บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

   ต้นพันธุ์จำปีสิรินธรนำมาจากหมู่บ้านซับจำปา จังหวัดลพบุรี นำมาเก็บรักษาที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีหลังจากนั้นจึงนำยอดมาขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเพิ่มปริมาณยอดจำปีสิรินธร ประมาณ 1,000 ยอด

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

   2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และหยาบ

   2.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

   2.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยความดันไอ

   2.4 เตาไฟฟ้า หรือเตาแก๊ส

   2.5 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ สำหรับเตรียมอาหารและบรรจุอาหาร เช่น กระบอกตวง บีกเกอร์ ปิเปต และแท่งแก้วคนสารเคมี เป็นต้น

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

   3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) (ตารางผนวก ข)

   3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BAP) และ 4-indole-3-butyric acid (IBA)

   3.3 สารที่มีผลต่อออสโมซิสของเซลล์พืช ได้แก่ mannitol

   3.4 สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ paclobutrazol

4. สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectants) (ตารางผนวก ก และข)

   4.1 PVS_2 ซึ่งประกอบด้วย 30% (w/v) glycerol , 15% (w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 15% (w/v) ethylene glycol ที่เติม 0.4 M sucrose ใน MS basal medium

   4.2 osmoprotective solution ซึ่งประกอบด้วย 2.0 M glycerol, 0.4 M sucrose ใน MS basal medium

5. สารหุ้มเนื้อเยื่อ (encapsulation chemical) ได้แก่

   5.1 3 % Na-alginate

   5.2 0.1 M $CaCl_2$

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

   6.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

   6.2 เครื่องมือผ่าตัด เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว เป็นต้น

   6.3 เครื่องมืออื่นๆ เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์

7. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

   7.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

   7.2 ถังไนโตรเจนเหลว

   7.3 water bath

   7.4 เครื่องเขย่า

   7.5 เครื่องมือผ่าตัด เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว เป็นต้น

   7.6 เครื่องมืออื่นๆ เช่น กล่องเก็บความเย็น (ice box) ไมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ทิปพลาสติก ตะเกียงแอลกอฮอล์ หลอดหยด ช้อนตักสาร และหลอดเก็บเนื้อเยื่อ (cryotube)

8. โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS version 11 ของ SPSS Inc. Chicago,USA

วิธีดำเนินการศึกษา

1. **ศึกษาการเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในหลอดทดลองระยะปานกลางในภาวะชะลอการเจริญ** (minimal growth condition)

เพิ่มปริมาณยอดจำปีสิรินธรในสภาพปลอดเชื้อโดยนำยอดจำปีสิรินธรที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ BAP (6-benzylaminopurine) 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 μmol.m.$^{-2}$s^{-1} อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณไม่น้อยกว่า 360 ยอด ให้เพียงพอต่อการศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก น้ำตาล และสารชะลอการเจริญเติบโต การทดลองทั้ง 3 ชุดนี้ แต่ละชุดการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำแต่ละซ้ำเลี้ยงยอดจำปีสิรินธร ขนาดความสูง 1.0 เซนติเมตร เท่า ๆ กัน 10 ชิ้น เก็บรักษาในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสงประมาณ 40 μmol.m.$^{-2}$s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ดังนี้

1.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก (macronutrients)

1.1.1 **เก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในอาหารสูตร MS เปรียบเทียบกัน 3 ระดับ คือ 1 ส่วน, 3/4ส่วน และ 1/2ส่วน ทั้งนี้ใช้** micronutrients **ตามปกติของสูตร** MS บันทึกผลการทดลองทุกเดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่จนกว่าจะพบว่ายอดจำปีสิรินธรมีสีเหลืองทั้งยอด เกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดในการทดลอง นั้นๆ ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

- ระยะเวลา (จำนวนเดือน) ที่เก็บรักษาจนพบว่ายอดจำปีสิรินธรเหลืองเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดในการทดลอง นั้นๆ
- เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซนต์จำนวนยอดที่ยังไม่เหลืองทั้งยอด
- ค่าเฉลี่ยคะแนนความแข็งแรงของยอดจำปีสิรินธร
- ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนตาข้างที่มีการเจริญ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ดีที่สุดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan' s multiple range test เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยอดจำปีสิรินธรเมื่อเวลาผ่านไประหว่างการเก็บรักษา ในการคำนวณใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS version 11

1.1.2 ทดสอบการรอดชีวิตของยอดจำปีสิรินธรหลังการเก็บรักษาในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก (macronutrients) 3 **ระดับ**

นำยอดจำปีสิรินธร จากการทดลองที่พบว่ายอดมีสีเหลืองทั้งยอดเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด จากข้อ 1.1.1 มาเลี้ยงใน regeneration medium ได้แก่ อาหาร MS ที่มี IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และติดตามบันทึกผลทุก 1 เดือน เป็นเวลานาน 2 เดือน ข้อมูลที่บันทึกมีดังนี้

- เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการเก็บรักษา และย้ายมาเลี้ยงใน regeneration medium
- ค่าเฉลี่ยคะแนนความแข็งแรงของยอดจำปีสิรินธร
- ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนตาข้างที่มีการเจริญ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนราก

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan' s multiple range test เพื่อดูการฟื้นตัวและกลับมาเจริญใหม่ของยอดจำปีสิรินธรที่นำมาเลี้ยงใน regeneration medium เป็นเวลา 2 เดือน ในการคำนวณใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS version 11

1.2 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล

1.2.1 เก็บรักษายอดจำปีสิรินธรบนอาหารที่มีน้ำตาล 2 ชนิด ได้แก่ sucrose **ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ใช้ร่วมกับ** mannitol **ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร**

รวม 6 การทดลอง โดยเลือกใช้สูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักระดับที่ให้ผลดีที่สุดเพียงแบบเดียวจากการทดลอง 1.1 มาใช้ในการทดลองที่ 1.2 บันทึกผลการทดลองทุกเดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่จนกว่าจะพบว่ายอดจำปีสิรินธรมีสีเหลืองทั้งยอด เกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดในการทดลอง นั้นๆ ข้อมูลที่บันทึกได้แก่

- ระยะเวลา (จำนวนเดือน) ที่เก็บรักษาจนพบว่ายอดจำปีสิรินธรเหลืองเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดในการทดลองนั้นๆ

- เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซนต์จำนวนยอดที่ยังไม่เหลืองทั้งยอด
- ค่าเฉลี่ยคะแนนความแข็งแรงของยอดจำปีสิรินธร
- ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนตาข้างที่มีการเจริญ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ดีที่สุดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan' s multiple range test เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยอดจำปีสิรินธรเมื่อเวลาผ่านไประหว่างการเก็บรักษา ในการคำนวณใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS version 11

1.2.2 **ทดสอบการรอดชีวิตของยอดจำปีสิรินธรหลังการเก็บรักษาในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ**

นำยอดจำปีสิรินธรจากการทดลองที่พบว่ายอดมีสีเหลืองทั้งยอดเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด จากข้อ 1.2.1 มาเลี้ยงใน regeneration medium ได้แก่ MS ที่มี IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และติดตามบันทึกผลทุก 1 เดือน เป็นเวลานาน 2 เดือน ข้อมูลที่บันทึกมีดังนี้

- เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการเก็บรักษา และย้ายมาเลี้ยงใน regeneration medium
- ค่าเฉลี่ยคะแนนความแข็งแรงของยอดจำปีสิรินธร
- ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนตาข้างที่มีการเจริญ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนราก

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan' s multiple range test เพื่อดูการฟื้นตัวและกลับมาเจริญใหม่ของยอดจำปีสิรินธรที่นำมาเลี้ยงใน regeneration medium เป็นเวลา 2 เดือน ในการคำนวณใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS version 11

1.3 **ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญเติบโต**

1.3.1 **เก็บรักษายอดจำปีสิรินธรบนอาหารที่มี** paclobutrazol 3 **ระดับ ได้แก่** 0, **10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร**

โดยใช้ผลการทดลองที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.2 มาใช้ในการทดลองที่ 1.3 บันทึกผลการทดลองทุกเดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่จนกว่าจะพบว่ายอดจำปีสิรินธรมีสีเหลืองทั้งยอดเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดในการทดลอง นั้นๆ ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

- ระยะเวลา (จำนวนเดือน) ที่เก็บรักษาจนพบว่ายอดจำปีสิรินธรเหลืองเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดในการทดลองนั้นๆ
- เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซนต์จำนวนยอดที่ยังไม่เหลืองทั้งยอด
- ค่าเฉลี่ยคะแนนความแข็งแรงของยอดจำปีสิรินธร
- ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนตาข้างที่มีการเจริญ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ดีที่สุดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan' s multiple range test เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยอดจำปีสิรินธรเมื่อเวลาผ่านไประหว่างการเก็บรักษา ในการคำนวณใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS version 11

1.3.2 **ทดสอบการรอดชีวิตของยอดจำปีสิรินธรหลังการเก็บรักษาในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญการเจริญต่าง ๆ**

นำยอดจำปีสิรินธรจากการทดลองที่พบว่ายอดมีสีเหลืองทั้งยอดเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด จากข้อ 1.3.1 มาเลี้ยงใน regeneration medium ได้แก่ MS ที่มี IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และติดตามบันทึกผลทุก 1 เดือน เป็นเวลานาน 2 เดือน ข้อมูลที่บันทึกมีดังนี้

- เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการเก็บรักษา และย้ายมาเลี้ยงใน regeneration medium
- ค่าเฉลี่ยคะแนนความแข็งแรงของยอดจำปีสิรินธร
- ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบ

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนตาข้างที่มีการเจริญ
- ค่าเฉลี่ยของจำนวนราก

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan' s multiple range test เพื่อดูการฟื้นตัวและกลับมาเจริญใหม่ของยอดจำปีสิรินธรที่นำมาเลี้ยงใน regeneration medium เป็นเวลา 2 เดือน ในการคำนวณใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS version 11

2. **ศึกษาการเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในหลอดทดลองระยะยาวในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) โดยวิธี encapsulation-vitrification**

เพิ่มปริมาณยอดจำปีสิรินธรในสภาพปลอดเชื้อโดยนำปลายยอดจำปีสิรินธรที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol.m.^{-2}s^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณไม่น้อยกว่า 700 ยอด ให้เพียงพอต่อขั้นตอนที่ 2.1

2.1 **ทำการทดลองเพื่อศึกษาหาระดับอุณหภูมิ และระยะเวลา ที่เหมาะสมในขั้นตอนต่างๆ ของการเตรียมความพร้อมปลายยอดจำปีสิรินธร ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification (Sakai, 2000)**

โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD อย่างน้อย 3 ซ้ำๆ ละ 10 ชิ้น ใช้ปลายยอดขนาด 2.0-3.0 มิลลิเมตร นำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมความพร้อม (ภาพที่ 1) ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส ดังนี้

2.1.1 ในขั้นตอนการทำ preculture (ตารางผนวก ก) นำปลายยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 0.3 M sucrose (Sakai *et al.*, 2000) เลี้ยงในจานแก้ว (90 mm. x 20 mm.) มาทำ cold hardening ใน growth chamber เปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส กับชุดควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol.m.^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 2 วัน

2.1.2 จากนั้นนำปลายยอดมาทำ encapsulation โดยใส่ลงในสารละลาย 3 % Na-alginate (ตารางผนวก ก และข) แล้วคนให้เข้ากัน ใช้ ปิเปตหรือ หลอดหยด ดูดสารละลาย 3 % Na-alginate ให้มีชิ้นส่วนของพืชติดเข้าไปด้วย แล้วหยดลงในสารลาย 0.1 M $CaCl_2$ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 หลังจากนั้น ย้าย beads ที่มีปลายยอดมาแช่ใน osmoprotective solution (ตารางผนวก ก และข) (Sakai *et al.*, 1991) ตั้งไว้ที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 60 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่ 0, 60 และ 90 นาที

2.1.4 ย้าย beads ที่มีปลายยอดมาแช่ใน plant vitrification solution (PVS_2) (ตารางผนวก ก และข) (Sakai *et al.*, 1991) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่เป็นเวลา 0, 60 และ120 นาที

รวมทั้งหมด 18 การทดลอง ทั้งนี้ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนทั้งหมดทุกการทดลองก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลวโดยนำมาเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อหาการทดลองที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดในการทดลองนั้นๆ มาทดลองในข้อ 2.2

2.2 ทดลองเตรียมปลายยอดจำปีสิรินธรเพื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว encapsulation-vitrification ที่เหมาะสม

จากข้อ 2.1 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้น บรรจุ beads ลงใน cryotube ที่มีสารละลาย PVS_2 นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน สามารถหยุดขบวนการ metabolism ต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้เหมือนเก็บเป็นเวลานาน 1 ปี (Sakai, 2000) หลังจากนั้นดำเนินการหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดังนี้

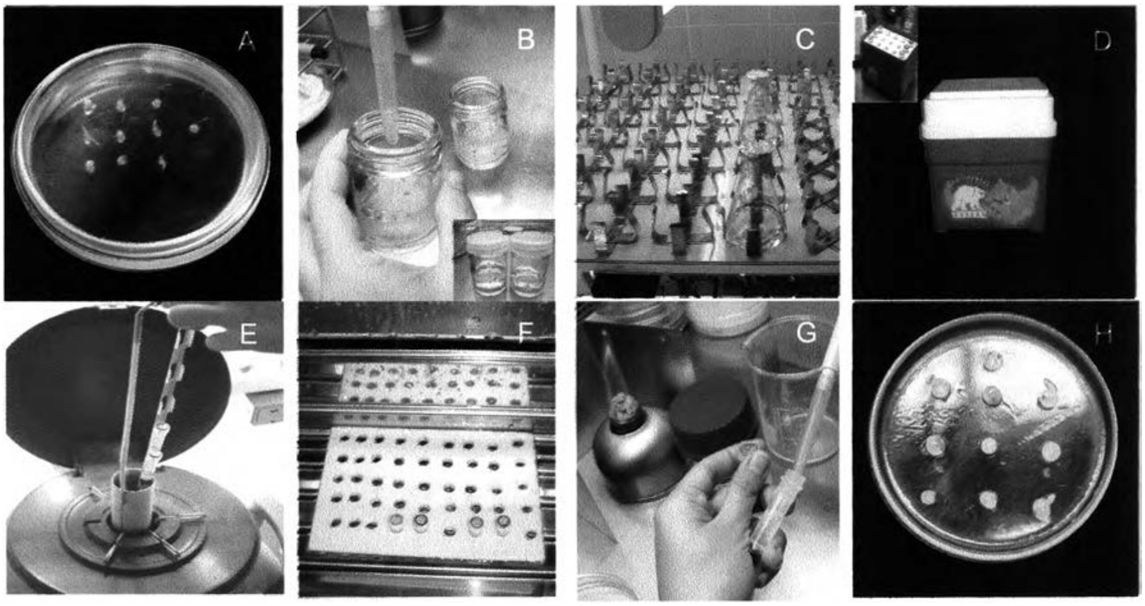
2.2.1 นำ cryotube ที่บรรจุ beads ที่มีปลายยอดมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่น อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส 2 นาที

2.2.2 เทสารละลาย PVS_2 ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 1.2 M sucrose (Sakai *et al.*, 1991) แช่ปลายยอดนาน 20 นาที

2.2.3 ย้าย beads มา เลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน

2.2.4 หลังจากนั้นย้าย beads เลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

2.2.5 หลังจากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 1 เดือน เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้น



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธรในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-vitrification

A: เตรียมปลายยอดขนาด 2.0-3.0 มิลลิเมตร เพื่อทำการ preculture บนอาหารสูตร MS ที่มี 0.3 M sucrose

B: นำปลายยอดมาทำ encapsulation โดยใส่ลงในสารละลาย 3 % Na-alginate แช่ในสารลาย 0.1 M $CaCl_2$ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส

C: ย้าย beads ที่มีปลายยอดมาแช่ใน osmoprotective solution (Sakai *et al.*, 1991) ตั้งไว้ที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 60 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

D: ย้าย beads ที่มีปลายยอดมาแช่ใน plant vitrification solution (PVS_2) (Sakai *et al.*, 1991) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

E: เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

F: นำ cryotube ที่บรรจุ beads ที่มีปลายยอดมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่น อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

G: เทสารละลาย PVS_2 ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 1.2 M sucrose (Sakai *et al.*, 1991) แช่ปลายยอดนาน 20 นาที

H: ย้าย beads มา เลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นย้าย beads เลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน และชักนำให้ปลายยอดเป็นต้นบนอาหาร MS ร่วมกับ BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 1 เดือน