สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เทคนิคการขยายพันธุ์ต้นกฤษณา (*Aquilaria sp.*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

น.ส.ยุพาวรรณ พินิจไพฑูรย์
น.ส.ฤดีกานต์ สายโกสินทร์
นายวัฒนา อัจฉริยะโพธา

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

ปพ.
ย 427 ท
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30609
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Propagation Technique of *Aquilaria sp.* by Tissue Culture

Miss Yupawan Pinitpaitoon
Miss Ruedeekan Saikosin
Mr. Wattana Aschariyhaphotha

A Special Project Sunmitted in Partial Fulfulment of the Requirement for the
Degree of Bechelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การขยายพันธุ์ต้นกฤษณาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย น.ส.ยุพาวรรณ พินิจไพฑูรย์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 37054349

น.ส.ฤดีกานต์ สายโกสินทร์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 37054353

นายวัฒนา อัจฉริยะโพธา นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 37054355

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

(อ.อารี ฤทธิบูรณ์) ประธานกรรมการ

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม) กรรมการ

(อ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การขยายพันธุ์ต้นกฤษณาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย น.ส.ยุพาวรรณ พินิจไพฑูรย์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 37054349

น.ส.ฤดีกานต์ สายโกสินทร์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 37054353

นายวัฒนา อัจฉริยะโพธา นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 37054355

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2540

บทคัดย่อ

ต้นกฤษณา (*Aquilaria sp.*) สามารถนำมาขยายพันธุ์ได้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดในอาหารสังเคราะห์สูตรของ Murashige and Skoog ,1962(MS) ที่มีการเติมฮอร์โมน BAP จากการศึกษาพบว่าระดับฮอร์โมน BAP ที่ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีความเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดกฤษณา โดยเริ่มแตกยอดในระยะเวลา 2 - 3 สัปดาห์และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.4 ยอด ซึ่งลักษณะของยอดที่เจริญมีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มีระดับฮอร์โมน BAP ที่ความเข้มข้นระดับอื่น ยอดที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำมาชักนำให้เกิดราก เพื่อให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีในอาหารที่มีฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 1.0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซนต์การเกิดจุดกำเนิดราก (root primordia) ได้100 เปอร์เซนต์ โดยมีจุดกำเนิดรากเฉลี่ยต่อต้นเป็น 3.2 และ 2.2 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Propagation Technique of *Aquilaria sp.* by Tissue Culture	
Name	Miss Yupawan	Pinitpaitoon
	Miss Ruedeekan	Saikosin
	Mr. Wattana	Aschariyhaphotha
Special Project Advisor	Asst. Prof. Nauwarat	Panyam
Department	Applied Biogoly	
Academic Year	1997	

Abstract

Shoot tips of *Aqularia sp.* were propagated by using tissue culture technique with synthetic medium of Murashige and Skoog, (MS 1962) supplementary by BAP hormone. The best results was BAP medium with concentration 1.0 mg./l. whish effectively to promote multiple shoots (2.4 shoots/one) This shoots were produced in 2-3 weeks and appearance of shoots were better than other. Rooting of shoots in vitro were obtain on media containing IBA 1.0 and 0.5 mg./l, respectively. It was produced 100 % of root promordia and inducing 3.2, 2.2 root primordia per one for six weeks.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษ เรื่อง "เทคนิคการขยายพันธุ์ต้นกฤษณา (*Aquilaria sp.*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ" เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยความช่วยเหลืออนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ซึ่งคณะผู้จัดทำโครงงานพิเศษต้องขอขอบคุณทุกท่านดังรายนามต่อไปนี้

1. ผ.ศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม อาจารย์ที่ปรึกษาควบคุมโครงงานพิเศษ ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน รวมทั้งให้ความเอื้อเฟื้อ อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่เป็นอย่างดี
2. อาจารย์ อารีย์ ฤทธิบูรณ์ ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำ และคำปรึกษา
3. อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำ และคำปรึกษา ปัญหา อุปสรรคต่าง ๆ
4. เจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาที่อำนวยความสะดวกด้านวัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี
5. เพื่อน ๆ และ พี่ ๆ ที่เอื้อเฟื้อนำใจมากมายในโครงงานชิ้นนี้

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษ ภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษ ภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	
วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	
ประวัติ และการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	3
ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อพืช	5
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	6
เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	7
ฮอร์โมนกับการควบคุมการเจริญของพืช	8
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นกฤษณา	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	23
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก ก	39
ภาคผนวก ข	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางแสดงความสูงของยอดต้นกฤษณาเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร สังเคราะห์ สูตร MS ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 23

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนยอดโดยเฉลี่ยของต้นกฤษณาที่เจริญโดยการชักนำของฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาที่เริ่มเกิดยอด (สัปดาห์) 25

ตารางที่ 3 ผลของฮอร์โมน BAP ต่อการนำให้เกิดยอดกฤษณาเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP เป็นเวลา 5 สัปดาห์ 26

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนจุดกำเนิดราก เมื่อชักนำโดยฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ 28

ตารางที่ 5 แสดงอัตราการเจริญของราก (เปอร์เซ็นต์) เมื่อชักนำโดยฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ 29

ตารางที่ 6 อิทธิพลของฮอร์โมน IBA ในการชักนำให้เกิดรากโดยใช้เทคนิคการชักนำ 2 ขั้นตอนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 29

ตารางที่ 7 แสดงสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog(1992) 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงเนื้อเยื่อเจริญของ Shoot apical 7

รูปที่ 2 แสดงความสูงของยอดที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ต่างๆ และระยะเวลาที่เริ่มเกิดยอด (สัปดาห์) 24

รูปที่ 3 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยของต้นกฤษณา โดยการชักนำของฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 26

รูปที่ 4 แสดงการฟอกฆ่าเชื้อก่อนย้ายลงอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 31

รูปที่ 5 แสดงการเกิดยอดของต้นตอกฤษณาที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 32

รูปที่ 6 แสดงการชักนำให้เกิดราก โดยใช้ฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 33

รูปที่ 7 ต้นสมบูรณ์ของต้นตอกฤษณาที่เกิดจากการชักนำด้วยฮอร์โมน 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กฤษณาเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีต้นกำเนิดทางแถบร้อนของเอเชีย โดยทั่วไปมีชื่อเรียกหลายชื่อได้แก่ Aloe wood, Agar wood, Eagle wood, Calambac, ไม้หอม และไม้พวงมะพร้าว เป็นต้น พบทั่วไปในป่าดิบชื้น ปะปนกับต้นไม้อื่นๆ กฤษณาเป็นพืชในวงศ์ Thymelaeaceae สกุล Aquilaria ซึ่งมีทั้งหมด 15 ชนิด แต่ในประเทศไทยพบเพียง 3 ชนิด

ลักษณะทั่วไปของไม้กฤษณามีลักษณะไม้เป็นไม้เนื้ออ่อน สีขาวนวล เมื่อเกิดแผล ความชอกช้ำ หรือความเครียดขึ้นที่เนื้อไม้ก็จะมีการหลั่งสารจำพวกซันหรือเรซินเข้ามาสะสมที่เนื้อไม้รอบๆแผลนั้น เมื่อเวลานานเข้าก็จะมีการสะสมสารนั้นมากขึ้นจนเปลี่ยนสีของเนื้อไม้จากสีขาว จนเป็นสีดำ เรียกสารนั้นว่าสารกฤษณา หรือกฤษณา ซึ่งเป็นส่วนของไม้ที่ผิดปกติ

ไม้กฤษณาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ๆได้หลายรูปแบบ ตั้งแต่ทำเฟอร์นิเจอร์ หั่นเป็นฝอยๆเผาให้กลิ่นหอม หรือนำไปเป็นเครื่องยา สมุนไพรที่ใช้รักษาโรค นอกจากนี้ยังนำไปปรุงแต่งกลิ่นน้ำหอมอื่นๆ นอกจากจะคงทนแล้วยังมีคุณประโยชน์ในการไล่ตัวไรขนาดเล็กที่เกาะตามลำตัวได้ ตลาดสำคัญของไม้กฤษณาคือ ตะวันออกกลาง และชาวมุสลิมทั่วโลก ยิ่งประเทศตะวันออกกลางมีฐานะดีขึ้นจากการขายน้ำมัน ก็มีกำลังซื้อสูงขึ้น เป็นสาเหตุที่ทำให้กฤษณามีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่กฤษณาที่ป้อนสู่ตลาดโลกเป็นผลผลิตจากกฤษณาในธรรมชาติจึงทำให้กฤษณาในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วปัญหาในขณะนี้คือ สินค้าไม่เพียงพอกับความต้องการ ยิ่งกฤษณามีราคาแพงก็มีคนจำนวนไม่น้อยเสี่ยงนำของป่ามาขาย ซึ่งเป็นการทำลายทรัพยากรธรรมชาติ และทำให้ไม้กฤษณาเป็นไม้หายาก จึงจำเป็นต้องทำการค้นคว้าวิจัยเพื่อทำการขยายพันธุ์ไม้กฤษณาไม่ให้สูญพันธุ์และเพื่อส่งเสริมให้มีการปลูกสร้างสวนกฤษณาเพื่อผลิตไม้หอมสู่ตลาดโลก ธุรกิจการขายกล้าไม้กฤษณา ได้รับความสนใจจากผู้มีที่ดินซึ่งมีการซื้อกล้าไม้ไปปลูกเป็นสวนส่วนตัวหรือสวนเกษตร เนื่องจากกฤษณามีข้อจำกัดในการสืบพันธุ์ตามธรรมชาติ มีสัตว์ชอบกินผลกฤษณาและยังมีเชื้อราทำลายส่วนผลและเมล็ดที่ร่วงหล่นตามพื้น ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการขยายพันธุ์ที่ให้จำนวนมากและรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกฤษณาในสภาพปลอดเชื้อจึงเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อทำการขยายพันธุ์ต้นกฤษณาให้ได้จำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนปลายของต้นกฤษณา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการขยายพันธุ์ต้นกฤษณาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP และ IBA ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและรากตามลำดับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตต้นกฤษณาได้เป็นจำนวนมากจากการขยายพันธุ์ต้นกฤษณาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ช่วยอนุรักษ์พันธุ์ต้นกฤษณามิให้สูญพันธุ์
3. ส่งเสริมการปลูกต้นกฤษณามากขึ้นเพื่อผลิตกฤษณาส่งขายต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

ประวัติและการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิคที่นำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ตั้งแต่ในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ หรือโปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุอาหารที่พืชต้องการครบทุกอย่างได้แก่ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น

ส่วนต่างๆของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ ปลายยอด ปลายราก เนื้อเยื่อเจริญ ใบ เมล็ด คัพภะ อับละอองเกสร รังไข่ ตาข้าง ดอก เซลล์แขวนลอย โปรโตพลาสต์

ในปี ค.ศ. 1839 Schwann and Schleiden ตั้งทฤษฎีเซลล์ มีใจความว่า สิ่งมีชีวิตทั้งหลายประกอบด้วยเซลล์ และสิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันในด้านองค์ประกอบ วงชีวิต และวิธีการแพร่พันธุ์ แต่มีลักษณะที่เหมือนกันคือ ในแต่ละสิ่งมีชีวิตต้องผ่านขั้นตอนการเป็นเซลล์เดี่ยว ซึ่งจะต้องมีรหัสพันธุ์กรรมที่จำเป็นต่อการเจริญและการสืบพันธุ์

ในปี ค.ศ. 1902 Herberlandt เป็นคนแรกที่นำเอาใบพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์โดยหวังว่าเซลล์ของพืชน่าจะสามารถเจริญ แบ่งตัว และเจริญเป็นต้นใหม่ได้ คือมีคุณสมบัติที่เรียกว่า totipotency ถึงแม้ว่า Herberlandt จะทำไม่สำเร็จเนื่องจากเซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวเพาะเลี้ยงยาก และในสมัยนั้นยังไม่มีการค้นพบสารเร่งการเจริญ แต่ในแนวความคิดของเขาก็มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านนำไปค้นคว้าและทดลอง จนในปี ค.ศ. 1934 P.R. Write ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ ในอาหารที่มีองค์ประกอบของเกลือแร่ น้ำตาลที่สกัดจากอ้อย (น้ำตาลซูโครส) และยีสต์สกัด หลังจากนั้นก็มีรายงานออกมาเรื่อยๆ ว่ามีการเพาะเลี้ยง ปลายยอด เอมบริโอ ใบ และส่วนต่างๆของพืช และมีนักวิทยาศาสตร์คิดสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันเพื่อเลี้ยงพืชที่จำเพาะเจาะจงยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ Skoog และ Miller (1957) พบว่าการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นหรือรากขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของสารเร่งการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) โดยพบว่า ถ้าอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินสูงกว่าอัตราส่วนสมดุลย์แล้ว เนื้อเยื่อพืชจะเจริญเป็น แคลลัส(callus) และราก แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินต่ำกว่าอัตราส่วนสมดุลย์แล้วเนื้อเยื่อพืชจะเจริญเป็นยอด ถ้าอัตราส่วนของสารทั้งสองกลุ่มสมดุลย์ เนื้อเยื่อ จะเจริญเป็นยอดและราก ผลจากการค้นคว้าเรื่องสารเร่งการเจริญเติบโตนี้ ทำให้ความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่กระจายกว้างขวางยิ่งขึ้น

ปี ค.ศ. 1962 Murachige และ Skoog ได้ศึกษาและปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น คือมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชในอัตราที่สูงขึ้น ทั้งสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ เพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบและยังสามารถนำไปใช้กับพืชอื่นๆได้อีกหลายชนิดด้วยกัน

หลังจากนั้นจนถึงปัจจุบันได้มีการค้นพบวิธีต่างๆ และมีการใช้เครื่องมือทันสมัยมาช่วยในการวิจัยมากขึ้นทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ประสบความสำเร็จและก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อพืช

1. เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ จากการเพาะเลี้ยงต้นพืชเพียงต้นเดียว และทำการย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง และแต่ละเดือนสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ 10 ต้น เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 6 เดือน เราสามารถผลิตต้นพืชในหลอดทดลองได้ถึง 1 ล้านต้น ซึ่งไม่มีวิธีอื่นใดที่จะผลิตต้นกล้าพืชให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็ว
2. เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค ในการผลิตพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อแบคทีเรีย และ รา เป็นอันดับแรก เพราะอาหารของการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะแสดงอาการปน-เปื้อน (contamination) ทันทีหากมีเชื้อดังกล่าว เราสามารถสังเกตเห็นด้วยตาเปล่าและสามารถนำมาขจัดทิ้งได้ ส่วนการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสนั้น ไม่สามารถแสดงอาการปน-เปื้อน (contamination)ให้เห็นได้ จะทราบได้เมื่อเกิดอาการ (symtom) บนต้นพืชและไม่สามารถแก้ไขได้นอกจากทำลายทิ้ง ดังนั้นก่อนเพาะเลี้ยงควรแน่ใจว่าปราศจากเชื้อไวรัส สำหรับส่วนที่ปลอดเชื้อไวรัสมากที่สุดคือ apical meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญบริเวณปลายยอด และเนื้อเยื่อของคัพภะ(embryo) ที่อยู่ในเมล็ด
3. เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเอาสายพันธุ์ที่ดีไว้ อาจทำได้โดยใช้สารเคมี ฉายรังสี หรือตัดต่อยีน
4. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistan plant) สามารถทำให้เกิดความต้านทานในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อแมลง
5. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) ในการเพาะเลี้ยงจะสามารถสร้างเงื่อนไขให้พืชมีความทนทานในสภาพต่าง ๆ กันได้
6. เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช สามารถทำให้พืชผลิตส่วนที่จะนำมาสังเคราะห์เป็นยาหรือสารเคมีให้มากขึ้นได้
7. เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช สามารถติดตามต้นพืชในหลอดทดลองได้อย่างใกล้ชิด เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนา
8. เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช ใช้วิธีเก็บเนื้อเยื่อที่เพาะได้เอาไว้ในหลอดทดลอง โดยอาจใช้สูตรอาหารที่ชลอการเติบโตของพืชหรือเก็บรักษาเนื้อเยื่อเอาไว้ในในโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลล์เซียส เมื่อใดที่ต้องการนำไปใช้ก็นำเนื้อเยื่อมาเก็บในสภาพปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะประกอบไปด้วยสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ซึ่งมีสารอาหารที่พืชต้องการอยู่ครบถ้วน จัดเป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้ดังนี้

1.ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (Inorganic compound)

- ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก เช่น C, H, N
- ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย เช่น Fe, B, Mo

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (Organic compound)

- ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
- วิตามิน
- กรดอะมิโน
- สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน
- สารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ

ในการเลือกอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

1. ความแตกต่างของชนิดหรือสายพันธุ์
   - สายพันธุ์ต่างชนิดอาหารต่างสูตร
2. ความแตกต่างของอายุพืช
   - อายุต่างกันอาจต้องการอาหารต่างกัน
3. ความแตกต่างของชิ้นส่วนพืช
   - ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นส่วนใดก็ต้องใช้อาหารสูตรที่เหมาะสมกับส่วนนั้น
4. เป้าหมายการเพาะเลี้ยง
   - พืชชนิดเดียวกันถ้าต้องการให้เกิดส่วนใดก็ให้อาหารที่จะทำให้เกิดส่วนนั้น
5. สถานะของอาหาร
   - อาหารเหลวหรืออาหารแข็งก็มีส่วนในการเพาะเลี้ยงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

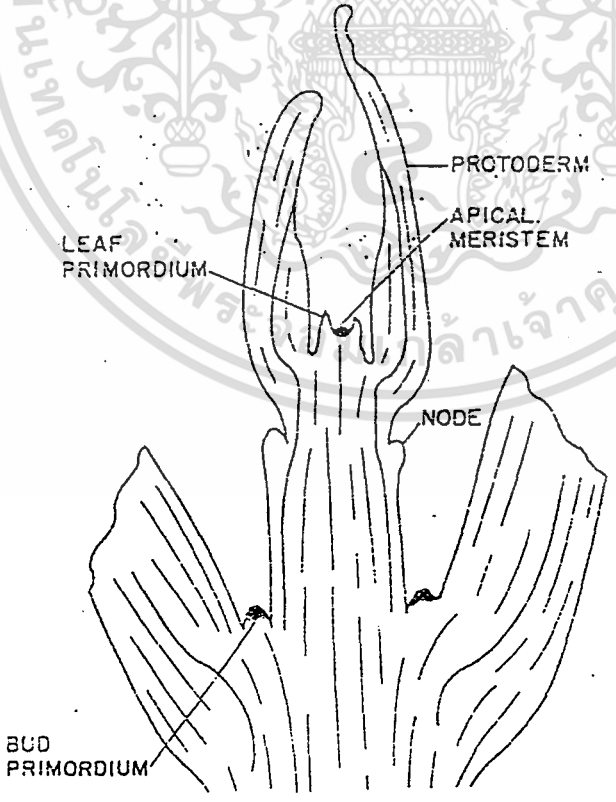
เนื้อเยื่อพืชในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การใช้เนื้อเยื่อปลายยอดลำต้นพืชมาทำการเพาะเลี้ยงนี้ ในระยะเริ่มต้นจะทำการขยายพันธุ์เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลของพืชจำนวนมากและการบำรุงรักษาพันธุ์พืชโดยเฉพาะพืชเป็นยาและพืชที่ให้กลิ่นหอม

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดจะสามารถเจริญอย่างต่อเนื่องไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ซึ่งเนื้อเยื่อนี้บางทีอาจจะเป็น axillary shoot จะเกิดตรงส่วนที่รวมกันระหว่าง ใบและลำต้น หรือบางทีก็เกิดที่ใดที่หนึ่งบนใบหรือลำต้น รูปที่ 1 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อเจริญของ shoot apical การเจริญของยอดและลักษณะของยอดนี้เป็นขบวนการที่ซับซ้อนมากและหาเหตุผลที่ชัดเจนไม่ได้เหมือนกับการเจริญของราก

ฮอร์โมนที่สำคัญในการเจริญคือ ไซโตไคนิน (cytokinin) หรืออาจรวมกับออกซิน (auxin) ซึ่ง ไซโตไคนิน นี้จะกระตุ้นการเจริญตายอดโดยเปลี่ยนจาก apical dominance (Hagimori et.al. 1984a)

ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญนี้โดยปกติจะมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่นนอกจากนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่มาจากการเพาะเลี้ยงยอดจะขึ้นกับ axillary หรือ adventitions ซึ่งการเพาะเลี้ยง axillary shoot จะมีความเสถียรมากที่สุด



รูป 1 แสดงเนื้อเยื่อเจริญของ Shoot apical

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฮอร์โมนกับการควบคุมการเจริญของพืช

ฮอร์โมนพืช (plant hormone) หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่พืชสร้างได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งพืชจะสร้างเพียงเล็กน้อย และปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ จะสามารถควบคุมเปลี่ยนแปลงหรือยับยั้งขบวนการต่างๆ ของการเจริญเติบโตได้ ธรรมชาติของฮอร์โมนจะสร้างจากแหล่งเนื้อเยื่อหนึ่งแล้วจะเคลื่อนย้ายไปมีผลยังส่วนอื่นๆ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติการทำงานเหมือนฮอร์โมนเรียกว่า "สารควบคุมการเจริญเติบโต" (plant growth regulator)

ปัจจุบันพบว่าฮอร์โมนพืชมี 5 กลุ่ม คือ

1. ออกซิน (auxin)
2. จิบเบอเรลลิน (gibberellin)
3. ไซโตไคนิน (cytokinin)
4. ฮอร์โมนยับยั้งการเจริญ (growth inhibitors)
5. เอธิลีน (ethylene)

ซึ่งฮอร์โมนใน 3 กลุ่มแรกมีผลในแง่การเจริญ (growth promotor) เช่น ขบวนการแบ่งเซลล์ ขยายขนาดของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงแบ่งหน้าที่ของเซลล์ ฮอร์โมนกลุ่มที่ 4 มักทำงานตรงข้ามหรือหักล้างกับฮอร์โมน 3 กลุ่มแรก ส่วนฮอร์โมนในกลุ่มเอธิลีนจะมีผลควบคุมขบวนการทางสรีรวิทยาของพืช

ฮอร์โมนในกลุ่ม growth promotor สามารถควบคุมขบวนการแบ่งเซลล์ได้ ขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อใดจะตอบสนองต่อฮอร์โมนตัวใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซโตไคนิน (cytokinin and Cell division)

ในปี 1950 Skoog ได้ทำการทดลอง โดยเติมออกซินและสารต่างๆ เช่น น้ำมะพร้าว adenine DNA ที่ผ่านความร้อน (heated DNA) ลงในอาหารวุ้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ แทนลำต้น (stem pith) ของต้นยาสูบซึ่งเป็นที่มาของการค้นพบฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินในพืช โดยที่ฮอร์โมนกลุ่มนี้จะมีผลต่อการชักนำการแบ่งเซลล์ (kinesis) ของชิ้นส่วนพืชที่แยกเลี้ยงในอาหาร

ซึ่งการทดลองพบว่าการวิเคราะห์สารที่ได้จากการให้ความร้อนกับDNA (heated DNA) ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์คือไคเนติน (kinetin) หรือ 6-เฟอร์ฟูริลอะมิโน เพียวรีน(6-furfurylamino purine) ซึ่งปัจจุบันได้สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ควบคุมการเจริญเติบโตในพืช และยังมีอีกหลายชนิด เช่น 6-เบนซิลอะมิโน เพียวรีน (6-benzylamino purine) และ อะดีนีน ซัลเฟต (adenine sulfate) ซึ่งในการควบคุมการเกิดหน่อในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ส่วนสารไซโตไคนินที่พืชสร้างขึ้นมาเองตามธรรมชาติที่สกัดได้มักจะอยู่ในรูปอนุพันธ์ของอะดีนีน (adenine) เช่น ซีเอติน (zeatin), ไอโซเพนโทนิล อะดีนีน (Isopentonyle adenine;IPA)

จากงานทดลองของ skoog พบว่าอัตราส่วน (ratio) ของไซโตไคนินต่อออกซินสูง เซลล์ต่างๆ ที่สร้างใน แคลลัส (Callus) จะมี การแบ่งเซลล์ และเริ่มพัฒนา (develop) ไปเป็นตาลำต้น และ ใบ หากอัตราส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินต่ำจะพัฒนาไปเป็นรากได้ดีกว่า ดังนั้นถ้าทำการคัดเลือกสัดส่วนไซโตไตนินและออกซินที่เหมาะสมจะสามารถทำให้ชิ้นส่วนของพืชหลายๆ ชนิดเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต้นใหม่ได้

<u>แหล่งสังเคราะห์ไซโตไคนินและการลำเลียง</u>

บริเวณที่มีไซโตไคนินอยู่มากและมีระดับสูงสุด คือบริเวณอวัยวะที่มีอายุน้อย เช่น เมล็ด ผล ใบอ่อน และบริเวณปลายราก (root tip) ทำให้เชื่อว่าไซโตไคนินจะได้รับการสังเคราะห์ขึ้นในบริเวณดังกล่าว แต่ก็อาจเป็นไปได้ที่อาจมีการสะสม เนื่องจากลำเลียงมาจากส่วนอื่น ในส่วนของปลายรากนั้นพบว่ารากสามารถให้ไซโตไคนินออกมาได้ แม้ว่าจะถูกตัดออกจากส่วนต้น ซึ่งนำไปสู่แนวความคิดที่ว่าปลายรากเป็นส่วนที่สังเคราะห์ไซโตไคนิน และลำเลียงผ่านทางท่อลำเลียง (xylem) ไปส่วนอื่นๆ ของพืช ต่อมาพบว่า ในพืชหลายชนิด ลำต้นสามารถสร้างไซโตไคนินได้และการลำเลียงโดยเฉพาะซีเอติน และซีเอติน ไรโบไซด์ (zeatin riboside) จะเกิดขึ้นใน ท่อลำเลียงแต่ในซีฟทิวบ์ (sieve tube) จะสามารถพบไซโตไคนินในรูปของ ไกลโคไซด์ (glucosides)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ส่งเสริมการเจริญของใบ

2. ยับยั้งการเจริญของราก

3. กระตุ้นให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดยอดหลายยอด (multiple shoots)

4. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ ไซโตไคนินเร่งการแบ่งตัวของเซลล์เนื่องจากมีผลต่อ RNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์และไซโตพลาสซึม

ออกซิน (Auxin and cell division)

ออกซิน (Auxins) ทำให้เนื้อเยื่อเกิดขบวนการแบ่งเซลล์ได้ในหลายกรณี แต่โดยทั่วไปจะมีผลต่อการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation)

ในปัจจุบันออกซินที่เกิดในธรรมชาติที่เป็นที่ยอมรับมี 3 ชนิดคือ

1. IAA (indole-3-acetic acid) หรือ indoleeacetic acid เป็นสารที่พบมากที่สุด บางครั้งเรียก IAA ว่าเป็นออกซินที่แท้จริงเพียงชนิดเดียว

2. 4-Chloro IAA (4-Chloro-indoleacetic acid)

3. PAA (phenylacetic acid)

ออกซินสังเคราะห์ที่นิยมใช้

NAA = α-napthalene acetic acid

2,4-D = 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

IBA = 3-indolebutyric acid

โดยทั่วไปการสังเคราะห์ออกซินในพืชจะเกิดในพืชที่มีอายุน้อย เช่น ราก เนื้อเยื่อเจริญ ใบที่กำลังเจริญเติบโต และในผลจะมี เอนไซม์ที่จำเป็นในการเปลี่ยน ทริปโตแฟน (tryptophan) ไปเป็น IAA มีประสิทธิภาพดีที่สุด และตรวจพบปริมาณออกซินสูงที่สุดด้วย จึงสรุปได้ว่าแหล่งสังเคราะห์ออกซินจะอยู่บริเวณที่มีการเจริญเติบโตทั่วทั้งต้น

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลส

2. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิก

3. กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดรากเป็นขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ทำให้พืชเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนนำออกมาปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับออกซินในต้นพืช กับสภาพแวดล้อม ถ้าออกซินในต้นพืชมีระดับต่ำก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อเกิดรากที่สมบูรณ์

ฮอร์โมนกับการพัฒนาของยอดและการเพิ่มจำนวนยอด

เนื่องจากรากเป็นแหล่งสังเคราะห์ไซโตไคนิน จึงไม่น่าจะเป็นไปได้ที่เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด และตาจะมีไซโตไคนินเพียงพอที่จะส่งเสริมการเจริญ และการพัฒนา ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงจำเป็นต้องมีการเติมไซโตไคนินลงไปในอาหาร ซึ่งไซโตไคนินที่นิยมใช้กันทั่วไป มี 3 ชนิดคือ Kinetin (KIN),N6-benzyladenine (BA) และ N6-(2-isopentenyl)-adenine (2ip) ซึ่ง BA จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเพิ่มจำนวนของยอดในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนบริเวณ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด และตา ตามด้วย KIN ส่วน 2IP จะมีการใช้น้อยกว่าสองชนิดแรก (Nair et. al., 1979)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกฤษณาได้มีการทดลองโดยนำชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด และตาข้างมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง และ Woody Plant Medium (wpm) พบว่าการเติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่า 2iP และ Kinetin โดย BA ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 2.0 และ4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดได้ดี (พิมล และ ปรานอม , 2538)

นอกเหนือจากนี้ ในการเจริญของยอดยังต้องการฮอร์โมนประเภทออกซินด้วย แต่เนื่องจากปลายยอดอ่อนเป็นแหล่งสังเคราะห์ออกซินอยู่แล้วในขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของยอดจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเติมออกซินลงในอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ปลายยอดที่มีขนาดใหญ่จากพืชที่กำลังเจริญเติบโต ยกเว้นส่วนของตาที่อยู่ในระยะพักตัว และเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กกว่า 0.4 มิลลิเมตร จะไม่มีออกซินภายในเพียงพอต่อการเจริญเป็นยอด ดังนั้นในกรณีนี้จึงจำเป็นต้องเติมออก-ซินลงไป ซึ่งออกซินที่นิยมใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ IAA, IBA, NAAและ 2,4-D ในบรรดาออก-ซินทั้ง 4 ชนิดนี้ IAA จะเป็นออกซินที่อ่อนที่สุด และจะทำงานได้ไม่ดีในสภาวะที่มีแสง และเนื้อเยื่อที่มีการทำงานของเอนไซม์ IAA-Oxidase ในปริมาณสูง แต่จะมีประสิทธิภาพมากในการชักนำให้เกิดการเจริญของอวัยวะ ส่วน IBA จะแรงกว่า IAA เพียงเล็กน้อย และ 2,4-D จะแรงที่สุดในบรรดาออกซินทั้ง 4 ชนิด ในการชักนำให้เกิดแคลลัส และจะเป็นปฏิปักษ์อย่างแรงในการพัฒนาให้เป็นชิ้นส่วนอวัยวะ NAA เป็นออกซินที่นิยมใช้มากในการปฏิบัติงานด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนบริเวณปลายเนื้อเยื่อเจริญของยอด และตา จะเห็นได้ว่าฮอร์โมนประเภทออกซินจะไม่ใช่ฮอร์โมนสำคัญที่ส่งเสริมการงอกของยอด ดังนั้นการเติมออกซินลงในอาหารในขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยอดจะไม่มี ความจำเป็นเนื่องจากจะไม่มีผลต่อการยืดยาวของปลายยอด และการเปลี่ยนแปลงเป็นยอดในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของ ไซโตไคนินที่สูง(Lundergan and Janick,1980)

การชักนำให้เกิดรากจากยอด

จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้คือการชักนำให้เกิดรากจากยอดเพื่อเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ การชักนำให้เกิดรากของพืชขนาดเล็กจะง่ายกว่าการทำไม้ยืนต้นให้เกิดราก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ชิ้นส่วนจากต้นพืชที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จากการทดลองของ Skoog และ Miller แสดงให้เห็นว่าการชักนำให้เกิดรากจะขึ้นกับสัดส่วนปริมาณไซโตไคนินที่ต่ำและปริมาณออกซินที่สูง Kuo และTsay (1977) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงหน่อของกะหล่ำจีนพบว่า สัดส่วนไซโตไคนินต่อออกซินที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงมากกว่า 1 จะเหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด และสัดส่วนที่น้อยกว่า 1 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นราก ซึ่งโดยทั่วไปไซโตไคนินที่ใช้ชักนำให้เกิดรากนี้จะใช้ในปริมาณ 4.5 ไมโครกรัมหรือต่ำกว่า

เมื่อทำการศึกษาผลของชนิดออกซินต่อการเจริญในเนื้อเยื่อพืช พบว่าNAA จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเนื้อเยื่อเป็นราก แต่ในพืชบางสายพันธุ์การพัฒนาของยอดอ่อนซึ่งเป็นแหล่งของการผลิตออกซินที่สมบูรณ์ในปริมาณมาก การเติมออกซินลงในอาหารจะเป็นสิ่งที่ไม่จำเป็น (Hasegawa, 1980; Lee et al.,1977; Meradith,1979; Papachatzi et al.,1981) เพราะเมื่อความเข้มข้นของออกซินสูงเกินไปจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสขึ้นที่ฐานของยอด ที่นำมาเพาะเลี้ยง ซึ่งจะยับยั้งการพัฒนาเป็นราก (Lane,1979a) และเนื่องจากสภาวะในการยืดยาวของรากจะไวต่อออกซินมากทำให้เกิดสภาวะการยับยั้งการขยายขนาดของราก

ในการชักนำให้เกิดรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกฤษณา พบว่าเมื่อนำยอดกฤษณาไปเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่มี และไม่มี IBA เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยมี ปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงที่สุดคือ 65เปอร์เซ็นต์ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (พิมล และ ปรานอม, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นกฤษณา

กฤษณาเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชีย เรียกได้หลายชื่อ เช่น ไม้หอม ไม้พวงมะพร้าว หรือเรียก กายูดือปู(มลายู) ภาษาอังกฤษก็เรียกได้หลายชื่อ เช่น อะโลวู้ด อะกาวู้ด อีเกิ้ลวู้ด พบทั่วไปในป่าดิบชื้น โดยปะปนอยู่กับต้นไม้อื่น

ชื่อวิทยาศาสตร์ เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Thymelaeaaaceae สกุล Aquilaria ซึ่งมีทั้งหมด 15 ชนิด แต่ในประเทศไทยพบ 3 ชนิด

1. *Aquilaria malaccensis* มีชื่อพ้องคือ *A. Agallocha* พบมากภาคใต้
2. *Aquilaria crassna* พบในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
3. *Aquilaria subintegra* พบทางตะวันออก จนถึงเขมร

จากรายงานการพบกฤษณาพบว่ากฤษณากระจายพันธุ์อยู่ตั้งแต่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ส่วนหนึ่งของเบงกอล บังกลาเทศ ปากีสถาน ครอบคลุมเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งหมด ประเทศไทยพบได้ทุกภาค ที่เหลืออยู่มากส่วนใหญ่จะเป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า

ลักษณะทั่วไป กฤษณามีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน สีขาวนวล ไม่มีราคา เว้นแต่จะมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อไม้จากขาวไปเป็นสีดำ มีกลิ่นหอม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำไปเผาไฟ ส่วนเนื้อไม้ที่มีกลิ่นหอมนี้มักเรียกว่า แก่นกฤษณา

ใบเป็นใบเรียงตัวแบบสลับใบเดียว เป็นรูปไข่ หรือรูปร่างยาวขอบขนาน ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบแหลม ใบที่แก่จะเกลี้ยงเป็นมัน ส่วนใบอ่อนมีขนสั้นแวววคล้ายไหมตามขอบใบ เส้นใบ ก้านใบ ตาอ่อน และกิ่งอ่อนปกคลุมด้วยขนลักษณะเดียวกัน

ดอก เป็นแบบสมบูรณ์เพศ คือมีเกสรตัวผู้และตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน เกิดตามง่ามใบ หรือปลายยอด ก้านดอกสั้น ดอกสีขาว ไม่มีกลีบดอก กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ ติดกันที่โคน ปลายแยกออกเป็น 5 แฉก ปกคลุมด้วยขนสั้นคล้ายไหม เกสรตัวผู้มี 10 อัน ก้านเกสรตัวผู้สั้น รังไข่อยู่เหนือส่วนอื่น ๆ ของดอก ไม่มีก้าน และปกคลุมด้วยขนสั้นคล้ายไหม

ผล เป็นแบบหลอดหรือแคปซูล มีรูปร่างคล้ายไข่กลับหัว หรือหอกกลับหัว ตั้งอยู่บนฐานของกลีบรองกลีบดอกที่ไม่หลุดร่วง ผลยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร เมล็ดมี 1 หรือ 2 เมล็ด ลักษณะรูปไข่ ขนาดของเมล็ดยาว 5 - 8 มิลลิเมตร มีส่วนฐานที่สดและนุ่ม เมล็ดมีส่วนของเส้นขนาดเล็ก ยาว เชื่อมต่อกับผล เมล็ดสีแดง ส้ม หรือ ดำ ปกคลุมด้วยขนสั้นและนิ่ม ผลแก่แตกออกเป็น 2 ซีก มีชีวิตอยู่ช่วงสั้น เพียง 1 ถึง 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นมาของการเกิดสารกฤษณา

สารกฤษณาเกิดจากอุบัติเหตุที่ทำให้ไม้เป็นแผลหรือซอกช้ำแล้วเกิดกระบวนการรักษาบาด-แผลขึ้น แต่ในสมัยก่อนไม่ทราบข้อมูลนี้ จึงรอให้กฤษณาเกิดเองตามธรรมชาติ ทำให้หากฤษณาได้ยาก ประกอบกับการเป็นไม้มีค่าที่ถูกคนเสาะหาอยู่ตลอดเวลาจึงยิ่งแพง และหายากมาแต่โบราณ ในสมัยก่อนมีความเชื่อว่ากฤษณาเป็นไม้ที่จะมีกลิ่นหอมก็ต่อเมื่อต้นไม้ตายและผุเท่านั้น โดยเชื่อว่าเกิดจากเชื้อราเข้าไปกินไม้ และทำให้ไม้เกิดเป็นไม้หอมแบบต่าง ๆ ขึ้น ความเชื่อนี้สอดคล้องกับความเชื่อของนักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งตลอดเวลา 50 ปีที่ผ่านมาต่างก็พยายามแยกเชื้อราออกจากเนื้อไม้ที่มีสารกฤษณา และพบเชื้อรามากมายหลายสิบชนิด จากนั้นก็ทดลองนำเชื้อราดังกล่าวใส่ลงไปในแผลของต้นกฤษณา แต่ก็ประสบความล้มเหลว

ผลงานวิจัยชิ้นสำคัญของ ดร. สมคิด สิริพัฒนดิลก, ดร. สุวิทย์ แสงทองพราว และ นายอนิวรรต เฉลิมพงษ์ ได้ชี้ให้เห็นว่า ต้นกฤษณา เป็นไม้ที่มีลักษณะพิเศษคือ มีท่ออาหารกระจายอยู่ในเนื้อไม้อีกส่วนหนึ่งนอกเหนือจากที่มีอยู่บริเวณรอยต่อของเปลือกไม้กับเนื้อไม้ ดังเช่นในพืชใบเลี้ยงคู่อื่น ๆ เมื่อทำให้เกิดแผล เนื้อไม้ก็จะมีการหลั่งสารจำพวกซันหรือเรซินสะสมที่เนื้อไม้รอบ ๆ บาดแผล เมื่อเวลาผ่านไปนานเข้า ก็จะมีการสะสมของสารดังกล่าวมากขึ้นจนเปลี่ยนสีของเนื้อไม้ จากสีขาวมาเป็นสีเหลือง น้ำตาล น้ำตาลเข้ม สีดำ และสีดำมีน้ำมันเยิ้มในที่สุด

การเกิดสารกฤษณาที่เป็นมาโดยธรรมชาติ จึงเกิดจากการเกิดบาดแผลของต้นกฤษณา โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น ถูกต้นไม้หรือวัตถุอื่น ๆ กระแทกให้เกิดเป็นบาดแผล หรือ ถูกสัตว์กระทำ เช่น ขวิด เบียด ถู ให้เกิดเป็นแผลซอกช้ำ หรือถูกแมลงชอนไช เมื่อเกิดแผลขึ้นแล้วก็จะหลั่งสารชนิดหนึ่งเรียกว่าสารกฤษณา ซึ่งจะมีสารที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์อยู่ 48 เปอร์เซ็นต์หลังจากแยกแอลกอฮอล์ออกไปแล้วสารที่ได้คือ เบนซิลอะซีโตน (benzyl acetone) คีโตน(ketone) ที่ยังจำแนกชนิดไม่ออก เซสควิ-เทอร์ฟีน แอลกอฮอล์ (sesquiterpene alcohol)และสารมีกรดบางตัวรวมทั้งไฮโดรซินนามิก (Hydrocinnamic acid) ในสารต่าง ๆ เหล่านี้พบว่าสารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมกฤษณา คือ เซสควิเทอร์ฟีน แอลกอฮอล์ (sesquiterpene alcohol) ซึ่งมีด้วยกันหลายชนิดคือ ไดไฮโดรอะกาโรฟูราน (Dihydrogarofuran) , เบต้าอะกาโรฟูราน (β-agarofuran) และ อัลฟาอะกาโรฟูราน (α-agarofuran)

คำเรียกส่วนต่าง ๆ ของเนื้อไม้ที่มีสารกฤษณาอยู่ตามลักษณะและรูปแบบของการเกิดบาดแผล เช่น ไม้ลูกแก่น เป็นไม้ที่มีเนื้อแข็งและมีสีดำ เกิดจากแมลงตัวเล็กเจาะไช ไม้ปากขวานคือไม้ที่มีผู้นำขวานไปฟันไว้

เมื่อต้นกฤษณาสร้างสารกฤษณาสร้างสารกฤษณาขึ้นแล้ว ต้นกฤษณานั้นจะมีอาการโทรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของส่วนยอดตั้งแต่เหนือรอยบาดแผลขึ้นไป เกิดจากท่อน้ำและท่ออาหารมีอุปสรรคในการขัดขวางการเคลื่อนย้ายน้ำและอาหาร ต้นกฤษณา ก็จะสร้างกิ่งจำนวนมากใต้รอยแผล แล้วเจริญขึ้นไปทดแทนส่วนยอด สารกฤษณาที่สะสมในเนื้อไม้จะตรวจสอบได้ภายในเวลา 6 เดือน และมีสารลงเต็มที่ภายใน 2-3 ปี

นิเวศน์วิทยาของกฤษณา

ต้นกฤษณาชอบขึ้นในป่าดิบชื้นนปะปนไปกับพรรณไม้อื่น ๆ เช่น ไม้ยาง ไม้ยมหอม เป็นต้น กฤษณามักออกดอกในช่วงเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ผลจะแก่ช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน ในบางเขตอาจช้ากว่านี้ แต่โดยทั่วไปผลกฤษณามักถูกสัตว์พวกกระรอกกัดกินระหว่างผลอยู่บนต้นก่อนที่ผลจะแก่ เป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณที่มีต้นกฤษณาขึ้นอยู่และต่อมาถูกตัดโค่นลง แต่จะไม่พบต้นกฤษณาชั้นอายุต่าง ๆ ขึ้นอยู่ น่าจะอธิบายได้ว่ากล้าไม้กฤษณาเป็นไม้ที่ไม่ทนร่ม และจากการที่มีสัตว์ชอบกินผลกฤษณาอาจทำให้เหลือผลแก่น้อยลง รวมทั้งเมล็ดกฤษณามีความงอกดีเฉพาะช่วง 2 สัปดาห์แรกเท่านั้น จากนั้น เมล็ดจะหมดความงอก ถ้าเมล็ดร่วงหล่นลงมาในช่วงที่ไม่มีฝนตกเป็นเวลานาน ซึ่งมักตรงกับช่วงระยะที่ผลกฤษณาแก่พอดี กว่าที่ฝนจะย้อนกลับมาใหม่ เมล็ดก็หมดความงอกหรือตายไปแล้ว นี่จึงเป็นข้อจำกัดหนึ่งในการสืบพันธุ์ตามธรรมชาติของต้นกฤษณา

ตลาดและอนาคตของไม้กฤษณา

ตลาดไม้กฤษณาในปัจจุบันมาจาก แหล่งใหญ่คือ กฤษณาที่เกิดตามธรรมชาติ จึงมีการโค่นหากฤษณาในธรรมชาติ ยิ่งเป็นไม้ที่เป็นแก่นกฤษณาต้องอาศัยต้นไม้ที่มีอายุมากและเกิดเองตามธรรมชาติ ตลาดที่รับซื้อไม้กฤษณาส่วนมากเป็นตลาดต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศตะวันออกกลาง ผู้ซื้อที่สำคัญคือชาวอาหรับ หรือชาวมุสลิม นอกจากนี้ยังมีโรงงานที่ซื้อไม้เกรดต่ำไปสกัดเป็นน้ำหอมที่ใช้ผสมในน้ำหอมชนิดพิเศษ

น้ำหอมที่เป็นน้ำหอมสกัดจากกฤษณา ใช้ผสมในน้ำหอมอื่น ๆ จะได้กลิ่นหอมเฉพาะตัว นอกจากจะคงทนติดผิวกายแล้วยังมีความสามารถไล่ตัวไรขนาดเล็กได้ ใช้แต่งกลิ่นน้ำหอมสำหรับผู้หญิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

White, P.R. (1934) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงปลายรากมะเขือเทศเป็นผลสำเร็จ ในอาหารที่มีองค์ประกอบของเกลือแร่ น้ำตาลที่สกัดจากอ้อย และ ยีสต์สกัด

Skoog, F. and Miller, C.O. (1957) ได้ศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ โดยใช้สารเร่งเจริญการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และ ไซโตไคนิน พบว่าการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็นต้นหรือราก ขึ้นอยู่กับปริมาณและความสมดุลของสารเร่งการเจริญเติบโตทั้งสองกลุ่ม

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) ได้ศึกษาและดัดแปลงอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่จากสูตรเดิมที่ได้เสนอไว้ในปี 1957 และทดลองใช้อาหารสูตรใหม่นี้กับเนื้อเยื่อยาสูบ พบว่ามีการเจริญเติบโตรวดเร็วขึ้นกว่าเดิม

White, P.R. (1963) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์และเซลล์พืช พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดไม่สามารถรวมกันได้ เนื่องจากความแตกต่างกันของชุดโครโมโซม

David D.Bilderback (1972) ได้ศึกษาผลของฮอร์โมน kinetin IAA และ GA_3 ที่มีผลต่อการเจริญของตาดอกของต้นกฤษณาพบว่า kinetin ความเข้มข้น 10^{-6} และ 10^{-7} โมล สามารถเพิ่มจำนวนต้นที่สมบูรณ์เกิดจุดกำเนิดราก(Primordia)ได้ ส่วน IAA และ GA_3 จะชักนำให้เกิด Carpel และ IAA จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะตาดอก

Schenk, R.V. and Hildebrant, A.C. (1972) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคในการชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเซลล์พืชใบเลี้ยงคู่ในอาหารสังเคราะห์

Riopel, J.L. (1973) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตทางด้านพฤกษศาสตร์ของพืช เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกส่วนต่าง ๆ ของพืชมาขยายพันธุ์ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Weier, T.E., Stocking, C.R. and Barbour, M.G. (1974) ได้ศึกษาวิธีการชักนำให้เป็นต้นพืชโดยใช้หลักการทางชีววิทยา

Thomas, E. and Davey, M.R. (1975) ได้ศึกษาและทดลองสร้างเซลล์เดี่ยว ให้เจริญเป็นต้นพืชได้สำเร็จ

Sweet, H.C. and Bolton, W.E. (1977) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเมล็ดเพื่อให้เจริญเป็นต้นในอาหารสังเคราะห์เพื่อช่วยให้เมล็ดที่งอกยากได้งอกดีขึ้น

O'Brien, T.P. and McCully M.E. (1981) ได้ศึกษาโครงสร้างของพืชและวิธีการคัดเลือกส่วนต่าง ๆ ของพืช มาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง_พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Thorpe, T.A. (ed.) (1981) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม

Williams, Richard R., Taji, Acram M, and Bolton, Janet A. (1984) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Dampiera diversifolia* และ *Prostanthera rotundifolia* แล้วชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยใช้อาหารสังเคราะห์

Williams, Richard R., Taji, Acram M, and Bolton, Janet A. (1985) ได้ศึกษาปฏิกริยาร่วมกันระหว่างฮอร์โมนออกซิน แสง และระดับความเป็นกรด-ด่างในการชักนำให้เกิดรากของพืชไม้เนื้อแข็งในออสเตรเลีย

Prakash, N. (1986) ได้ศึกษาวิธีการใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของพืชให้เจริญเติบโตเป็นต้น

Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.G. (1986) ได้ศึกษาชีววิทยาของพืชเพื่อเป็นหลักในการพิจารณาคัดเลือกพืชที่จะนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Pennell, D. (1987) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์พืชสวนโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

Pierik, R.L.M. (1987) ได้ทดลองเลี้ยงเซลล์พืชชั้นสูงในห้องปฏิบัติการเป็นผลสำเร็จ

Williams, Richard R. and Taji, Acram M. (1987) ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ ความมืด และ Gelrite ต่อการเก็บรักษาพันธุ์พืชพื้นเมืองของออสเตรเลีย เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Torres, K.C. (1989) ได้ศึกษาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับนำไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตของพืชสวน

Williams, Richard R. and Taji, Acram M. (1989) ได้ศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินและความเข้มข้นของเครื่องปลูก เพื่อชักนำให้เกิดรากในพืช *Cheiranthera volubilis*

Taji, Acram and Williams, R.R. (1990) ได้ศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดการเจริญเป็นยอดจากการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

Taji, Acram and Williams, R.R. (1990) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์พืชพื้นเมืองของออสเตรเลียด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Williams, Richard R., Taji, Acram M. and Winney, Kelly A. (1990) ได้ศึกษาผลของเนื้อเยื่อ *Ptiolotus* ที่ตอบสนองต่อระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยง

Ridge, I. (1991) ได้ศึกษาสรีระวิทยาของพืชเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30609

ของพืช

Taji, Acram and Williams, Richard. (1991) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์ของเฟิร์นออสเตรเลียโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Salisbury, F. and Ross, C. (1992) ได้ศึกษาโครงสร้างและระบบทางสรีระวิทยาของพืช

Williams, R.R. (1993) ได้ศึกษาธาตุอาหารเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสูตรอาหารนั้นควรประกอบด้วย ธาตุอาหาร 16 ธาตุโดยแบ่งเป็นธาตุอาหารหลัก (Macronutrient elements) 9 ธาตุ ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม โปแทสเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และธาตุอาหารรอง (Micronutrient elements) 7 ธาตุ ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โมลิบเดนัม โบรอน และ คลอไรด์

พิมล เที่ยงธรรม และ ปรานอม พฤฒพงษ์ (2538) ได้ศึกษาและทำการเพาะเลี้ยงกฤษณาในสภาพปลอดเชื้อ, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของกฤษณาในอาหาร MS สูตรดัดแปลงที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่งและ Woody Plant Medium (WPM) พบว่าการเติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่า 2iP และ kinetin โดย BA ความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดได้ดี เมื่อนำยอดกฤษณาเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่มีและไม่มี IBA เพื่อชักนำให้เกิดราก สามารถชักนำให้เกิดรากได้โดย โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงสุดคือ 65 เปอร์เซ็นต์ ที่ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อย้ายต้นที่มีรากสมบูรณ์แล้วออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 90เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ต้นกฤษณา(*Aquilaria*)
2. ภาชนะเครื่องแก้ว
    - 2.1 บีกเกอร์(Beaker)
    - 2.2 ขวดรูปชมพู่(Erlenmeyer flask)
    - 2.3 ปิเปต(Pipette)
    - 2.4 แท่งแก้วคน(Stirrer)
    - 2.5 จานแก้ว(Petri dish)
    - 2.6 กระบอกตวง(Cylinder)
    - 2.7 ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน
    - 2.8 ขวดสีชา
3. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
    - 3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (Balance)
    - 3.2 เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
    - 3.3 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
    - 3.4 เตาไมโครเวฟ (Microwave)
    - 3.5 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
    - 3.6 ตู้เย็น (Refrigerator)
4. มีดผ่าตัดแบบต่างๆ (Knives and Scalpels)
5. ปากคีบ (Forceps)
6. ลูกยาง (Pipette Bulbs)
7. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium Foil)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. เครื่องเขย่าไฟฟ้า (Rotary Shaker)
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11.ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Culture Room)

12.เครื่องมือวัดอุณหภูมิ (Thermometer)

13.เครื่องมือวัดความเข้มแสง (LuxMeter)

14.อุปกรณ์ถ่ายภาพ (Camera)

15.ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)

16.พาราฟิล์ม (Parafilm)

17.อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงต้นกฤษณาในการ Hardening

17.1 ตู้เพาะเลี้ยงโปร่งแสง

17.2 ตาข่ายปรับแสง

17.3 ขวดพ่นละอองน้ำ

18. อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงต้นกฤษณาในเรือนเพาะชำ

18.1 ดินผสมสำหรับปลูก

18.2 ภาชนะสำหรับปลูก

18.3 เรือนเพาะชำบุด้วยมุ้งลวดละเอียด

สารเคมี

1.สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS

2.สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ

คลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์และ โซเดียมไฮโปคลอไรด์

3.สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

- BAP
- IBA

4.อาหารเสริมสำหรับพืช (Fertilizer)

5.สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อโรคและเป็นเชื้อเพลิง

- แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลองและการวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมต้นตอยอดของต้นกฤษณา ในสภาวะปลอดเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดในอาหาร MS ที่มี BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาระดับฮอร์โมน BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยวัดจากความสูง และจำนวนยอดที่ระดับฮอร์โมน BAP ต่างๆ

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาระดับฮอร์โมน IBA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากโดยใช้เทคนิคในการชักนำ 2 ขั้นตอน และวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่ระดับฮอร์โมน IBA ต่างๆ

ขั้นตอนที่ 4 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนที่ 5 สรุปผลการทดลองและนำเสนอ

แผนการดำเนินงาน

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมต้นตอยอดของต้นกฤษณาที่ใช้ในการศึกษา ในสภาวะปลอดเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1 เลี้ยงต้นกฤษณาให้แตกยอดอ่อน

1.2 เตรียมอาหารแข็งสูตร MS เติมฮอร์โมน BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละประมาณ 10 มิลลิลิตร

1.3 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ

-นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้าง (shoot bud and axillary bud)มาล้างให้สะอาด นำมาใส่ในฟลาสก์ที่มีคลอรอกซ์ 10เปอร์เซ็นต์และ tween 1-2 หยด เป็นเวลา 20 นาที

-นำออกจากฟลาสก์ฟอกด้วยแอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 วินาทีในตู้ Lamina air flow

-นำออกมาใส่ใน โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ-กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที

-ตัดแต่งชิ้นส่วนโดยตัดใบแก่ออกให้เหลือเป็นท่อนประมาณ 1 เซ็นติเมตร

-จุ่มใน โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2.5เปอร์เซ็นต์

1.3 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาระดับฮอร์โมน BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยวัดจากความสูงและจำนวน ที่ระดับฮอร์โมน BAP ต่างๆโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 เมื่อกฤษณาในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหาร MS ที่มี ความเข้มข้นของ BAP 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 18 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส

2.2 บันทึกผลการเจริญทุกสัปดาห์ โดยการนับจำนวนยอดและวัดความสูง

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาระดับฮอร์โมน IBA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากโดยใช้เทคนิคในการชักนำ 2 ขั้นตอน

3.1 ย้ายยอดที่มีความยาวประมาณ 2 เซ็นติเมตร ลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง (Half MS) และมีฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 และ 1.0 ทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2 ย้ายลงในอาหาร free MS ที่มี วุ้น 8 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.35 กรัมต่อลิตร และ ฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

3.3 บันทึกผลโดยนับจำนวนจุดกำเนิดรากและความยาวรากทุกสัปดาห์

ขั้นตอนที่ 4 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4.1 เก็บรวบรวมผลการทดลองในขั้นตอน 1-3

4.2 นำข้อมูลผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติแบบวางแผนแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (The Least Significant Different ; LSD)

ขั้นตอนที่ 6 สรุปผลการทดลองและนำเสนอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาระดับฮอร์โมน BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยวัดจากความสูงและจำนวน ที่ระดับฮอร์โมน BAP ต่าง ๆ

เมื่อกฤษณาในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อในขั้นตอนการเตรียมต้นตอของยอดกฤษณาเจริญจนมีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาปลูกถ่ายลงในอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดยอด แสดงอัตราการเจริญเติบโตดังนี้

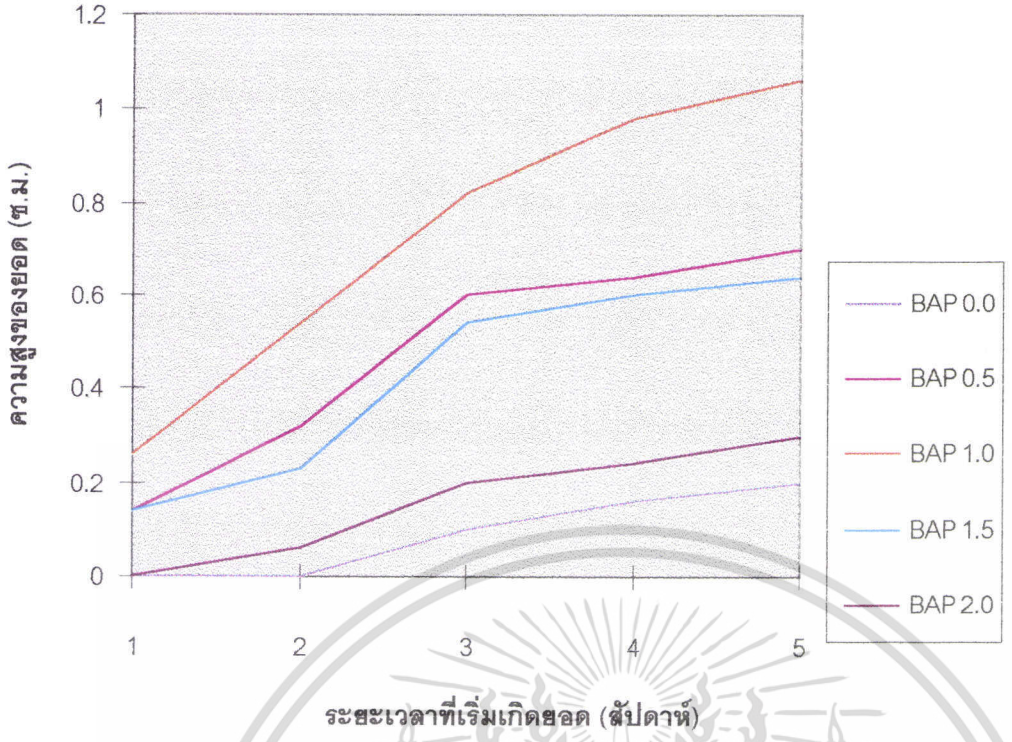
1.1 การศึกษาความสูงของต้นกฤษณาที่ระดับความเข้มข้น BAP ต่างๆ

เมื่อนำต้นตอยอดกฤษณามาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา1 สัปดาห์ ยอดจะมีความสูง เพิ่มขึ้น โดยระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดยอด และความสูงของยอดจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ใช้ จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นฮอร์โมน BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้ยอดมีความสูงมากที่สุด แต่ยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มี BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีลักษณะไม่ยืดยาว เป็นกระจุก และในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน BAP พบว่ายอดจะมีลักษณะเป็นสีเหลือง หงิกงอไม่ยืดยาว เมื่อบันทึกอัตราการเจริญโดยวิธีวัดความสูงของยอด แสดงผลดังตาราง 1 และกราฟรูปที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงความสูงของยอดต้นกฤษณาเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน

เวลา (สัปดาห์)	ความสูงของยอด (ซ.ม.)				
	BAP 0.0	BAP 0.5	BAP 1.0	BAP 1.5	BAP 2.0
1	0.00	0.14	0.26	0.14	0.00
2	0.00	0.32	0.54	0.23	0.06
3	0.10	0.60	0.82	0.54	0.20
4	0.16	0.64	0.98	0.60	0.24
5	0.20	0.70	1.06	0.64	0.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงความสูงของยอดที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ต่างๆ และระยะเวลาที่เริ่มเกิดยอด (สัปดาห์)

1.2ศึกษาจำนวนยอดของต้นกฤษณาในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยการชักนำของฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อนำต้นตอของยอดกฤษณามาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นฮอร์โมน BAP 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าระยะเวลาที่ยอดเริ่มเกิด จะใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ ขึ้นกับความเข้มข้นของ BAP ที่ใช้ จากการทดลอง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน BAP คือ 1.0 จะให้จำนวนยอดมากที่สุดคือ 3 ยอด และยอดที่ได้จะมีลักษณะค่อนข้างอวบ สีเขียว ปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับยอดกฤษณาที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน BAP พบว่ายอดที่ได้มีลักษณะหงิกงอ สีเขียวอมเหลือง และไม่มีการเพิ่มจำนวนยอด จะเพิ่มเพียงความสูงเท่านั้น ที่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลักษณะของยอดที่เกิดจะใกล้เคียงกับยอดที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ฮอร์โมน BAP แต่จะมีอัตราการเพิ่มจำนวนของยอดดีกว่าเพียงเล็กน้อยแสดงผลดังตารางที่ 2 และ รูปที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

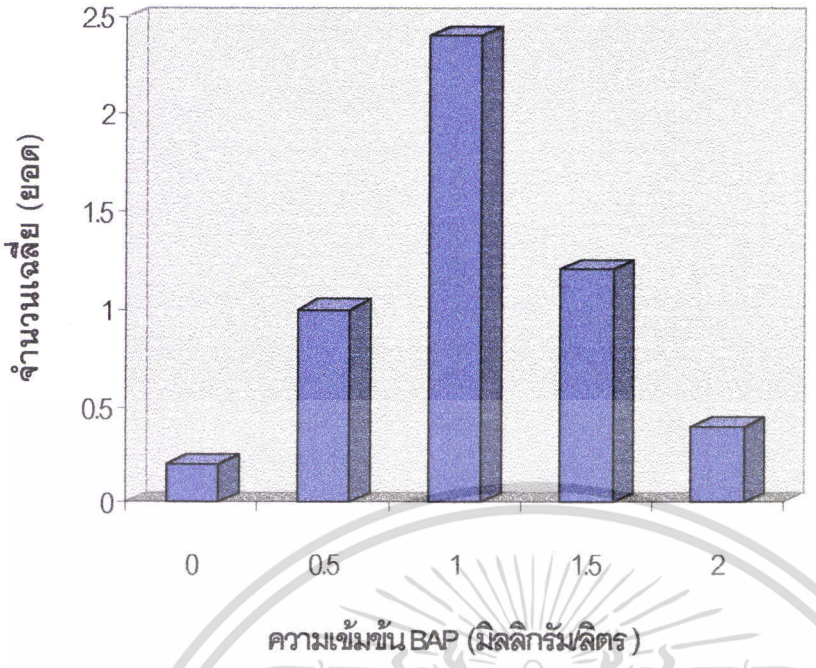
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนยอดโดยเฉลี่ยของต้นกฤษณาที่เจริญโดยการชักนำของฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาที่เริ่มเกิดยอด (สัปดาห์)

ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนยอด					จำนวนยอดเฉลี่ย **	ระยะเวลาการเกิดยอด (สัปดาห์)
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	ชุดที่ 5		
0.0	0	0	0	1	0	0.2	3
0.5	0	1	1	1	2	1.0	3
1.0	1	3	2	3	3	2.4	2
1.5	1	2	0	1	2	1.2	2
2.0	1	0	1	0	0	0.4	3

หมายเหตุ

1. C.V. (สัมประสิทธิ์ความแปรผัน) = 67.99 เปอร์เซ็นต์
2. ** หมายถึง จำนวนยอดที่เกิดขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ที่ใช้ชักนำต่างกัน จะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์
3. ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 0.55
   ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ = 0.80
   จากค่า LSD สรุปได้ว่า จำนวนนยอดที่เจริญในอาหารที่มี BAP 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร จะชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ ความเข้มข้นฮอร์โมน BAP 0.0 , 0.5 , 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ที่ความเข้มข้นของ BAP = 0 และ BAP = 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวนยอดที่เกิดจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยของต้นกฤษณา โดยการชักนำของฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 3 ผลของฮอร์โมน BAP ต่อการนำให้เกิดยอดกฤษณาเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อต้น(ยอด)
0.0	0.20	0.2
0.5	0.70	1.0
1.0	1.06	2.4
1.5	0.64	1.2
2.0	0.30	0.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก ของต้นกฤษณา โดยใช้เทคนิคในการชักนำ 2 ขั้นตอน และวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ในการศึกษาจะทำการย้ายยอดที่เกิดจากขั้นตอนการทำให้เกิดยอดมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ดัดแปลงความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง และเติม IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้ยอดที่จะนำมาชักนำให้เกิดรากปรับสภาพให้เหมาะสมกับอาหารที่ไม่ใส่ธาตุอาหาร MS ที่มีเพียงวุ้น น้ำตาลทราย ผงถ่าน และ ฮอร์โมน IBA เท่านั้น พบว่าฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันจะให้จำนวนรากที่เกิดและเวลาในการเกิดรากต่างกัน ต้นกฤษณาใช้ระยะเวลาในการเกิดราก 4-6 สัปดาห์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ในอาหารที่มี IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสังเกตลักษณะการเกิดราก พบว่าปริมาณส่วนล่างของลำต้นก่อนที่เกิดรากจะโตขึ้นลักษณะเป็นก้อน นูน เรียบ แล้วจึงเกิดตุ่มรากขึ้น ซึ่งขนาดของก้อนนูนนั้นจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IBA ที่เพิ่มขึ้น ส่วนรากที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน IBA จะเกิดจำนวนรากน้อยมากหรือแทบจะไม่เกิดเลย แสดงผลดังตารางที่ 4 และตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนจุดกำเนิดราก เมื่อชักนำโดยฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนจุดกำเนิดราก					จำนวนรากเฉลี่ย *
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	ชุดที่ 5	
0.0	0	1	1	0	0	0.4
0.5	4	2	3	4	3	3.2
1.0	2	2	2	3	2	2.2

หมายเหตุ

1. C.V. (สัมประสิทธิ์ความแปรผัน) = 56.07 เปอร์เซ็นต์
2. * หมายถึง จำนวนจุดกำเนิดรากที่เกิดขึ้นในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA ต่างกันจะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
3. ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 1.0586
   ค่า LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ = 1.7678
   จากค่า LSD สรุปได้ว่า ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA = 0.0 มิลลิกรัม/ลิตร จะ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA = 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงอัตราการเจริญของราก (เปอร์เซ็นต์) เมื่อชักนำโดยฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดกำเนิดราก
0.0	40
0.5	100
1.0	100

ตารางที่ 6 อิทธิพลของฮอร์โมน IBA ในการชักนำให้เกิดรากโดยใช้เทคนิคการชักนำ 2 ขั้นตอนเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดกำเนิดราก	จำนวนจุดกำเนิดรากเฉลี่ยต่อต้น
0.0	40	0.4
0.5	100	3.2
1.0	100	2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการขยายพันธุ์ต้นกฤษณาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของยอดเมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และชักนำด้วยฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราการเจริญของรากเมื่อชักนำด้วยฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มขัน 0.0 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เทคนิคการชักนำ 2 ขั้นตอน ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยการเพาะเลี้ยงตายอดของต้นกฤษณา พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดโดยวัดจากจำนวนยอดเฉลี่ย 2.4 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์และเมื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตจากความสูงของยอด พบว่าอาหารสูตร MS ที่มี BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเช่นเดียวกัน โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

2. จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฮอร์โมน IBA ในการชักนำให้เกิดรากโดยใช้เทคนิคการชักนำ 2 ขั้นตอน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดกำเนิดราก 100 เปอร์เซ็นต์และเมื่อพิจารณาบริเวณราก พบว่าฮอร์โมน IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนจุดกำเนิดรากสูงสุด คือ 3.2 โดยฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มขัน 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับ IBA ที่ระดับความเข้มขัน 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4 แสดงการฟอกฆ่าเชื้อก่อนย้ายลงอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 แสดงการเกิดยอดของต้นตอกฤษณาที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 แสดงการชักนำให้เกิดราก โดยใช้ฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.0 ,0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 ต้นสมบูรณ์ของต้นตอกฤษณาที่เกิดจากการชักนำด้วยฮอร์โมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จินดา ศรศรีวิชัย,**สรีรวิทยาของพืช ภาคการเจริญเติบโตและการควบคุม**.ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,2524 :17-23 .

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ,**กฤษณา**.ชมรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,2537.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์,**ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช**.โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซท,2537 :19-23.

ประศาสตร์ เกื้อมณี,**เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,2536.

พิมล เที่ยงธรรม และ ปรานอม พฤฒพงษ์,**การเพาะเลี้ยงกฤษณาในสภาพปลอดเชื้อ**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 33 สาขาพืชสวน,2538 : 97-102.

สมคิด ศิริพัฒนดิลก. **ไม้กฤษณา**, เอกสารทางวิชาการเล่มที่ 17 ภาควิชาวิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ. 2525:14.

Barlow P.W., Bray D., Green P.B. and Slack. J.M.W., **Hormones as correlative agents** . Developmental and cell Biology series. Department of Botany. The Hebrew University., Israel,1991 : 25-27.

David E. Biblerback. **The effects of hormons upon the development of excise floral bud of Aquileqia**. American J. Bot. 59(5), 1972:525-529.

Evans, Sharp, Aminirato and Yamada.,**Meristem, shoot tip, and Bud Cultures** . Handbook of plant cell culture ., New York,1983 : 205-209.

Hagimori M, Matsumoto T, Mika Y., **Aqric. Biol. Chem.** 48,1984:965-970.

Hasegawa, **In vitro propogation of rose**. Hortscience. 14(5):610-612.

KUO & Tsay, **Regeneration of Poaglas fir Plantlets through tissue culture**. Science 198, 1977:306-307.

Lane, **On the nature of the bud scales in the *Cunoniaceae***. Kew Buw.26, 1979:477-485.

Lundergan and Janick, **Plant cell culture tractical approch**. IRL Press Oxford, 1981:235 P.

Lee, L., R.E. School, H.D. Grime and T.K. Hodgess. **Plant reganaration form indica rice (oryaz sativa L.) Protoplasts**: Planta 178, 1977:325-333.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Nair et. al. **Culture of chestnut Shoots form bud in vitro.** J. HortSci. 55(1), 1979:83-84.

O'Brien, T.P. and McCully M.E., **The Study of Plant Structure, Principles and Selected Methods.** Termacarphi Pty Ltd, Melbourne, Australia. 1981.

Pagne F., Bringl V., Prince C.and Snuler M.L ., **Shoot Cultures .** Plant cell and Tissue culture in liquid systems. Hanser Publisher., USA ,1992 : 284-286.

Pennell, D. (1987). **Microprogation in Horticulture.** Grower Guide No.29, Grower Books, London.

Peter J. Davies ., **Cytokinin Biosynthesis and Metabolism.** Plant Hormones. The Robert Gordon University., Scotland ,1995 : 98-117.

Pierik, R.L.M. , **In vitro culture of higher plants.** Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987.

Prakash, N. , **Methods in Plant Microtechnique,** The University of New England Printery, Armidale. N.S.W. ,1986.

Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.G., **Biology of Plants,** Fourth edition, Worth Publishers Inc, New York, 1986.

Ridge, I. , **Plant Physiology.** Publisher Hodder and Stoughton. The Open University, 1991.

Riopel, J.L. , **Experiments in developmental botany,** Dubuque, Iowa, 1973.

Salisbury, F. and Ross, C. , **Plant Phydiology,** 4th edition, Wadsworth, London, 1992.

Schenk, R.V. and Hildebrant, A.C., **Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.** Can. J. Bot. 50, 1972 :199-204.

Skoog, F. and Miller, C.O., **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro.** Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 1957: 118-131.

Sweet, H.C. and Bolton, W.E., **The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings.** Amer. J. Bot. 66, 1977: 692-698.

Taji, Acram and Williams, R.R., **Recovering infested shoot cultures.** Aust. Hort. 88(5) ,1990 : 58-61.

Taji, Acram and Williams, R.R. , **Propagation of some Australian plants by tissue culture.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aust. Hort. 88(9) ,1990: 89-92.

Taji, Acram and Williams, Richard. **Propagation of some Australian Ferns via tissue culture.** Aust. Hort. 89(2) ,1991: 99-101.

Thomas, E. and Davey, M.R., **From single cells to plants.** Wykenham Publications (London) Ltd. ,1975.

Thorpe, T.A. (ed.) , **Plant tissue culture - methods and applications in agriculture.** Academic Press, New York,1981.

Torres, K.C., **Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops.** Van Nostrand Reinhold, New York, 1989.

Weier, T.E., Stocking, C.R. and Barbour, M.G., **Botany: An Introduction to Plant Biology,** 5th edition. John Wiley and Sons, Sydney, London, New York, 1974.

White, P.R., **The cultivation of animal and plant cells,** 2nd edition. The Ranald Press Co.,New York,1963.

Williams, Richard R., Taji, Acram M, and Bolton, Janet A. , **In vitro propagation of Dampiera diversifolia and Prostanthera rotundifolia.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3, 1984: 273-281.

Williams, Richard R., Taji, Acram M, and Bolton, Janet A., **Specificity and interaction among auxins, light and pH in rooting of Australian woody species in vitro.** HortScience 20 (6), 1985: 1052-1053.

Williams, Richard R. and Taji, Acram M., **Effects of temperature, darkness and Gelrite on long-term storage of Australian woody plant species.** Plants, Cell, Tissue and Organ Culture 11(2), 1987: 151-156.

Williams, Richard R. and Taji, Acram M. , **Effects of auxin type and gelling agent concentration on rooting and survival of Cheiranthera volubilis plants propagated in vitro.** HortScience 24, 1989: 305-307.

Williams, Richard R., Taji, Acram M. and Winney, Kelly A. , **The effect of Plilotus tissue on pH of in vitro media.** Plant Cell Tissue and Organ Culture 22, 1990: 153-158.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Williams, R.R. , **Mineral nutrition in vitro - a mechanistic approach.** Aust. J. Bot. 41(2), 1993: 237-251.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Media preparation)

สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog(1992) หรือสูตร MS โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น ดังตาราง

ตารางที่ 7 แสดงสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog(1992)

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	
	KH_2PO_4	34000	200	
	KI	166	200	5
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	50	200	
	$CoCl_2.6H_2O$	5	200	
4	$CaC_2I.2H_2O$	88000	200	5
5	$MgSO_4.7H_2O$	74000	200	
	$MnSO_4.4H_2O$	4450	200	5
	$ZnSO_4.7H_2O$	1720	200	
	$CuSo_4.5H_2O$	5	200	
6	Na_2EDTA	7450	200	5
	$FeSO_4.7H_2O$	5570	200	
7	glycine	400	200	
	nicotinic acid	100	200	5
	pyridoxine-HCl	100	200	
	thiamine-HCl	20	200	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 ดูดเอาสารละลายออกจาก Stock ต่างๆมารวมกันโดยใช้ปริมาณในแต่ละ Stock ตามที่ได้คำนวณไว้

ขั้นที่ 2 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbom source) ซึ่งก็คือน้ำตาล

ขั้นที่ 3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่น ๆ

ขั้นที่ 4 ปรับปริมาตรให้ครบตามปริมาณที่ต้องการ

ขั้นที่ 5 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้เกลือ (Hcl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (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 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ปล่อยอาหารไว้ให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายเป็น PPM (Part per millon)

1 ppm หมายถึง ในปริมาตรสารละลาย 1 ล้านส่วน มีปริมาณเนื้อสารอยู่ 1 ส่วน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตัวอย่าง ต้องการสารละลาย IAA ความเข้มข้น 100 PPM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม 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

การเตรียมสารละลายเป็นปอร์เซ็นต์

สารละลายเป็นเปอร์เซ็นต์หมายถึง ปริมาณส่วนเนื้อในสารละลาย 100 ส่วน

ตัวอย่าง ต้องการเตรียม HCl 10เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ในสารละลาย 100 มล. มี Hcl อยู่ 10 มิลลิลิตร

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

ฉะนั้นต้องใช้ Hcl ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบปริมาตร 500มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้