รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มปริมาณต้นและการอนุรักษ์พันธุกรรมของสายพันธุ์วานิลา โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation and genetic conservation of *vanilla* sp. by tissue culture

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบเงินรายได้ ประจำปี 2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มปริมาณต้นและการอนุรักษ์พันธุกรรมของสายพันธุ์วานิลา โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation and genetic conservation of *vanilla* sp. by tissue culture

b00268516

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบเงินรายได้ ประจำปี 2559

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การเพิ่มปริมาณต้นและการอนุรักษ์พันธุกรรมของสายพันธุ์วานิลา โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(ภาษาอังกฤษ) Micropropagation and genetic conservation of *vanilla* sp. by tissue culture

แหล่งเงิน **ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป (เงินรายได้) ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงิน 50,000 บาท**

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 100 %

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนข้อของต้นวานิลา (*Vanilla sp*) บนสูตรอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นนำต้นมาชักนำให้เกิดราก ในอาหารแข็ง สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (Indole-3-butyric acid) ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ในการชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด และย้ายต้นที่สมบูรณ์นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้สำเร็จ

คำสำคัญ: วานิลา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเจริญเป็นต้นใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Node culture of *vanilla sp* was performed on solid MS (Murashige and Skoog 1962) medium supplemented with different concentrations of 0.5, 1, 3 and 5 mg/L BA (6-benzylaminopurine) 30 g/L sucrose and 2.6 g/L phytagel for 60 days. Results showed that the MS with 1 mg/L BA was the best to induce average multiple shoots. Root generation, was monitored on MS medium supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/L IBA (Indole-3-butyric acid) in the light condition for 60 days. Results showed that 3 mg/L BA induced the greatest number of roots. The plantlet were transferred in the pot.

Keywords: *vanilla sp*, tissue culture, regeneration

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2559 ประเภท ส่งเสริมนักวิจัย และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบคุณ คุณทัศนารถ กระจ่างวุฒิ ที่ได้อนุเคราะห์สายพันธุ์วานิลลา (*vanilla* sp.) จากแปลงทดลองส่วนพระองค์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ น้องๆ รวมทั้งลูกศิษย์ทุกคนที่มีร่วมในการวิจัย ครอบครัวที่กำลังใจ และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VI
สารบัญภาพ VII
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 1
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 2
1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย 3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ 4
2.1 ลักษณะทั่วไปของวานิลา 4
2.1.1 ถิ่นกำเนิด 4
2.1.2 การจัดหมวดหมู่ของวานิลา 5
2.1.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 5
2.1.3.1 วานิลา แพลนนิโฟเลีย (*Vanilla planifolia*) 5
2.1.3.2 วานิลา ปอมโปนา (*Vanilla pompona*) หรือ วานิลลอน (Vanillon) 6
2.1.3.3 วานิลา ตาฮาเทนซีส (*Vanilla tahatensis*) 7
2.1.3.4 เถางูเขียว (*Vanilla aphylla Rolfe*) 7
2.1.3.5 เอาะลบ (*Vanilla albida*) 8
2.1.3.6 สามร้อยต่อใหญ่ หรืองด (*Vanilla pilifera*) 9
2.1.3.7 พลูช้าง หรือตองผา (*Vanilla siamensis*) 9
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) 10
2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง 10
2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 11
2.2.2.1 การขยายพันธุ์พืช 11
2.2.2.2 การปรับปรุงพันธุ์ (plant improvement) 11
2.2.2.3 การผลิตพืชปราศจากโรค (disease-free plants) 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.2.4 การเก็บรักษาพันธุ์พืช (plant conservation)	12
2.2.2.5 การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)	13
2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)	13
2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส	13
2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)	14
2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	14
2.2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์	15
2.2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์	15
2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช	18
2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้	19
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	22
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	22
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง	23
3.2.1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอด	23
3.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก	23
3.2.3 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ	24
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	25
4.1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด	25
4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก	25
4.3 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ	26
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	28
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	29
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	30
ภาคผนวก ก	31
ข้อมูลประวัติผู้วิจัย	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962) 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ต้นวานิลา แพลนนิโฟเลีย	6
2.2 ต้นวานิลา ปอมโปนา	7
2.3 ต้นวานิลา ตาฮาเทนซีส	7
2.4 ต้นวานิลา เถางูเขียว	8
2.5 ต้นวานิลา เอาะลบ	8
2.6 ต้นวานิลา สามร้อยต่อใหญ่	9
2.7 ต้นวานิลา พลูช้าง หรือตองผา	9
4.1 การเจริญของข้อวานิลาในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน	25
4.2 การเจริญของข้อวานิลาในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30	26
4.3 การเจริญของรากจากส่วนข้อต้นวานิลา ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 60 วัน	26
4.4 สามารถชักนำให้เป็นต้นที่ที่มีรากที่สมบูรณ์	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย

วานิลา (Vanilla) เป็นพืชจัดอยู่ในสกุลกล้วยไม้ (Orchidaceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vanilla planlifolia* Andrew ชื่อพ้อง *Vanilla Maxicana* Mill, *Vanilla viradiflora Blume* ชื่อสามัญ วานิลา, Vanilla, Vanilla bean (http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/use/spicies10.htm) วานิลา หรือ ที่เราเรียก และเขียนกันเป็นส่วนใหญ่นั้น มาจากคำภาษาอังกฤษ “ Vanilla ” เขียนเป็นภาษาไทยให้ถูกต้องตามพจนานุกรมไทยของมานิต มานิตเจริญ พ.ศ. 2537 ว่า “วานิลา” จัดเป็นพืชที่คนไทยไม่คุ้นเคยเพราะเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในป่าแถบอเมริกากลาง โดยเฉพาะประเทศแมกซิโก และกัวเตมาลา สำหรับประเทศไทยไม่ทราบแน่ชัดว่าใครเป็นผู้นำวานิลามาปลูก และนำเข้ามาเมื่อไรสันนิษฐานว่าคงได้ต้นมาจาก อินโดนีเซีย มาปลูกไว้ที่สวนทดลองพืชสวนพลิ้ว จังหวัดจันทบุรีนานมาแล้ว (http://yalor.yru.ac.th/) วานิลาเป็นไม้ที่มีสารหอมระเหยที่สามารถนำสารสกัดมาใช้ในการทำอาหาร อุตสาหกรรมยาและสารหอมระเหยได้ ซึ่งประเทศไทยต้องมีการนำเข้าสารสกัดวานิลาเป็นจำนวนมากในแต่ละปี จึงน่าจะมีการศึกษาหาสายพันธุ์ทั้งวานิลาสายพันธุ์ป่า สายพันธุ์ที่เป็นการค้า เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ การปรับปรุงโดยใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถที่จะช่วยขยายพันธุ์วานิลาได้อย่างรวดเร็ว และสามารถเก็บรักษาต้นพันธุ์ไว้ในหลอดทดลองได้เป็นระยะเวลานาน

จากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความจำเป็นต้องมีการขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นจำนวนมาก และเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรม เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของตาข้าง เพื่อชักนำให้มีจำนวนยอดหลายยอด และชักนำให้เป็นต้นใหม่

1.2.2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของราก

1.2.3. ศึกษาวิธีการย้ายต้นที่สมบูรณ์ของวานิลาที่อยู่ในขวดออกปลูกในธรรมชาติได้จำนวนมาก

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างเพื่อชักนำให้มีจำนวนยอดหลายยอด และให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของราก และ ศึกษาการย้ายพืชจากขวดเพาะเลี้ยงออกสู่สภาพธรรมชาติได้จำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ปัจจุบันการปลูกและผลิตวานิลลายังไม่แพร่หลายในประเทศไทย แต่มีความสนใจและความต้องการปลูกทั้งหน่วยงานในภาครัฐและเอกชน จึงควรมีการศึกษาและสัมภาษณ์นักวิชาการผู้เกี่ยวข้องเพื่อให้เป็นข้อมูลแก่เกษตรกรหรือผู้ที่สนใจเพื่อพัฒนาระบบปลูกวานิลลาให้เหมาะสมกับการผลิตในประเทศ George และ Ravishankar (1997) การเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลา สกุล *V. planifolia* ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนนวนมาก จากนั้นย้ายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2-3 อาทิตย์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยวิธีนี้ยอดหนึ่งยอดสามารถเพิ่มเป็น 42 ยอด ในเวลา 134 วัน

Geetha และ Shetty (2000) ได้ทำการทดลองเลี้ยงปลายยอด และบริเวณตาข้างวานิลา สกุล *V. planifolia* ในอาหารสูตร คือ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์ แล้วย้ายไปในอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเซลล์ที่พัฒนาขึ้น แล้วย้ายลงมาเพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร N69 ที่ประกอบด้วย BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ d-biotin 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร folic acid 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดการยืดตัวของยอด และการเกิดราก หลังจากนั้นทำการตัดยอดที่มีขนาด 7-8 เซนติเมตร แล้วย้ายในอาหารสูตรเดิม ทุกๆ 2-3 สัปดาห์

Giridhar และคณะ (2002) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงปลายยอดของวานิลา สกุล *V. planifolia* ในอาหารสูตร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ PAA สามารถชักนำการเกิดยอดใหม่ที่เกิดจากตาได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถชักนำให้เกดเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ได้

Abebe และคณะ (2009) เพาะเลี้ยงส่วนข้อของวานิลาสายพันธุ์ *Vanilla planifolia* Andr ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ KIN และ NAA พบว่า BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KIN ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้เท่ากับ 3.12 ถึง 4.17 ยอด ในระยะเวลา 45 วัน ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และใน NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ สามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และ สานำออกปลูกและรอดในธรรมชาติได้ 85 เปอร์เซ็นต์

กษิดิศ และคณะ (2553) นำเมล็ดจากฝักช้างกระที่มีอายุประมาณ 7-9 เดือน ซึ่งมีสีครีมจนถึงน้ำตาลอ่อนมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตรต่างๆ โดยพิจารณาจากคะแนนในการงอกเมล็ด พบว่าเมล็ดงอกดีที่สุดบนอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) หรือ VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และน้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ที่ระดับ 2.7 คะแนน และอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นอ่อนคืออาหาร VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21 – 21 – 21 อัตรา 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ต้นอ่อนมีอัตราการเจริญเติบโต 1.70 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้นในระยะเวลา 9 เดือน ในการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีการชะลอการเติบโต การเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม mannitol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์ (w /v) โดยไม่เปลี่ยนอาหารนาน 12 เดือน สามารถชะลอการเติบโตของช้างกระได้โดยที่น้ำหนักสดยังคงเพิ่มขึ้น มีสีใบและลักษณะความสมบูรณ์ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการที่จะขยายพันธุ์ การเพิ่มปริมาณ โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นวานิลลา ให้มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ประโยชน์

1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

วานิลา (*Vanilla* sp), การเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำตาข้างให้เป็นต้นใหม่
2. ย้ายออกปลูกในธรรมชาติเพื่อได้ต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 วานิลา

วานิลามาจากคำในภาษาสเปน vainilla แปลว่า ฝักเล็กๆ จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Orchidaceae สกุล (Genus) Vanilla (Cemeron และคณะ, 1999) ประกอบด้วย 110 ชนิด (Portères, 1954; Purseglove และคณะ, 1981) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในป่าแถบอเมริกากลาง โดยเฉพาะประเทศเม็กซิโก และกัวเตมาลา (Funk และ Brodelius, 1990; Arenas, 1999) วานิลามักถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ไอศกรีม ช็อกโกแลต เค้ก เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง และยาสูบ (Korthou และ Verpoorte, 2007)

2.1.1 ถิ่นกำเนิด

วานิลา เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในป่าแถบอเมริกากลาง โดยเฉพาะประเทศเม็กซิโก และกัวเตมาลา ว่ากันว่าชาวสเปนรู้จักวานิลามาตั้งแต่กลางคริสต์ศตวรรษที่ 16 โดยมีชาวสเปนนำฝักวานิลาเข้าไปในประเทศสเปน และมีการตั้งโรงงานขึ้นสำหรับผลิตช็อกโกแลตกลิ่นวานิลา ปี ค.ศ. 1681 วานิลาถูกนำไปปลูกในคอสตาริกา และต่อมามีการนำเอาวานิลาไปใช้ในทางการแพทย์

สำหรับประเทศไทย ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าใครเป็นผู้นำวานิลามาปลูก และนำเข้ามาเมื่อไร แต่สันนิษฐานว่าคงได้ต้นพันธุ์มาจากประเทศอินโดนีเซีย และนำมาปลูกไว้ที่สถานีทดลองพืชสวนพลิ้ว จังหวัดจันทบุรีเมื่อนานมาแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่ามีการปลูกอยู่ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2521 แต่ไม่ได้ปลูกบนค้างโดยเฉพาะ แต่อาศัยค้างของเรือนเพาะชำ และปล่อยให้เกาะเป็นร่มเงาในเรือนเพาะชำ

ในปี พ.ศ. 2531 คุณอรุณ เลียววสุต นักวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรนำต้นพันธุ์วานิลามาจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีมาปลูกที่สถาบันพืชสวนชุมพร โดยใช้ค้างเสาซีเมนต์ที่ใช้ปลูกพริกไทย และปลูกอยู่ใต้ร่มเงาต้นมะพร้าว จนกระทั่งปี พ.ศ. 2534 วานิลาที่ปลูกเริ่มให้ผลผลิตปัจจุบันกรมวิชาการเกษตร มีการปลูกวานิลาเพื่อทดสอบในศูนย์วิจัย และสถาบันวิจัยพืชสวนหลายแห่งโดยเฉพาะสถานีทดลองพืชสวนดอยมูเซอจังหวัดตาก ศูนย์วิจัยพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การจัดหมวดหมู่ของวานิลา (Cemeron และคณะ 1999)

Kingdom Plant

Division Magnoliophyta

Class Asparagales

Family Orchidaceae

Subfamily Vanilloideae

Tribe Vanilleae

Subtribe Vanillinae

Genus Vanilla

Species เช่น *Vanilla aphylla* *V. griffithii* เป็นต้น

2.1.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

วานิลาเป็นพืชเถาเลื้อยอายุการให้ผลผลิตหลายปี เถาสามารถเลื้อยพันไปบนค้างหรือไม้ยืนต้นอื่นๆ โดยธรรมชาติจะอาศัยรากเป็นตัวยึดเกาะ วานิลาที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันซึ่งนำมาใช้ในการสกัดสารหอมเพื่อใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นอาหาร หรือเครื่องสำอางมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ วานิลา แพลนนิโฟเลีย (*Vanilla planifolia*) วานิลา ปอมโปนา (*Vanilla pompona*) และวานิลา ตาฮาเทนซีส (*Vanilla tahatensis*) แต่ที่นิยมปลูกมากที่สุด คือ วานิลา แพลนนิโฟเลีย (Bouriquet, 1954; Childers และคณะ., 1959; Correll, 1953; Purseglove และคณะ 1981; Sauer, 1993; Korthou และ Verpoorte, 2007)

2.1.3.1 วานิลา แพลนนิโฟเลีย (*Vanilla planifolia*)

ปลูกแถบตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเม็กซิโก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vanilla plannifolia* Andrew หรือ *Vanilla fargrans* (Salish) *Ames* ภาพที่ 2.1

1. ลำต้น มีลักษณะเป็นเถายาวสีเขียว อวบน้ำขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับ ความสมบูรณ์ของเถาเมื่องโค้งงอจะหักง่าย มีเส้นผ่านศูนย์กลาง1 - 2 เซนติเมตร ปล้องความยาว 5 – 15 เซนติเมตร

2. ใบ มีลักษณะแบน อวบน้ำใบกว้าง ปลายใบเรียว ก้านใบสั้น

3. ราก มีสีเขียว เป็นรากอากาศค่อนข้างยาว รากแตกออกตรงข้ามกับใบรากบริเวณโคนจะแตกออกมาเป็นแขนง

4. ช่อดอก ออกจากตรงซอกใบ ไม่มีก้านช่อดอกแตกออกไป แต่ละต้นมีประมาณ 4 ช่อ

5. ดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ดอกวานิลาจะมีสีเหลืองอมเขียว กลีบดอกหนา มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นหรือแทบไม่มีแต่ละช่อจะมีดอกเฉลี่ย 15 ดอก ดอกไม่เป็นที่ดึงดูดของแมลงจึงช่วยผสมเกสรมิเช่นนั้นจะไม่ติดฝักดอกจะบานตอนเช้าเวลาที่พร้อมจะผสมเกสร คือระหว่าง 08.00 - 10.00 ถ้ามีผู้ชำนาญจะผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

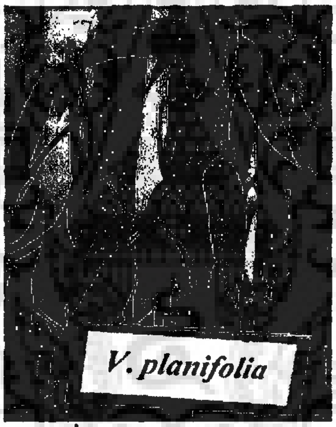
ติด 80 - 95 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังผสมติดแล้วรังไข่จะเจริญอย่างรวดเร็ว ส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่

-กลีบเลี้ยง (sepal) มี 3 กลีบรูปร่างยาวรี กว้าง 1.3 เซนติเมตร ยาว 5 เซนติเมตร

-กลีบดอก (petal) มี 3 กลีบ สองกลีบด้านบน มีลักษณะคล้ายกลีบเลี้ยง อีกกลีบหนึ่งเปลี่ยนเป็นรูปปากแตร เรียกว่า กลีบปาก (lip) มีกลีบดอกสั้นกว่ากลีบดอกอื่น ปลายปากแตรแยกเป็น 3 ส่วน และขอบหยักไม่สม่ำเสมอ

-เกสร มีเกสรตัวผู้ 1 อัน ประกอบด้วย อับละอองเกสรตัวผู้อยู่ 2 อัน ส่วนของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียจะแยกออกจากกัน โดยมีเยื่อบางๆกั้นอยู่ กั้นอยู่ เยื่อนี้เรียกว่า โรสเทลลั่ม (rosetellum) *เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ ละอองเกสรตัวผู้ไม่สามารถถ่ายลงไปผสมกับเกสรตัวเมียได้*

6. ฝัก มีลักษณะคล้ายทรงกระบอกแคบ โป่งตรงปลายฝัก มี 3 มุม ฝักยาว 9.5 - 14.5 เซนติเมตร กว้าง 1.2 - 1.4 เซนติเมตร การเจริญเติบโตของฝักวานิลาจะเป็นไปอย่างรวดเร็วภายใน 2 สัปดาห์ หลังการผสมติดจากนั้นการเจริญเติบโตจะค่อนข้างคงที่ ภายในฝักจะมีเมล็ดอยู่จำนวนมาก (*student.nu.ac.th/sangtawan/กรมวิชาการ.html*)

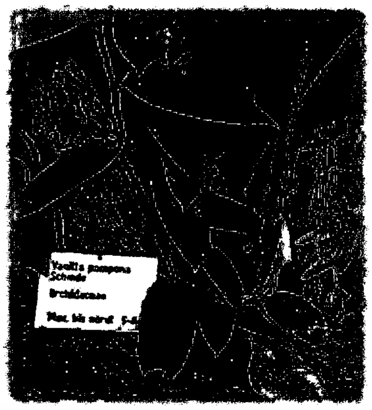


ภาพที่ 2.1 ต้นวานิลา แพลนนิโฟเลีย

2.1.3.2 วานิลา ปอมโปนา (*Vanilla pompona*) หรือ วานิลลอน (Vanillon) (ภาพที่ 2.2) ปลูกในอเมริกากลาง ใบมีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์แรก ลักษณะโดยรวมเหมือนกับวานิลา แพลนนิโฟเลีย แต่มีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ

1. ดอก มีสีเขียวอมเหลือง กลีบดอกและกลีบเลี้ยง มี 3 กลีบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 วานิลา ปอมโปนา

2.1.3.3 วานิลา ตาฮาเทนซีส (*Vanilla tahatensis*)

หรือเรียกว่า Tahitian vanilla ปลูกมากในประเทศตาฮิติ ลักษณะโดยรวมเหมือนกับวานิลา แพลนนิโฟเลีย (ภาพที่ 2.3) แต่มีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ

1. ใบ มีลักษณะแคบกว่า 2 พันธุ์แรก
2. ฝัก มีขนาดสั้นกว่า มีสีแดงปนน้ำตาล

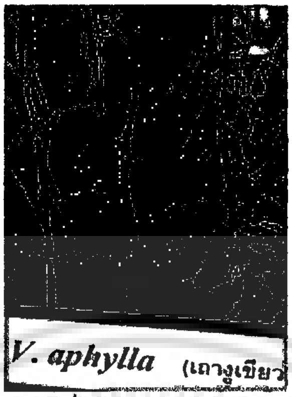
ภาพที่ 2.3 ต้นวานิลา ตาฮาเทนซีส

2.1.3.4 เถางูเขียว (*Vanilla aphylla Rolfe*)

จัดเป็นกล้วยไม้ประหลาดชนิดหนึ่ง เพราะใบลดรูปลงจนเหลือให้เห็นเป็นแค่เกล็ดเล็กๆ อยู่ตามข้อลำต้นที่เป็นเส้นยาวสีเขียว (ภาพที่ 2.4) จึงเป็นที่มาของชื่อ เพราะเมื่อเถาของมันเลื้อยไต่อยู่ในป่าดูเหมือนงูมาก จึงจัดว่าเป็นพวกไม่มีใบ ดอกมีสีเขียวออกตามข้อ กลีบปากมีกลุ่มขนสีม่วง ออกเป็นช่อ 2-3 ดอก ขนาด 3-4 เซนติเมตร เถางูเขียวออกดอกช่วงฤดูร้อน เดือนมีนาคม-กรกฎาคม มีการกระจายพันธุ์อยู่แถวภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคใต้ แหล่งที่สามารถชมกล้วยไม้ประหลาดชนิดนี้ได้ เช่น ที่เส้นทางศึกษาธรรมชาติเขาตระกรุบของสวนพฤกษศาสตร์ 100 ปี กรมป่าไม้ จังหวัดสระแก้ว และเส้นทางศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



ภาพที่ 2.4 ต้นเถางูเขียว

2.1.3.5 เอาะลบ (*Vanilla albida*)

วานิลาชนิดนี้พบทางภาคใต้ ลำต้นเป็นเถา อวบน้ำสีเขียวใบยาวรูปใบหอก หรือรูปขอบขนานปลายแหลมมีลักษณะอวบน้ำเช่นกัน ใบอาจยาวได้ถึง 15 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.5) ดอกออกเป็นช่อตามข้อสีเขียว กลีบปากสีขาว เอาะลบออกดอกช่วงฤดูร้อน มักพบขึ้นเลื้อยไต่ตามกิ่งไม้ในป่าดิบชื้น ใกล้ลำธารหรือน้ำตก แหล่งที่แนะนำให้ไปชมมีหลายแห่งด้วยกัน เช่น ที่น้ำตกเขาช่อง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาบรรทัด จังหวัดตรัง หรือที่น้ำตกธารโต อุทยานแห่งชาติบางลาง จังหวัดยะลา (http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43)

ภาพที่ 2.5 ต้นเอาะลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.6 สามร้อยต่อใหญ่ หรืองด (*Vanilla pilifera*)

จัดเป็นชนิดที่ค่อนข้างหาชมได้ยาก ลักษณะลำต้นและใบคล้ายกับเอาะลบ ต่างกันที่บริเวณข้อคอดกิ่ว จึงดูเหมือนลำต้นต่อกันเป็นท่อนๆ อันเป็นที่มาของชื่อ สามร้อยต่อใหญ่ (ภาพที่ 2.6) ออกดอกช่วงฤดูร้อนดอกมีสีเขียว ยกเว้นส่วนกลีบปากสีชมพูสวยงามมาก เคยมีรายงานกล่าวไว้ว่าพบที่จังหวัดปราจีนบุรี และที่เขาขั้นบันได จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ปัจจุบันแหล่งที่พบกล้วยไม้หายากชนิดนี้ได้คือที่บริเวณเส้นทางไปเขาปะการัง ตรงกิโลเมตรที่ 15 บ้านกร่างแคมป์ ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

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

ภาพที่ 2.6 ต้นสามร้อยต่อใหญ่

2.1.3.7 พลูช้าง หรือตองผา (*Vanilla siamensis*)

กล้วยไม้ชนิดนี้เป็นพรรณไม้ถิ่นเดียว (endemic) ของประเทศไทย จัดเป็นกล้วยไม้ ที่มีลำต้นยาวที่สุดชนิดหนึ่งในโลก เถามีขนาดใหญ่กว่าชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับใบซึ่งมีขนาดยาวได้ถึง 10 นิ้ว กว้างถึง 5 นิ้ว และอวบหนามากเป็นพิเศษ (ภาพที่ 2.7) พลูช้างออกดอกช่วงปลายฤดูร้อน ช่อดอกขนาดใหญ่เกิดตามข้อ ในประเทศไทยมีรายงานพบหลายแห่ง เช่น ที่อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพปุย จังหวัดเชียงใหม่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ และที่บริเวณน้ำตกสอยดาว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นที่ที่เราจะพบกล้วยไม้พิเศษต้นนี้ห้อยจากกิ่งต้นไม้ใหญ่ริมลำธารน้ำตกช่วงชั้นที่ 5 ถึงชั้นที่ 8

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

ภาพที่ 2.7ต้นพลูช้าง หรือตองผา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) (อนุรักษ์, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆ ส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

2.2.1.1 เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่มีเซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2.2.1.2 เนื้อเยื่อบริเวณปลายราก (root apex) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณถัดจากส่วนของหมวกราก (root cap) ซึ่งจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับบริเวณส่วนของปลายยอด

2.2.1.3 เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular ambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในบริเวณส่วนของราก และลำต้น โดยจะอยู่บริเวณระหว่างกลุ่มของท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem)

2.2.1.4 เนื้อเยื่อเจริญอยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

2.2.1.5 เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ได้แก่

2.2.1.5.1 ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื้อท่ออาหารและ cortex

2.2.1.5.2 ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.3 ใบ (leaf) ในส่วนของมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่เป็นจำนวนมาก เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์

2.2.1.5.4 ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.5 ผล (fruit) เนื้อเยื้อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.6 เมล็ด (seed) ในบริเวณส่วนของเมล็ดจะประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ เอ็มบริโอ เอ็นโดสเปิร์ม และใบเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็มบริโอภายในเมล็ดจะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จค่อนข้างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานหลายสาขาวิชา เช่น พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์ของเซลล์ พันธุวิศวกรรมด้านพืช สรีรวิทยาของพืช ชีวเคมี ชีวโมเลกุล เซลล์วิทยา โรคพืช พฤษศาสตร์ และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ที่สำคัญในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ

2.2.2.1 การขยายพันธุ์พืช (plant propagation) ในปัจจุบันการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีปกติมีหลายวิธี ได้แก่ การตอน การติดตา การทาบกิ่ง และการเพาะเมล็ด เป็นต้น แต่ละวิธีต่างก็มีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกัน เช่น การตอน การติดตา และการทาบกิ่ง จะได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนเดิม แต่การขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก ต้องใช้เวลายาวนาน สำหรับการเพาะเมล็ดจะได้ต้นพันธุ์ที่ไม่เหมือนเดิม อาจเกิดจากความผันแปรโดยได้ลักษณะที่ดี หรือไม่ดีไปจากต้นพันธุ์เดิมได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถช่วยเพิ่มการขยายพันธุ์พืชให้ได้จำนวนมาก และในระยะเวลาที่เร็วกว่าการขยายพันธุ์ตามวิธีปกติ

ในปัจจุบันสามารถขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เป็นจำนวนมาก ดังตัวอย่างต่อไปนี้

พืชไร่นา ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย หม่อน ยางพารา ยาสูบ ปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ ป่านศรนารายณ์ มันสำปะหลัง มันเทศ มันฝรั่ง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วอาหารสัตว์ งา เผือก ละหุ่ง ฝ้าย ปอแก้ว ปอกระเจา และหญ้าสายพันธุ์ต่างๆ เป็นต้น

ไม้ดอก และไม้ประดับ ได้แก่ กล้วยไม้สายพันธุ์ต่างๆ เบญจมาศ หน้าวัว ทานตะวัน กุหลาบ พุดสวน ยี่หุบ บอนสี โกสน ว่านสี่ทิศ ว่านมหาโชค ว่านนางคุ้ม ว่านแสงอาทิศ ขิงแดง ขิงชมพู ปทุมมา ดาหลา หมากผู้หมากเมีย สับปะรดสี เฟิร์นก้านดำ บัวสายพันธุ์ต่างๆ เยอร์บิรา แกลดิโอลัส ลิลลี่ อาฟริกันไวโอเล็ต กลอกซิเนีย บีโกเนีย จิบโซฟิลลา ลิเซียนทัส สแตติส อะโลคาเซีย คาเนชัน แคตตัส ดราเซียนา และฟิลโลเดนดรอน เป็นต้น

ผัก และไม้ผล ได้แก่ ขิง ข่า ขมิ้น บุก กลอย เผือก หน่อไม้ฝรั่ง ขนุน ส้ม มะนาว มะม่วง มะพร้าว มะเฟือง มังคุด ทุเรียน น้อยหน่า ชมพู่ ลำไย สับปะรด มะละกอ องุ่น อินทผาลัม กีวีฟรุต สตรอเบอรี กล้วยสายพันธุ์ต่างๆ กาแฟ และแตงโม เป็นต้น

การผลิตในรูปหัวมันฝรั่งขนาดเล็กเรียกว่า ไมโครทูเบอร์ (microtubers) หรือผลิตเมล็ดพันธุ์ผักต่างๆ ในรูปของเมล็ดเทียม ได้แก่ แครอท โดยการเพาะให้เกิดเป็นเอ็มบริออยด์ แล้วเคลือบด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนต *ผลสุดท้ายจะได้ลักษณะคล้ายกับเปลือกหุ้มเทียมที่เคลือบเอ็มบริออยด์เอาไว้* เลียนแบบเมล็ดในธรรมชาติ เมื่อนำไปออกปลูกจะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนเดิม

2.2.2.2 การปรับปรุงพันธุ์ (plant improvement) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เช่น การช่วยย่นระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ โดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูซึ่งมีจำนวนโครโมโซมหนึ่งชุดให้พัฒนาเป็นแคลลัสหรือต้นอ่อน จากนั้นเติมสารโคลชิซีนลงไปในอาหารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นมาอีกเท่าหนึ่งกลายเป็นสองชุดและเป็นสายพันธุ์แท้ หรือเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็นโดสเปิร์มซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุดก็จะได้พืชที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุด ซึ่งต้นพืชดังกล่าวเมื่อนำไปปลูกในสภาพธรรมชาติจะให้ผลที่ไม่มีเมล็ด นอกจากนี้ยังสามารถชักนำเกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี เช่น แกมมา อัลตราไวโอเลต และเอ็กซ์ เป็นต้น หรือใช้สารเคมี เช่น โคลชิซีน (colchicine) เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) และโซเดียมเอไซด์ (sodiumazide) เป็นต้น เพื่อให้เกิดสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะที่พึงประสงค์ เช่น สายพันธุ์กลายที่ทนทานต่อโรคแมลง ทนทานต่อสภาพดินกรด ดินเค็ม ทนต่อสภาพความแห้งแล้ง ทนทานต่อสารปราบวัชพืชบางชนิด หรือสายพันธุ์กลายที่มีสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่สูงขึ้นกว่าเดิม เป็นต้น

2.2.2.3 การผลิตพืชปราศจากโรค (disease-free plants) โดยทั่วไปพืชที่ถูกเชื้อจุลินทรีย์เข้าทำลาย เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย เชื้อไวรัสนี้จะติดไปกับส่วนของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชตลอดเวลาทำให้ไม่สามารถผลิตพืชที่ปราศจากโรคได้ ซึ่งมีผลต่อพืชโดยตรง คือ พืชต้นนั้นจะมีความอ่อนแอ อัตราการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ ผลผลิตต่ำหรืออาจทำให้พืชนั้นตายได้ การผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยการตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด ให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.01-0.05 มิลลิเมตร เพราะบริเวณปลายยอดมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว และต่อเนื่อง การตัดปลายยอดต้องตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไวรัสเคลื่อนตัวตามท่อน้ำ และท่ออาหารไปไม่ถึง เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ก็สามารถที่จะพัฒนาให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และปราศจากเชื้อไวรัส เช่น มะเขือเทศ ยาสูบ เผือก มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นต้น

2.2.2.4 การเก็บรักษาพันธุ์พืช (plant conservation) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำได้ในขวด จานแก้ว หรือในหลอดทดลอง ซึ่งต้องถูกเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพที่ปราศจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และใช้เนื้อที่ในการจัดเก็บน้อย จึงเหมาะสำหรับการเก็บรวบรวมสายพันธุ์พืชที่หายาก หรือพืชที่ใกล้จะสูญพันธุ์ชนิดต่างๆ มาเพาะเลี้ยงไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยต้องเลือกชิ้นส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืชให้เหมาะสมกับอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยง

วิธีที่จะเก็บรักษาสายพันธุ์พืชต่างๆ ไว้ในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแคลลัส และเซลล์แขวนลอย ในอาหารที่มีส่วนประกอบของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด ซึ่งมีผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ซึ่งเป็นการประหยัดอาหารที่เพาะเลี้ยง แรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายต่างๆ ในการที่จะต้องเปลี่ยนอาหารใหม่เป็นประจำทุกๆ เดือน และมีอีกวิธีหนึ่ง คือการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืช แคลลัส และเซลล์แขวนลอย ไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ได้ในระยะเวลานาน ซึ่งจะมีขั้นตอนที่ซับซ้อน และต้องใช้ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เมื่อต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืช แคลลัส และเซลล์แขวนลอย ก็สามารถที่จะย้ายออกจากไนโตรเจนเหลวโดยวิธีการที่ถูกต้อง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้ตามชนิดอาหารของพืชชนิดนั้นๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.5 การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) การนำเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้ผลิตสารเคมีบางชนิดเช่น แอลคาลอยด์ (alkaloid) สเตรอยด์ (steroid) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) แอนทราคิวโนน (anthraquinones) เรซิปีน (resepine) และสารอื่นๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในทางเภสัชกรรม เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น Ginseng (*Ranax ginseng c.v Meyer*) สามารถจะผลิตสารหลายชนิดที่มีผลต่อการช่วยให้เลือดไหลเวียนได้ดี และสารที่ต้านการเกิดมะเร็ง (anti-tumor) สำหรับการเพาะเลี้ยงต้นแพงพวยฝรั่ง (*Cantharanthus raseus*) ซึ่งมีสารแอลคาลอยด์หลายชนิด และมีสารที่สำคัญคือ vineblastine และ vineristine ซึ่งเป็นสารต่อต้านการเกิดมะเร็งเช่นกัน

2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรงไคมา (parenchyma) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆแคลลัสมีขนาดต่างๆกันหลายรูปแบบมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคคิวโอสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆฉ่ำน้ำ คล้ายกับฟองน้ำ เรียกว่า friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน เนื้อเยื่อพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิต สามารถที่จะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ ยกตัวอย่างเช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ลำต้น ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เมล็ด เรณู แคมเบียม คอร์เทกซ์ และท่อลำเลียงอาหาร เป็นต้น

2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

2.2.4.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึง สารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช โดยขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน เช่น ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนสูง เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นราก แต่ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนต่ำ เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นส่วนยอด ถ้าอัตราส่วนสมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นรากและยอด แต่ในบางกรณีอาจขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ

2.2.4.2 ธาตุอาหารชนิดต่าง เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท กลูตามีน แอลฟา-คีโตกลูตาลิก โพรลีน แอสปาราจีน อาร์จินีน และ ซิลเวอร์ไนเทรต นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าวยังมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน

2.2.4.3 แหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุสโตส น้ำตาลซอบิทอล น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลกาแลกโตส เป็นต้น ซึ่งโดยปกติจะใช้น้ำตาลประมาณ 20-40 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะต้องใช้แสงที่มีความเข้มข้นต่ำ หรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

2.2.4.5 สถานะของอาหารที่เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งจะช่วยให้แคลลัสมีพื้นที่สัมผัสอาหารน้อยกว่า

2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตรอาหาร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื้อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆจากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆสามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้ว หรือ ช้อนตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้นควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารต่างๆ แต่ละสูตรจะมีชื่อเรียกต่างๆ กัน ตามชื่อผู้คิดค้น เช่น

White (1943) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ

Vacin และ Went (1949) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

Murashige และ Skoog (1962) ค้นพบสูตร MS เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ

Linsmaier และ Skoog (1965) ค้นพบอาหารสูตร LS

Nitch และ Nitch (1969) ค้นพบสูตรอาหาร NN

Gamborg และคณะ (1968) ค้นพบสูตรอาหาร B_5

Chu (1975) ค้นพบสูตร N_6 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด

Lloyd และ McCown (1980) ค้นพบสูตร WPM เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้เนื้อแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Driver และ Kuniyuki (1984) ค้นพบสูตร DKW เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวอลนัส

2.2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์

2.2.6.1.1 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macro element/nutrients) (macronutrients หรือ major elements) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมาก และขาดไม่ได้ โดยทั่วไปพืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณ 25-60 มิลลิโมล หรืออาจจะมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.1.2 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micro-element/nutrients) (micronutrients หรือ trace elements) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมล โคบอลต์ (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล ทองแดง (Cu) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล โดยทั่วไปพืชต้องการแร่ธาตุอาหารรองไปใช้ในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์

2.2.6.2.1 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีสำคัญมาก มีผลทำให้พืชมีการพัฒนา และเจริญเติบโต มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

2.3.6.2.1.1 ไทอามีน (thiamine) หรือวิตามิน B_1 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{17}N_4OS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 265.35 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.2 อินโนสิทอล (inositol) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.15 ปกติจะใช้ในรูปของไมโอ-อินโนสิทอล (myo-inositol) ใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.3 ไนอะซิน (niacin) หรือกรดนิโคทินิก (nicotinic acid) หรือเรียกว่าวิตามิน B_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_5NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 123.11 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.4 ไพริดอกซิน (pyridoxine) หรือวิตามิน B_6 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_{11}NO_3$ น้ำหนักโมเลกุล 169.18 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.5 ไบโอติน (biotin) หรือวิตามิน H หรือวิตามิน B_7 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ น้ำหนักโมเลกุล 244.31 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.6 อะดีนีน (adenine) หรือวิตามิน B_4 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $\underline{C_5H_5N_5}$ น้ำหนักโมเลกุล 135.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.1.7 กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) หรือวิตามิน C สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_8O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 176.13

2.2.6.2.1.8 กรดโฟลิก (folic acid) หรือวิตามิน M หรือวิตามิน B_9 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{19}H_{19}N_7O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 441.14

2.2.6.2.1.9 กรดแพนโททีนิก (pantothenic acid) หรือแคลเซียมแพนโททีเนต (calcium pantothenate) หรือเรียกว่าวิตามิน B_5 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_9H_{17}NO_5$ น้ำหนักโมเลกุล 219.24

2.2.6.2.1.10 ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamine) หรือวิตามิน B_{12} สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{63}H_{90}CoN_{14}O_{14}P$ น้ำหนักโมเลกุล 1355.4

2.2.6.2.1.11 โคลีน คลอไรด์ (choline chloride) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_5H_{14}ONCl$ น้ำหนักโมเลกุล 139.63

2.2.6.2.1.12 ไรโบฟลาวิน (riboflavin) หรือวิตามิน B_2 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{17}H_{20}N_4O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 376.37

2.2.6.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโต พืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ขึ้นได้เอง และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโต เหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช เร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ สารควบคุมการเจริญเติบโต พืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

2.2.6.2.2.1 ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส ออกซินปกติจะพบในรูปของกรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acitic acid : IAA) ส่วน IAA ที่ผลิตจากทริปโตเฟนหรืออินโดล โดยส่วนมากพบได้ในใบอ่อนที่กำลังงอก และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาในขณะที่มีการงอก สาร IAA จะมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ควบคุมการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และมีผลในการกระตุ้นการเกิดราก

2.2.6.2.2.2 กรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acetic acid) หรือ 3-indolacetic acid เรียกย่อๆ ว่า IAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_9NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 175.19 สามารถละลาย ในอะซิโตน และอีเทอร์

2.2.6.2.2.3 กรดแอลฟาแนพทาลีนอะซิติก (α-napthalene acetic acid) หรือ 1-napthalene acetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า NAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{10}O_2$ ($C_{10}H_7CH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 186.21 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

2.2.6.2.2.4 กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2,4-D สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_6Cl_2O_3(Cl_2C_6H_3OCH_2CO_2H)$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.2.5 กรดอินโดล-3-บิวทีริก (3-idole butyric acid) หรือ indol-3-butyric acid หรือ 4-[3-indoly] butyric acid หรือ เรียกย่อๆ ว่า IBA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{13}NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 203.24 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และอะซิโตน

2.2.6.2.2.6 กรด 4-อะมิโน-3,5,6-ไตรคลอโรพิโคลินิก (4-amino-3,5,6-trichloro picolinic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า picloram สูตรทางเคมีประกอบด้วย C_6H_3 $Cl_3N_2O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 241.46 สามารถละลายในน้ำ และอะซิโตน

2.2.6.2.2.2 ไซโตคินิน (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีนซึ่งพบได้หลายชนิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไซโตไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดีนิน โดยจะเกิดในบริเวณปลายราก และเอ็มบริโอที่กำลังเจริญ มีผลต่อการแสดงออกของพืช คือสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม นอกจากนี้ยังกระตุ้นการเจริญทางด้านข้างของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง ชะลอการแก่ของพืช นอกจากนั้นยังมีผลเล็กน้อยต่อการพัฒนาของผลโดยสารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่

2.2.6.2.2.2.1 6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า ไคนีทีน (kinetin) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_9N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล215.2 สามารถละลายในเมทานอล และเอทานอล

2.2.6.2.2.2.2 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า BA หรือ BAP สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{11}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 225.26 สามารถละลายในเมทานอลและ เอทานอล

2.2.6.2.2.2.3 2-ไอโซเพนทินิลอะมิโนเพียวรีน (2-isopentenyl aminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2iP สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{13}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 203.3 ละลายใน 1N. NaOH

2.2.6.2.2.2.4 ซีเอทิน (zeatin) หรือ 6-(4-ไฮดรอกซี-3-เมทิล-ทราน-2-บิวทีนิวอะมิโน) เพียวรีน (6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino) purine) หรือเรียกย่อๆ ว่า zea เป็นสารที่เกิดในธรรมชาติ สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{13}N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 219.25 ลักษณะสีขาวปนเหลืองๆ ละลายใน 1N. NaOH

2.2.6.2.2.3 จิบเบอร์เรลลิน (gibberellin) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid) สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญขึ้น กรดจิบเบอร์เรลลิก สามารถที่จะเคลื่อนย้ายผ่านท่อน้ำและท่ออาหารได้

กรดจิบเบอร์เรลลิก หรือเรียกย่อๆ ว่า GA_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{19}H_{22}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346.38 สามารถละลายใน เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน ที่มีส่วนสำคัญในการให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีทั้งชนิดที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยปกติจะใช้น้ำตาลปริมาณ 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเตรียมอาหาร 1 ลิตร หรือพบในบางรายงานอาจใช้ปริมาณมากกว่านี้ ตัวอย่างน้ำตาลที่ใช้ได้แก่

2.2.6.2.3.1 กลูโคส (glucose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16

2.2.6.2.3.2 ฟรักโทส (fructose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16

2.2.6.2.3.3 กาแลกโทส (galactose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16

2.2.6.2.3.4 ซอบิทอล (sobitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17

2.2.6.2.3.5 แมนนิทอล (mannitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17

2.2.6.2.3.6 ซูโครส (sucrose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30

2.2.6.2.3.7 มอลโทส (maltose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30

2.2.6.2.4 กรดอะมิโน (amino acid) กรดอะมิโนมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก กรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ไกลซีน (glycine) ใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน (glutamine) และ กรดกลูตามิก (glutamic acid) ใช้ประมาณ 8 มิลลิโมล อะลานีน (alanine) ซีสทีน (cystein) และ อาร์จีนีน (arginine) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปาราจีน (asparagine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสปาติก (aspartic acid) ไทโรซีน (tyrosine) และ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลิวซีน (leucine) เมทไทโอนีน (methionine) โพรลีน (proline) ใช้ประมาณ 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซอรีน (serine) ทริปโตเฟน (tryptophan) เป็นต้น

2.2.6.2.5 สารอื่น ๆ เช่น สารอินทรีย์อื่นๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน (coconut milk) น้ำมะเขือเทศ (tomato juice) น้ำองุ่น (grape juice) น้ำมันฝรั่ง (potato juice) กล้วย (banana) น้ำข้าวโพด (corn milk) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) และอื่นๆ บทบาทของสารอินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ผงถ่าน (activated charcoal) เมื่อเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกมาจาก มักใช้ผงถ่านที่ความเข้มข้นประมาณ 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์

2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับขั้นตอนนี้ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอกเป็นต้น โดยจะต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพราะว่าในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ จะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แพร่กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โดยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไป พร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆภายในก็จะสูญเสียไปด้วย สารเคมีสามารถทำปฏิกิริยากับสารในไซโตพลาสซึม จะมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจะต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

2.2.7.1 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีเปอร์เซ็นต์ความปลอดจุลินทรีย์สูง

2.2.7.2 สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว

2.2.7.3 สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว ไม่ควรมีสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์

2.2.7.4 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

2.2.7.5 ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้

2.2.8.1 แคลเซียมไฮโปรคลอไรด์ ($Ca(OCl_2)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.2 โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ($Na(OCl_2)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.3 คลอร็อกซ์ (Clorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันโดยทั่วไปตามบ้าน หรือน้ำยาซักผ้าขาวที่มีชื่อทางการค้าว่า ไฮเตอร์ โดยมีส่วนประกอบของโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 5-15 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.4 เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 1-5 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.5 ซิวเวอร์ไนเทรต ($Ag(NO_3)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.6 สารละลายโปรไมด์ (bromide solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.7 เมอคิวริคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีพอสมควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8.8 เมอคิวริไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีเมอคิวริโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.3.8.9 สารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 4-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ใช้ 30-60 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆในการฆ่าเชื้อโยไม่ต้องใช้สารเคมี เช่น การอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light) หรือที่เรียกกันว่าแสง UV การเผาไฟซึ่งใช้กับตัวอย่างที่แข็งๆ เช่น เมล็ด ท่อนไม้ เป็นต้น

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลา เพื่อขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพอสรุปได้ดังนี้

Janarthanam และ Seshadri (2008) กล่าวว่า วานิลาเป็นพันธุ์พื้นเมืองเขตร้อนที่เป็นที่รู้จักกันดีคือเป็นพืชที่มีกลิ่นและมีผลยาวโค้ง โดยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส พบว่า การเพาะเลี้ยงโดยใช้ใบสามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่าลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MS ที่มี 2,4-D เข้มข้น 4.52 ไมโครโมลลา และ BAP เข้มข้น 2.22 ไมโครโมลลา จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA เข้มข้น 13.43 ไมโครโมลลา และ BAP เข้มข้น 13.32 ไมโครโมลลา พบว่า สามารถชักนำยอดได้ 14 ยอด หลังจากการเพาะเลี้ยง 40 วัน และชักนำการเกิดรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี IAA และ NAA ได้ด้วย

Abebe และคณะ (2009) เพาะเลี้ยงส่วนข้อของวานิลลาสายพันธุ์ *Vanilla planifolia* Andr ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ KIN และ NAA พบว่า BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KIN ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้เท่ากับ 3.12 ถึง 4.17 ยอด ในระยะเวลา 45 วัน ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และใน NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ สามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และ สานำออกปลูกและรอดในธรรมชาติได้ 85 เปอร์เซ็นต์

Mondal และ คณะ 2013 กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สายพันธุ์ *Doritis pulcherrima* Lindl. จากตาข้างและ protocorm-like body (PLB) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิดยอด ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Knudson's C ที่ประกอบด้วย peptone 0.1% และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BAP พบว่า NAA และ BAP สามารถชักนำการเจริญของตาข้าง PLB อีกทั้งยังสามารถชักนำการเกิดรากได้ โดยตาข้างสามารถชักนำการเกิดยอดได้ดีที่ BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PLB ชักนำการเกิดยอดได้ดีที่ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองยังพบว่า BAP ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญของตาข้างและ PLB ได้ และที่ NAA ความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำการเกิดรากได้ดี แต่อย่างไรก็ตามการเจริญของรากสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biradar และ คณะ (2016) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลาสามารถเพื่อเพิ่มปริมาตรและพัฒนาสายพันธุ์ของวานิลา เป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้มาก โดยสามารถทำได้หลายประการ เช่น การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม ราก ตาข้าง โดยในงานวิจัยชิ้นนี้ทำการทดลองการชักนำยอดของ *Vanilla Planifolia* บนอาหารสังเคราะห์ MS ที่มี BAP ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า BAP เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเจริญได้ดีที่สุด และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพของ BAP ร่วมกับน้ำมะพร้าว พบว่า BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร L ร่วมกับน้ำมะพร้าว 1.5 เปอร์เซ็นต์ ชักนำการเจริญได้ดีและยังพบว่าอาหารสังเคราะห์ MS ที่มี IAA Kn BAP D-Biotin Ca-Pentatrenate ชักนำการเจริญได้ดีเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

วานิลามีชื่อวิทยาศาสตร์ *vanilla sp.*

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)

3.1.2.2 อาหารผงสำเร็จสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1962)

3.1.2.3 วุ้นไฟตาเจล

3.1.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ไฮโดรคลอริก (HCl)

3.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.1.3.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)

3.1.3.1.1 Indole-3-butyric acid (IBA)

3.1.3.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)

3.1.3.2.1 N6-benzylaminopurine (BA)

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)

3.1.4.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)

3.1.4.3 ตู้อบความร้อน (hot air oven)

3.1.4.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และหยาบ (balance)

3.1.4.5 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.1.4.6 เครื่องเขย่า (shaker)

3.1.4.7 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)

3.1.4.8 ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.1.4.9 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beaker)

3.1.4.10 กระบอกตวงขนาดต่างๆ 100 200 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (cylinder)

3.1.4.11 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดต่างๆ 1 2 4 6 และ 8 ออน (bottle)

3.1.4.12 ปากคีบขนาดต่างๆ (forcept)

3.1.4.13 มีดผ่าตัดขนาดต่างๆ (knives)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.14 ช้อนตักสาร (spectula)

3.1.4.15 เวอร์เนียร์ (Vernier caliper)

3.1.4.16 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner Stainless)

3.1.4.17 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.1.4.18 ทิปขนาดต่าง ๆ (tip)

3.1.4.19 กล้องถ่ายภาพดิจิตอล กล้องสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.4.20 กระถาง ดิน ปุ๋ย และ ยาฆ่าแมลง

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอด

นำส่วนตาข้างมาทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า จากนั้นทำการตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก แล้วนำส่วนของตาข้างมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอก 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะ และเมอร์คิวลิกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ย้ายลงบนจานกระดาษ ตัดแต่งส่วนของตาข้าง จากนั้นนำส่วนตาข้างมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

เพาะเลี้ยงตาข้างวานิลลาสายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ประกอบด้วยระดับความเข้มข้นของสารควบคุมเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มืด ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโต แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก

นำต้นใหม่ที่ได้มาชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยระดับความเข้มข้นของสารควบคุมเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตเป็นจำนวนราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 และ 60 วัน แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

หลังจากชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วนำต้นวานิลา ออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 3-7 วันเพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ

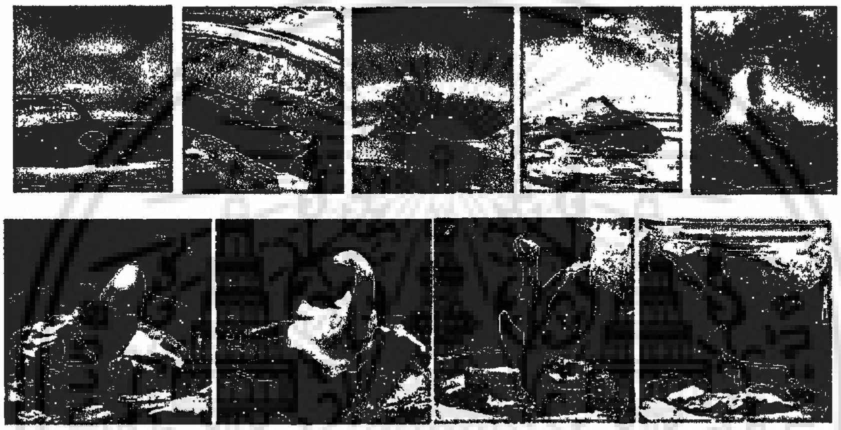
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

นำส่วนตาข้างวานิลาไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดต่อต้นได้สูงที่สุด 1.8 ยอดต่อต้น และ 3.73 ยอดต่อต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน และ 60 วันตามลำดับ (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 การเจริญของข้อวานิลาในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน

4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก

การชักนำให้เกิดรากจากส่วนของต้นที่สมบูรณ์ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด ในระยะเวลา 60 วัน (ภาพที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 การเจริญของข้อวานิลาในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30

4.3 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

การชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 4.3) แล้วนำต้นวานิลา ออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 3-7 วัน เพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ และสามารถย้ายปลูกในดินได้สำเร็จ สามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 4.4)

ภาพที่ 4.3 การเจริญของรากจากส่วนข้อต้นวานิลา ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.4 สามารถชักนำให้เป็นต้นที่ที่มีรากที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนข้อของวานิลาในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นนำต้นมาชักนำให้เกิดราก ในอาหารแข็ง สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ในระยะเวลาเวลา 60 วัน และย้ายต้นที่สมบูรณ์นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้เป็นผลสำเร็จ

สามารถเก็บรักษาต้นขนาดเล็กไว้ในหลอดทดลองเพื่อเป็นการรักษาพันธุกรรมของวานิลาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

Anurug Poeaim and Tassnart Krajangvuthi. 2017. **Regeneration of *Vanilla aphylla* from immature seeds explants. International Conference on "Advanced Technologies and their Applications in Agriculture" March, 27-29, 2017, Cairo, Egypt .**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

กษิดิศ ดิษฐบรรจง ชยานิจ ดิษฐบรรจง และ บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ. 2533. การขยายพันธุ์และการเก็บรักษากล้วยไม้ช้างกระในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 48.571-578.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. เทคโนโลยีชีวภาพของพืช. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 159 น.

Abebe, Z., Mengesha, A., Teressa. A and W.Tefera. 2009. Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. African Journal of Biotechnology Vol. 8. (24): 6817-6821.

Biradar, V. Inamdar, A. Shamse, A. and Patil, M.S. 2016. *In Vitro* Studies on the Influence of Different Concentrations of Growth Regulators on Economically Important Orchid, *Vanilla planifolia.* International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 5(9) : 311-323.

Geetha, S. and S.A. Shetty. 2000. *In vitro* propagation of *vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science*. 79 (6) : 886 – 889.

George, P.S and G.A. Ravishankar. 1977. In vitro multiplication of *vanilla planifolia* axillary bud explants. Plant cell report. Vol 16:490-494.

Giridhar, P., Ramu, D.V and G.A. Ravishankar. 2002. Plenyl acetic acid-induced *in vitro* shoot multiplication of *vanilla planifolia*. Tropical Science Vol 43(2): 92-95.

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

Korthou, H. and Verpoorte, R. 2007 *Vanilla*. In Flavors and Fragrances. 202–217.

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physio. Plant 15:473 – 497.

Sauer, J.D. 1993. Historical Geography of Crop Plants: A Select Roster. Boca Raton.

Vacin, E. F and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110 : 605-613.

http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/use/spicies10.htm

http://yalor.yru.ac.th/

http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html

student.nu.ac.th/sangtawan/กรมวิชาการ.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม/ลิตร)
NH_4 NO_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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

ส่วน ค ประวัติ

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

3. หน่วยงานที่สังกัด สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เลขที่ 1 ถนน ฉลองกรุง 1 เขต ลาดกระบัง กรุงเทพ 10520.

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา ตรี โท เอก	อักษรย่อและปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2531	ตรี	วท.บ วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาศาสตร์	ชีววิทยา	ศรีนครินทรวิโรฒ	ไทย
2535	โท	วท.ม วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร์	พันธุศาสตร์	เกษตรศาสตร์	ไทย
2548	เอก	Dr. Sci. in Agr.		Plant Breeding and Molecular Genetics	Kyushu Tokai University	Japan

6. ระบุสาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยการใช้รังสี และสารเคมี การย้ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม และเครื่องยิงยีน การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

รางวัลและเกียรติประวัติที่เคยได้รับ

1990-1991	Thesis of Master Degree at Kasetsart university	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (NCGEB) Bangkok ,Thailand.
1995-1998	Plant tissue culture of Rice and Corn	National Research Council of Thailand.
1995	Visiting at Kyushu Tokai University. Japan.	Visiting scholar under the Acadermic Exchang Program between King Mongkut's Institute

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan.
1996-1998	Thai rice genetic transformation by Agrobacterium	The Rockefeller Foundation USA.
2001	Visiting at Kyushu Tokai University. Japan.	Visiting scholar under the Academic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan.
2002-2005	Doctural Degree at Kyushu Tokai University , Japan.	Visiting scholar under the Academic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan.
2006-2009	Improvement of Nile Grass (*Acrocras macrum* Stapf) by Tissue Culture.	National Research Council of Thailand.
2009-2010	Genetics variation of *Ficus* sp.	Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
2010-2011	Genetic diversity in *Passiflora* spp.	Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
2009-2011	Mass Propagation of *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture for Agricultural and Studies on Genetic Diversity.	National Research Council of Thailand.
2011-2012	Improvement of *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade for virus resistance by tissue culture.	National Research Council of Thailand.
2013	Study on factor for plant regeneration of Hoya.	Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2013	Study on cost and time to produce of Rhizoma peanut (*Arachis glabrata*) by tissue culture and to determine the mutation after culturing.	Fund of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
2014	Study on drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by tissue culture and induction by gamma ray.	The Office of the Higher Education Commission Thailand.
2014	Study on factor for callus induction plant regeneration of *Aristolochia ringens* Vahl.	Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
2015	Micropropagation and genetic conservation of *vanilla* sp. by *tissue culture*	Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2015	Study on produce of peanut plant (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) for drought tolerant by tissue culture	National Research Council of Thailand

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ยาสุชิ มัสสุดะ และ ทัสสุโระ มุระตะ. 2548 การศึกษาผลของความดันและระยะทางจากเครื่องยิงอนุภาคต่อไมโครแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากเซลล์แขวนลอยของหญ้า สายพันธุ์ "ยูคิกิรุชิ" (*Zoysia japonica*) การประชุมพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 26-29 เมษายน.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ปราการ กระถินทอง และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2548. ชนิดของอะโกรแบคทีเรียมที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 565-572 น.

Poeaim, A, Y, Matsuda and T. Murata. 2004. Optimization of callus induction and plant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

regeneration from seed explants of Zoysia species. J Jpn Soc Turfgrass Sci 31: 3-10.

Poeaim, A., Y, Matsuda, T, Inoue, T, Shigeyasu and Tatsuro Murata. 2004. Estiblishment of plant regeneration systems from callus in the lawn grass (*Zoysia minima*) collectioned from New Zealand. Breeding research. Ikushugaku Kenkyu. Japan.

Poeaim, A., Y, Matsuda, and T.Murata. 2005. Callus formation and plant regeneration from shoot tip of Zoysis species. Proceedings of the school of agriculture, Kyushu Tokai University. Vol 24:29-36.

Poeaim, A., Y, Matsuda and T. Murata. 2005. Plant regeneration from immature florescence of zoysiagrass. Plant Biotechnology. 22(3), 245-248.

Poeaim, A., Y, Matsuda and T. Murata. 2005. Callus induction and plant regeneration from seeds and shoot tip explants of *Zoysia minima* collected from New Zealand. J Jpn Soc Turfgrass Sci. Vol 34(1) 1-7.

Poeaim, A., K. Meepian , J. Benjanukrom and N. Sangduen. 2006. Plant regeneration from suspension Culture of RD 6 and Chainat rice (*Oryza sativa* L.). Conference *Science and Technology Thammasat University.*

Poeaim, A., O. Chonvanich and S. Amnuaypanich. 2006. Plant regeneration from somatic embryogenesis in Bermudagrass. International Conference on Applied Science (ICAS-2006) Vientiane, 5-7 November. Loa. 296-300

Poeaim, A., S. Sukhawat and S. Hungtrakul. 2006. Regeneration of Ruzi grass (*Brachiaria ruziziensis*) by Tissue culture. The 6th National Horticultural Congress.7-10 November. Lutus Hotel Pang Suan Kaew Chiang Mai. Thailand. 909-912.

Poeaim, A. T. Wongkankha and S. Jayasuta. 2007. Efficiency of gene transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in tissue of F60 grass (*Zoysia japonica*). 45th Kasetsart University Annual Conference. 30 January-2 February. 45. 224-229.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม นิตย์ศรี แสงเดือน ชาญวิทย์ ม่วงมิตร และ ชำนาญ ฉัตรแก้ว . 2550. การเจริญเป็นแคลลัส และ เซลล์แขวนลอยของเนื้อเยื่อสบู่ดำสายพันธุ์ สมก. ในโครงการสัมมนาวิชาการ เรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1 จัดโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 119-123.

Poeaim, S., A. Poeaim and K. Soytong. 2007. Determination of the genetic relationship of Vanilloideae (Orchidaceae) based on the sequence of the internal transcribed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spacer of ribosomal DNA. Proceedings of the International Conference on Science and Technology for Sustainable Development. Bangkok, Thailand. 26-27 April. 514-517.

Poeaim. A., S. Poeaim and N. Sangduen. 2007. Gene Transformation in Calli of Supunburi 1 Rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium tumefaciens.*The 2nd International Conference on Rice for the Future. Bioasia 2007 5-6 November, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. 385-391.

Poeaim, A., Y. Matsuda and T. Murata. 2008. Effect of pressure and distance of grass variety "V.102" (*Zoysia minima*) microcallus from suspension culture using particle bombardment. 46th Kasetsart University Annual Conference. 29 January - 1 February. 609-615.

Poeaim, A., S, Sukhawat., A, Jantakarn and P. Pongtongkam. 2008. Induction embryogenic callus and plant regeneration of Nile grass (*Acroceras macrum*). 46th Kasetsart University Annual Conference. 29 January-1 February. 603-608น.

Sukhawat. S and A. Poeaim. 2008. Plant regeneration from cell suspension culture of Nilegrass (*Acroceras macrum*). The 7th National Horticultural Congress, May 26-30. Amarin Lagoon Hotel, Phitsanulok, Agricultural Sci. J. 39(3) (Suppl.) : 556-559.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม วิชุดา พิริยพลพงศ์ ศุภลักษณ์ มั่นไทย ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2551. **การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด.** **การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่** 5. 8-9 **ธันวาคม.**1139-1145 **น.**

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ศรัณย์ สุขวัฒน์ จันทกานต์ อรณนันท์ และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2552. **การพัฒนาเป็นต้น ใหม่จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของหญ้าไนล์. วารสารพันธุศาสตร์** 2(1) 30-35 **น.**

Sukhawat, S and A. Poeaim. 2009. Efficiency of gene transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Node tissue of Nilegrass (*Acroceras macrum*). The International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences in Collaboration with Kasetsart University 23-27 Febuary the Emerald hotel, Rachadapisek Road, Bangkok Thailand. 99-106.

ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. **ผลของสภาวะแล้งจากการชักนำด้วย** PEG **ต่อการพัฒนาเป็นต้นในเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์. การประชุมทางวิชาการ พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่** 16. 281-286 **น.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิริพร ขุนศรี และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. การขยายพันธุ์ของวานิลา (*Vanilla planifolia* Andr.) จากการ เพาะเลี้ยงตาข้างในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช. กรุงเทพฯ, 630-635 น.

ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. การชักนำให้เกิดเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์ในสภาพปลอดเชื้อ. ว. วิทย. กษ. 40:1 (พิเศษ) 197-200.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2554. การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาตา (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) รวมผลงานประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 17: การวิจัยพันธุศาสตร์เพื่อแปลผลสู่การประยุกต์. โรงแรมอิมพีเรียลแม่ปิง จังหวัดเชียงใหม่. ระหว่างวันที่ 7-9 เมษายน. 175-178.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม มธุรา อุณหศิริกุล อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ โองการ วณิชาชีวะ. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจักรนารายณ์บริเวณ *trn*L intron ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ. เอกสารรวมผลงานการประชุม วิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 17: การวิจัยพันธุศาสตร์เพื่อแปลผลสู่การประยุกต์. โรงแรมอิมพีเรียลแม่ปิง จังหวัดเชียงใหม่. ระหว่างวันที่ 7-9 เมษายน 2554. 199-202.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554. การเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. ว. วิทย. กษ. 42(2) (พิเศษ) 185-188.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2554. การศึกษาการเจริญของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianesis* CIAT 184) การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาพืช. กรุงเทพฯ

Boonruang Ratanaporn. A., Poeaim, A., Jantakarn and P. Pongtongkam. 2012. An efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from callus of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. 1st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2011) 26-29 January KMITL Bangkok Thailand. 42-46.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาถสุดา พุทธรักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2555. การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด. Thai J. Genet. , 5(2): 194-202.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม รัญญิการ์ โปราหา ราริ ช้อนทอง อรสา จันทิมา และแสงทอง พงษ์เจริญกิต. 2555. การชักนำแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร. การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9. 2182-2188.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. 2556. Genetic Diversity in *Passiflora* spp. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18. Thai J. Genet. S(1): 214-217.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจติยา ด่านธนวานิช, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และวินัย สมประสงค์. 2556. ความหลากหลาย และ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ในประเทศไทย. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 18: พันธุศาสตร์ก้าวสู่อาเซียน. Thai Journal Genetic. S (1): 210-213.

Chaiyabut, A., Poeaim, S., Poeaim, A and Distabanjong, K. 2014. Genetic diversity analysis of sugarcane (*Saccharum* sp.) in Thailand using RAPD technique. Journal of Agricultural Technology. 10(1): 159-165.

Poraha, R. and Poeaim, A. 2014. Optimal media for callus induction of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties RD6 and Khao Pong Krai. Proceedings of the 3rd TSB International Forum 2014 “Green Bioprocess Engineering”. September 16-19. 110-113.

Danthanawanit, C., Poeaim, S and Poeaim, A. 2015. Evidence of molecular marker for genetic relationship of *Asystasia gangetica* (Linn) T. Anderson. Journal of Agricultural Technology. 11(2): 287-296.

Poraha, R., Poeaim, A., Pongjaroenkit S. and Pongthongkam P. 2015. Callus induction and growing cell suspension culture of jow haw rice (*Oryza sativa* L.) Journal of Agricultural Technology 2015 Vol. 11(2): 279-305.

Poraha, R., Poeaim, A., Pongjaroenkit, S. and Pongthongkam, P. 2015. Effect of different media and concentrations of growth regulator on callus induction and growing suspension cell culture of San-pah-tawng1 (*Orayza sativa* L.). The 2nd International Symposium on Agricultural Technology (ISAT2015) “Global Agriculture Trends for Sustainability”. July 1-3.

Poraha, R., Poeaim, A., Pongjaroenkit, S. and Pongthongkam, P. 2015. Growth curve and cell viability of growing cell suspension culture in RD6 and Khao Pong Krai rice (*Oryza sativa* L.). National Genetics Conference 2015 (NGC2015) “Genetics and Genomics: from Molecular Studies to Applications”. July 15-17. 220-225.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ธราพงษ์ สุทธิวโรดม กิตติชัย ชัยทวีวัฒน์ เธียรรัตน์ หลีวิจิตร จันทกานต์ อรณนันท์ และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2558. อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) สายพันธุ์ Arbrook. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 19. 271-275.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม รัญญิการ์ โปราหา จิดาภา นวานุช พงศ์นเรศ กฤษบุญ พวงผกา ยาชุมภู แสงทอง พงษ์เจริญกิต และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2558. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในข้าว 6 สายพันธ์ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 19. 276-281.

Poeaim, A., Poeaim, S., Pongtongkam, P. and A, Jantakarn. 2015. Callus induction and cell suspension cultures of rhizome peanut (Arachis glabrata) cultivars: Arbrook. Journal of Agricultural Technology 2015 Vol. 11(8): 2481-2488.

Phong, N.H., W. Pongnak, K. Soytong, S. Poeaim and A, Poeaim. 2016. Diversity of tea (*Camellia sinensis*) grown in Vietnam based on morphological characteristics and inter-primer binding sites (iPBS) marker. Int. J. Agric. Biol., 18: 385-392.

Poeaim, A ., Poeaim, S Poraha, R., Pongjaroenkit, S. and P, Pongthongkam. 2016. Optimization for Callus induction and plant regeneration from mature seeds of thai rice variety: Nam Roo (*Oryza sativa* L.) Conference Proceedings. May 10-12, Osaka, Japan. 480-487.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้