สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์วานิลา

THE INCREASE EFFICIENCY FOR REGENERATION OF *VANILLA* SPECIES

T117358

นาย ณัฐวุฒิ ไชยวิรุณรักษ์

นาย พัฒนพล เงือจันทร์

นาย พีรพัฒน์ สิริวันต์

เลขหมู่.........
เลขทะเบียน 117358
วัน.เดือน.ปี 20 ก.ค. 2554

b. 12340118
i...................

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE INCREASE EFFICIENCY FOR REGENERATION OF *VANILLA* SPECIES

NUTTAWUT CHAIWIRUNRAK
PATTANAPON JUAJUN
PEERAPAT SIRIWAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกา... อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์วานิลา
	The increase efficiency for regeneration of *Vanilla* sp.
ชื่อนักศึกษา	นาย ณัฐวุฒิ ไชยวิรุณรักษ์
	นาย พัฒนพล เจือจันทร์
	นาย พีรพัฒน์ สิริวันต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม (ประธานกรรมการ)	สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม (กรรมการ)	
อาจารย์ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ (กรรมการ)	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์วานิลา
	The increase efficiency for regeneration of *Vanilla* species
ชื่อนักศึกษา	นาย ณัฐวุฒิ ไชยวิรุณรักษ์
	นาย พัฒนพล เจือจันทร์
	นาย พีรพัฒน์ สิริวันต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ

บทคัดย่อ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Vanilla planifolia* พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตร สามารถเร่งการเจริญเติบโตของยอดได้ดีที่สุด คือ มีความยาวของยอดที่เกิดขึ้นทั้งหมด 106.38 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 17.73 มิลลิเมตร ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *V. pilifera* พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตร สามารถเร่งการเจริญเติบโตของยอดได้ดีที่สุด คือ มีความยาวของยอดที่เกิดขึ้นทั้งหมด 54.96 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 13.74 มิลลิเมตร ในการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของ *V. pilifera* สามารถชักนำให้ได้จำนวนยอดที่มากและทำให้ยอดมีความยาวดีที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นทั้งหมด 11 ยอด คิดเป็นจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 1.83 ยอด และมีความยาวของยอดทั้งหมด 19.83 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ย 1.80 มิลลิเมตร ส่วนการนำส่วนข้อและส่วนใบของ *V. planifolia* มาทำการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ส่วนข้อเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด และสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของใบเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด ในอาหารเหลวสูตร MS พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนของข้อพัฒนากลายเป็นชิ้นส่วนของยอดและราก ส่วนในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถเร่งการเจริญเติบโตของรากได้ดีที่สุด คือ มีความยาวของรากที่เกิดขึ้นทั้งหมด 1,083 มิลลิเมตร คิดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 54.16 มิลลิเมตร และสูตรอาหาร ½ MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดคือ มีจำนวนรากเกิดขึ้นทั้งหมด 44 ราก คิดเป็นจำนวนรากเฉลี่ย 2.20 ราก ส่วนการศึกษาหาเวลาและความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของวานิลาเมื่อทำการแช่ในสารโคลชิซิน พบว่ายอดของ *V. planifolia* ที่แช่อยู่ในโคลชิซินเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร โดยทำการเลี้ยงร่วมกับอาหารเหลวสูตร MS ตั้งแต่ระยะเวลามากกว่า 3 วันขึ้นไป ยอดของวานิลาจะตาย เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์

คำสำคัญ : วานิลา, แคลลัส, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, โคลชิซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title The increase efficiency for regeneration of *Vanilla* species

Students Mr. Nuttawut Chaiwirunrak

Mr. Pattanapon Juajun

Mr. Peerapat Siriwan

Degree Bachelor of Science

Major Program Biotechnology

Academic Year 2010

Advisor Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Co-Advisor Mr. Tasanard Krajundwut

ABSTRACT

Tissue culture of *V. planifoila* on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP combination with 150 ml/l of coconut juice gave the best result of growth. The longest length of shoot was 105.38 mm and average of length was 17.73 mm and tissue culture *V. pilifera,* using MS medium supplemented with 1 mg/l BAP combination with 150 ml of coconut juice, the longest length of its shoot, dedicating the best growth in this experiment, was 54.96 mm and average length 13.74 mm. Tissue culture *V. pilifera* from part of node gave the best result in term of shoot induction and longest length of its shoot when it was done on MS medium supplemented with 1 mg/l BAP combination with 0.5 mg/l IBA and combination with 0.5 mg/l GA_3. The total shoot was 11 shoot and average number of shoot was 1.83 shoots, total length of shoot was 19.83 mm and average length was 1.80 mm. When part of node of *V. planifolia* was used to induce callus, it was found that MS medium supplemented with 0.1 mg/l. NAA and combination with 0.01 mg/l TDZ give the best result. When part of leaf was used to induce callus, MS medium supplemented with 0.1 mg/l NAA and 0.5 mg/l TDZ gave the best result. It was also found during tissue culture with part of node of *V. planifolia* on MS liquid medium that part of node was also induced and developed to shoot and root. In tissue culture of *V. planifolia* in MS medium, without growth hormone, it was found that root was best developed. The total length of root was 1,083 mm and average length was 54.16 mm. ½ MS medium can induce number of total root was

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

44 roots and average 2.20 roots per plant. During the study of survival rate that when part of *V. planifolia* shoot was soaked in liquid MS medium with colchcine concentration 1.5 % D/V more than 3 days, shoots will die after 3 weeks.

Keywords : Vanilla, Callus, Tissue culture, Colchicine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาได้ให้คำแนะนำช่วยเหลือชี้แนะปรับปรุงแก้ไขในข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดมาจนโครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงสมความปรารถนา และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่ให้ทั้งคำแนะนำ ตรวจสอบ ชี้แนะในการแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความเรียบร้อยและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และผู้จัดทำโครงงานพิเศษขอขอบพระคุณ อาจารย์ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ ที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนตัวอย่างของพรรณไม้ที่นำมาทดลองและคอยให้คำปรึกษาต่างๆ รวมถึงบิดา มารดา และบรรดาเพื่อนๆ ร่วมชั้นทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนช่วยเหลือในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจหรือผู้ที่ต้องการค้นคว้าและศึกษางานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกันกับผลการวิจัยในโครงงานนี้ไม่มากก็น้อย

นาย ณัฐวุฒิ ไชยวิรุณรักษ์
นาย พัฒนพล เจือจันทร์
นาย พีรพัฒน์ สิริวันต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎี และหลักการ	3
2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับวานิลา (*Vanilla* sp.)	3
2.1.1 *Vanilla pilifera*	4
2.1.2 *Vanilla planifolia*	5
2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืช	6
2.2.1 ออกซิน (Auxin)	6
2.2.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin)	6
2.2.3 จิบเบอเรลลิน (Gibberellin)	7
2.2.4 ไทเดียซูรอน (Thidiazuron)	7
2.3 โคลชิซินและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร โคลชิซิน	8
2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	10
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย	14
3.1 พืชที่นำมาใช้ในการศึกษา	14
3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	14
3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
3.2.2 สารเคมี	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.3 วิธีการทดลอง	16
3.3.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเร่งการเจริญเติบโตของยอด	16
3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำตาข้างให้เกิดยอดจำนวนมากและเพิ่มการเจริญของยอด	16
3.3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการยืดยาวของราก	18
3.3.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส	19
3.3.5 การศึกษาหาเวลาและความเข้มข้นของสาร โคลชิซินที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของพืช	21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	22
4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเร่งการเจริญเติบโตของยอด	22
4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำตาข้างให้เกิดยอดจำนวนมากและเพิ่มการเจริญของยอด	29
4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการยืดยาวของราก	32
4.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส	35
4.5 ผลการศึกษาหาเวลาและความเข้มข้นของสาร โคลชิซินที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของพืช	38
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	สูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ โดยแยกเป็น 14 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – N ตามลำดับ	17
3.2	สูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกเป็น 5 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – E ตามลำดับ	18
3.3	สูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสูตรอาหาร MS ที่ลดปริมาณของสารอาหารลงครึ่งหนึ่ง (½MS) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกเป็น 6 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – F ตามลำดับ	19
3.4	สูตรอาหารแข็งสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA กับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA กับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกเป็น 20 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – T ตามลำดับ	20
4.1	แสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. planifolia* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรต่างๆในระยะเวลา 7 สัปดาห์	24
4.2	แสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. pilifera* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรต่างๆ ในระยะเวลา 7 สัปดาห์	26
4.3	แสดงความยาวของยอด *V. pilifera* และจำนวนของยอดที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตรต่างๆ ภายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์	31
4.4	จำนวนการเกิดของรากและความยาวของรากจากการเพาะเลี้ยง *V. planifolia* บนอาหารสูตรต่างๆ ภายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์	32
4.5	ผลของการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อในอาหารสูตรต่างๆ ภายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะของ *Vanilla pilifera*	4
2.2	แสดงลักษณะของ *Vanilla planifolia*	5
2.3	โครงสร้างของสาร Gibberellin A3 (GA_3)	7
2.4	โครงสร้างของสาร ไทเดียซูรอน (Thidiazuron)	8
2.5	โครงสร้างของสารโคลชิซิน	8
4.1	ลักษณะขนาดของยอด *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ	23
4.2	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. planifolia* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 สัปดาห์	23
4.3	ลักษณะของยอด *V. planifolia* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ	25
4.4	ลักษณะของยอด *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ	27
4.5	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 สัปดาห์	28
4.6	ลักษณะส่วนข้อในบริเวณที่มีตาข้างของ *V. pilifera* ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ	29
4.7	แสดงการพัฒนาจากตาข้างไปเป็นยอดของ *V. pilifera* บนการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ	30
4.8	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์	31
4.9	ลักษณะของส่วนข้อ *V. planifolia* ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง	33
4.10	แสดงการเจริญเติบโตของรากที่เกิดขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.11 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากที่เกิดขึ้นในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ 34

4.12 ลักษณะของชิ้นส่วนของใบที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร E 35

4.13 ลักษณะของชิ้นส่วนของข้อที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 36

4.14 ลักษณะของชิ้นส่วนของใบและข้อที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นชิ้นส่วนต่างๆของพืชเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร O 36

4.15 แสดงลักษณะของยอด *V. planifolia* ที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินที่ระยะเวลาและความเข้มข้นต่างๆ 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

วานิลา เป็นพืชเถาไม้เลื้อยจัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้สายพันธุ์หนึ่ง มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปอเมริกากลางบริเวณประเทศเม็กซิโก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Vanilla fargrans* (Salish) Ames กล้วยไม้วานิลานี้พบว่ามีทั้งสิ้น 110 สายพันธุ์ มีการพบในประเทศไทยมี 5 สายพันธุ์คือ *V. siamensis* (พลูช้าง, ตองผา), *V. albida* (เอาะลบ), *V. pilifera* (สามร้อยต่อใหญ่, งด), *V. aphylla* (เถางูเขียว) และ *V. griffithii* (พลูนรา) (http://www.suanlukchan.com/discussion.php?suan_chan-ruean_id=38)

วานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* นิยมนำมาปลูกในทางการค้าเพราะเป็นพันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตคือฝักได้มากและมีคุณภาพของฝักที่ดีที่สุดซึ่งสารที่ผลิตขึ้นในฝักคือสารกลูโควานิลลิน (glucovanillin) สามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารให้กลิ่นในอุตสาหกรรมอาหาร (Goodenough, 1982) เช่น ไอศครีม เค้ก ลูกกวาด รวมไปทั้งอุตสาหกรรมยา น้ำหอม และเครื่องสำอาง ซึ่งล้วนแต่มีคุณค่าทางการค้าทั้งสิ้น (Hocking, 1997) แต่เนื่องจากกล้วยไม้สายพันธุ์วานิลานี้มีให้ผลผลิตของฝักที่น้อยและใช้เวลาที่นานในการเกิดฝักอีกทั้งมีการเจริญเติบโตของต้นในอัตราที่ต่ำทำให้จึงต้องมีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ของวานิลาเพื่อทำการคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตคือให้ฝักในปริมาณที่มากที่สุดและใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่ลดน้อยลงกว่าที่เป็นอยู่ ซึ่งวิธีการทางชีววิทยาประยุกต์ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของวานิลาได้ ซึ่งมีวิธีการหนึ่งคือการทำการเพิ่มจำนวนของชุดโครโมโซม (double chromosome) ของต้นวานิลาโดยใช้สารโคลชิซินซึ่งมีความสามารถในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของชุดโครโมโซมในต้นพืช เป็นสารชักนำให้เกิดการเพิ่มของจำนวนชุดโครโมโซมในต้นวานิลา ซึ่งการที่ต้นพืชมีจำนวนของชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นก็จะมีผลทำให้ลักษณะต่างๆของต้นพืช เช่น ลักษณะของใบ, ลำต้น หรือดอก เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้สามารถคัดเลือกต้นพืชที่มีคุณสมบัติในด้านต่างๆที่ดีที่สุด และทำให้ได้สายพันธุ์ของวานิลาที่มีความสามารถในการผลิตฝักที่ดีที่สุด และสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตของสารสกัดกลูโควานิลลินเพื่อตอบสนองต่อความต้องการในการบริโภคสารสกัดนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำการเจริญเติบโตของยอดในวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และสายพันธุ์ *V. pilifera*

1.2.2 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเร่งการยืดยาวของรากของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia*

1.2.3 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้วานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* เกิดการเพิ่มจำนวนของยอดและเร่งการเจริญเติบโตของยอดได้ดีที่สุด

1.2.4 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia*

1.2.5 เพื่อศึกษาผลของเวลาและความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถนำความรู้ที่ได้จากการทำโครงงานนี้ไปใช้ในพัฒนาพืชสายพันธุ์อื่นได้

1.3.2 ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำการยืดยาวของต้นวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera*

1.3.3 ทำให้ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญของยอดและราก

1.3.4 ทำให้ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับวานิลา (*Vanilla* sp.)

วานิลา (Vanilla) เป็นพืชจัดอยู่ในตระกูลกล้วยไม้ (Orchidaceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vanilla fargrans* (Salish) Ames เป็นพืชเครื่องเทศที่มีการใช้ประโยชน์โดยการนำผักมาหมักและบ่มให้เกิดกลิ่นจากนั้นนำไปสกัดสารที่ให้กลิ่นและรสชาตินำมาปรุงแต่งรสอาหาร โดยเฉพาะไอศครีม ช็อกโกแลต ขนมหวาน และลูกกวาด นอกจากนี้ ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาและน้ำหอมด้วย วานิลาเป็นพืชเถาเลื้อยอายุการให้ผลผลิตหลายปีโดยเถาจะเลื้อยพันไปบนค้างหรือไม้ยืนต้นอื่นๆ โดยอาศัยรากเป็นตัวยึดเกาะลำต้นจะมีลักษณะเป็นเถายาวสีเขียวอวบน้ำขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเถาเมื่อโค้งงอจะหักง่ายมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 - 2 เซนติเมตร ปล้องมีความยาว 5 - 15 เซนติเมตร ใบจะมีลักษณะแบน อวบน้ำใบกว้าง ปลายใบเรียว ก้านใบสั้น รากจะมีสีเขียวเป็นรากอากาศค่อนข้างยาว รากแตกออกตรงข้ามกับใบรากบริเวณโคนจะแตกออกมาเป็นแขนง ช่อดอกจะออกจากตรงซอกใบ ไม่มีก้านช่อดอกแตกออกไป แต่ละต้นมีประมาณ 4 ช่อดอก แต่ละช่อจะมีดอกเฉลี่ย 15 ดอก ดอกไม่เป็นที่ดึงดูดของแมลงจึงต้องมีการช่วยในการผสมเกสร ดอกวานิลาจะมีสีเหลืองอมเขียวกลีบดอกหนา ดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นหรือแทบไม่มี ฝักจะมีลักษณะคล้ายทรงกระบอกแคบ โป่งตรงปลายฝัก มี 3 มุม ฝักยาว 9.5 - 14.5 เซนติเมตร ยาว 1.2 - 1.4 เซนติเมตร โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษา 2 สายพันธุ์ คือ *Vanilla pilifera* และ *Vanilla planifolia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 *Vanilla pilifera*

มีชื่ออีกอย่างหนึ่งว่าต้นสามร้อยต่อใหญ่ จัดเป็นพืชที่ค่อนข้างหาชมได้ยาก ลักษณะลำต้นและใบคล้ายกับเอาะลบ ต่างกันตรงที่บริเวณข้อคอดกิ่ว จึงดูเหมือนลำต้นต่อกันเป็นท่อนๆ อันเป็นที่มาของชื่อสามร้อยต่อใหญ่ ออกดอกช่วงฤดูร้อนดอกมีสีเขียว ยกเว้นส่วนกลีบปากสีชมพูสวยงามมาก (รูปที่ 2.1) ก่อนหน้านี้เคยมีรายงานกล่าวไว้ว่าพบที่จังหวัดปราจีนบุรี และที่เขาขั้นบันได จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ ปัจจุบันแหล่งที่พบกล้วยไม้หายากชนิดนี้ได้คือบริเวณเส้นทางไปเขาปะการัง ตรงกิโลเมตรที่ 15 บ้านกร่างแคมป์ ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี (http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43)

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของ *Vanilla pilifera*

(ที่มา http://www.nationaalherbarium.nl/pubs/orchidweb/genera/Vanilla/Vanilla.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 *Vanilla planifolia*

มีการปลูกแถบตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเม็กซิโก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vanilla planifolia* Andrew หรือ *Vanilla fargrans* (Salish) Ames ลำต้นมีลักษณะเป็นเถายาวสีเขียว อวบน้ำ ขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเถา เมื่อโค้งงอจะหักง่าย ใบมีลักษณะแบน อวบน้ำใบกว้าง ปลายใบเรียว ก้านใบสั้น ช่อดอกออกจากซอกใบ ไม่มีก้านช่อดอก รากมีสีเขียว เป็นรากอากาศค่อนข้างยาว รากแตกออกตรงข้ามกับใบรากบริเวณโคนจะแตกออกมาเป็นแขนง ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (รูปที่ 2.2)

(http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43)

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของ *Vanilla planifolia*

(ที่มา: http://www.amadeusvanillabeans.com/pictures/vanilla-planifolia.asp)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืช

2.2.1 ออกซิน (Auxin)

ออกซิน (Auxin) เป็นกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่กระตุ้นการเจริญเติบโต ทำให้มีการแบ่งเซลล์และยืดตัวของเซลล์ การขนส่งออกซินภายในพืชเป็นการขนส่งอย่างมีทิศทาง ออกซินเป็นฮอร์โมนที่แพร่กระจายทั่วไปในพืช มีเข้มข้นสูงที่เนื้อเยื่อเจริญ ตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ออกซินได้แก่เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดและปลายราก ใบอ่อน ช่อดอกที่กำลังเจริญ เมล็ดที่กำลังงอกเอ็มบริโอและผลที่กำลังเจริญ การสังเคราะห์ออกซินเกิดในเนื้อเยื่อที่มีอายุมากน้อยหรือไม่มีเลย สารตั้งต้นของการสังเคราะห์ออกซินในพืช คือกรดอะมิโนทริปโตแฟน (Trytophan) ออกซินที่พืชสร้างขึ้นมีสองแบบคือแบบอิสระ สามารถเคลื่อนที่ได้ดี กับอีกแบบหนึ่งเป็นแบบที่จับอยู่กับสารอื่นๆ ทำให้เคลื่อนที่ได้น้อยหรือไม่ออกฤทธิ์ ซึ่งมีทั้งพวกที่พืชสามารถสร้างขึ้นได้เองตามธรรมชาติและพวกที่มีการสังเคราะห์ขึ้น เช่น กรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acetic acid : IAA) ที่พืชสร้างขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ส่วนพวกที่สังเคราะห์ขึ้นเช่น กรดแอลฟาแนพทาลีนอะซิติก (α-napthalene acetic acid), กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), กรดอินโดล-3-บิวทีริก (3-idole butyric acid) (วันทนี, 2542)

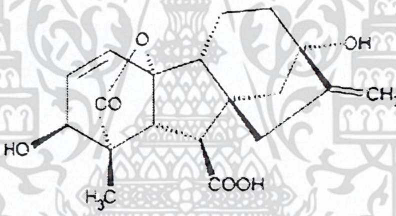
2.2.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin)

ไซโตไคนิน (Cytokinin) เป็นกลุ่มของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นอนุพันธ์ของอะ-ดีนีนโดยมีโซ่ข้างมาเชื่อมต่อกับเบสที่ตำแหน่ง N6 ไซโตไคนินแบ่งได้เป็นสองชนิดตามชนิดของโซ่ข้างคือ ไอโซพรีนอยด์ ไซโตไคนิน (Isoprenoid cytokinin) มีโซ่ข้างเป็นสารกลุ่มไอโซพรีน กับ อะโรมาติก ไซโตไคนิน (Aromatic cytokinin) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการขยายตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืช นอกจากนั้นยังควบคุมกระบวนการที่สำคัญต่างๆในการเจริญและพัฒนาการของพืช ได้แก่ 6- เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine) หรือไคนีทีน (kinetin), 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine) หรือ BAP, 2-ไอโซเพนทินิลอะมิโนเพียวรีน (2-isopentenylaminopurine) หรือ 2 iP, ซีเอทิน (zeatin) หรือ 6-(4-ไฮดรอกซี-3-เมทิล-ทราน-2-บิวทีนิวอะมิโน) เพียวรีน (6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenyiamino) purine) หรือเรียกย่อๆว่า zea (วันทนี, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 จิบเบอเรลลิน (Gibberellin)

จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ บทบาททางสรีรวิทยาที่สำคัญของจิบเบอเรลลิน คือช่วยเพิ่มความสูงของพืชที่เกิดจากการยืดตัวของข้อ การค้นพบจิบเบอเรลลินเริ่มจากการศึกษาต้นข้าวที่เป็นโรค Bakanae ซึ่งมีลักษณะสูง ผอม เกิดจากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ พ.ศ. 2471 เมื่อสกัดสารที่เชื้อรานี้สร้างขึ้นไปทดสอบกับพืชชนิดอื่น พบว่าทำให้พืชนั้นๆมีอาการอย่างเดียวกันคือต้นผอม สูง จึงตั้งชื่อสารที่พบนี้ว่าจิบเบอเรลลิน สารที่พบชนิดแรกตั้งชื่อว่าจิบเบอเรลลินเอ ต่อมามีการพบอนุพันธ์ของกรดจิบเบอเรลลิกจากราอีกหลายชนิด การสกัดสารจิบเบอเรลลินจากพืชทำได้สำเร็จครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2511 โดยแยกได้จากเมล็ดถั่วในปริมาณที่ต่ำมาก ปัจจุบันค้นพบจิบเบอเรลลินแล้ว 89 ชนิด มีการผลิตเชิงการค้าเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ กรดจิบเบอเรลลิก (หรือ Gibberellin A3, GA, และ GA_3) เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มจิบเบอเรลลิน สูตรโครงสร้างคือ $C_{19}H_{22}O_6$ (รูปที่ 2.3) ในรูปบริสุทธิ์เป็นผงสีขาวหรือเหลืองละลายในเอทานอลและละลายในน้ำได้เล็กน้อย (วันทนี, 2542)



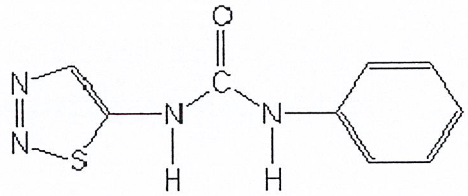
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสาร Gibberellin A3 (GA_3)

(ที่มา: http://th.wikipedia.org/wiki/Indole-3-butyric_acid)

2.2.4 ไทเดียซูรอน (Thidiazuron, TDZ)

ไทเดียซูรอน (Thidiazuron, TDZ) มีชื่อเต็มว่า N-phenyl-N’-1,2,3-thidiazol-5- yl urea (รูปที่ 2.4) เป็นสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ใกล้เคียงกับไซโตไคนิน และนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างกว้างขวาง TDZ เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในเอทานอล TDZ กระตุ้นให้พืชหลายชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาได้ดี แม้ว่าจะใช้ในปริมาณต่ำหรือพืชชนิดนั้นจะตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆได้น้อย เช่นในกลุ่มของไม้เนื้อแข็ง (วราภรณ์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

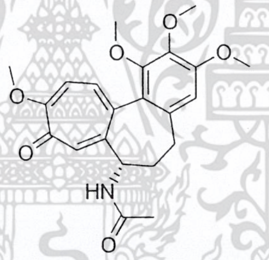


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสาร ไทเดียซูรอน (Thidiazuron, TDZ)

(ที่มา: http://www.alanwood.net/pesticides/thidiazuron.html)

2.3 โคลชิซินและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารโคลชิซิน

โคลชิซีน (Colchicine) เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (รูปที่ 2.5) พบมากในดองดึง ในทางการแพทย์นำมาใช้รักษาโรคเกาต์ ไขข้ออักเสบ ส่วนในทางด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช นำมาใช้ในการเพิ่มชุดโครโมโซมของพืชเพราะมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ระหว่างการแบ่งนิวเคลียส ทำให้โครโมโซมไม่แยกตัว (บุญยืน, 2551)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของสารโคลชิซีน (N-[(7*S*)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo [*a*] heptalen-7-yl] acetamide , $C_{22}H_{25}NO_6$)

(ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine)

การทำการเพิ่มจำนวนของชุดโครโมโซม (double chromosome) ของต้นวานิลาโดยใช้สารโคลชิซีน ที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของชุดโครโมโซมในต้นพืชเป็นสารชักนำให้เกิดการเพิ่มของจำนวนชุดโครโมโซมในต้นวานิลา ซึ่งการที่ต้นพืชมีจำนวนของชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นก็จะมีผลทำให้ลักษณะต่างๆของต้นพืชเช่น ลักษณะของใบ, ลำต้น หรือ ดอกเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้สามารถคัดเลือกต้นพืชที่มีคุณสมบัติในด้านต่างๆที่ดีที่สุด

Griesbach (1981) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดของกล้วยไม้สายพันธุ์ *Phalaenopsis equestris*, *Phalaenopsis fasciata* และ *Phalaenopsis Betty Hausermann* มีอายุประมาณ 4 - 5 เดือนซึ่งจะนำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลาย Chlorox ที่เจือจางแล้วมีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเลี้ยง บนอาหารที่เติม NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bactopeptone 2 กรัมต่อลิตร pH 5.2 หลักจากที่เมล็ดงอกแล้ว นำส่วนของ protocrom 50 ตัวอย่าง ย้ายลงไปยังอาหารเหลวปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งใส่สารโคลชิซินลงไป 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน โดยเขย่าที่ที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งที่ไม่มีโคลชิซินและมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆเดือน จากนั้นนำไปตรวจการเกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซม พบว่ามีตัวอย่าง protocrom ที่มีการเพิ่มชุดของจำนวนโครโมโซมแบบ tetraploids จำนวน 50 เปอร์เซ็นต์

ชยานิจ และคณะ (2008) ทำการเพาะเลี้ยงตาข้างดาหลาพันธุ์บัวแดงใหญ่, พันธุ์แดงอินโด และพันธุ์บานเย็น บนอาหารที่เติม BA 20 - 30 ไมโครโมลาร์ นำยอดอ่อนมาเพิ่มปริมาณและเลี้ยงร่วมกับโคลชิซินความเข้มข้น 0.03, 0.06 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร นาน 1, 2 และ 3 วัน พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของยอดอ่อนลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้น และระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกันนานขึ้น การใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.09 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร กับดาหลาทั้ง 3 พันธุ์ทำให้หน่ออ่อนตายทั้งหมด เมื่อทำการวัดระดับชุดของโครโมโซมจากใบของต้นอ่อนในรุ่น M1V2 ที่ผ่านการใช้โคลชิซินเข้มข้น 0.03 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร โดยวิธี flow cytometry พบว่าดาหลาทั้ง 3 พันธุ์มีโครโมโซมเป็น mixoploid ต่อจากนั้นนำต้นอ่อนที่มีปริมาณนิวเคลียส ในขอบเขตชุดโครโมโซมที่ 4n ที่มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ที่วัดได้จากเครื่อง flow cytometer ไปขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณจนถึงรุ่น M1V4 แล้วนำไปวัดระดับชุดโครโมโซมอีกครั้ง เพื่อคัดเลือกต้น tetraploid พบว่าพันธุ์บัวแดงใหญ่มีระดับชุดโครโมโซมเป็น 4n (tetraploid) จำนวน 5 ต้นจากการใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร นาน 2 และ 3 วัน ส่วนพันธุ์บานเย็นและแดงอินโดยังคงมีจำนวนโครโมโซมเป็น mixoploid ไม่สามารถคัดเลือกต้นที่เป็น tetraploid ได้

จักรกฤษณ์ และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารโคลชิซิน ในข้าวโพดหวาน ผักกาดขาวปลี คะน้า และหอมแดง ผลปรากฏว่าสารโคลชิซินไม่สามารถชักนำให้เกิด Polyploid ที่มีลักษณะดีเด่นกว่าพันธุ์เดิมในข้าวโพดหวาน และผักกาดขาวปลี แต่สามารถชักนำให้เกิด Polyploid ที่มีลักษณะดีเด่นได้ในผักคะน้าและหอมแดง จากผลการทดลองในข้าวโพดหวานพบว่า ต้นข้าวโพดหวานที่เกิดจากเมล็ดที่ถูกแช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 - 6 ชั่วโมง จะให้ต้นข้าวโพดหวานที่เจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ใบขนาดเล็กกว่า ฝักขนาดเล็กกว่า จำนวนฝักต่อต้นน้อยกว่า ลำต้นเตี้ยกว่า และระยะเวลาที่ใช้ในการออกดอกช้ากว่าต้นปกติ (Diploid) ที่เมล็ดไม่ผ่านการแช่สารโคลชิซิน โดยจำนวนโครโมโซมข้าวโพดหวาน 2n = 2x = 20 จากผลการทดลองในผักกาดขาวปลี ผลปรากฏว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินที่ 0.25 เปอร์เซ็นต์ แช่เมล็ดผักกาดขาวปลีนาน 6 ชั่วโมง จะมีอัตราการรอดชีวิต 7 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเข้นข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่เมล็ดนาน 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการรอดชีวิตจะเป็นศูนย์ เนื่องจากว่าอัตราการรอดชีวิตต่ำมาก โอกาสที่จะพบต้นที่กลายพันธุ์จึงมีน้อยลงไปด้วย การทดลองในผักกาดขาวปลีจึงไม่พบต้นที่กลายพันธุ์ หากตรวจนับจำนวนโครโมโซม ของผักกาดขาวปลีแล้วจะพบว่า 2n = 2x = 20 จากผลการทดลองในผักคะน้าพบว่าสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สำเร็จโดยใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่เมล็ดนาน 24 ชั่วโมง จะได้ต้น Polyploid ที่มีลักษณะดีเด่นกว่าต้นปกติ (Diploid) ที่ไม่แช่สารโคลชิซิน คือ ใบจะมีสีเขียวเข้มกว่า ขนาดใบใหญ่กว่า จำนวนใบต่อต้นมากกว่าปกติ และออกดอกช้ากว่าปกติแต่สามารถติดเมล็ดได้ จำนวนโครโมโซมของคะน้า 2n = 2x = 18 จากผลการทดลองในหอมแดง ผลปรากฏว่า หอมแดงที่ถูกฉีดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สองครั้งติดต่อกันแต่ฉีดคนละวัน จะให้ต้นคล้ายต้น Polyploid ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นปกติ (Diploid) ที่ไม่ฉีดสารโคลชิซินเลย กล่าวคือ ต้น Polyploid จะมีใบสีเขียวเข้มกว่า ขนาดหัวสะสมอาหารและใบใหญ่กว่า จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมพบว่า 2n = 2x = 16 และต้น Polyploid 2n = 4x = 32

2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มต้นในปี ค.ศ.1902 โดย Haberland นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันได้ทำการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยง เพื่อจะทำการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จจนถึงระดับเซลล์มีการแบ่งตัว เพียงแต่พบว่าเซลล์มีการขยายขนาดขึ้นเท่านั้น ในปี ค.ศ.1930 ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจากรากของพืชหลายชนิดโดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ต่อมาในปี ค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Organ) และแคลลัส (Callus) ของพืชได้หลายชนิดและนับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาไปได้อย่างกว้างขวาง และมีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆอีกมากมาย ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงพืชเซลล์เดี่ยวๆ และโปรโตพลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อยีนส์ การถ่ายยีนส์ ฯลฯ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น อวัยวะ เนื้อเยื่อเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยวิตามิน แร่ธาตุ น้ำตาล สารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ แสง ความชื้น ชิ้นส่วนเหล่านี้มีการเจริญเติบโต และมีการพัฒนาได้หลายรูปแบบ เช่น สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส (callus formation) แล้วพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (embryogenessis) หรือชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงพัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) จากนั้นจึงพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (อรดี, 2539)

เซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆของพืช ที่นำมาเพ้าะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้นั้นได้ผ่านกระบวนการเปลี่ยนสภาพเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์และทำหน้าที่เฉพาะอย่างตามที่กำหนดมาแล้ว การจะชักนำ

ชิ้นส่วนเหล่านี้ให้มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และมีการพัฒนาการจนเกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้ จะต้องผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสภาพเพื่อเปลี่ยนสภาพของเซลล์ 2 ขั้นตอน คือ dedifferentiation เพื่อเปลี่ยนสถานะของเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆให้มาอยู่ในสภาพที่เป็นเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพ แต่มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบ proliferative division ที่อาจอยู่ในรูปของกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส หรืออยู่ในรูปเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์แขวนลอย ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่ยังไม่ถูกกำหนดให้มีการเปลี่ยนสภาพ (undetermined cell) และ redifferentiation เพื่อเปลี่ยนสถานะของกลุ่มเซลล์หรือแคลลัสให้กลับมีการกำหนดการเปลี่ยนแปลงสภาพ (determined cell) เพื่อพร้อมเข้าสู่กระบวนการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่

การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันและยังไม่มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรงไคมา มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุอาจมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ มีสีเหลืองของแคโรทีนอยด์และฟลาโวนอยด์ หรือมีสีม่วงจากแอนโทไซยานิน ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น แสง ลักษณะของแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันหนาแน่น (compact callus) สีเหลืองอ่อนหรือขาวจะพัฒนาเป็นคัพภะแบบเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (รังสฤษดิ์, 2541 และ Vasil, 1987) การชักนำแคลลัส ในระยะแรกจะมีการกระตุ้นกิจกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสโดยสภาพทางสรีรวิทยาของเซลล์พืชและสภาพการเพาะเลี้ยงจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ดังกล่าว จากนั้นเซลล์ที่แบ่งแบบไมโทซิสจะเปลี่ยนกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ และมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชเกิดขึ้นต่อไป (Dodds และ Roberts, 1995) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงมี 2 แบบ คือ

1. Embryogenesis เป็นกระบวนการที่เซลล์ร่างกายเปลี่ยนรูปไปเป็นโครงสร้างที่มีส่วนยอดและราก (bipolar structure) ซึ่งมีการเจริญเติบโตระยะต่างๆเหมือนเอ็มบริโอ (embryo) ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์ เรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) เป็นโครงสร้างที่มีทั้งส่วนของ shoot primodia และ root primodia ที่เจริญมาจากจุดกำเนิดเดียวกัน โดย เอ็มบริออยด์ (embryoid) จะเกิดได้ 2 ลักษณะ คือ

1.1 Direct embryogenesis เกิดเอ็มบริออยด์โดยตรงจากเซลล์หรือกลุ่มเซลล์โดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัสมาก่อน

1.2 Indirect embryogenesis เกิดเอ็มบริออยด์จากแคลลัสโดยชักนำส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัสที่พร้อมจะเจริญเป็นเอ็มบริออยด์ เรียกว่า เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (embryogenic callus)

2. Organogenesis เป็นกระบวนการเกิดอวัยวะจากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์แคมเบียม คือ เซลล์ที่มีขนาดเล็กมีแวคิวโอลน้อย ไซโทพลาสซึมเข้มข้น มีเม็ดแป้งขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เรียกว่า เมอริสเต็มมอยด์ (meristemoid) จากจุดกำเนิดนี้จะมีการเจริญเป็นอวัยวะเพียงชนิดเดียวคือ ยอด หรือ ราก เรียก monopolar structure เกิดขึ้น 2 ลักษณะ คือ

2.1 Direct organogenesis อวัยวะเกิดโดยตรงจากเซลล์เนื้อเยื่อหรือตายอดตาข้างที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยไม่เกิดจากแคลลัสมาก่อน

2.2 Indirect organogenesis อวัยวะเกิดจากแคลลัสบนชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง (สุมล, 2546)

วชิระ และคณะ (2545) ได้ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลาจากตาและรากตั้งแต่เดือนมีนาคม 2543 ถึงเดือนมีนาคม 2545 เพื่อศึกษาความสามารถในการพัฒนาของชิ้นส่วนตาและรากไปเป็นต้นสมบูรณ์ โดยนำชิ้นส่วนตาข้างและปลายรากมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BA, kinetin, 2,4-D และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA 1 ส่วนในล้านส่วน สามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากที่สุด 5.2 ต้นต่อชิ้นส่วน และเมื่อนำต้นอ่อนที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปกติจะชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์แข็งแรง สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากนั้น พบว่า เมื่อนำรากของวานิลลามาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร KC ที่เติม BA 5 ส่วนในล้านส่วน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (0.35 กรัมต่อชิ้นส่วน) และเมื่อนำแคลลัสที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ 4.6 ต้น หลังจากนั้นย้ายต้นอ่อนที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.01 ส่วนในล้านส่วน จะชักนำให้เกิดรากได้ 1.6 ราก เมื่อนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาและรากอ่อนมาปลูก พบว่า มีเปอร์เซ็นต์รอดตายหลังย้ายปลูก 100 เปอร์เซ็นต์ และต้นอ่อนที่ได้มีลักษณะปกติ มีการเจริญเติบโต และแข็งแรงดี

Janarthanam และ Seshadri (2008) เพาะเลี้ยงใบของ *V. Planifolia* บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D) 4.52 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BAP 2.22 มิลลิโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 13.32 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 13.43 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอก 14 ยอด มีความยาวเฉลี่ย 3.6 เซนติเมตร ในเวลา 40 วัน ศึกษาการเพิ่มจำนวนโดยนำยอดมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 8.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 8.08 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอด 12.3 ยอด มีความยาวเฉลี่ย 3.6 เซนติเมตร โดยใช้เวลา 35 - 40 วัน จากนั้นย้ายลงอาหาร ½ MS ที่เติม NAA ร่วมกับ IBA เพื่อชักนำให้เกิดราก และสามารถย้ายปลูกในธรรมชาติได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

ศิริพร (2552) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *V. planifolia* และ *V. pilifera* โดยชักนำตาข้างให้พัฒนาเป็นยอดอ่อนได้ ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ และยอดอ่อนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera* สามารถพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากได้ดีที่สุดในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เฉลี่ย 4.33 และ 4.13 ยอดต่อตาข้าง มีความยาวยอดเฉลี่ย 1.49 และ 1.69 เซนติเมตร ตามลำดับ ภายหลังการเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ เมื่อนำยอดของสายพันธุ์ *V. planifolia* มาชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารที่เติมผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ดีที่สุด เฉลี่ย 1.93 และ 1.70 รากต่อยอด มีความยาวเฉลี่ย 1.47 และ 1.19 เซนติเมตร ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

วานิลา (*Vanilla* sp.) จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่มีอยู่ที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสาขาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1.1 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.1.2 เครื่องไมโครเวฟ (microwave)

3.2.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar air flow)

3.2.1.4 ฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร

3.2.1.5 เครื่องเขย่า (shaker)

3.2.1.6 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)

3.2.1.7 เครื่องปรับความเป็นกรด-เบส (pH meter)

3.2.1.8 เครื่องชั่งสาร (digital electronic balance weight scale)

3.2.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

3.2.1.10 ออโตปิเปต (autopipet) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 20 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร

3.2.1.11 ทิป (tip) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร

3.2.1.12 กระบอกตวง (cylinder)

3.2.1.13 เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernia caliper) แบบตัวเลขดิจิตอล

3.2.1.14 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)

3.2.1.15 ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (tissue culture flask)

3.2.1.16 มีดผ่าตัด (scalpel)

3.2.1.17 คีมคีบ (forcep)

3.2.1.18 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri disc)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3.2.1.19 ช้อนตักสาร (spectula)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.20 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร, และ 500 มิลลิลิตร

3.3.2 สารเคมี

3.2.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS

3.2.2.2 น้ำตาลซูโครส (sucrose)

3.2.2.3 ไฟตาเจล (phytagel)

3.2.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน (Auxin) เช่น IBA (indole-3-butyric acid) , 2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid) และ NAA (naphthalene acetic aacid)

3.2.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น BAP (6-benzyladenopurine)

3.2.2.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มจิบเบอเรลลิน (gibberrellin) เช่น GA_3 (gibberrelic acid A3)

3.2.2.7 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชไทเดียซูรอน (Thidiazuron)

3.2.2.8 โคลชิซิน (colchicine)

3.2.2.9 น้ำมะพร้าว (coconut milk)

3.2.2.10 แอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเร่งการเจริญเติบโตของยอด

ตัดยอดของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ให้มีขนาดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ BAP ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตรต่อลิตร (ตารางที่ 3.1) โดยในแต่ละสูตรอาหารมีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร โดยแต่ละสูตรอาหารใช้ยอด 3 ยอดต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ทั้งหมด 6 ขวดเพาะเลี้ยงต่อ 1 สูตรอาหาร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารในสัปดาห์ที่ 4 ทำการบันทึกผลการทดลองโดยการวัดความยาวของต้นทุกๆ 7 วัน

3.3.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดยอดจำนวนมากและ เพิ่มการเจริญของยอด

ตัดส่วนของข้อตรงตำแหน่งบริเวณที่มีตาข้างของ *V. pilifera* ให้มีขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และร่วมกับ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.2) น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร โดยแต่ละสูตรอาหารจะใช้ข้อ 2 ข้อต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ทั้งหมด 6 ขวดเพาะเลี้ยงต่อ 1 สูตรอาหาร จากนั้นนำไปทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยวาง 2 ยอดต่อขวด ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นและวัดความยาวของยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆโดยแยกเป็น 14 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – N ตามลำดับ

สูตรอาหาร	**สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)**		
	GA_3	**BAP**	**น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร**
A	ไม่เติม	ไม่เติม	ไม่เติม
B	0.5	ไม่เติม	ไม่เติม
C	1	ไม่เติม	ไม่เติม
D	1.5	ไม่เติม	ไม่เติม
E	2	ไม่เติม	ไม่เติม
F	ไม่เติม	0.5	ไม่เติม
G	ไม่เติม	1	ไม่เติม
H	ไม่เติม	3	ไม่เติม
I	ไม่เติม	5	ไม่เติม
J	ไม่เติม	ไม่เติม	เติม
K	ไม่เติม	0.5	เติม
L	ไม่เติม	1	เติม
M	ไม่เติม	3	เติม
N	ไม่เติม	5	เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
117358

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกเป็น 5 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – E ตามลำดับ

สูตรอาหาร	**สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)**		
	BAP	**IBA**	**GA_3**
A	1	0.5	0
B	1	0.5	0.5
C	1	0.5	1
D	1	0.5	1.5
E	1	0.5	2

3.3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการยืดยาวของราก

ตัดส่วนข้อของ *V. planifolia* ให้มีขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต, เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการลดปริมาณของสารอาหารลงครึ่งหนึ่งที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต, เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการลดปริมาณของสารอาหารลงครึ่งหนึ่งร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.3) โดยในแต่ละสูตรอาหารจะมีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร โดยแต่ละสูตรอาหารจะใช้ข้อ 1 ข้อต่อขวด ทั้งหมด 20 ขวดต่อ 1 สูตรอาหาร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองทุกๆ 14 วัน โดยการวัดความยาวของรากและจำนวนของรากที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 สูตรอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสูตรอาหาร MS ที่ลดปริมาณของสารอาหารลงครึ่งหนึ่ง (½MS) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกเป็น 6 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – F ตามลำดับ

สูตรอาหาร	**อาหารสังเคราะห์**	**สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
A	MS	ไม่เติม
B	MS	0.5
C	MS	1
D	½MS	ไม่เติม
E	½MS	0.5
F	½MS	1

3.3.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

ตัดชิ้นส่วนของใบและข้อของ *V. planifolia* ที่มีขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร นำไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS และในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.4) โดยในแต่ละสูตรอาหารจะมีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร โดยแต่ละสูตรอาหารใช้ชิ้นส่วนของใบและข้อ 5 ชิ้นส่วนต่อขวด ทั้งหมด 5 ขวดต่อ 1 สูตรอาหาร ถ้าในอาหารเหลวจะไม่มีการเติมไฟตาเจล โดยแต่ละสูตรอาหารใช้ชิ้นส่วนของข้อและใบ 10 ชิ้นต่อฟลาสก์ ทั้งหมด 2 ฟลาสก์ต่อ 1 สูตรอาหาร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยการวัดจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 สูตรอาหารแข็งสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA กับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA กับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆโดยแยกเป็น 20 สูตร โดยแทนด้วยตัวอักษร A – T ตามลำดับ

สูตรอาหาร	สภาวะอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
		NAA	**2,4-D**	**TDZ**
A	แข็ง	0.1	ไม่เติม	ไม่เติม
B	แข็ง	0.1	ไม่เติม	0.01
C	แข็ง	0.1	ไม่เติม	0.05
D	แข็ง	0.1	ไม่เติม	0.1
E	แข็ง	0.1	ไม่เติม	0.5
F	แข็ง	ไม่เติม	0.1	ไม่เติม
G	แข็ง	ไม่เติม	0.1	0.01
H	แข็ง	ไม่เติม	0.1	0.05
I	แข็ง	ไม่เติม	0.1	0.1
J	แข็ง	ไม่เติม	0.1	0.5
K	เหลว	0.1	ไม่เติม	ไม่เติม
L	เหลว	0.1	ไม่เติม	0.01
M	เหลว	0.1	ไม่เติม	0.05
N	เหลว	0.1	ไม่เติม	0.1
O	เหลว	0.1	ไม่เติม	0.5
P	เหลว	ไม่เติม	0.1	ไม่เติม
Q	เหลว	ไม่เติม	0.1	0.01
R	เหลว	ไม่เติม	0.1	0.05
S	เหลว	ไม่เติม	0.1	0.1
T	เหลว	ไม่เติม	0.1	0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การศึกษาหาเวลาและความเข้มข้นของสารโคลชิซินต่อการอยู่รอดของวานิลา

ตัดปลายยอดของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยสาร colchicines ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระยะเวลา 1, 3, 6 และ 8 วัน โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดระยะเวลาจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และทำการแช่ในสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลาจึงย้ายไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ทำการบันทึกลักษณะของต้นที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

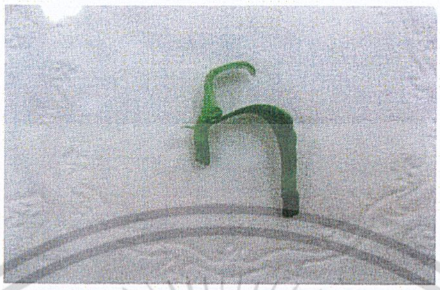
4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเร่งการเจริญเติบโตของยอด *V.planifolia* และ *V. pilifera*

จากการนำส่วนยอดของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร (รูปที่ 4.1) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ (ตารางที่ 3.1) พบว่าใน *V. planifolia* ความยาวของยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2) ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงครบตามระยะเวลา 7 สัปดาห์ (รูปที่ 4.3 ก. – ง.) พบว่าสูตรอาหาร K (BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตรต่อลิตร) สามารถเร่งการเจริญเติบโตของยอดได้ดีที่สุดคือมีความยาวทั้งหมด 106.38 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยต่อยอด 17.73 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.2 ค.) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร A (MS) ซึ่งเป็นสูตรอาหารตัวควบคุม พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยมีความยาวทั้งหมด 96.3 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยต่อยอด 16.05 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.2 ก.) และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรต่างๆ พบว่าส่วนใหญ่มีความยาวยอดแตกต่างกันไม่มากนัก (รูป 4.2 ข. และ 4.2 ง.) ส่วนสูตรอาหาร E (GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถเร่งการเจริญโตได้น้อยที่สุด คือ มีความยาวยอดทั้งหมด 16.02 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยต่อยอด 2.67 มิลลิเมตร

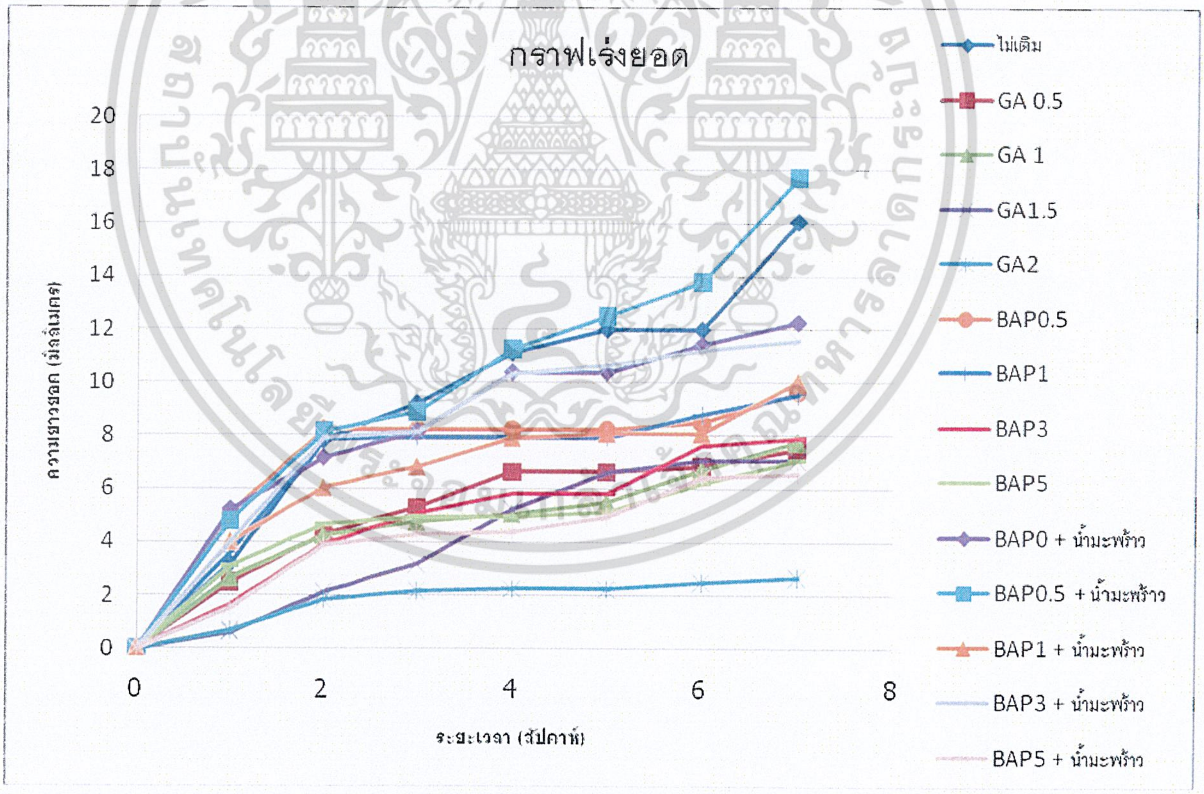
ใน *V. pilifera* พบว่าในความยาวของยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.5) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 7 สัปดาห์ (รูปที่ 4.4 ก. – ง.) พบว่าในอาหารสูตร L (BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตรต่อลิตร) สามารถเร่งการเจริญของยอดได้ดีที่สุดคือมีความยาวทั้งหมด 54.96 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยต่อยอด 13.74 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.4 ค.) และในอาหารสูตร J (BAP ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตรต่อลิตร) พบว่าให้ความยาวของยอดไม่แตกต่างจากสูตร L มากนัก คือ มีความยาวยอดทั้งหมด 53.92 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยต่อยอด 13.48 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร A ซึ่งเป็นตัวควบคุม พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยมีความยาวทั้งหมด 35.88 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยต่อยอด 8.97 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.4 ก.) และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรต่างๆ พบว่าส่วนใหญ่มีความยาวยอดแตกต่างกันไม่มากนัก (รูป 4.2 ข.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 4.2 ง.) ส่วนสูตรอาหาร H (BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถเร่งการเจริญเติบโต ได้น้อยที่สุด คือ มีความยาวยอดทั้งหมด 10.32 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยต่อยอด 2.58 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.1 ลักษณะขนาดของยอด *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. planifolia* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์ สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 สัปดาห์

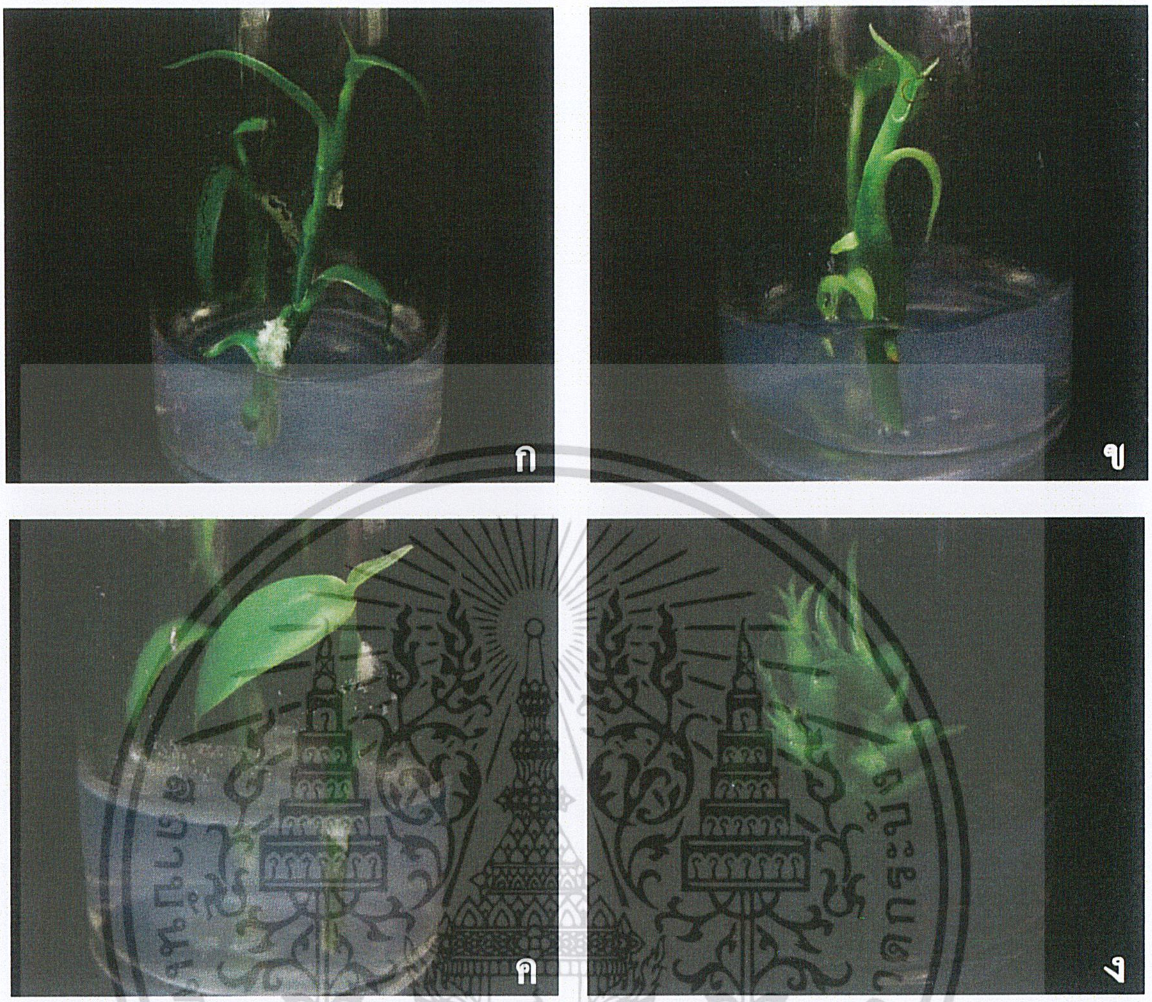
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. planifolia* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรต่างๆในระยะเวลา 7 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนยอดเริ่มต้น	สัปดาห์การเพาะเลี้ยง							ความยาวยอดต่อชิ้น (มม.)
		1	2	3	4	5	6	7	
A	6	3.16^{abcd}	7.79^{a}	9.19^{a}	11.10^{a}	11.97^{ab}	11.97^{ab}	16.05^{ab}	16.05^{ab}
B	6	2.49^{abcd}	4.29^{ab}	5.28^{abc}	6.63^{abc}	6.63^{abcd}	6.85^{bc}	7.47^{cd}	7.47^{cd}
C	6	2.65^{abcd}	4.23^{ab}	4.74^{abc}	5.05^{abc}	5.49^{cd}	6.69^{bc}	7.76^{cd}	7.76^{cd}
D	6	0.60^{d}	2.11^{b}	3.16^{bc}	5.22^{abc}	6.58^{abcd}	7.07^{bc}	7.07^{cd}	7.07^{cd}
E	6	0.68^{d}	1.83^{b}	2.15^{c}	2.23^{c}	2.23^{d}	2.48^{c}	2.67^{d}	2.67^{d}
F	6	5.07^{ab}	8.23^{a}	8.23^{ab}	8.23^{abc}	8.23^{abcd}	8.48^{abc}	9.63^{c}	9.63^{c}
G	6	3.59^{abcd}	7.87^{ab}	7.92^{ab}	7.92^{abc}	7.92^{abcd}	8.79^{ab}	9.53^{c}	9.53^{c}
H	6	1.65^{bcd}	3.91^{ab}	5.05^{abc}	5.80^{abc}	5.80^{bcd}	7.60^{bc}	7.89^{cd}	7.89^{cd}
I	6	3.09^{abcd}	4.64^{ab}	4.95^{abc}	4.95^{abc}	5.13^{cd}	6.18^{bc}	7.07^{cd}	7.07^{cd}
J	6	5.20^{a}	7.15^{a}	8.12^{ab}	10.36^{ab}	10.36^{abc}	11.41^{ab}	12.25^{abc}	12.25^{abc}
K	6	4.78^{abc}	8.15^{a}	8.87^{a}	11.25^{a}	12.47^{a}	13.79^{a}	17.73^{a}	17.73^{a}
L	6	4.01^{abcd}	6.03^{ab}	6.83^{abc}	7.92^{abc}	8.10^{abcd}	8.10^{abc}	10.05^{bc}	10.05^{bc}
M	6	4.91^{abc}	7.89^{a}	8.14^{ab}	10.32^{ab}	10.63^{abc}	11.20^{ab}	11.56^{bc}	11.56^{bc}
N	6	1.50^{cd}	3.86^{ab}	3.86^{ab}	4.40^{bc}	4.94^{cd}	6.43^{bc}	6.57^{cd}	6.57^{cd}

ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลักษณะของยอด *V. planifolia* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ

ก. อาหารสูตร A

ข. อาหารสูตร C

ค. อาหารสูตร K

ง. อาหารสูตร N

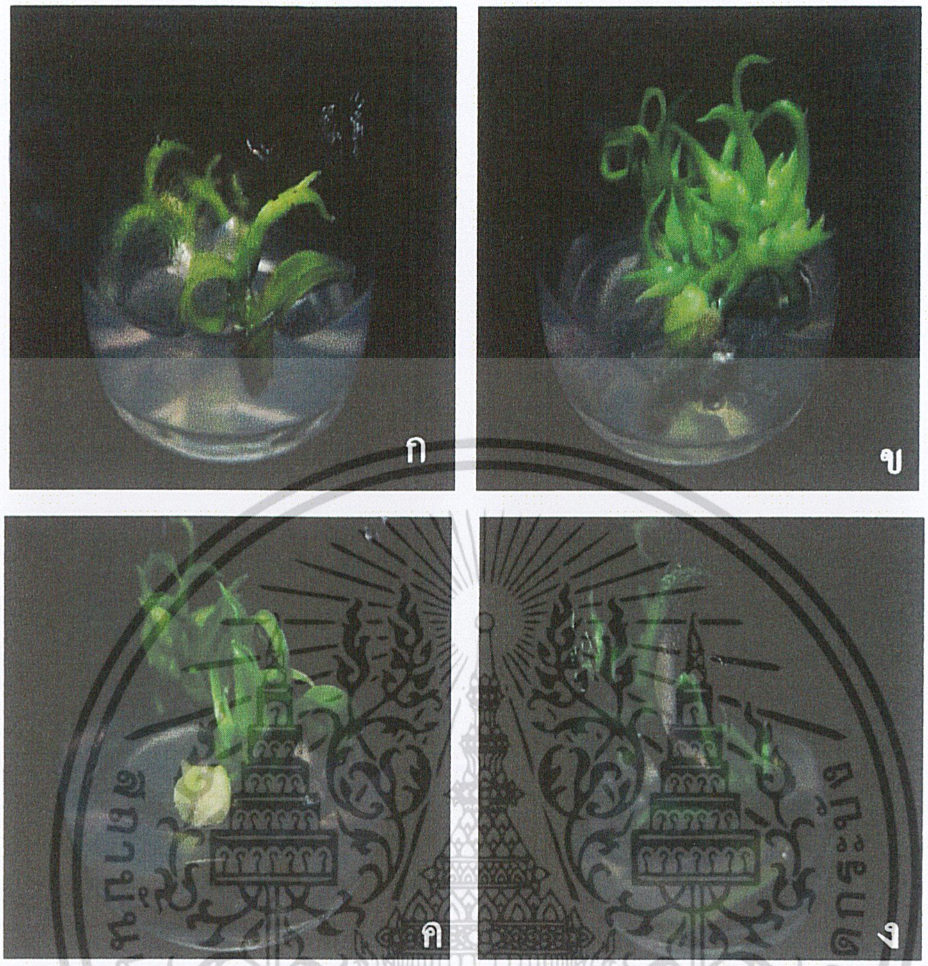
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. pilifera* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรต่างๆ ในระยะเวลา 7 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนยอดเริ่มต้น	สัปดาห์การเพาะเลี้ยง							ความยาวยอดต่อชิ้น(มม.)
		1	2	3	4	5	6	7	
A	4	2.16^{abc}	4.52^{ab}	6.07^{ab}	8.33^{ab}	8.97^{ab}	8.97^{abc}	8.97^{abc}	8.97^{abc}
B	4	1.24^{abcd}	2.76^{ab}	3.70^{b}	4.26^{bc}	5.13^{bc}	5.13^{bc}	6.14^{abc}	6.14^{abc}
C	4	0.42^{cd}	1.90^{ab}	1.90^{b}	2.65^{bc}	3.98^{bc}	4.33^{bc}	4.33^{c}	4.33^{c}
D	4	0.47^{bcd}	1.97^{ab}	2.24^{b}	3.77^{bc}	4.88^{bc}	4.88^{bc}	4.77^{abc}	4.77^{abc}
E	4	0.00^{d}	0.55^{b}	1.03^{b}	3.41^{bc}	4.61^{bc}	5.02^{bc}	5.02^{bc}	5.02^{bc}
F	4	0.90^{abcd}	1.14^{ab}	1.31^{b}	1.62^{c}	3.32^{bc}	3.32^{c}	3.85^{c}	3.85^{c}
G	4	1.70^{abcd}	3.14^{ab}	3.76^{b}	5.03^{bc}	5.30^{bc}	5.30^{bc}	5.30^{bc}	5.30^{bc}
H	4	1.06^{abcd}	1.52^{ab}	1.52^{b}	1.52^{c}	2.07^{c}	2.58^{c}	2.58^{c}	2.58^{c}
I	4	1.31^{abcd}	2.53^{ab}	3.55^{b}	3.91^{bc}	3.91^{bc}	3.91^{bc}	3.91^{c}	3.91^{c}
J	4	1.10^{abcd}	3.30^{ab}	4.54^{b}	5.90^{bc}	6.63^{abc}	11.00^{ab}	13.48^{a}	13.48^{a}
K	4	0.90^{abcd}	3.52^{ab}	5.72^{ab}	8.10^{ab}	8.43^{abc}	9.68^{abc}	12.95^{ab}	12.95^{ab}
L	4	2.65^{a}	5.51^{a}	10.25^{a}	12.15^{a}	12.56^{a}	12.56^{a}	13.74^{a}	13.74^{a}
M	4	0.62^{bcd}	4.03^{ab}	5.20^{b}	6.57^{bc}	7.42^{abc}	7.94^{abc}	8.66^{abc}	8.66^{abc}
N	4	2.38^{ab}	3.15^{ab}	6.57^{b}	6.77^{bc}	6.77^{abc}	8.79^{abc}	10.37^{abc}	10.37^{abc}

ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงแหล่งที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ลักษณะของยอด *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ

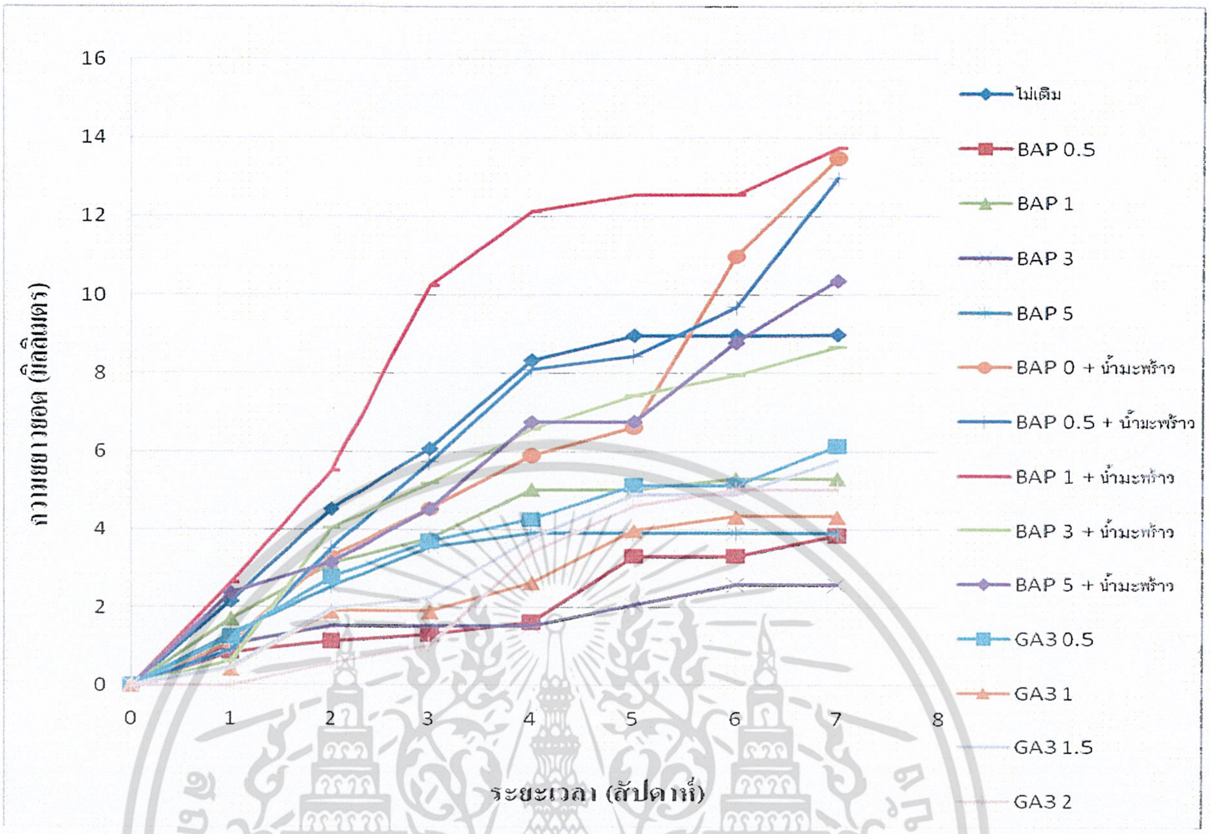
ก. อาหารสูตร A

ข. อาหารสูตร I

ค. อาหารสูตร L

ง. อาหารสูตร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

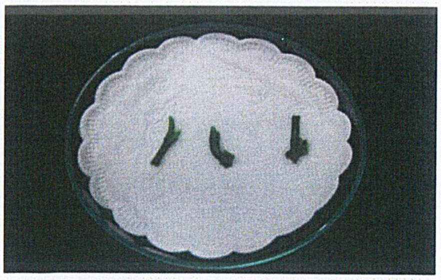


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 สัปดาห์

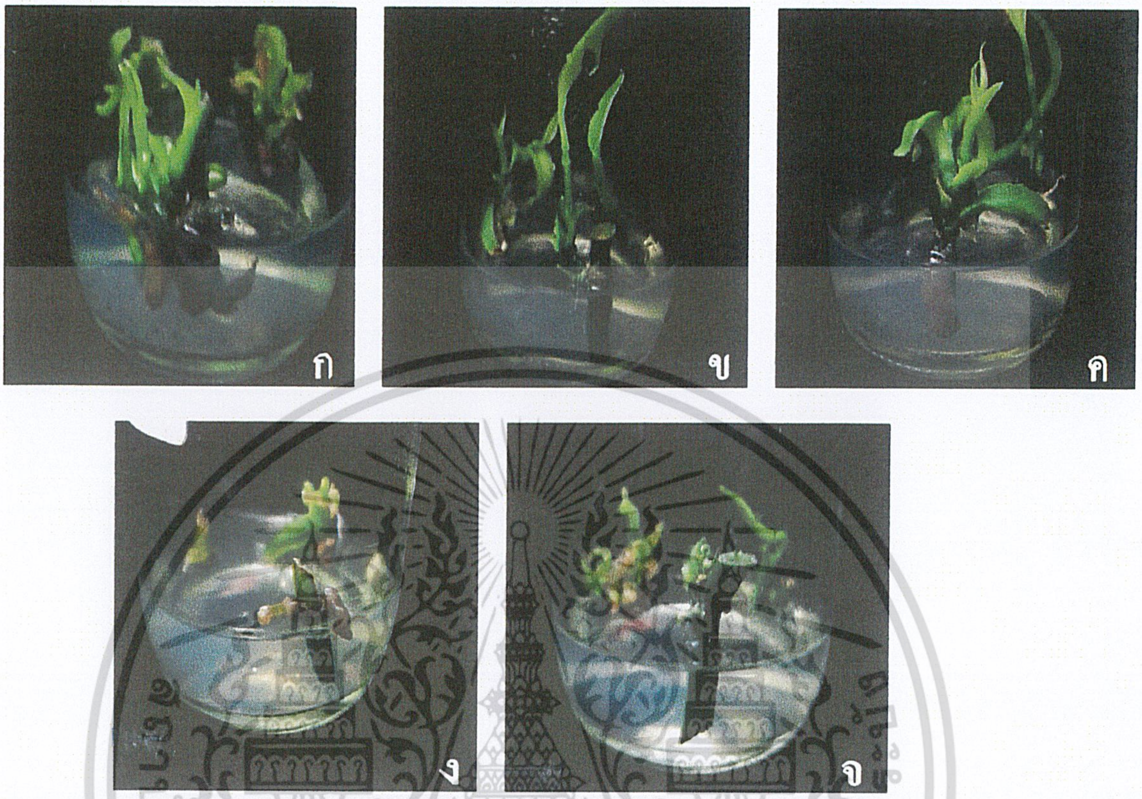
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดยอดจำนวนมากและเพิ่มการเจริญของยอด

ภายหลังจากการนำส่วนข้อตรงตำแหน่งบริเวณที่มีตาข้างของ *V. pilifera* (รูปที่ 4.6) ที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ (ตารางที่ 3.2) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (รูปที่ 4.7 ก. – จ.) พบว่าอาหารสูตร A (BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูตร B (BAP ความเข้มข้น1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถที่จะทำเกิดยอดทั้งหมด 11 ยอด โดยอาหารสูตร B จะทำให้ยอดเจริญเติบโตได้ความยาวของยอดทั้งหมดมากที่สุด คือ 19.83 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 1.80 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.7 ข.) และในอาหารสูตร C (BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าให้ความยาวของยอดไม่แตกต่างจากสูตร B มากนัก คือ มีความยาวยอดทั้งหมด 19.75 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 2.19 มิลลิเมตร แต่ได้จำนวนยอดทั้งหมด 9 ยอด (รูปที่ 4.7 ค.) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร A ซึ่งเป็นตัวควบคุม พบว่ามีความยาวยอดแตกต่างกัน คือ มีความยาวยอดทั้งหมด 17.35 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 1.58 มิลลิเมตร มีจำนวนยอดเกิดขึ้นทั้งหมด 11 ยอด (รูปที่ 4.7 ก.) ส่วนอาหารสูตร D (BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูตร E (BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ความยาวยอดทั้งหมด 5.97 มิลลิเมตร และ 9.58 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 0.65 มิลลิเมตรและ 1.06 มิลลิเมตร และมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้น 9 ยอด ทั้ง 2 สูตรอาหาร (รูปที่ 4.7 ง. และ จ.) ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Das และคณะ (1996) ที่พบว่าตาข้อที่ได้จากยอดอ่อนจะให้ปริมาณยอดมากกว่าชิ้นส่วนอื่นๆ



รูปที่ 4.6 ลักษณะส่วนข้อในบริเวณที่มีตาข้างของ *V. pilifera* ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ



รูปที่ 4.7 แสดงการพัฒนาจากตาข้างไปเป็นยอดของ *V. pilifera* บนการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่

ก. อาหารสูตร A

ข. อาหารสูตร B

ค. อาหารสูตร C

ง. อาหารสูตร D

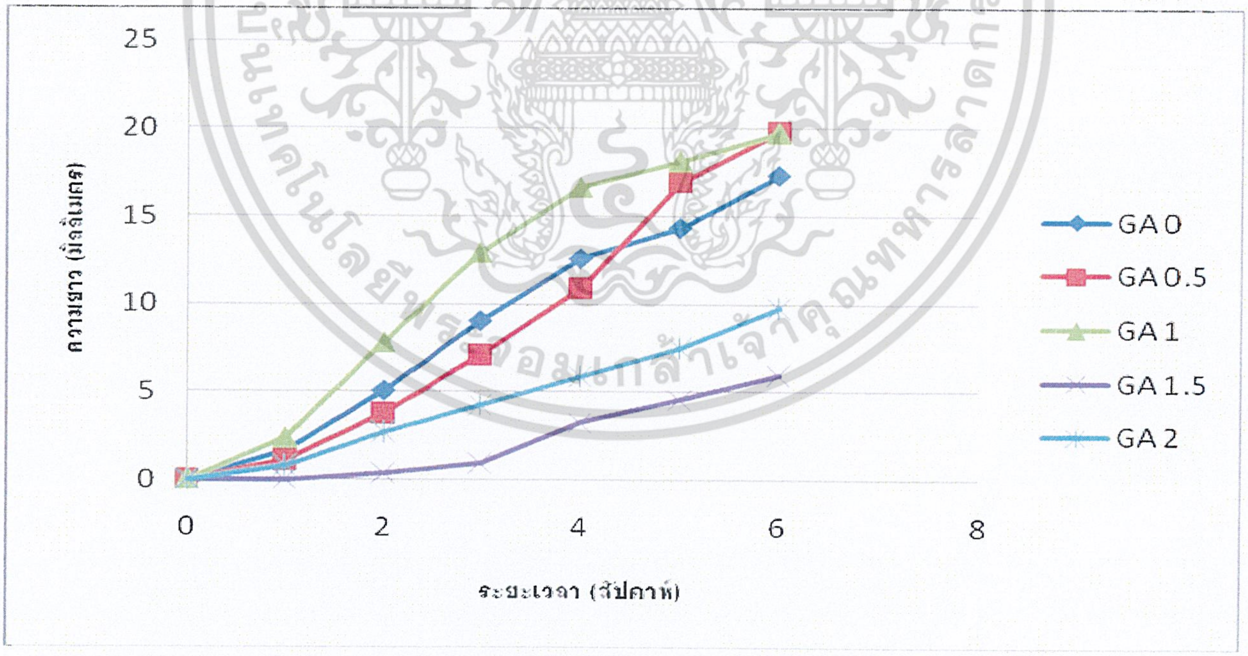
จ. อาหารสูตร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงความยาวของยอด *V. pilifera* และจำนวนของยอดที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตรต่างๆ ภายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	**จำนวนยอด**	**สัปดาห์**					
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
A	11	1.78[a]	4.90[ab]	8.90[a]	12.60[a]	14.34[a]	17.35[a]
B	11	1.12[a]	4.53[ab]	7.90[a]	12.30[a]	16.94[a]	19.83[a]
C	9	2.36[a]	7.81[a]	12.93[a]	16.65[a]	18.16[a]	19.75[a]
D	9	0[a]	0.35[b]	0.96[a]	3.27[a]	4.56[a]	5.97[a]
E	9	1.36[a]	2.74[ab]	4.26[a]	5.90[a]	7.52[a]	9.58[a]

ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของยอด *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการยืดยาวของราก

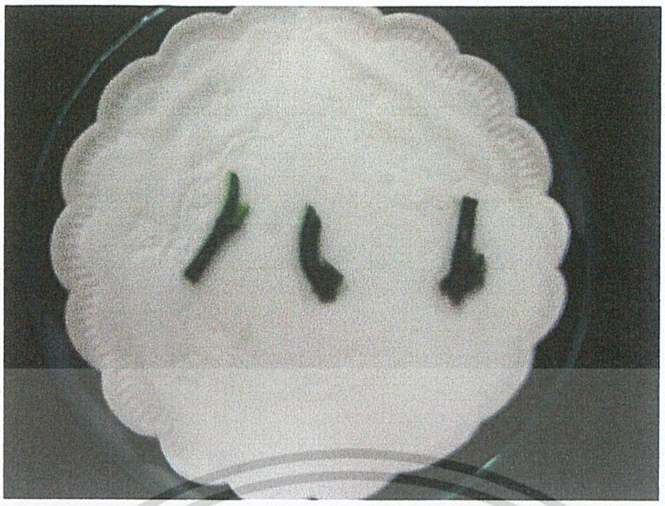
ภายหลังจากการนำส่วนข้อของ *V. planifolia* (รูปที่ 4.9) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ (ตารางที่ 3.3) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (รูปที่ 4.11 ก. – ฉ.) พบว่าในแต่ละสูตรอาหารจะแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.4) โดยพบว่าในอาหารสูตร A (MS) และ D (½ MS) มีความยาวของรากรวมกันทั้งหมด 1,083.28 และ 1,062.95 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวของรากเฉลี่ยเท่ากับ 54.16 และ 53.14 มิลลิเมตรและมีจำนวนของรากเฉลี่ย 2.10 และ 2.20 รากตามลำดับ (รูปที่ 4.11 ก. และ ง.) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ พบว่าอาหารสูตร B (MS ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูตร C (MS ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความยาวของรากรวมกันรองลงมา คือ มีความยาวรากทั้งหมด 832.12 และ 638.90 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 41.60 และ 31.94 มิลลิเมตร และมีจำนวนของรากเฉลี่ย 1.95 และ 2.10 รากตามลำดับ (รูปที่ 4.11 ค. และ ง.) ในอาหารสูตร E (½ MS ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูตร F (½ MS ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าให้ความยาวของรากน้อยที่สุด คือ มีความยาวรากทั้งหมด 257.37 และ 284.46 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวของรากเฉลี่ยเท่ากับ 12.86 และ 14.22 มิลลิเมตร และมีจำนวนของรากเฉลี่ย 1.35 และ 1.60 รากตามลำดับ (รูปที่ 4.11 จ. และ ฉ.) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Phillip และคณะ (1988) ที่พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS จะช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของต้นและราก

ตารางที่ 4.4 จำนวนการเกิดของรากและความยาวของรากจากการเพาะเลี้ยง *V. planifolia* บนอาหารสูตรต่างๆ ภายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

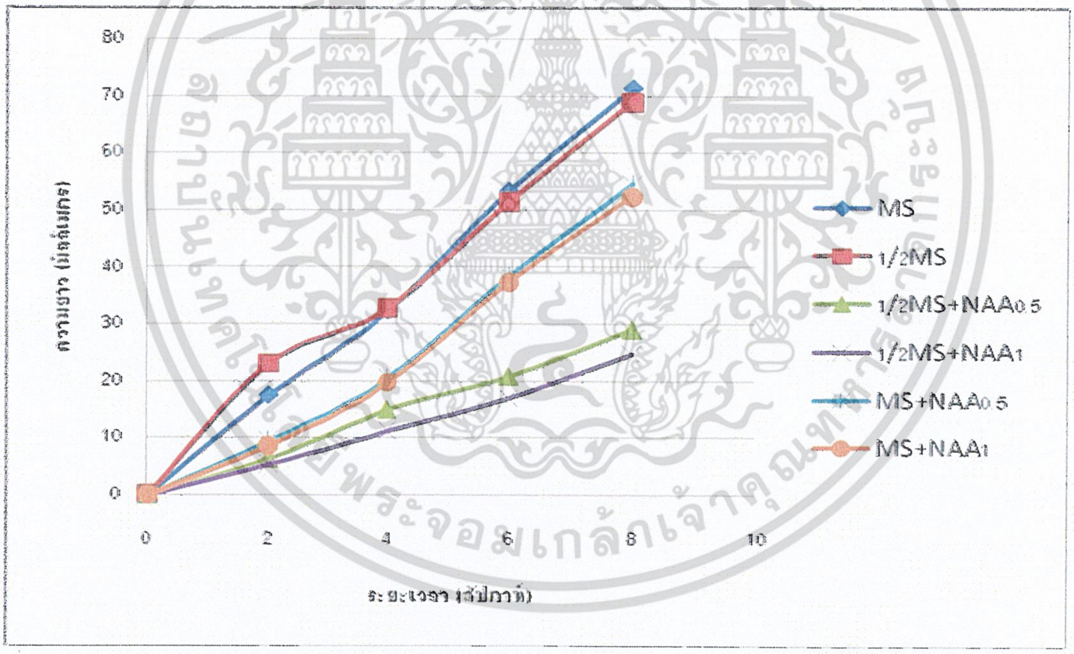
สูตรอาหาร	**จำนวนตาข้าง(ชิ้น)**	**จำนวนรากทั้งหมด(ราก)**	**จำนวนรากเฉลี่ย(ราก)**	**ความยาวรากทั้งหมด(มม.)**	**ความยาวรากต่อชิ้น(มม.)**
A	20	42	2.10[a]	1,083.28	54.16[a]
B	20	39	1.95[a]	832.12	41.60[b]
C	20	42	2.10[a]	638.90	31.94[b]
D	20	44	2.20[a]	1062.95	53.14[a]
E	20	27	1.35[a,b]	257.37	12.86[c]
F	20	32	1.60[a,b]	284.46	14.22[c]

ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

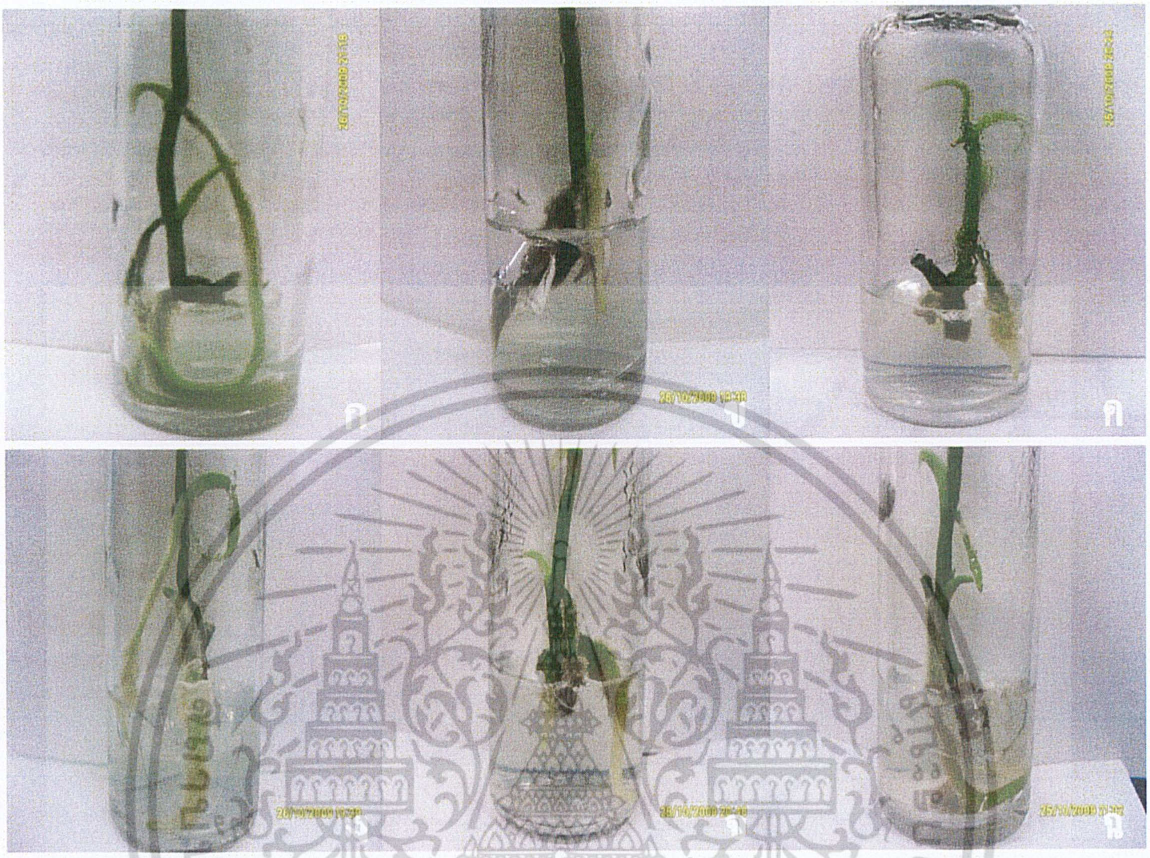


รูปที่ 4.9 ลักษณะของส่วนข้อ *V. planifolia* ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.10 แสดงการเจริญเติบโตของรากที่เกิดขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากที่เกิดขึ้นในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่

ก. อาหารสูตร A

ข. อาหารสูตร B

ค. อาหารสูตร C

ง. อาหารสูตร D

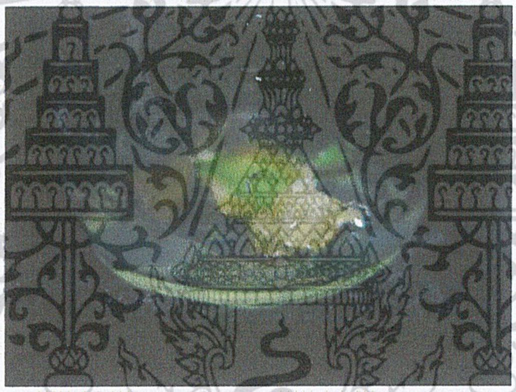
จ. อาหารสูตร E

ฉ. อาหารสูตร F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนของใบและส่วนข้อของ *V. planifolia* ที่มีขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตรนำมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ (ตารางที่ 3.4) ภายหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในอาหารแข็งสูตร E สามารถทำให้ชิ้นส่วนของใบจำนวน 2 ชิ้นมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นแคลลัส (รูปที่ 4.12) ในอาหารแข็งสูตร B สามารทำให้ชิ้นส่วนของข้อจำนวน 2 ชิ้นมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นแคลลัส (รูปที่ 4.13) แต่ในอาหารเหลวสูตร K, L, M, N, O, P, Q, R, S, และ T พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนของข้อพัฒนาไปเป็นชิ้นส่วนต่างๆของพืชโดยจะมีการพัฒนาไปเป็นยอดและราก (รูปที่ 4.14 ก. และ ข. และตารางที่ 4.5) แต่ส่วนของใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ไม่พบการพัฒนาของชิ้นส่วนใบไปเป็นแคลลัส โดยชิ้นส่วนของใบในอาหารเหลวทั้งหมดจะมีลักษณะซีดลง และตายในที่สุด (รูปที่ 4.14 ค.)



รูปที่ 4.12 ลักษณะของชิ้นส่วนของใบที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.13 ลักษณะของชิ้นส่วนของข้อที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B

รูปที่ 4.14 ลักษณะของชิ้นส่วนของใบและข้อที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นชิ้นส่วนต่างๆของพืช เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร O

ก. ชิ้นส่วนของข้อที่มีการเจริญเติบโตเป็นใบ

ข. ชิ้นส่วนของข้อที่มีการเจริญเติบโตเป็นยอด

ค. ชิ้นส่วนของใบที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อในอาหารสูตรต่างๆ ภายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด (ชิ้น)	จำนวนที่พัฒนาเป็นแคลลัส(ชิ้น)	จำนวนที่เกิดการเปลี่ยนแปลง	ลักษณะที่เกิดขึ้น
K	10	0	1	เกิดรากและยอด
L	10	0	1	เกิดยอด
M	10	0	1	เกิดยอด
N	10	0	4	เกิดยอดและก้าน
O	10	0	8	เกิดยอดและราก
P	10	0	3	เกิดยอดและราก
Q	10	0	6	เกิดยอดและราก
R	10	0	1	เกิดยอด
S	10	0	0	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง
T	10	0	2	เกิดยอดและราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาหาเวลาและความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของวานิลา

ภายหลังจากการนำส่วนยอดของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาทำการแช่ลงในสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรที่ระยะเวลาการแช่ 1, 3 และ 5 ชั่วโมง และทำการแช่ด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร โดยการเลี้ยงร่วมกับอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 1, 3, 6 และ 8 วันโดยทำการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดระยะเวลาที่แช่นำมาย้ายลงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเพื่อสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น พบว่าที่ความเข้มข้นของโคลชิซินที่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ไม่ว่าที่ระยะเวลาของการแช่ใดๆ จะไม่พบการตายของยอด (รูปที่ 4.15 ก.) และที่ความเข้มข้นโคลชิซิน 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่แช่โดยการเลี้ยงร่วมกับอาหารเหลวสังเคราะห์ที่ระยะเวลาการแช่ 3 วัน ชิ้นส่วนของยอดวานิลาทั้งหมดจะตาย โดยสังเกตเห็นได้ว่ายอดของ *V. planifolia* จะมีการซีดเปื่อยโดยจะเริ่มจากส่วนปลายใบเข้ามา หลังจากย้ายมาทำการเพาะเลี้ยงลงในอาหารแข็งสังเคราะห์เป็นระยะเวลา 2 ถึง 3 สัปดาห์ (รูปที่ 4.15 ข. และ ค.)

รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของยอด *V. planifolia* ที่ระยะเวลาและความเข้มข้นต่างๆ โดยที่

ก. คือลักษณะของยอดที่ผ่านการแช่แล้วยังอยู่ในสภาพปกติ

ข. คือลักษณะของยอดที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินที่ร่วมกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเขย่า 3 วัน เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์

ค. คือลักษณะของยอดที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินที่ร่วมกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรแช่ระยะเวลา 3 วัน เมื่อผ่านไป 3 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* เพื่อเร่งการเจริญเติบโต พบว่าใน *V. planifolia* อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตร (สูตร K) สามารถเร่งการเจริญเติบโตของยอดได้ดีสุด คือ มีความยาวของยอดทั้งหมด 106.38 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ย 17.73 มิลลิเมตร ใน *V. pilifera* อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 150 มิลลิลิตร (สูตร L) สามารถเร่งการเจริญเติบโตของยอดได้ดีสุด คือ มีความยาวของยอดทั้งหมด 54.96 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ย 13.74 มิลลิเมตร ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ และส่วนข้อของ *V. pilifera* สามารถให้จำนวนยอดได้มากสุด 11 ยอด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร(สูตร A และ B) และจะมีความยาวมากที่สุด 19.83 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ย 1.80 มิลลิเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตร B) ภายหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และจากการนำส่วนข้อและส่วนใบของ *V. planifolia* มาทำการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตร B) สามารถชักนำให้ส่วนข้อเกิดเป็นแคลลัสได้ดีสุด คือ เกิดเป็นแคลลัสคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตร E) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของใบเกิดเป็นแคลลัสได้ดีสุด คือ เกิดเป็นแคลลัสคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารเหลวสูตร MS ในทุกสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญต่างๆ พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนของข้อพัฒนากลายเป็นชิ้นส่วนของยอดและราก แต่ชิ้นส่วนของใบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆเกิดขึ้น ภายหลังทำการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ และการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเร่งการเจริญเติบโตของราก *V. planifolia* พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (สูตร A) สามารถเร่งการเจริญเติบโตของรากได้ดีสุด คือ มีความยาวทั้งหมด 1,083 มิลลิเมตร คิดเป็นความยาวเฉลี่ย 54.16 มิลลิเมตร และสูตรอาหาร ½ MS ที่ไม่เติม

สารควบคุมการเจริญเติบโต (สูตร D) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดคือมีจำนวนรากทั้งหมด 44 ราก คิดเป็นจำนวนรากเฉลี่ย 2.20 รากต่อต้น ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ และการศึกษาอัตราการอยู่รอดของวานิลาเมื่อทำการแช่ในสารโคลชิซิน พบว่ายอดของ *V. planifolia* ที่แช่อยู่ในโคลชิซินเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรที่เลี้ยงร่วมกับอาหารเหลวสูตร MS ตั้งแต่ระยะเวลามากกว่า 3 วันขึ้นไป ชิ้นส่วนของยอดจะเกิดการซีดขาวและมีการเปื่อยโดยเริ่มจากส่วนปลายใบเข้ามาและยอดพืชจะตายในที่สุดเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์

ในส่วนของการการชักนำเพื่อให้เกิดแคลลัสใน *V. planifolia* ชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาใช้ควรเป็นชิ้นส่วนที่มีอายุของเซลล์น้อย เพราะชิ้นส่วนของพืชที่มีอายุเซลล์ที่น้อยสามารถที่จะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนพืชที่มีอายุเซลล์มาก สำหรับศึกษาการเพิ่มปริมาณของชุดโครโมโซมโดยการใช้สารโคลชิซิน ยังไม่สามารถศึกษาถึงความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่ปรากฏว่ามีความแตกต่างจากลักษณะเดิมอย่างไร เนื่องจากต้นวานิลาเป็นพืชที่ต้องใช้ระยะเวลานานในการเจริญเติบโต ทำให้ต้องใช้เวลาในการศึกษาการตรวจนับจำนวนโครโมโซมที่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงยังไม่สามารถทำการศึกษาได้ เนื่องจากตัวอย่างของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่ได้รับสารโคลชิซินยังมีจำนวนที่น้อย จึงทำให้มีตัวอย่างของพืชที่น้อยไป ซึ่งทำให้ไม่มีความน่าเชื่อถือเมื่อทำการวิเคราะห์ในเชิงสถิติ ในอนาคตสำหรับผู้ที่สนใจจะศึกษาการเพิ่มปริมาณของชุดโครโมโซมโดยการใช้สารโคลชิซิน ควรที่จะทำให้มีตัวแทนของหน่วยการทดลองที่มากพอ เพื่อที่จะเมื่อทำการทดลองแล้วผลที่ได้จึงจะมีความน่าเชื่อถือในทางสถิติมากกว่าหน่วยการทดลองที่มีขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จักรกฤษณ์ ภารการ, สุปาณี บุดดีคง, ยุพิน ไชยโต, วาสนา ไวจำปา และ ชูเกีรติ ผาโสม. 2545. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารโคลชิซิน ในข้าวโพดหวาน ผักกาดขาวปลี คะน้า และหอมแดง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง และ เบ็ญจมาศ ทรงพระ. 2551. การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในดาหลาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

บุญยืน กิจวิจารณ์, จารุวรรณ นกไม้ และ หนูเดือน เมืองแสน. 2551. ผลของไทโรซีนและสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ. แก่นเกษตร. 36, 144 – 152.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ. 219 น.

วชิระ เกตุเพชร, สุมนา นีระ, ปรีชา นีระ, สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์, ทวีเกียรติ ยิ้มสวัสดิ์, 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลาจากตาและราก. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 2: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิยาลัยขอนแก่น. หน้า 32.

วราภรณ์ ฉุยฉาย. 2552. บทบาทของไทเดียซูรอนกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. 4 (2), 123-135.

วันทนี สว่างอารมณ์. 2542. การเจริญและการเติบโตของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ.

สุทธาชีพ ศุภเกษร , การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในดาหลาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชสวนยะลา

สุมล นิลรัตน์นิศากร. 2546. ผลของรังสีแกมม่าร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหญ้ากินนีสีม่วง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพร ขุนศรี. 2552. การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและศึกษาความหลากหลายทางพันธุ-กรรมของวานิลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. เทคโนโลยีชีวภาพของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: หจก.วี.เจ.พริ้นติ้ง

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรมหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 73 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Arends, J.C. and Van der Laan, F.M., 1986. Cytotaxonomy of the Vandeae. Lindleyana, 1: 33-41.

Das.s.,A.J.,Abbott,and K.C.,Hall.1996.In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature Quercus robur L. Plant Cell. Rep. 15 : 615-616.

Dodds, J.H. and L.W. Roberts, 1995. Experiments in Plant Tissue Culture. 3rd Edn., Press Syndicate of the University of Cambridge, Australlia.

Goodenough, D.R. 1982. Vanilla, vanillin delivatives. Bakers Dig. 56: 8-10.

Hocking, M.B. 1997. Vanillin : synthetic flavoring from spent sulfite liquor. Journal Chemical Education. 74, 1055-1059.

Janarthanam, B. and Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from left derived callus of Vanilla planifolia Andr. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 44: 84-89

Phillip, V.J. and Nainar, S. A. Z., Ann.Bot., 1988,61,193-199.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant physiology. 15, 473-497.

Griesbach, R.J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in phalaenopsis orchids. Plant Cell tissue Organ Culture 1:103-107

Vasil V. and Vasil 1987 , Formation of callus and somatic embryos from protoplasts of a commercial hybrid of maize (*Zea mays* L.,) Theory apply genetics 73:793-798.

[Online].Available : http://www.suanlukchan.com/discussion.php?suan_chanruean_id=38

[Online].Available : http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43

[Online].Available : http://www.nationaalherbarium.nl/ pubs/orchidweb/orchidweb/genera/ Vanilla/ Vanilla.htm

[Online].Available : http://www.amadeusvanillabeans.com/pictures/vanilla-planifolia.asp

[Online].Available : http://th.wikipedia.org/wiki/Indole-3-butyric_acid

[Online].Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine

[Online].Available : http://www.alanwood.net/pesticides/thidiazuron.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS (Murashige and Skoog , 1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100
Agar	8000
Sucrose	30000
pH 5.7	

(รังสฤษฎ์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้