สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เทคนิคการขยายพันธุ์ต้นไม้กันยุงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นาย ศิริพันธ์ วัชราพฤกษ์
นาย สุธรรม คงทอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2539

ปพ.
ต.ส.165 ท
2539
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....28153
วัน, เดือน, ปี.....17 ก.ค. 2540

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Propagation Technique of Mozzie Buster by Tissue Culture.

Mr. Siripan Watcharapluk
Mr. Sutham Kongtong

A Special Project Submitted in Partial Fulfilment of the Requirement for the
Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang
1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การขยายพันธุ์ต้นไม้กันยุงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย นาย ศิริพันธ์ วัชราพฤกษ์ รหัสประจำตัว 36054345

นาย สุธรรม คงทอง รหัสประจำตัว 36054350

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัตินับโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาควิชา

.....
(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์) ประธานกรรมการ

.....
(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม) กรรมการ

.....
(อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การขยายพันธุ์ต้นไม้กันยุงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
นักศึกษา นายศิริพันธ์ วัชราพฤกษ์
นายสุธรรม คงทอง
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

บทคัดย่อ

การศึกษาการขยายพันธุ์ต้นไม้กันยุง (Mozzie buster) จากวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรของ Murashige and Skoog, 1962 (MS) ที่มีการเติมฮอร์โมน N^6-benzyladenine (BA) ในระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงว่าเนื้อเยื่อบริเวณส่วนปลายยอด จะเริ่มแตกเป็นยอดได้ในระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ และมีจำนวนยอดมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้ 87.5 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยอดทั้งหมดที่ทำการทดลอง

หลังจากนั้นทำการย้ายลงไปเลี้ยงลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน Indolebutylic acid (IBA) เพื่อชักนำให้เกิดราก อัตราเกิดรากดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของ IBA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดรากได้ 83.5 เปอร์เซ็นต์ของรากที่ใช้ในการทดลอง และในยอดที่อายุ 4 สัปดาห์จะชักนำให้เกิดรากได้มากสุด หลังจากเป็นต้นไม้กันยุงที่สมบูรณ์แล้วทำการย้ายลงแปลงเพาะเลี้ยงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Propagation Technique of Mozzie Buster by Tissue Culture.
Name	Mr. Siripan Watcharapluk
	Mr. Sutham Kongtong
Special Project Advisor	Asst. Prof. Nauvarat Panyam
Department	Applied Biology
Academic Year	1996

Abstract

The propagation of Mozzie Buster by Tissue Culture in synthetic mediums of Murashige and Skoog, (MS.1962) supply by homone N^6-benzyladenine (BA) with concentration 0,1,2 and 3 mg/l respectively. The best concentration for shoot's regeneration was 2 mg/l. to be produce shoot in 87.5% of all treatment shoots . After that the best concentration of homone Indolebutylic acid (IBA) for inducing roots was 3 mg/l. about 83.5% of initial roots and the age of shoots are 4 weeks.

When complete plants occured in these media, may be transfered in field.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นมาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณบุคคลต่างๆที่ได้ให้การช่วยเหลือให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ดังรายนามต่อไปนี้

1. ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม อาจารย์ที่ปรึกษาที่ควบคุมโครงงาน ได้ข้อคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ทั้งทางด้านทฤษฎีและปฏิบัติมาโดยตลอด
2. อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ
3. พี่ๆปริญญาโทที่ช่วยเหลือด้านข้อมูลต่างๆ
4. เจ้าหน้าที่ของภาคทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือด้านวัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี
5. เพื่อนนักศึกษาทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการช่วยล้างขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่2 การตรวจเอกสาร	3
ประวัติและวิวัฒนาการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	3
ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	4
การเตรียมและส่วนประกอบของอาหารที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	5
แนวทางการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	7
บทที่3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	11
บทที่4 ผลการทดลองและวิจารณ์	16
บทที่5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	
ก. สูตรอาหารMS	39
ข. วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่1 แสดงตัวทำละลายและการเก็บรักษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พืชบางชนิด 6

ตารางที่2 แสดงความสูงของยอดของต้นไม้กันยุงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้ฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร 16

ตารางที่3 แสดงจำนวนยอดของต้นไม้กันยุงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ใน 4 สัปดาห์เมื่อใช้ฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร 17

ตารางที่4 แสดงจำนวนยอดของต้นไม้กันยุงเฉลี่ยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้ฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 18

ตารางที่5 แสดงอัตราการเกิดรากในเวลา 4 สัปดาห์จากการใช้ยอดที่ระดับอายุต่างๆ 18

ตารางที่6 แสดงอัตราการเจริญของรากที่เวลาต่างๆเ มื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้ฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร 19

ตารางที่7 แสดงอัตราการเจริญของรากของต้นไม้กันยุง เ มื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้ฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตรในเวลา 8 สัปดาห์ 20

ตารางที่8 แสดงสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่1 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฮอร์โมน BA กับความสูงของยอดที่ระยะเวลาต่างๆ 21
รูปที่2 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนยอดของต้นไม้กันยุงในฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 22
รูปที่3 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยของต้นไม้กันยุงในฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 23
รูปที่4 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น BA ต่างๆ 24
รูปที่5 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเกิดรากคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการใช้ยอดที่ระดับอายุต่างๆ 25
รูปที่6 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุต้นตอของต้นไม้กันยุงกับอัตราการเกิดรากเฉลี่ย 26
รูปที่7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระยะเวลากับอัตราการเจริญของราก 27
รูปที่8 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเกิดรากเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 28
รูปที่9 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเจริญของรากในฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 29
รูปที่10 แสดงต้นไม้กันยุงที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 30
รูปที่11 แสดงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่ย้ายลงขวดเพาะเลี้ยง 31
รูปที่12 แสดงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเพาะเลี้ยง 32
รูปที่13 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสจากฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 2 สัปดาห์ 33
รูปที่14 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสจากฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์ 34
รูปที่15 แสดงการเกิดรากจากฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์ 35
รูปที่16 แสดงต้นไม้กันยุงที่เป็นต้นสมบูรณ์ 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ปัญหาของภูมิภาคเขตร้อนที่น่ากลัวและอันตรายมาก คือ เรื่องโรคที่เกิดจากแมลง แมลงส่วนใหญ่ที่ก่อปัญหามากมายให้กับมนุษย์ สามารถทำร้ายหรือสร้างความเจ็บป่วยถึงขนาดเสียชีวิตได้นั้นก็คือยุง

ในอดีตคนไทยก็เคยทนทุกข์ทรมานจากโรคมาลาเรีย โรคเท้าช้าง โรคผิวหนังที่เกิดจากยุงกัด รวมทั้งโรคไข้เลือดออก แต่เพราะวิทยาการทางการแพทย์เจริญก้าวหน้าขึ้น โรคต่างๆที่เกิดจากยุงจึงลดน้อยลง แต่ยุงก็ยังคงก่อปัญหา สร้างความรำคาญกับมนุษย์ได้ต่อไป ปัญหาต่างๆเหล่านี้เราสามารถป้องกันได้ โดยการกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุง หรือโดยการฉีด สารเคมีที่เราเรียกกันสั้นๆ ว่า ดีดีที ในปัจจุบันสารเคมีป้องกันและกำจัดยุงมียอดจำหน่ายในประเทศเขตร้อนโดยเฉพาะประเทศไทยปีละหลายพันล้านบาท แต่ละชนิดก็ล้วนเป็นสารอันตรายที่มีผลทำให้มนุษย์ได้รับอันตรายไปด้วย ซึ่งสารดีดีทีนี้เองเป็นตัวที่สร้างปัญหามลพิษให้กับสิ่งแวดล้อมเพราะ ดีดีทีเป็นสารพิษที่ตกค้างในน้ำ และในดินยาวนานมาก

ปัจจุบันนี้เรายังมีวิธีป้องกันใหม่นอกเหนือจากการใช้สารเคมีฉีดไล่ยุง นั่นก็คือ การปลูกต้นไม้ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติไล่ยุงได้ ต้นไม้นี้คือ ต้นไม้กันยุง หรือ ภาษาอังกฤษ เรียกว่า ต้นมอสซี่บัสเตอร์ (Mozzie buster) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Cymbopogon nardus ชื่อสามัญ Citronella grass ซึ่งเป็นต้นที่เกิดจากการผสมระหว่างไม้ตระกูลจิเรเนียมแอฟริกัน (AFRICAN GERANIUM) และต้นไม้ตระกูลตะไคร้หอมของจีน (CITRONELLA GRASS OF CHINA) เนื่องจากสารที่สกัดได้จากตะไคร้หอมมีคุณสมบัติใน การต่อต้านยุง คุณลักษณะที่ดีอีกอย่างหนึ่งของต้นกันยุงนี้ก็คือสามารถนำมาใช้ประดับตกแต่งอาคารบ้านเรือนได้ การค้นคว้าเริ่มต้นมาจากที่สหรัฐอเมริกาเป็นประเทศแรกต่อมา แพร่หลายที่ญี่ปุ่น สิงคโปร์ และประเทศเพื่อนบ้านเรา คือ มาเลเซีย ก็มีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์กันจนเป็นธุรกิจ

สำหรับในประเทศไทยเราตอนนี้พบว่าต้นมอสซี่ บัสเตอร์ จะมีราคาที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องจากว่ายังต้องมีการนำเข้ามาจากต่างประเทศ หากมีสามารถขยายพันธุ์ได้ในประเทศไทยเราเอง โดยไม่ต้องนำเข้ามาก็จะทำให้มีราคาที่ถูกลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อทำการขยายพันธุ์ต้นไม้กันยุงให้ได้จำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของฮอร์โมนต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของต้นไม้กันยุง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตต้นได้เป็นจำนวนมากจากการขยายพันธุ์ต้นไม้กันยุงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ทำให้สามารถเลือกความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการเกิดต้นกล้าได้มากที่สุดเพื่อประโยชน์ ในการขยายพันธุ์
3. ช่วยรักษาสิ่งแวดล้อม จากการลดการใช้สารเคมีลง
4. ลดการขาดดุลทางการค้ากับต่างประเทศที่ต้องสั่งซื้อสารเคมีมากำจัดยุง
5. สามารถนำมาใช้ประดับตกแต่งสถานที่ให้สวยงามได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ประวัติและวิวัฒนาการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ทำกันมานานแล้ว ตั้งแต่ Haberlandt (1902) ซึ่งเป็นคนแรกที่ได้นำเอาใบพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เนื่องจากเขาคิดว่าเนื้อเยื่อพืชที่ประกอบด้วยเซลล์เหล่านี้น่าจะนำมาเลี้ยงให้มีชีวิตรอด และสามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ ถึงแม้ว่า Haberlandt จะทำไม่สำเร็จเนื่องจากใช้เซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งเพาะเลี้ยงยาก และในสมัยนั้นยังไม่มีการค้นพบหรือรู้จักสารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulator) แต่แนวความคิดของเขาก็ได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านค้นคว้าและก็ประสบผลสำเร็จ การทดลองในระยะแรกส่วนใหญ่นั้น ทำได้เพียงให้เนื้อเยื่อพืชมีชีวิตรอดอยู่ได้ในอาหารสังเคราะห์ จนกระทั่ง White (1934) ได้ค้นพบสูตรอาหารใหม่ คือ อาหารที่มีองค์ประกอบของเกลือแร่ น้ำตาลที่สกัดจากอ้อย (น้ำตาลซูโครส) และยีสต์สกัด (yeast extract) เลี้ยงรากมะเขือเทศให้มีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยรากมีการเจริญเติบโตได้เรื่อยๆไม่มีที่สิ้นสุด และต่อมาเขาก็สามารถเลี้ยงรากยาสูบได้สำเร็จ และต่อนอกจากนี้ยังมีนักวิทยาศาสตร์คิดสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน เพื่อเลี้ยงพืชให้เฉพาะเจาะจงยิ่งขึ้น เช่น สูตรอาหารเลี้ยงกล้วยไม้ของ Knudson C (1946) และ Vacin and Went (1949)

นอกจากนี้ Skoog และ Miller (1957) ยังพบว่า การพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นหรือรากขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของสารเร่งการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน (auxins) และ ไซโตไคนิน (cytokinins) โดยพบว่า ถ้าอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินสูงกว่าอัตราสมดุลย์แล้ว เนื้อเยื่อพืชจะเจริญไปเป็นแคลลัส (callus) และราก แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำกว่าอัตราสมดุลย์เนื้อเยื่อพืชจะเจริญเป็นยอด ถ้าอัตราส่วนของสารทั้งสองกลุ่มนี้สมดุลย์ เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอดและราก ผลจากการค้นคว้าเรื่องสารเร่งการเจริญเติบโตนี้ ทำให้ความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแผ่กระจายกว้างขวางยิ่งขึ้น

ต่อมา Murashige และ Skoog (1962) ได้ศึกษาและปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น คือมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชในอัตราที่สูงขึ้น ทั้งสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ เพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ และสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog นี้ ยังสามารถนำไปใช้กับพืชอื่นๆได้อีกหลายชนิดด้วยกัน การเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ประสบผลสำเร็จเรื่อยมาและก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กล่าวได้เป็นข้อๆดังนี้

1. เพื่อการผลิตต้นพืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยสูตรอาหารที่สามารถ เ พิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ

2. เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการผลิตพืชก็คือ โรค ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อและราเป็นอันดับแรก เพราะหากมีอนุภาคของเชื้อเหล่านี้ตกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก็จะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) เพราะทั้งเชื้อราและแบคทีเรียจะสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร ปรากฏเป็นกลุ่มโคโลนีที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เราจึงสามารถขจัดออกได้ ส่วนกรณีของเชื้อไวรัสไม่มีทางแก้ไขได้ นอกจากจะกำจัดหรือทำลายทิ้งเท่านั้น ฉะนั้นก่อนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องมีการคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อ จนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อไวรัส ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ epical meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และส่วนของเนื้อเยื่อคัพภะ (embryo) ที่อยู่ในเมล็ด อันเนื่องมาจากอนุภาคไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหาร และท่อน้ำ แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีมีท่อน้ำ และท่ออาหารที่ติดกับส่วนอื่นๆของลำต้น

3. เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA recombination) และการย้ายยีน (gene transformation)

4. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant) เราสามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่างๆ เช่น การสร้างสายพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช

5. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เราสามารถที่จะคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาพแวดล้อม เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง

6. เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดมีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม แต่ในบางครั้งเนื้อสารที่ต้องการมีน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากในการสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อเหล่านั้น ในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดสารสังเคราะห์ที่เราต้องการได้มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช ต้นพืชที่เรานำมาเลี้ยงในหลอดทดลองจะสามารถติดตามการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและอย่างใกล้ชิด เช่น การศึกษาการตอบสนองของพืชต่อยาฆ่าแมลง

8. เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช เราสามารถเก็บพืชที่หายากและกำลังใกล้จะสูญพันธุ์ได้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมในการชะลอการเจริญเติบโต ทำให้พืชเจริญเติบโตช้าๆ จนกว่าเรามีความต้องการที่จะใช้เนื้อเยื่อลงไปเลี้ยงในอาหารปกติ ยังมีอีกวิธีหนึ่ง คือ การใช้ไนโตรเจนเหลวในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำ -196 องศาเซลเซียส

<u>อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u>

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน ซึ่งเป็นสารประกอบพวกอนินทรีย์ (inorganic compound) และพวกสารประกอบอินทรีย์ (organic compound)

เนื่องจากสารประกอบที่กล่าวมาเป็นสารกลุ่มใหญ่ในที่นี้จะจัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ดังนี้

1. ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (Inorganic compound) ประกอบด้วยธาตุต่างๆ ดังนี้

1.1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (Macro-nutrient) ได้แก่ C,H,N,O,P,K,S.Ca และMg

1.2 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (Micro-nutrient) ได้แก่ Fe,Cl,Mn,Cu.Zn,B และMo

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (Organic compound)

2.1 พวกวิตามิน (Vitamin) วิตามินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น thiamin,nicotinic acid,pyridoxine, inositol,panthothenic acid,biotin,folic acid,choline choride,riboflavin และ ascobic acid

2.2 ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant hormones and plant growth regulators) ได้แก่สารในกลุ่มของพวกออกซิน(Auxin) เช่น indole acitic acid,indole butyric acid,napthaleneacetic acid,2,4-dichlorophanoxyaacetic acid เป็นต้น ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น gibberellic acid,paclobutrazol,abscissic acid,daminozine เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่1 แสดงตัวทำละลายและการเก็บรักษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ตัวทำละลาย	การเก็บรักษา
Auxin	2,4,5-T	50% EtOH	RT
	2,4-D	50% EtOH	RT
	IAA	1 N. NaOH	0° C
	IBA	1 N. NaOH	0-5° C
	NAA	1 N. NaOH	RT
	BAP	1 N. NaOH	RT
Cytokinin	Kinetin	1 N. NaOH	0° C
	Zeatin	1 N. NaOH	0° C
Other plant grown regulators	ABA	1 N. NaOH	0° C
	GA	50% EtOH	RT
	Picloram	0.2 M. KOH	0° C

หมายเหตุ RT = Room temperature
EtOH = Ethanol
N = Normality
M = Molarity

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon source) ได้แก่ สารประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ เช่น glucose,sucrose,fructose,saccharose และ mannitol

2.4 พวกกรดอะมิโน (Amino acid) ได้แก่ glutamin,asparagine,adenine,glycine และ casein hydrolysate เป็นต้น

2.5 พวกสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ซึ่ง ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง สารสกัดจากยีสต์(yeast extract) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับการปรับตัวหลายอย่างให้เหมาะสม ซึ่งแต่ละอย่างมีความแตกต่างกันสำหรับระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้และจุดประสงค์ของการเลี้ยง

จีโนไทป์

ความสามารถของพืชต่างสปีชีร์และต่างพันธุ์จะเกิดต้นและรากใหม่ สภาพการเลี้ยงที่จะทำให้เกิดได้นั้นมีความแปรผันมาก จำเป็นต้องมีการวิจัยเฉพาะแต่ละพืช โดยทั่วไปพืชที่สามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยวิธีธรรมดา ก็จะขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่ายด้วย เช่น ไม้พุ่มเนื้ออ่อน สำหรับไม้เนื้อแข็งออกรากและต้นได้ยากกว่าต้องพัฒนาการเลี้ยงขึ้นมาใหม่และความสำเร็จขึ้นอยู่กับปัจจัยความเยาว์วัยเป็นส่วนมาก ส่วนไม้พุ่มขยายพันธุ์ได้ง่ายไม้ยืนต้น

เมื่อมีหลักและวิธีการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างละเอียดมากขึ้นก็จะทำให้สามารถขยายวิธีการเลี้ยงพืชได้มากชนิดขึ้น แม้ในพืชสปีชีร์เดียวกัน บางพันธุ์ตอบสนองต่อวิธีการเลี้ยงได้ง่ายกว่า เมื่อได้วิธีการเลี้ยงจนได้มาตรฐานแล้วก็จะมีปัญหาในการพัฒนาพันธุ์ที่ปรับตัวได้ดีกว่าจึงต้องมีวิวิฒนาการร่วมระหว่างการปรับปรุงจีโนไทป์กับการปรับปรุงวิธีเลี้ยงขึ้นมาอีก

อิทธิพลของโรค

เชื้อโรคที่อยู่ภายนอก

เชื้อโรคที่อยู่ภายนอก ได้แก่ รา แบคทีเรีย ยีสต์และจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีอยู่ทุกหนทุกแห่งในอากาศ บนผิวของพืช บนโต๊ะ ที่มือ และอื่นๆ สปอร์ของเชื้อเหล่านี้ติดอยู่กับฝุ่นและเคลื่อนที่ไปโดยลม เราอาจฆ่าเชื้อภายนอกของ explant และบริเวณที่จะทำงานเพื่อขจัดเชื้อโรคที่อยู่ตามผิว งานทั้งหมดต้องทำในบริเวณพิเศษซึ่งกำจัดเชื้อออกไปได้หมดและระวังการติดเชื้อซ้ำด้วย การลดจำนวนเชื้อที่ติดอยู่ตามผิวเริ่มจากการควบคุมต้นแม่ที่เป็นที่มาของ explant ปกติเชื้อโรคจะอยู่ตามผิวของส่วนต่างๆของพืชแต่อาจจะอยู่ในรอยแตก อยู่ระหว่างเปลือกที่หุ้มตาและบริเวณอื่นๆที่ค่อนข้างจะปลอดโรคได้ ถ้าพืชเติบโตในบรรยากาศที่ชื้น เส้นใยของเชื้อก็อาจจะเข้าไปในพืชและเป็นปัญหาที่แก้ยาก

การลดจำนวนเชื้อที่ติดอยู่ตามผิวของต้นแม่ ช่วยกำจัดจุลินทรีย์ที่อยู่ข้างในทั่วไปต้นแม่จะเติบโตอยู่ในภาชนะที่ได้รับการปกป้อง เช่น ในโรงกระจก เป็นที่มาของ explant ที่สะอาดกว่าพวกที่เติบโตอยู่กลางแจ้ง ควรหลีกเลี่ยงการให้น้ำจากด้านบนแบบฝนโปรยหรือวิธีใด ๆ ที่เพิ่มความชื้นของอากาศรอบๆต้นพืชและพยายามไม่ให้ส่วนใดๆของพืชอยู่ติดดิน ถ้าเป็นไปได้พยายามไม่ใช้รากหรือส่วนที่อยู่ใต้ดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกำจัดพืชที่อยู่ตามผิวต้องใช่สารเคมีที่เป็นพิษกับจุลินทรีย์แต่ไม่เป็นพิษกับพืช การเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถสำเร็จได้โดยการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อที่อยู่ตามผิวที่ใช้ได้สะดวก และมีประสิทธิภาพ เช่น แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ซึ่งมีจำหน่ายเป็นชื่อทางการค้า

การใส่สารปฏิชีวนะ เช่น สเตรปโตไมซินในอาหารที่ใช้เลี้ยงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ผลสำเร็จต่างกัน

เชื้อโรคที่อยู่ภายใน

ภายในเนื้อเยื่อของ explant ขณะนำไปเลี้ยงอาจมีไวรัสและจุลินทรีย์คล้ายไวรัสแม้จะส่วนปลายสุดของ meristem ก็ไม่ควรคิดว่าส่วนนั้นปลอดโรค ควรใช้วิธีตรวจเชื้อและวิธีอื่นๆร่วมด้วย

เชื้อโรคที่เป็นแบคทีเรีย เช่น *B.Subtilis,Ervinia* และ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ภายในต้นเล็กๆที่เลี้ยงได้แต่ไม่เติบโตในอาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งอาจเป็นเพราะมีความเป็นกรดมากเกินไปหรือไซโตไคนินในอาหารทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโต เชื้อโรคเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและความสามารถในการออกรากหรืออยู่โดยไม่แสดงอิทธิพลใดๆจนกว่าจะย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ วิธีตรวจเลี้ยงเชื้ออาจใช้วิธีกำจัด explant ที่มีเชื้ออยู่ แต่การตรวจในระยะแรกไม่สามารถจำแนกเชื้อได้ทั้งหมดเสมอไป

อิทธิพลของความเยาว์วัย

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชไม้เนื้อแข็งขึ้นอยู่กับความเยาว์วัยของต้นแม่ถ้าจะขยายพันธุ์จากต้นที่โตเต็มที่จะทำได้ยากและต้องใช้วิธีพิเศษ ส่วนมากการทำให้เกิดต้นจำนวนมากทำได้ไม่ยาก ที่ยากคือการทำให้ออกราก วิธีที่ได้ explant ที่มีความเยาว์วัยจากต้นแม่ได้แก่ การเลือกใช้ส่วนโคนของต้นกล้าจากเมล็ด การทำให้เกิด advantitious shoot จากท่อนราก

การย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารใหม่คล้ายจะเป็นกระบวนการทำให้เยาว์วัยซึ่งเพิ่มความสามารถในการออกราก ลักษณะอ่อนวัย ได้แก่ การเปลี่ยนลักษณะสัณฐานของใบและส่วนอื่นๆ ต้นที่ออกรากแล้วจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความเยาว์วัยแน่นอน

การคัดเลือก explant

การคัดเลือก explant ที่เหมาะสมมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การตั้งต้นโปรแกรมของพืชสปีชีร์ใหม่และพันธุ์ใหม่ต้องมีการวิเคราะห์เป็นระบบเพื่อหาความสามารถในการเกิดต้นใหม่จาก explant ที่มาจากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเลี้ยงปลายยอด การเลือกกิ่งที่กำลังเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการเติบโตมักทำสำเร็จมากที่สุด ต้นที่มีการเติบโตลดลงแล้วอาจต้องมีการปรับฮอร์โมนตัวแปรอื่น ได้แก่ ขนาดของ explant การเลือกกิ่งข้างหรือตายอด ความแข็งแรงของกิ่งที่นำมาใช้และสภาพการพัก

อิทธิพลของฮอร์โมนและอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

ควรเลือกหรือกำหนดอาหารพื้นฐานจากการวิเคราะห์เป็นระบบ อาหารมาตรฐานที่ใช้กันมากที่สุด คือ สูตรของ Murashige และ Skoog (MS) แม้ว่าบางครั้งจะใช้กับเนื้อเยื่อแคลลัสของพิธในใบยาสูบ แต่ก็ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเหมาะสมมากกับไม้พุ่มเนื้ออ่อนเกือบทุกชนิดเนื่องจากมีไนโตรเจนเป็นบริมาณสูงทั้งแอมโมเนียและไนเตรต ในทางตรงข้ามกันในไม้เนื้อแข็งต้องลดความเข้มข้นลงทั้งหมดและมีสูตรที่ปรับแล้วหลายสูตร

การขยายพันธุ์เป็นการค้าอย่างจริงจังต้องไม่ปรับเฉพาะสารอินทรีย์ แต่รวมทั้งปัจจัยอื่นๆของอาหารด้วย โดยการทดสอบความเข้มข้นของอาหารแต่ละธาตุรวมกับธาตุอื่นๆหลายๆแบบอย่างเป็นระบบ วิธีที่แนะนำคือ การทดลองแบบกว้างๆ ใช้สูตรรวมที่เป็นไปได้ทุกสูตร หรือทดลองแบบแฟกเทอเรียล โดยทดสอบส่วนประกอบแต่ละอย่างในความเข้มข้นต่างๆกัน (ให้ส่วนประกอบอื่นๆคงที่) เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่เป็นลำดับ การย้ายไปเลี้ยงควรทำระหว่างทุกการทดลองเพื่อให้มีความเสมอภาคกัน

ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง

ก. วุ้น ทำหน้าที่พยุง explant ไว้แต่ให้ผลต่างกันตามแต่ยี่ห้อที่ใช้ และสารอื่นทดแทนได้ สารที่ให้พลังงานที่นิยมใช้กัน คือ น้ำตาลซูโครสเนื่องจากหาง่าย และราคาไม่แพง

ข. ฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต ช่วยให้เจริญเติบโตและมีความสำคัญในการกำหนดการตอบสนองของส่วนที่นำไปขยายพันธุ์ คือ ส่วนของไซโตไคนินกำหนดการเติบโตทางลำต้น เมื่อให้ปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้ยืดตัวมากที่สุด ถ้าเพิ่มปริมาณขึ้นไปอีกจะยับยั้งการข่มของตายอดและกระตุ้นการเกิดยอดทางตาข้างเป็นจำนวนมาก ความต้องการทางไซโตไคนินอาจผันแปรในขั้นตอนต่างๆของการเลี้ยง เช่น มีการเติบโตผันแปรไประหว่างการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่เป็นลำดับ จึงจำเป็นต้องปรับความเข้มข้นใหม่ของไซโตไคนิน ในระยะที่3 ต้องลดปริมาณไซโตไคนินลงหรือไม่ให้เลยเนื่องจากไซโตไคนินจะยับยั้งการเกิดราก

การให้ออกซินช่วยกระตุ้นการเกิดรากแม้ว่าออกซินในระดับต่ำสุดเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจะช่วยกระตุ้นการเกิดรากอย่างไรก็ตาม ต้นที่ตัดมาจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอบสนองต่อออกซินในช่วง 2-3 วัน จึงนิยมจุ่มลงไปในออกซินหรือย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารใหม่มากกว่าให้ออกซินตลอดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. พืชที่นำมาใช้ในการทดลอง

- ต้นไม้กันยุงโดยเนื้อเยื่อบริเวณที่ใช้เป็นส่วนปลายยอด

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตร MS ในภาคผนวก

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

- BA (N^6-benzyladenine)
- IBA (Indolebutyric acid)

2.3 สารอินทรีย์

- น้ำตาลซูโครส

2.4 สารที่ใช้ทำวุ้นแข็งตัว

- วุ้นผง (agar)

2.5 สารเคมีที่ใช้ปรับ pH

- NaOH 0.1 นอร์มอล
- HCl 0.1 นอร์มอล

2.6 สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทำความสะอาดเนื้อเยื่อก่อนย้ายลงขวดเพาะเลี้ยง

- สารละลายคลอรอกซ์
- เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.7 สารฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

- เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อุปกรณ์ที่ใช้

3.1 ประเภทเครื่องแก้ว

- บิกเกอร์ ,ปิเปตต์, ฟลาสก์รูปชมพู่,ฟลาสก์วัดปริมาตร,ขวดสีชา,แท่งแก้วคน, จานเพาะเชื้อ,ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 เครื่องมือต่างๆ

1) เครื่องชั่ง (balance) ทั้ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2) ช้อนตักสาร (spatula)
3) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
4) เตาอุ่นความร้อนและแท่งแม่เหล็ก (hot plate and megnetic stirrer)
5) เตาอบไมโครเวฟ (microwave)
6) ตู้เย็น (refrigerator)
7) เตาอบความร้อน (hot air oven)
8) หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
9) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet)
10) กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
11) ตะเกียงบุนเซ็น
12) มีดผ่าตัดแบบต่างๆ
13) อุปกรณ์ถ่ายภาพ

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งควบคุมการให้แสงที่ความเข้ม 700 ลักซ์ โดยหลอด fluorescent Toshiba FL 40T9W/38 W cool white ช่วงสว่าง 16 ชม. ช่วงมืด 8 ชม.ต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการทดลอง

สามารถแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่1 ศึกษาระดับฮอร์โมน BA ที่เหมาะสมต่อการใช้นำให้เกิดยอดในอาหารสังเคราะห์ สูตร MS โดยวัดจากความสูงและจำนวนที่ระดับฮอร์โมน BA ต่างๆ

ขั้นตอนที่2 ศึกษาอายุต้นตอต้นไม้กันยุงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ด้วยฮอร์โมน IBA

ขั้นตอนที่3 ศึกษาระดับฮอร์โมน IBA ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยวัดจากเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่ระดับฮอร์โมน BA ต่างๆ

ขั้นตอนที่4 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนที่5 สรุปผลการทดลองและนำเสนอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลองโดยละเอียด

ขั้นตอนที่1 การศึกษาระดับฮอร์โมน BA ที่เหมาะสมต่อการใช้นำให้เกิดยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยวัดจากความสูงและจำนวนที่ระดับฮอร์โมน BA ต่างๆ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารแข็งสูตร MS ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละประมาณ 10 มิลลิลิตร ทำการเติมฮอร์โมน BA 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. นำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของต้นไม้กันยุง ทำตามขั้นตอนดังนี้
   - นำอุปกรณ์ที่จะใช้ในการทำการทดลอง ไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
   - แช่เนื้อเยื่อในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาที เติม Tween 20 จำนวน 2-3 หยด
   - เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วนำเนื้อเยื่อมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที
   - ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยตัดเอาบริเวณที่ใสๆ ออก เพราะเป็นส่วนที่สัมผัสกับสารละลายคลอรอกซ์นานเกินไปจนทำให้เซลล์ตาย
   - ตัดแบ่งตัวอย่างออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาวางไว้บนอาหาร
3. นำเนื้อเยื่อย้ายลงสู่ขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. นำขวดอาหารเพาะเลี้ยงไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
5. ตรวจนับและบันทึกผลการทดลองตรวจนับจำนวนที่งอก และความสูงที่ระดับความเข้มข้นของ BA ต่างๆ

ขั้นตอนที่2 ศึกษาอายุต้นตอต้นไม้กันยุงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ด้วยฮอร์โมน IBA

วิธีการทดลอง

1. นำต้นไม้กันยุงที่มีอายุ 4 สัปดาห์ออกจากขวดเพาะเลี้ยง
2. ทำการแยกต้นไม้กันยุงออกเป็นต้นเดี่ยวๆ ย้ายลงเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน IBA ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ
3. นำขวดเพาะเลี้ยงจากข้อ2 ไปพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ทำการทดลองเหมือนกับข้อ1-3 โดยใช้ต้นไม้กันยุงอายุ 6 8 10 และ12 สัปดาห์ ทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ

5. สังเกตและบันทึกจำนวนยอดที่เกิดภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์หลังจากเริ่มการเพาะเลี้ยง

ขั้นตอนที่3 ศึกษาระดับฮอร์โมน IBA ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยวัดจากเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่ระดับฮอร์โมน BA ต่างๆ

วิธีการทดลอง

1. นำขวดเพาะเลี้ยงจากการใช้ต้นไม้กันยุงอายุ 4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงเจริญเป็นรากได้ดีที่สุด (จากการทดลองขั้นตอนที่2) นำมาศึกษาอัตราการเกิดรากที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ

2. ตรวจนับและบันทึกผลการทดลอง สังเกตดูอัตราการเกิดรากที่ต้นตอในระยะเวลาแต่ละสัปดาห์

ขั้นตอนที่4 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิธีการทดลอง

1. เก็บรวบรวมผลการทดลองในขั้นตอนที่1-3 เป็นข้อมูลแบบตัวเลข

2. นำข้อมูลที่เป็นตัวเลขของผลการทดลองที่มีการเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ completely Randomized Design (CRB) และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ค่า The Least Significant Different (LSD)

ขั้นตอนที่5 สรุปผลการทดลองและนำเสนอ

วิธีการทดลอง

1. นำข้อมูลที่วิเคราะห์แล้วทั้งหมดมาอภิปรายและสรุปผล

2. นำเสนอผลงานปัญหาพิเศษแก่คณาจารย์ และนักศึกษาภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมน BA ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยการชักนำให้เกิดยอด

หลังจากการนำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่สมบูรณ์แข็งแรงของต้นไม้กันยุงที่ถูกฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยใช้ฮอร์โมน BA เพื่อชักนำให้เกิดยอด สามารถแสดงอัตราการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BA ต่างๆดังผลการทดลอง

1.1 การเจริญของยอดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของฮอร์โมน BA

ตารางที่2 แสดงความสูงของยอดของต้นไม้กันยุงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยใช้ฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (สัปดาห์)	ความสูงของยอด(ซม.)			
	BA0	BA1	BA2	BA3
1	0	0.3	0.7	0.4
2	0	0.7	1.2	0.8
3	0.1	1.2	1.6	1.3
4	0.2	1.5	2.1	1.7
5	0.2	1.7	2.5	2.2
6	0.2	1.9	3	2.3
7	0.2	2	3.3	2.5
8	0.2	2	3.3	2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

1.2 ศึกษาจำนวนยอดของต้นไม้กันยุงเมื่อใช้ฮอร์โมน BA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่3 แสดงจำนวนยอดของต้นไม้กันยุงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ใน 4 สัปดาห์โดยใช้ฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย					เฉลี่ย**	ระยะเวลาการเกิดยอด (สัปดาห์)
	ชุดที่1	ชุดที่2	ชุดที่3	ชุดที่4	ชุดที่5		
0	0	0	1	0	0	0.4	3
1	4	3	2	1	3	2.6	1
2	5	4	3	4	6	4.4	1
3	4	3	3	2	5	3.4	1

หมายเหตุ

1. CV. (สัมประสิทธิ์ความแปรผัน) = 37.9 เปอร์เซ็นต์

2. ** หมายถึง จำนวนยอดที่เกิดขึ้นที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน BA ต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ = 0.5

ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 0.37

จากค่า LSD ที่ได้ สรุปว่า จำนวนยอดที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะดีที่สุด และมีค่าแตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน BA ที่ 0 1 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28153

1.3 ศึกษาอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยของต้นไม้กันยุงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ใน 4 สัปดาห์ เมื่อใช้ฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่4 แสดงอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น BA ต่างๆ

ความเข้มข้นBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	อัตราการเกิดยอดเฉลี่ย(เปอร์เซ็นต์)
0	40
1	83.3
2	87.5
3	85

2. ศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์สูตร MS

เมื่อทำการชักนำให้เกิดรากแล้วทำการย้ายยอดที่เกิดขึ้นลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน IBA เพื่อชักนำให้เกิดราก แล้วทำการศึกษาประสิทธิภาพการเกิดราก

2.1 การเจริญของรากของต้นไม้กันยุงเมื่อเลือกใช้ยอดอายุต่างๆจากขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอด

ตารางที่5 แสดงอัตราการเกิดรากในเวลา 4 สัปดาห์จากการใช้ยอดที่ระดับอายุต่างๆ

อายุต้นตอ (สัปดาห์)	อัตราการเกิดราก(เปอร์เซ็นต์)					เฉลี่ย**
	ชุดที่1	ชุดที่2	ชุดที่3	ชุดที่4	ชุดที่5	
4	86	85	82	86	89	84.4
6	80	77	82	80	78	74.9
8	75	76	72	68	70	72.2
10	60	60	62	58	57	59.4
12	50	55	50	52	45	50.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

1. CV. (สัมประสิทธิ์ความแปรผัน) = 3.84 เปอร์เซ็นต์

2. ** หมายถึง จำนวนยอดที่เกิดขึ้นที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน BA ต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

3. ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ = 8.057

ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 5.90

จากค่า LSD ที่ได้ สรุปว่า จำนวนรากเฉลี่ยที่ระดับอายุต้นตอของไม้กันยุงที่ 4 สัปดาห์จะดีที่สุดและมีค่าไม่แตกต่างกับอายุต้นตอของไม้กันยุงที่ 6 สัปดาห์แต่จะมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นตอของไม้กันยุงที่ 8 10 และ12 สัปดาห์

2.2 การเจริญของรากของต้นไม้กันยุงเมื่อชักนำให้เกิดรากเมื่อใช้ฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่6 แสดงอัตราการเจริญของรากที่เวลาต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน IBA ระดับความเข้มข้นที่ 0 1 2และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา(สัปดาห์)	อัตราการเจริญของราก (เปอร์เซ็นต์)			
	IBA0	IBA1	IBA2	IBA3
1	0	27	38	52
2	16	40	48	66
3	23	47	57	75
4	30	50	64	80
5	32	53	69	83
6	33	56	71	85
7	33	58	73	86
8	33	58	73	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การศึกษาการเจริญของรากในเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่7 แสดงอัตราการเจริญของรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน IBA ระดับความเข้มข้นที่ 0 1 2และ3 มิลลิกรัมต่อลิตรในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญของราก (เปอร์เซ็นต์)					เฉลี่ย**	ระยะเวลาการเกิดราก (สัปดาห์)
	ชุดที่1	ชุดที่2	ชุดที่3	ชุดที่4	ชุดที่5		
0	27	30	35	33	29	30.8	2
1	54	55	62	58	60	57.8	1
2	71	68	76	70	75	72	1
3	66	80	85	82	85	84.2	1

หมายเหตุ

1. CV. (สัมประสิทธิ์ความแปรผัน) = 51.2 เปอร์เซ็นต์

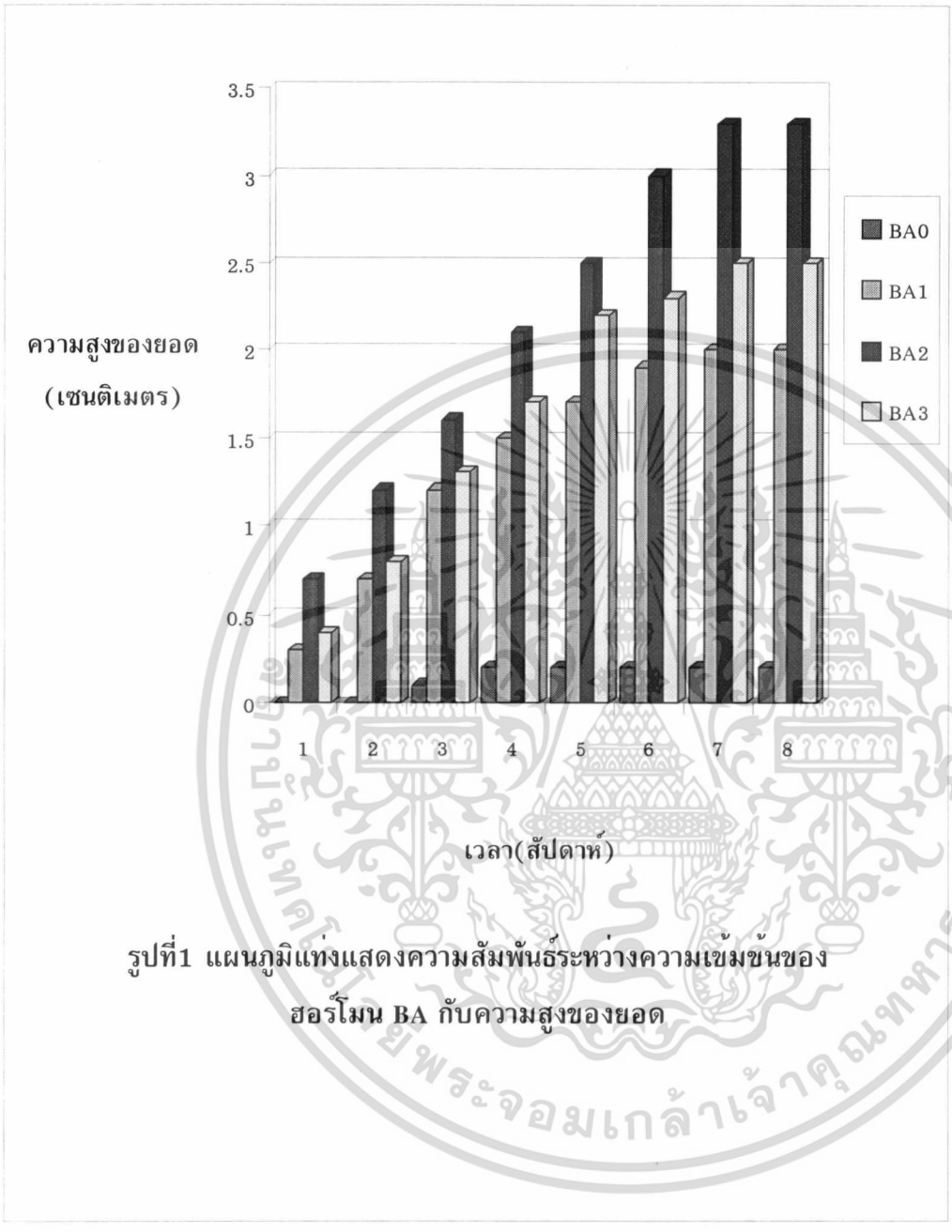
2. ** หมายถึง จำนวนยอดที่เกิดขึ้นที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน IBA ต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

3. ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ = 5.78

ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 4.20

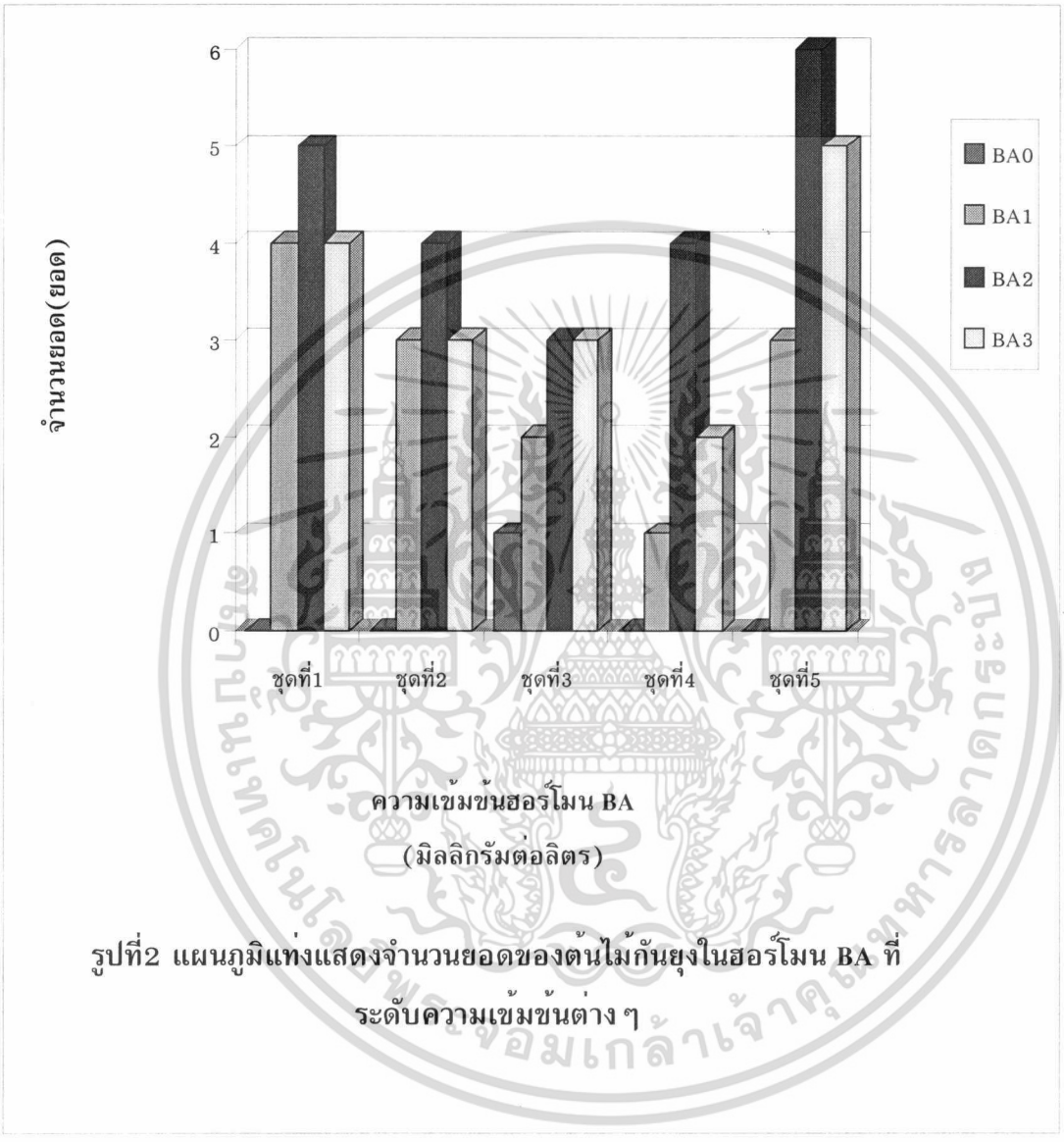
จากค่า LSD ที่ได้ สรุปว่า จำนวนยอดที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน IBA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะดีที่สุด และมีค่าแตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน IBA ที่ 0 1 และ2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



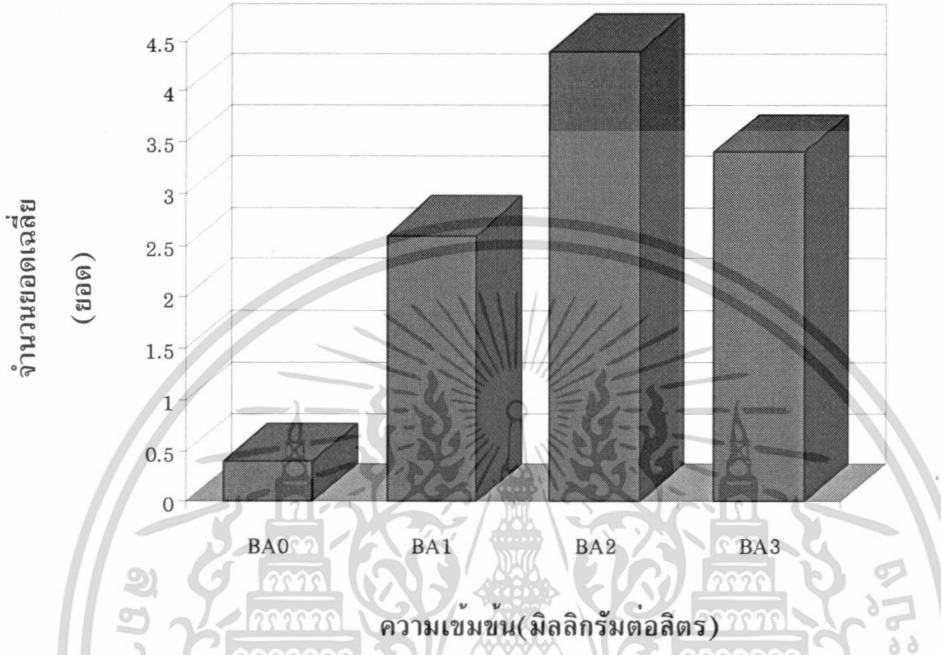
รูปที่1 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฮอร์โมน BA กับความสูงของยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



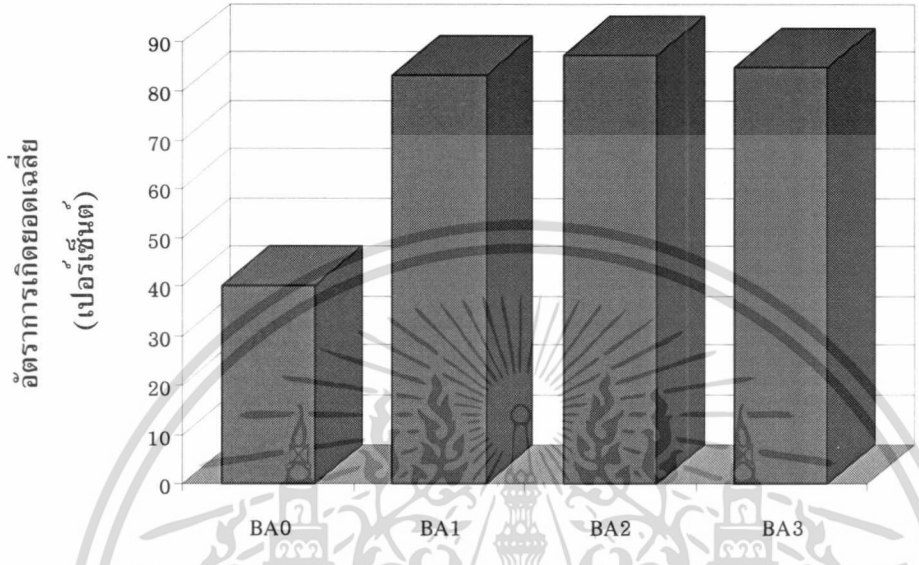
รูปที่2 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนยอดของต้นไม้กันยุงในฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



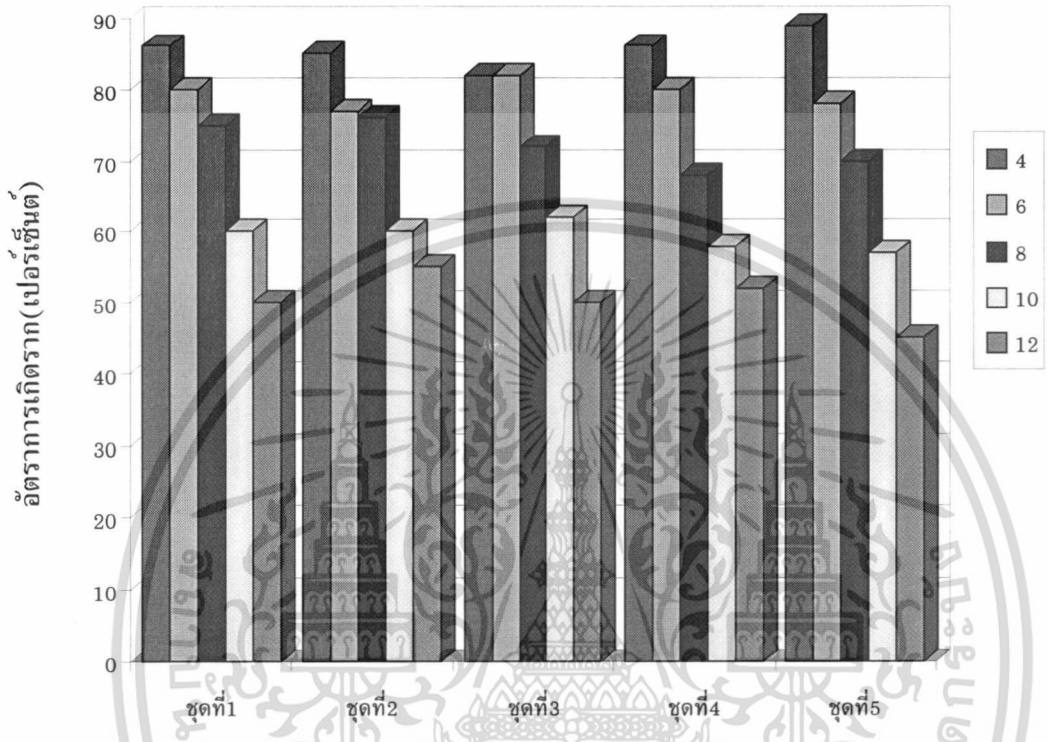
รูปที่3 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยของต้นไม้กันยุงในฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



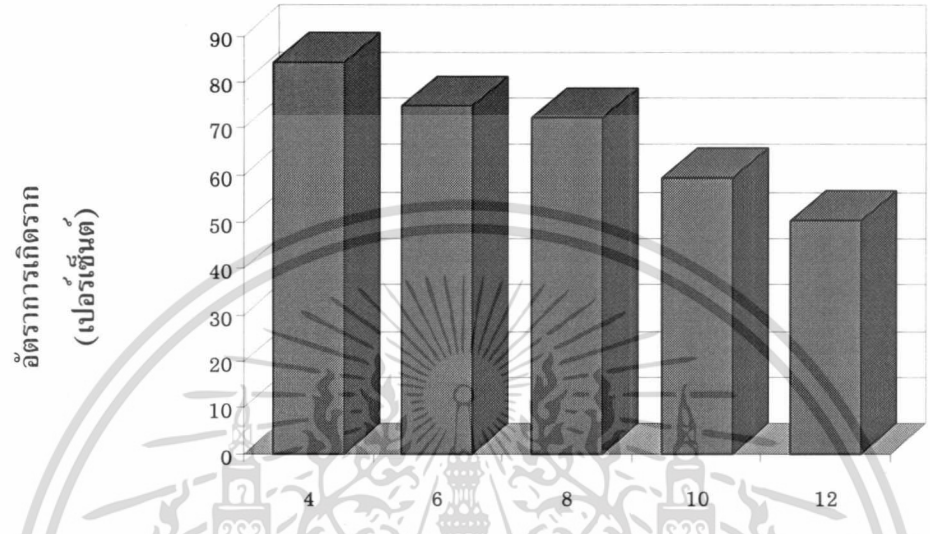
รูปที่4 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น BA ต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



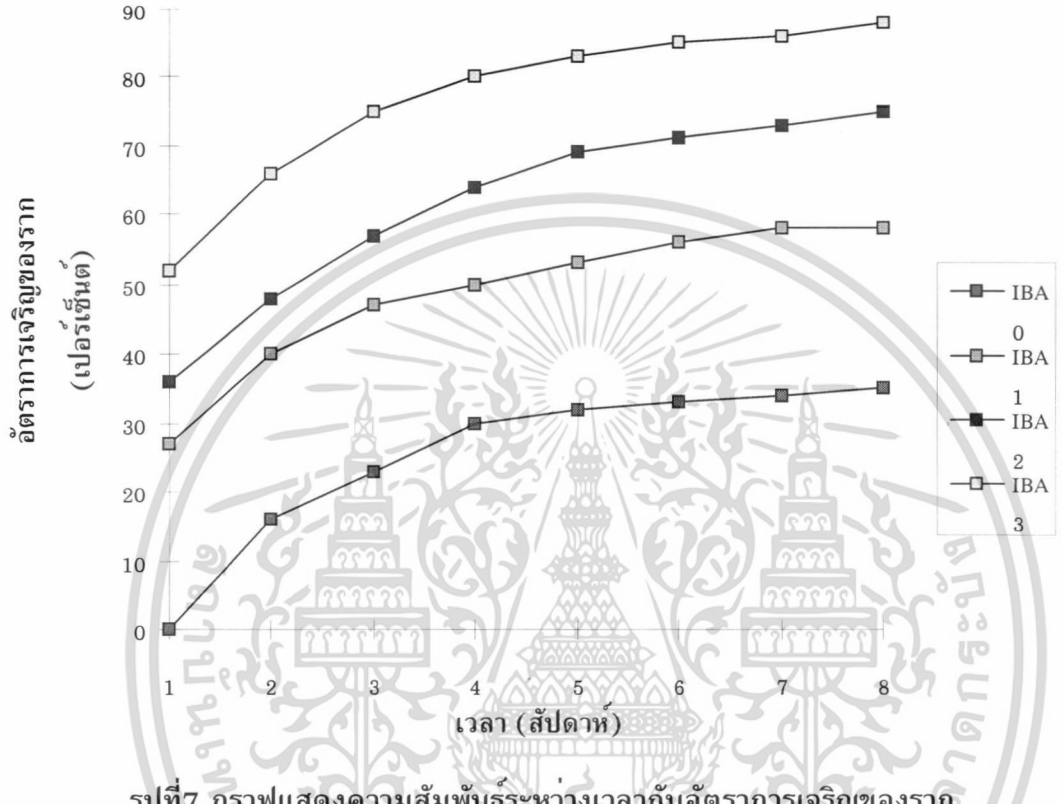
รูปที่5 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเกิดรากคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการใช้ยอดที่ระดับอายุต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



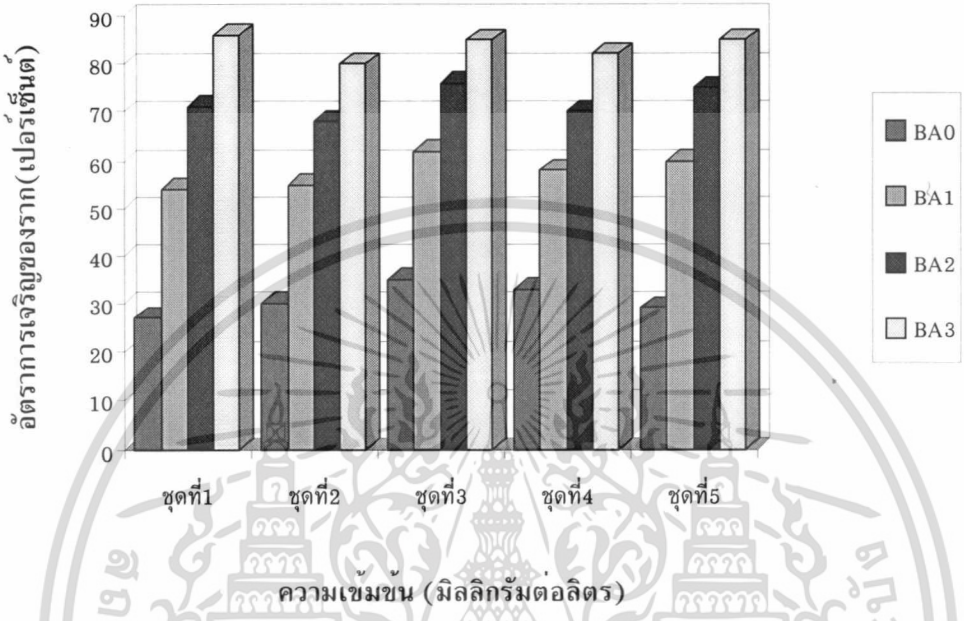
รูปที่6 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุต้นตอของต้นไม้กันยุง กับอัตราการเกิดรากเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



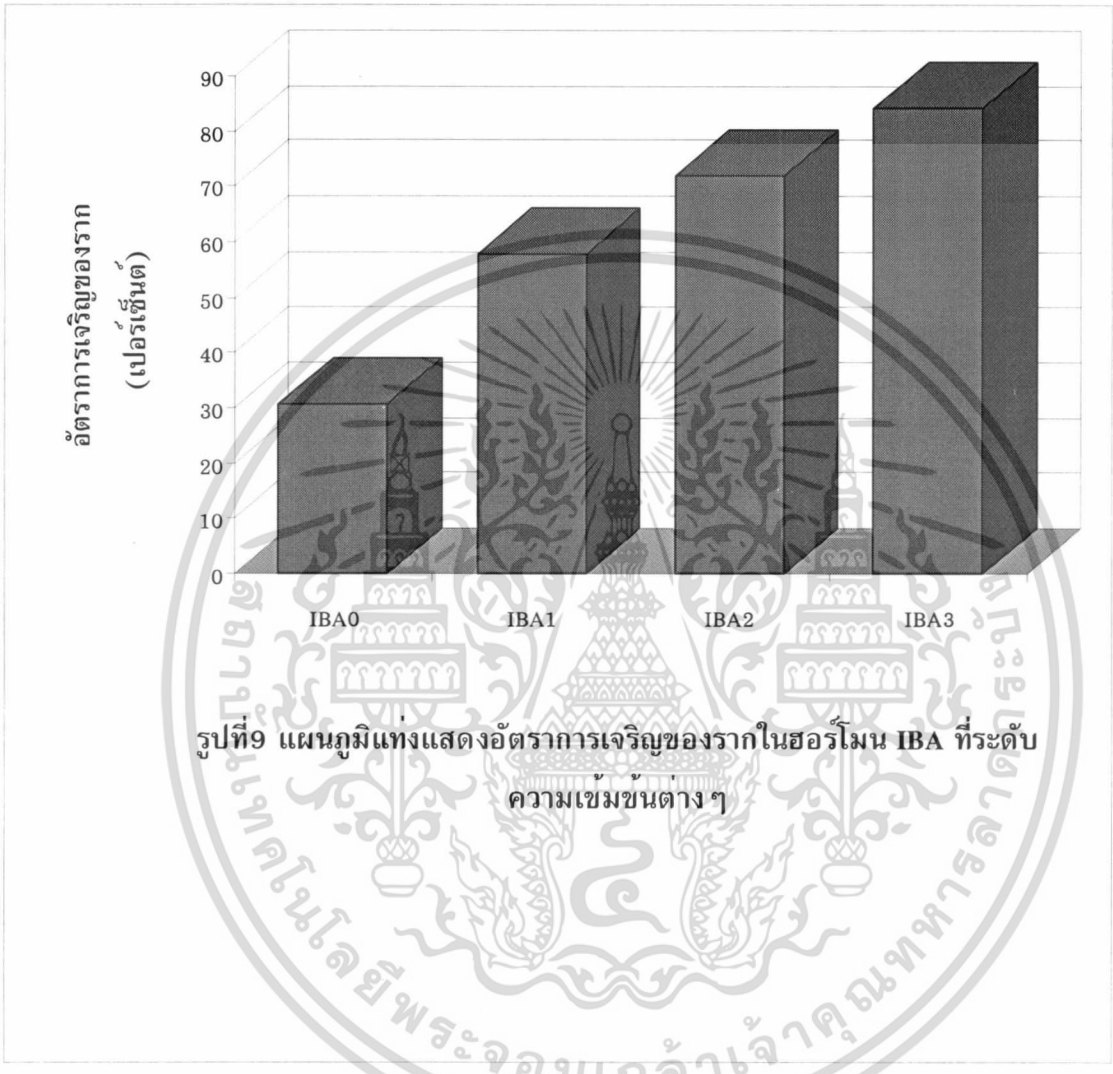
รูปที่7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับอัตราการเจริญของราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่8 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเจริญของรากเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA ที่ระดับต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่9 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเจริญของรากในฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่10 แสดงต้นไม้กันยุงที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่11 แสดงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่ย้ายลงขวดเพาะเลี้ยง

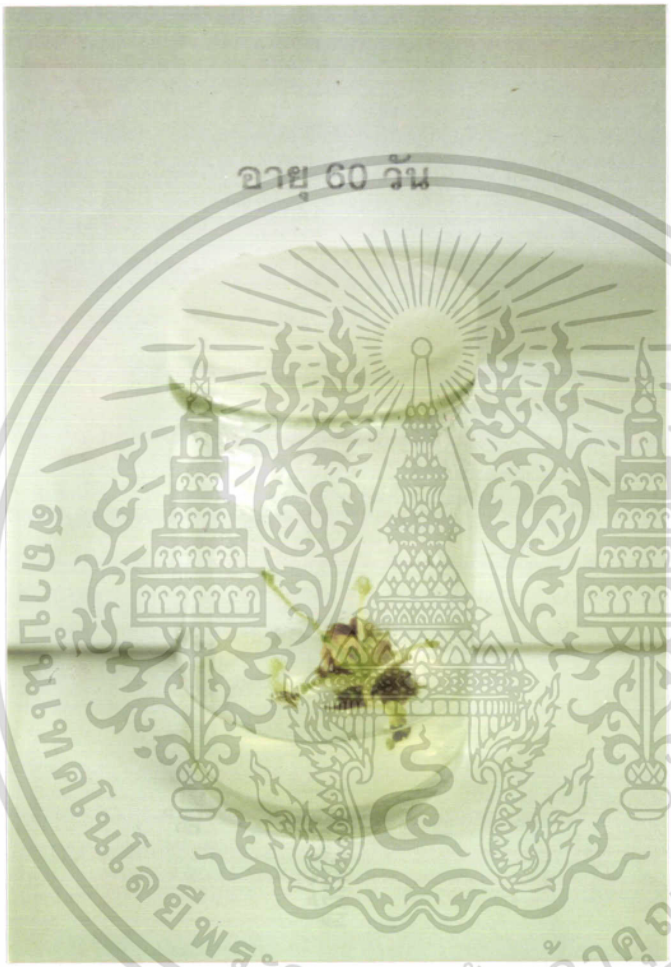
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่12 แสดงขวดเพาะเลี้ยงที่เก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

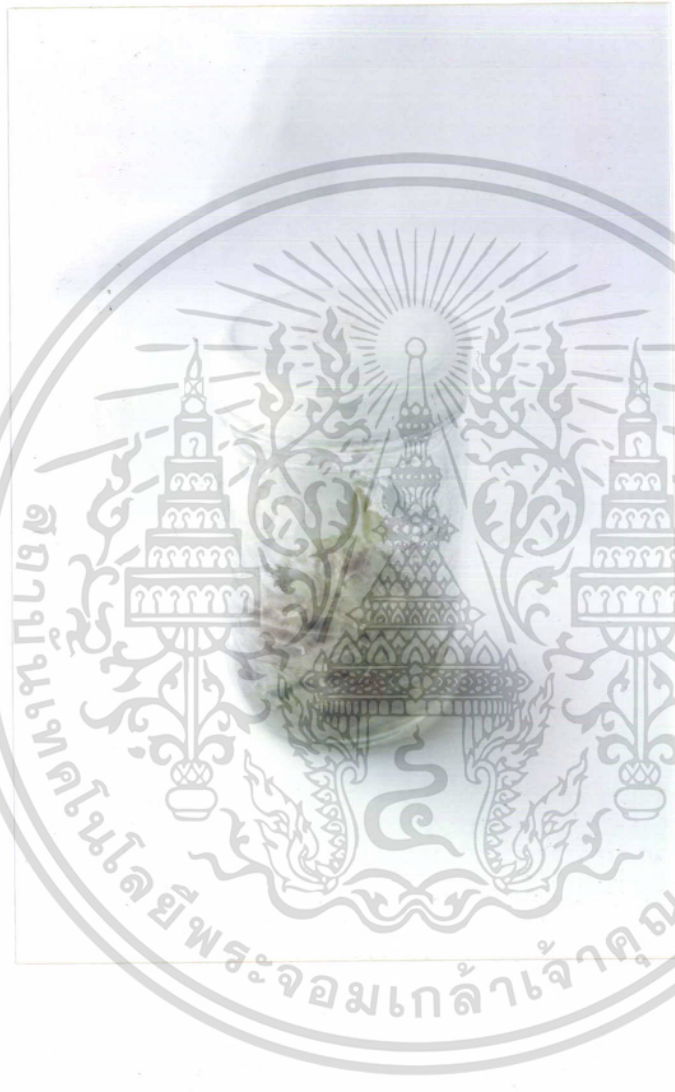
รูปที่13 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสจากฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
อายุ 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



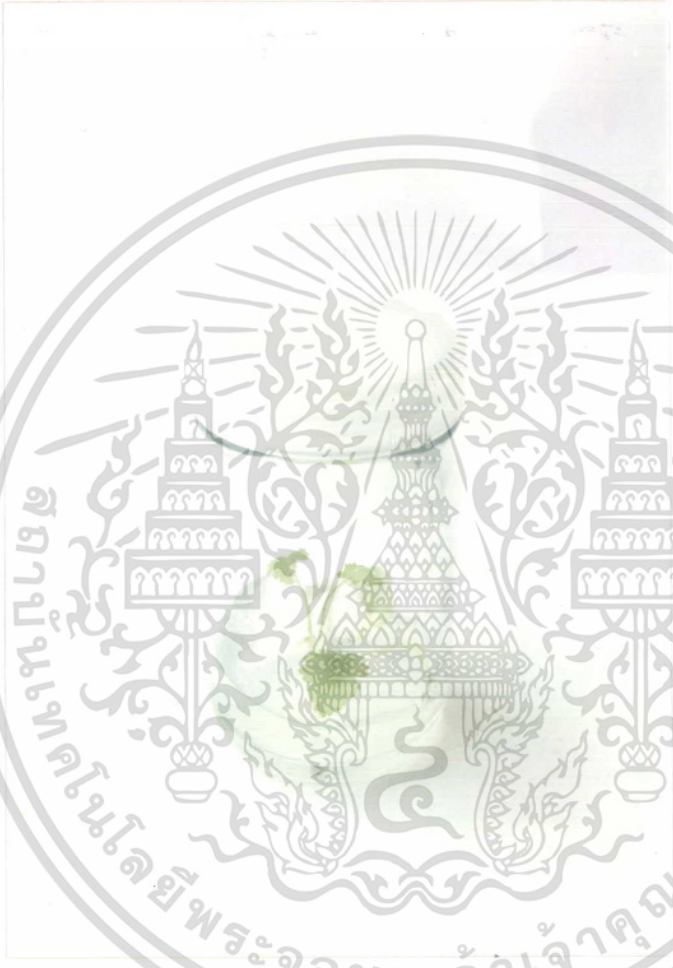
รูปที่14 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสจากฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
อายุ 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่15 แสดงการเกิดรากจากฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่16 แสดงต้นไม้กันยุงที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

การศึกษางานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาถึงปัจจัยของฮอร์โมนที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นไม้กันยุงโดยทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของยอด และอัตราการเจริญของราก โดยอัตราการเจริญของยอดจะทำการศึกษาจากการวัดความสูงและจำนวนยอดที่ระดับฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอัตราการเจริญของรากจะศึกษาโดยวัดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่ระดับฮอร์โมน IBA ที่ความเข้มข้น สามารถทำการพิจารณาแยกได้เป็นดังนี้

1. อิทธิพลของความเข้มข้นของฮอร์โมน BA ในอาหารที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนบริเวณปลายยอด จากการศึกษาพบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน BA ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตโดยวัดจากจำนวนการเกิดยอด คิดเป็น 87.5 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. อิทธิพลของอายุต้นตอต้นไม้กันยุงในขั้นตอนของการชักนำยอด ยอดที่นำมาใช้ชักนำให้เกิดรากอายุ 4 สัปดาห์ จะเหมาะสมมากที่สุดจะเกิดรากประมาณ 84.4 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

3. อิทธิพลของความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA ในอาหารที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยการนำส่วนยอดที่เจริญเติบโตอายุ 4 สัปดาห์มาศึกษา พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน IBA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตโดยและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ วัดจากจำนวนการ เกิดรากสูงสุด คิดเป็น 83.5 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

สรุปได้ว่า ในฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดได้ดีที่สุด และในฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรในอายุต้นตอที่ 4 สัปดาห์ของต้นไม้กันยุงจะสามารถชักนำให้เกิดรากได้ง่ายที่สุด และมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คมสัน จำรูญพงษ์. และวีระศักดิ์ จุลลเกษตร์. 2539. **พืชเพื่อการส่งออก**. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. หน้า4.

ชะอ้อน หิรัญรัตน์. 2523. **การขยายพันธุ์หน้าวัวโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ชุติมา คุณาไทย. 2526. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสี**. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ไพบูล กวินเลิศวัฒนา. **หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** , 2524: 76-78

สุวรรณา ชัยเจริญสุข. 2537. เทคโนโลยีการเกษตร. **เทคโนโลยีชาวบ้าน**. สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพฯ. หน้า54-57.

ภูวดล บุตรรัตน์. "โครงสร้างของเนื้อเยื่อพืช", โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิชย์, 2535: 52-53

Amirato, P.V. et. al. 1984. **Handbook of plant cell culture**. Vol.1 Mc Millan, Newyork. 583p.

_____. 1984. **Handbook of plant cell culture**. Vol.2 Mc Millan, Newyork. 644p.

_____. 1984. **Handbook of plant cell culture**. Vol.3 Mc Millan, Newyork. 620p.

Gamborg, O.L. 1986. **The workshop on tissue culture and protoplast technology**. National center for genetic engineering and biotechnology. Bangkok. Thailand. 45p.

Haberlandt, M.H., **Plant cell culture**. Edward Anold. London. 458p.

Kim, Y.H. 1989. **Origin of somatic embryos in Celery tissue culture**. Hortscience. 24 (4) : 671-673

Miller, A.R. and C.K. Chandler. 1990. **Plant regeneration from excised cotyledon of mature strawberry achenes**. Hortscience. 25 (5) : 569-571.

Murashige T., and Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture**. Physiologia Platurum, 34, 473-497

Vacin, T.H., and Went, D.N. 1949. **Invitro propagation of orchid**. Kluwer Acadamic publishers, Dordrecht. Netherlands. 78-85.

Wetter, L.R. and F. Constable. 1982. **Plant tissue culture methods**. The national research council of Canada. 145p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Media preparation)

สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) หรือสูตร MS โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น ดังตาราง

ตารางที่8 สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962)

stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg.)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ cc / ลิตร
1	NH_4NO_3	82500	50	20
2	KNO_3	95000	50	20
3	H_3BO_3	1240	200	5
	KH_2PO_4	34000	200	
	KI	166	200	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	50	200	
	$CoCl_2.6H_2O$	5	200	
4	$CaCl_2.2H_2O$	88000	200	5
5	$MgSO_4.7H_2O$	74000	200	5
	$MnSO_4.4H_2O$	4450	200	
	$ZnSO_4.7H_2O$	1720	200	
	$CuSO_4.5H_2O$	5	200	
6	Na_2EDTA	7450	200	5
	$FeSO_4.7H_2O$	5570	200	
7	glycine	400	200	5
	nicotinic acid	100	200	
	pyridoxine-HCl	100	200	
	thiamine-HCl	20	200	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 ดูดเอาสารละลายจาก stock ต่างๆมารวมกัน โดยใช้ปริมาณในแต่ละ stock ตามที่ได้คำนวณไว้

ขั้นที่ 2 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) ซึ่งก็คือน้ำตาลนั่นเอง

ขั้นที่ 3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่นๆ

ขั้นที่ 4 ปรับปริมาตรให้ครบตามปริมาณที่ต้องการ

ขั้นที่ 5 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้กรดเกลือ (HCl) และโซดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นบัฟเฟอร์ pH ที่ใช้ปกติอยู่ในช่วง 5.6-5.8

ขั้นที่ 6 เติมวุ้นลงไป

ขั้นที่ 7 เคี่ยวอาหารหลอมวุ้น โดยใช้ไมโครเวฟ (microwave)

ขั้นที่ 8 หยอดอาหารลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยง เช่น ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขั้นที่ 9 นำอาหารที่หยอดแล้วไปเข้าหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ปล่อยอาหารไว้ให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

<u>การเตรียมสารละลายเป็น ppm</u> (part per million)

1 ppm หมายถึง ในปริมาตรสารละลาย 1 ล้านส่วน มีปริมาณเนื้อสารอยู่ 1 ส่วนซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตัวอย่าง ต้องการสารละลาย IAA ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม</u> ใน 1 ppm มีเนื้อสารอยู่ 1 มก./ลิตร

ถ้า 100 ppm มีเนื้อสารอยู่ 100 มก./ลิตร

ต้องการเตรียม IAA ความเข้มข้น 100 มล. จะมีเนื้อสารอยู่ $= \frac{100 \times 100}{1000} =$ 10 มิลลิลิตร

ฉะนั้น จะต้องใช้สารละลาย IAA ปริมาณ 10 มิลลิกรัมในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร

<u>การเตรียมสารละลายเป็นเปอร์เซ็นต์</u>

สารละลายเป็นเปอร์เซ็นต์ หมายถึง ปริมาณส่วนเนื้อในสารละลาย 100 ส่วน

ตัวอย่าง ต้องการเตรียม HCl 10% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม</u> ในสารละลาย 100 มล. มี HCl อยู่ 10 มิลลิลิตร

ในสารละลาย 500 มล. มี HCl อยู่ $= \frac{10 \times 500}{100} =$ 50 มิลลิลิตร

ฉะนั้น จะต้องใช้ HCl ปริมาณ 50 มิลลิลิตรเติมน้ำให้ครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้