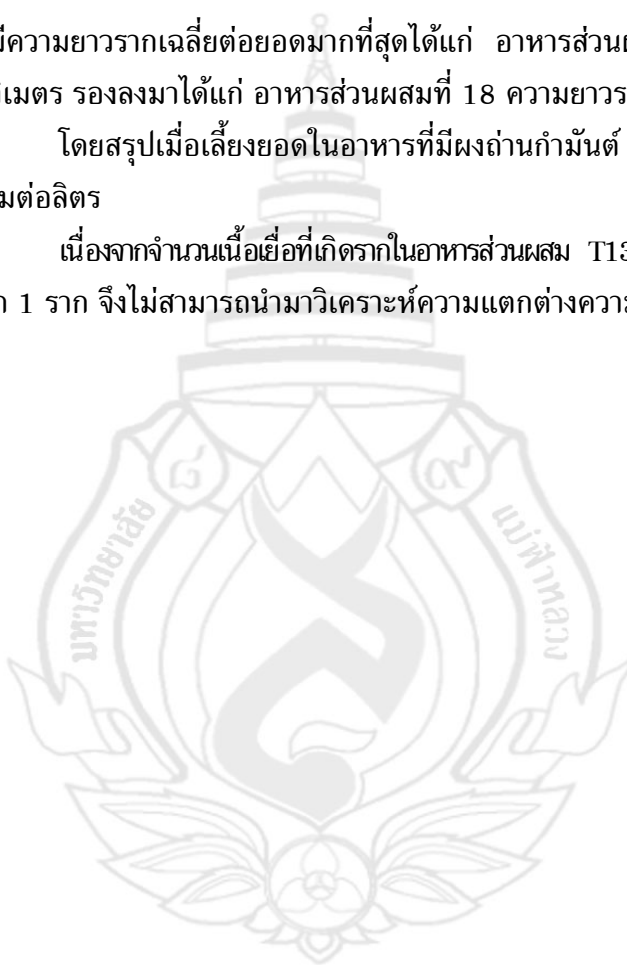
4.2.2 ผลของ BA, IBA และผงถ่านกัมมันต์ ต่อการชักนำรากชา

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดรากในอาหารเพาะเลี้ยง 2 กรรมวิธี ได้แก่ เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารส่วนผสมที่ 13 และ 18 (ภาพที่ 4.11) โดยอาหารส่วนผสมที่ 18 มีผลต่อการเกิดรากมากที่สุดคือ 12.50% รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 13 มีเนื้อเยื่อเกิดราก 10%

นอกจากนี้พบว่าจำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละส่วนผสมเท่ากันคือ อาหารส่วนผสมที่ 13 และ 18 มีเนื้อเยื่อเกิดราก 1 ราก ส่วนอาหารที่ทำให้เนื้อเยื่อมีความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดมากที่สุดได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 13 ความยาวรากเฉลี่ย 6.7 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 18 ความยาวรากเฉลี่ย 1 เซนติเมตร

โดยสรุปเมื่อเลี้ยงยอดในอาหารที่มีผงถ่านกัมมันต์ รากเกิดในอาหารที่มี IBA เพียง 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เนื่องจากจำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดรากในอาหารส่วนผสม T13 และ T18 มี 1 เนื้อเยื่อ และมีจำนวนราก 1 ราก จึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างความแปรปรวนได้

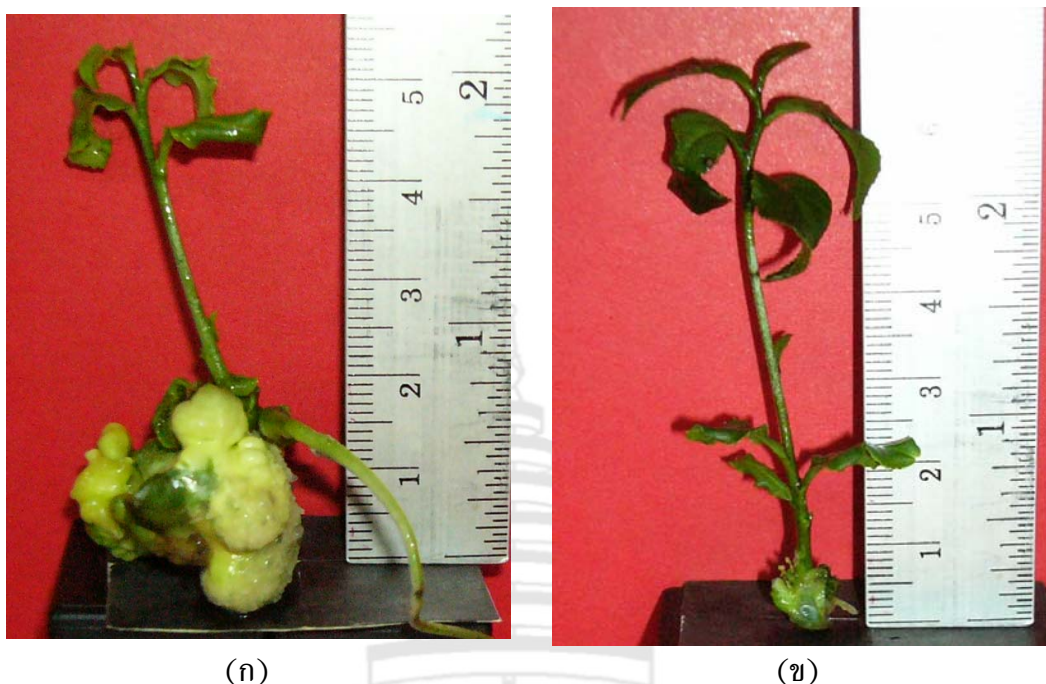


ตารางที่ 4.2 ผลการเกิดรากของชาจีนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ในอาหาร MS ร่วมกับ BA, IBA และผงถ่านกัมมันต์

กรรมวิธี	ความเข้มข้น มก/ล (BA:IBA)	จำนวน เนื้อเยื่อที่ไม่มี การปนเปื้อน ^{1/}	จำนวน เนื้อเยื่อที่ เกิดราก	การเกิดราก (%)	จำนวนราก เฉลี่ย (ต่อยอด) ^{2/}	ความยาวราก เฉลี่ย (ซม) ^{2/}
T1	0:2	4	0	0.00	–	–
T2	0:4	4	0	0.00	–	–
T3	0:6	0	0	–	–	–
T4	0:8	10	0	0.00	–	–
T5	1:2	10	0	0.00	–	–
T6	1:4	4	0	0.00	–	–
T7	1:6	0	0	–	–	–
T8	1:8	0	0	–	–	–
T9	2:2	6	0	0.00	–	–
T10	2:4	8	0	0.00	–	–
T11	2:6	8	0	0.00	–	–
T12	2:8	10	0	0.00	–	–
T13	3:2	10	1	10.00	1.00	6.70
T14	3:4	6	0	0.00	–	–
T15	3:6	6	0	0.00	–	–
T16	3:8	0	0	–	–	–
T17	4:2	9	0	0.00	–	–
T18	4:4	8	1	12.50	1.00	1.00
T19	4:6	0	0	–	–	–
T20	4:8	0	0	–	–	–

^{1/} จากการทดลอง 10 ซ้ำ

^{2/} จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ย คัดเฉพาะต้นที่เกิดราก



ภาพที่ 4.11 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่านกัมมันต์เป็นเวลา 90 วัน

- ก) ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข) ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.3 ผลของ BA, IBA และ Quick Dip Method ต่อการชักนำราก

จากตารางที่ 4.3 พบว่าสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดรากในอาหารเพาะเลี้ยง 6 กรรมวิธี ได้แก่ เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารส่วนผสมที่ 1, 3, 4, 7, 9 และ 10 (ภาพที่ 4.12) โดยอาหารส่วนผสมที่ 1 มีผลต่อการเกิดรากมากที่สุดคือ 80% รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 7 เนื้อเยื่อเกิดราก 50% อันดับสามได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 4 มีเนื้อเยื่อเกิดราก 40% นอกจากนี้พบว่าจำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละส่วนผสมแตกต่างกันคือ อาหารส่วนผสมที่ 9 มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 8.33 รากต่อยอด รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 7 มีจำนวนรากเฉลี่ย 7 รากต่อยอด อันดับสามได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 2 มีจำนวนรากเฉลี่ย 4 รากต่อยอด ซึ่งจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอดในทุกส่วนผสมอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก) ส่วนอาหารที่ทำให้เนื้อเยื่อมีความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดมากที่สุดได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 1 มีความยาวรากเฉลี่ย 1.09 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 4 และ 9 มีความยาวรากเฉลี่ย 1.05 เซนติเมตร ซึ่งความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดในทุกส่วนผสมอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 (ภาคผนวก)

ตารางที่ 4.3 ผลการเกิดรากของชาจีนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ในอาหาร MS ร่วมกับ BA, IBA และ Quick Dip Method

กรรมวิธี	ความเข้มข้น มก/ล (BA:IBA)	จำนวน เนื้อเยื่อที่ไม่มี การปนเปื้อน ^{1/}	จำนวน เนื้อเยื่อที่ เกิดราก	การเกิดราก (%)	จำนวนราก เฉลี่ย ต่อยอด ^{2/}	ความยาวราก เฉลี่ย (ซม) ^{2/}
T1	0:2	10	8	80.00	4.00	1.09
T2	0:4	10	0	0.00	-	-
T3	0:6	10	2	20.00	2.50	0.49
T4	0:8	5	2	40.00	2.00	1.05
T5	1:2	10	0	0.00	-	-
T6	1:4	10	0	0.00	-	-
T7	1:6	2	1	50.00	7.00	0.97
T8	1:8	10	0	0.00	-	-
T9	2:2	8	3	37.50	8.33	1.05
T10	2:4	10	1	10.00	1.00	1.00
T11	2:6	10	0	0.00	-	-
T12	2:8	8	0	0.00	-	-
T13	3:2	8	0	0.00	-	-
T14	3:4	0	0	-	-	-
T15	3:6	10	0	0.00	-	-
T16	3:8	0	0	-	-	-
T17	4:2	0	0	-	-	-
T18	4:4	4	0	0.00	-	-
T19	4:6	4	0	0.00	-	-
T20	4:8	4	0	0.00	-	-

^{1/} จากการทดลอง 10 ซ้ำ

^{2/} จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ย คัดเฉพาะต้นที่เกิดราก



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 4.12 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการใช้ Quick Dip Method

ก) ผสม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) ผสม IBA เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.4 ผลของ BA, IBA และ Quick Dip Method ต่อการชักนำรากขาในอาหารที่มีผงถ่านกัมมันต์

จากตารางที่ 4.4 พบว่าสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดรากในอาหารเพาะเลี้ยง 14 กรรมวิธี ได้แก่ เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารส่วนผสมที่ 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18 และ 19 (ภาพที่ 4.13-4.15) โดยอาหารส่วนผสมที่ 1, 3, 5, 8, 10, 11 และ 12 มีผลต่อการเกิดรากมากที่สุดคือ 100 ร่องลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 18 มีเนื้อเยื่อเกิดราก 60%

นอกจากนี้พบว่า จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละส่วนผสมแตกต่างกัน คือ อาหารส่วนผสมที่ 3 มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 16.60 รากต่อยอด ร่องลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 12 มีจำนวนรากเฉลี่ย 15.50 รากต่อยอด อันดับสามได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 1 มีจำนวนรากเฉลี่ย 13 รากต่อยอด ซึ่งจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอดในทุกส่วนผสมอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวก) ส่วนอาหารที่ทำให้เนื้อเยื่อมีความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดมากที่สุดได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 1 มีความยาวรากเฉลี่ย 1.93 เซนติเมตร ร่องลงมาได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 12 มีความยาวรากเฉลี่ย 1.78 เซนติเมตร อันดับสามได้แก่ อาหารส่วนผสมที่ 7 มีความยาวรากเฉลี่ย 1.68 เซนติเมตร โดยความยาวรากเฉลี่ยต่อยอดในทุกส่วนผสมอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 (ภาคผนวก)

โดยสรุปยอดขาที่เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ BA, IBA ผงถ่านกัมมันต์และใช้ Quick Dip Method โดยการจุ่มโคนกิ่งใน IBA ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกรากในทุกส่วนผสมของอาหาร (ยกเว้นในกรรมวิธีที่เนื้อเยื่อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมด)

ตารางที่ 4.4 ผลการเกิดรากของชาจีนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ในอาหาร MS ร่วมกับ BA, IBA ผงถ่านกัมมันต์และ Qick Dip Method

กรรมวิธี	ความเข้มข้น มก/ล (BA:IBA)	จำนวน เนื้อเยื่อที่ไม่มี การปนเปื้อน ^{1/}	จำนวน เนื้อเยื่อที่ เกิดราก	การเกิดราก (%)	จำนวนราก เฉลี่ย (ต่อ ยอด) ^{2/}	ความยาว รากเฉลี่ย (ซม) ^{2/}
T1	0:2	10	10	100.00	13.00	1.93
T2	0:4	5	2	40.00	2.50	0.84
T3	0:6	5	5	100.00	16.60	1.22
T4	0:8	0	0	-	-	-
T5	1:2	0	0	-	-	-
T6	1:4	10	0	0.00	-	-
T7	1:6	5	2	40.00	5.00	1.68
T8	1:8	8	8	100.00	8.25	1.43
T9	2:2	6	3	50.00	3.33	0.56
T10	2:4	10	10	100.00	8.60	1.15
T11	2:6	4	4	100.00	7.00	0.61
T12	2:8	2	2	100.00	15.50	1.78
T13	3:2	2	2	100.00	1.00	1.25
T14	3:4	0	0	-	-	-
T15	3:6	7	4	57.14	6.25	1.64
T16	3:8	7	4	57.14	5.00	1.21
T17	4:2	0	0	-	-	-
T18	4:4	5	3	60.00	3.33	0.48
T19	4:6	4	2	50.00	5.50	0.26
T20	4:8	0	0	-	-	-

^{1/} จากการทดลอง 10 ซ้ำ

^{2/} จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ย คัดเฉพาะต้นที่เกิดราก



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.13 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการใช้ผงถ่านกัมมันต์ และ Quick Dip Method

ก) ผสม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) ผสม IBA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) ผสม IBA เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) ผสม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.14 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการใช้แผ่นก้ำมันต์ และ Quick Dip Method ในอาหารที่มี BA และ IBA

ก) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) ผสม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) ผสม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.15 การเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการใช้ผงถ่านและ Quick Dip Method ในอาหารที่มี BA และ IBA ความเข้มข้นสูง

ก) ผสม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) ผสม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) ผสม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) ผสม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร



บทที่ 5

การวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

5.1 การวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงผลของอาหารสูตร MS (1962) ร่วมกับ BA, IBA ผงถ่านกัมมันต์ และการใช้ Quick Dip Method ต่อการชักนำรากของชาจีนในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ ต้นชาพันธุ์ดี ในระยะเวลาสั้น ให้ได้จำนวนมาก โดยการศึกษาทดลองครั้งนี้ใช้พืชทดลองคือ ชาพันธุ์ *Camellia sinensis* var. *sinensis* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า

การเตรียมเนื้อเยื่อพืชทดลองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดและลำต้นที่มีตาข้างติดอยู่ โดยการนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดที่มีความแข็งแรงสมบูรณ์ได้เป็นจำนวนมากตามความต้องการ แสดงให้เห็นว่าไฮโดโคนินที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตของยอดดีขึ้น โดยเฉพาะการใช้ไฮโดโคนินที่มีความเข้มข้นสูงช่วยให้ระยะพักตัวถูกทำลายลง ส่งผลให้สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542, 2548)

นอกจากนี้การใช้ชิ้นส่วนปลายยอดและลำต้นที่มีตาข้างติดอยู่มาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้มี โอกาสประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงมากขึ้น เนื่องจากการเลือกชิ้นส่วนปลายยอดและลำต้นที่มีตาข้าง ติดอยู่เป็นการนำชิ้นส่วนของพืชซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot meristem) มาเพาะเลี้ยงส่งผลให้ สามารถชักนำพัฒนาการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อได้ง่ายตามต้องการ (คำณูน, 2542)

นอกจากนี้การเลือกใช้อาหารสูตร MS และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไฮโดโคนินต่อกลุ่ม ออกซินคือ BA และ IBA โดยใช้อัตราส่วนที่มีไฮโดโคนินสูงส่งผลให้กระตุ้นการเกิดต้นได้ดีเนื่องจาก BA เป็นไฮโดโคนินสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติสำคัญในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ โดยจะเป็นตัวเพิ่มการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอส่งผลให้การแบ่งเซลล์ดีขึ้น ช่วยเร่งการแตกตาข้าง ดังนั้นจึงทำให้มีชักนำยอดได้มาก ขึ้น (stem, 1994) ประกอบกับความเหมาะสมของอายุเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงและ endogenous growth regulators ในชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงด้วย

ผลการชักนำรากชาในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองที่ 2 (ตารางที่ 4.1, 4.2, 4.3, 4.4) แสดงให้เห็นว่าอาหารสังเคราะห์ที่มีความเหมาะสมในการชักนำรากคือ อาหาร MS ที่เติม BA, IBA ในอัตราส่วน 0:2, 0:6 และ 2:8 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้ผงถ่าน 6.0 กรัมต่อลิตรและ Quick Dip Method ด้วย IBA เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 นาที ทั้งนี้เนื่องจากอาหารสูตรต่างๆดังกล่าวสามารถชักนำรากได้ 100 %

โดยที่มีจำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคพื้นฐานการชักนำรากหลากหลายวิธีร่วมกันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำรากให้ประสบความสำเร็จได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ IBA ระดับความเข้มข้นสูงกว่า BA จะกระตุ้นการตอบสนองการเกิดรากดีกว่าการใช้ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (พีรเดช, 2537) ส่วนการใส่ผงถ่านกัมมันต์ลงไปในการเพาะเลี้ยงทำให้เกิดสภาพดำมืดของอาหาร ส่งผลให้เกิดรากได้ดีขึ้นเพราะความมืดมีผลต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาจเป็นเพราะผงถ่านช่วยดูดซับสารพิษของรากตัวตุงสีดำและสีน้ำตาลซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล เมลานิน (melanin) และสารพิษไม่มีสี (ค่านูณ, 2542)

นอกจากนี้การจุ่มแช่ต้นกล้าในสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานาน ก่อนทำการย้ายเลี้ยงในอาหารชักนำรากจะส่งเสริมการสร้างรากดีขึ้นและเร็วขึ้น ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ สมปอง (2538) ที่ทำการตัดแยกต้นกล้ามังคุดโดยทำแผลที่ฐานยอดแล้วจุ่มแช่ในสารละลาย IBA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มีดเป็นเวลา 7-15 นาที จากนั้นย้ายเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำรากที่เติม BA เข้มข้น 1 ไมโครโมลร่วมกับ IBA หรือ NAA เข้มข้น 20-80 ไมโครโมล พบว่าการจุ่มแช่เป็นเวลา 7 นาที ให้ผลชักนำรากดีที่สุดถึง 100%

5.2 สรุปผลการทดลอง

การชักนำรากชาพันธุ์ *Camellia sinensis* var. *sinensis* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

ยอดชาที่เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ BA, IBA ผงถ่านกัมมันต์และใช้ Quick Dip Method โดยการจุ่มโคนกิ่งใน IBA ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 นาที สามารถชักนำรากได้ในทุกส่วนผสมของอาหาร (ยกเว้นในกรรมวิธีที่เนื้อเยื่อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมด) อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำรากในสภาพปลอดเชื้อได้แก่ อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA และ IBA ในอัตราส่วนความเข้มข้น เท่ากับ 0:2, 0:6 และ 2: 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดรากจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้ 100% และให้จำนวนราก ความยาวรากเฉลี่ยมากกว่าอาหารส่วนผสมอื่นๆ ในกรรมวิธีเดียวกัน

บรรณานุกรม

- คำคุณ กาญจนภูมิ. (2542). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชา. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.(แผ่นพับ).
- เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน. (2546). กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.
- นิตยา โง้ววัฒนา. (2525). การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นพดล จรัสสัมฤทธิ์. (2535). เทคโนโลยีการปลูกและการผลิตชา : รายงานการสัมมนา. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ทิพย์มณี กระจะศิลป์. (2530). ปรับปรุงพันธุ์ชาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์ : รายงานฉบับสมบูรณ์การวิจัย : Tea improvement by using tissue culture technique. เชียงใหม่ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- บุญลธิ รุจิไพบูลย์. (2004). ผลของ NAA และ BA ต่อการเกิดแคลลัสของส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุน. แหล่งที่มา <http://www.riclib.nrct.go.th> (1 สิงหาคม 2004).
- บัณฑิต สายทอง. (2542). การชักนำยอดและราก sandawood ในสภาพปลอดเชื้อ : ปัญหาพิเศษ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปิยะนันท์ จารุสมบัติ. (2535). อิทธิพลของน้ำตาลและ BA ต่อ morphogenic callus ของเฟินใบหนัง(*Arachniodes adiantifomis*) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ. แหล่งที่มา <http://www.riclib.nrct.go.th/> (1 สิงหาคม 2004).
- ประภาพรรณ ยังสุขยิ่ง. (2541). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย *Croton sublyratus* Kurz. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พีรเดช ทองอำไพ. (2529). สอโรโมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเบื้องต้น : เอกสารประชุมวิชาการ. (2548). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิลาศ วิษณุเดชา. (2526). การขยายพันธุ์ต้นเลี่ยน (*Melia azedarach* Linn.) แบบไม่ใช้เพศ เพื่อหาแนวทางผลิตเป็นจำนวนมาก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- วิสุทธิ พัชรพิสุทธิสิน. (2538). การเกิดเอ็มบริอยด์และต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วรรณพร คำเซ่ง. (2541). “ ผลของ BA และ พาโคลบิวทราโซลต่อการเจริญเติบโตของหงษ์เหินในสภาพปลอดเชื้อ.” [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.riclib.nrct.go.th/> (1 August 2004).
- ศุภนารถ เกตุเจริญ. (2541). “ ชา.” [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.thai.net/> (15 December 2003).
- ศิริกานต์ ทะนันแก้ว. (2544). อิทธิพลของ IBA และ BA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของชาปีญจชั้นในสภาพปลอดเชื้อ : ปัญหาพิเศษ. เชียงใหม่ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สันต์ ละอองศรี. (2532). รายงานสรุปผลการวิจัยประจำปี 2532 ของโครงการวิจัยและพัฒนาชา. เชียงใหม่ : โครงการหลวง.
- _____. (2535). ชา. กรุงเทพฯ : เคอูบู้คส์เซนเตอร์.
- สมปอง เตชะโต. (2538). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ : หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรุณี ม่วงแก้วงาม. (2534). การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะยางพาราพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอ และการทวีจำนวนต้นตอด้วยวิธีไมโครคัตติง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรดี สหวัชรินทร์. (2539). เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ : เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 8. (มปป) นครปฐม : สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน .
- Dixon, R. A. (1985). **Plant Cell Culture : A Practical Approach**. Oxford : IRL. 236 p.
- Dodd, W. A. (1994). “Tissue culture of tea (*Camellia sinensis* L.) : a review” **Int. J. Trop. Agric.** XII: 212-247.
- Goncalves, J. C., et al. [n.d.]. “ *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*)” **Hort Science**. 72 (3-4):265-275.
- Mi-Joung Oh, Jun-Young Choi and Nam-In Hyung. (2004). **Factors affecting shoot multiplication from node culture in tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze).** Available [http://home.tinex.co.kr/~teasoc/bulletin/08_01\(6\).htm](http://home.tinex.co.kr/~teasoc/bulletin/08_01(6).htm) (April 2004)

- Mondal, *et al.* (1998). "Micropropagation of Tea (*Camellia sinensis* (L) using Thidiazaron" **Plant Growth Regulation**. 26 (1):57-61.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15
- Pierik, R.L.M. (1997). **In vitro Culture of Higher Plants**. London : Kluwer academic.
- Shervington, Amol and *et.al.* (1998). **Caffeine and the obromine formation by tissue cultures of Camellia Sinensis**. Netherland : Elsevier Science.
- Sudripta Das, Timir B. Jha and Sumita Jha. (1996). "Organogenesis and regeneration from Pigmented callus in *Camellia sinensis* (L)cv. Nandadevi an elite Darijeeling tea clone." **Plant Science**. 121:207-212.
- S.S. Bhojwani and M.K. Razdan. (1996). **Plant Tissue Culture : Theory and Practice**. Netherland : Elsevier Science.
- Torres, K.C. (1989). **Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops**. New York : AVI .
- Tea culture media**. (2004). Available [http: www.scu.edu](http://www.scu.edu) (5 March 2004).
- Tea tissue culture**. (2004). Available [http: www.geocities.com](http://www.geocities.com) (5 March 2004).
- Tea**. (2004). Available [http: www.bord.dserver.org](http://www.bord.dserver.org) (5 March 2004).
- Wachira, Francis. And Ogada, Johnson. (1995). "In Vitro regeneration of *Camellia sinensis* (L.) by somatic embryogenesis" **Plant Cell Reports** 14:463-466.

ภาคผนวก

**ส่วนประกอบของแร่ธาตุใน Bacto Agar Difco
และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน**



ส่วนประกอบของแร่ธาตุใน Bacto Agar Difco

ส่วนประกอบ	Bacto-agar (%)	Noble-agar (%)	purified-agar (%)
ขี้เถ้า (Ash)	4.50	2.60	1.75
แคลเซียม (Calcium)	0.13	0.23	0.27
แบเรียม (Barium)	0.01	0.01	0.01
ซิลิกา (Silica)	0.19	0.26	0.09
คลอไรด์ (Chloride)	0.43	0.18	0.13
ซัลเฟต (Sulphate)	2.54	1.90	1.32
ไนโตรเจน (Nitrogen)	0.17	0.10	0.14
เหล็ก (Iron)	11.00 มก/ล	11.00 มก/ล	11.00 มก/ล
แมกนีเซียม (Magnesium)	285.00 มก/ล	260.00 มก/ล	695.00 มก/ล
ทองแดง (Copper)	5.00 มก/ล	7.50 มก/ล	20.00 มก/ล

(บุญยืน, 2540)

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร
สูตร MS ร่วมกับ BA และ IBA เป็นเวลา 90 วัน

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	3	271.625	90.542	7.807
ภายในกลุ่ม	14	162.375	11.598	
รวม	17	434.000		

$$F(3, 14) = 5.56$$

** มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวรากเฉลี่ยต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร
สูตร MS ร่วมกับ BA และ IBA เป็นเวลา 90 วัน

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	5	36.067	7.213	12.499**
ภายในกลุ่ม	164	94.648	0.577	
รวม	169	130.715		

$$F(5, 164) = 3.02$$

** มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวรากเฉลี่ยต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน
บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA, IBA และ quick dip method

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	6	19.739	3.29	4.019**
ภายในกลุ่ม	94	76.950	0.819	
รวม	100	96.689		

$$F(6, 94) = 2.96$$

** มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน
บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA, IBA, ผงถ่าน และ quick dip method

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	14	1,095.181	78.227	2.145*
ภายในกลุ่ม	56	2,042.283	36.469	
รวม	70	3,137.465		

$$F(14, 56) = 2.00$$

* มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยารากเฉลี่ยต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน
บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA, IBA, ผงถ่าน และ quick dip method

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	14	101.306	7.236	4.149**
ภายในกลุ่ม	584	1,018.604	1.744	
รวม	598	1,119.910		
F (14, 584) = 2.18				
** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01				



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ

นางจินตณี ขมภักดี

วัน เดือน ปี เกิด

5 ธันวาคม 2501

ประวัติการศึกษา

ประกาศนียบัตรวิชาการศึกษาชั้นสูง

วิทยาลัยครูลำปาง พ.ศ. 2521

ระดับปริญญาตรี

วิทยาลัยครูเชียงราย พ.ศ. 2526

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2521-2525 โรงเรียนพานพิทยาคม อ.พาน จ.เชียงราย

พ.ศ. 2525-ปัจจุบัน โรงเรียนดำรงราษฎร์สงเคราะห์ อ.เมือง จ.เชียงราย