การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญของพืช ที่เหมาะสมต่อการชักนำน้อยหน่าเครือให้เจริญด้วย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

MEDIUM AND PLANT HORMONES FOR PLANT TISSUE CULTURE GROWTH OF *Kadsura* spp.

ฝากฝัน พันธุ์พิทย์แพทย์
สิรี รวมทรัพย์
อัษฎาวุธ แป้นเจริญ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MEDIUM AND PLANT HORMONES FOR PLANT TISSUE CULTURE GROWTH OF *Kadsura* spp.

FAKFUN PHANPHITPHAET
SIREE ROUMSUB
ATSADAWUT PANCHAROEN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำน้อยหน่าเครือให้เจริญด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Medium and Plant Hormones for Plant Tissue Culture Growth of *Kadsura* spp.		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฝากฝัน	พันธุ์พิทย์แพทย์	รหัสนักศึกษา 58050785
	นางสาวสิริ	รวมทรัพย์	รหัสนักศึกษา 58050829
	นายอัษฎาวุธ	แป้นเจริญ	รหัสนักศึกษา 58050846
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ภาควิชา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) ให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร. วิมลมาศ บุญมี กรรมการ	
ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำน้อยหน่าเครือให้เจริญด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฝากฝัน	พันธุ์พิทย์แพทย์	รหัสนักศึกษา 58050785
	นางสาวสิรี	รวมทรัพย์	รหัสนักศึกษา 58050829
	นายอัษฎาวุธ	แป้นเจริญ	รหัสนักศึกษา 58050846
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ภาควิชา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม		

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำชิ้นส่วนน้อยหน่าเครือให้เกิดการเจริญภายใต้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการศึกษาใช้ชิ้นส่วนจากต้นน้อยหน่าเครือ 2 รหัส ในการทดลอง โดยในการทดลองใช้น้อยหน่าเครือรหัส 024 และ 025 มาชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด พบว่าอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้น้อยหน่าเครือทั้งรหัส 024 และ 025 มีการเกิดยอดได้มากที่สุด แต่อาหารสังเคราะห์ MS สูตรปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถทำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด และในการชักนำแคลลัสของน้อยหน่าเครือรหัส 001 ให้เกิดเอ็มบริโอพบว่า อาหาร MS สูตรเติมผงถ่านที่เติมสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ผลการเกิดเอ็มบริโอมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการทดลองศึกษาผลของตำแหน่งข้อต่อลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนของน้อยหน่าเครือรหัส 025 โดยทดสอบตำแหน่งข้อลำดับที่ 1 2 3 4 และ 5 เพื่อหาตำแหน่งข้อที่สามารถเจริญดีที่สุด ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าข้อตำแหน่งที่ 5 สามารถให้ความยาวยอดเฉลี่ยที่มากที่สุด 1.70 มิลลิเมตร

คำสำคัญ : น้อยหน่าเครือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำยอด การชักนำแคลลัส การเกิดเอ็มบริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	MEDIUM AND PLANT HORMONES FOR PLANT TISSUE CULTURE GROWTH OF *Kadsura* spp.		
Students	Miss Fakfun	Phanphitphaet	Student ID 58050785
	Miss Siree	Roumsub	Student ID 58050829
	Mr. Atsadawut	Pancharoen	Student ID 58050846
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2018		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim		

Abstract

We studied the optimum conditions for plant tissue culture growth of *Kadsura* spp. We used strain code 024 and 025 for regeneration. We found the best conditions for regeneration was culturing in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 6-benzylpurine (BAP) 5.0 mg/L. At 8 weeks, the longest shoot generated from a segment was 2.16 mm. in strain code 024 and 5.26 mm. in strain code 025. We examined the position of the segment on strain code 025, by using the first, second, third, fourth and fifth positions to find the best position for tissue culture, in MS medium, supplemented with charcoal powder and meta-Topolin (*m*T) 2.0 mg. At 4 weeks, the longest shoot, came from the fifth segment, and was 1.70 mm long. We used a 1 year old callus from *Kadsura* spp. strain code 001 for regeneration of somatic embryogenesis, the best regeneration was found in a subculture in MS medium, supplemented with charcoal powder and BAP 2.0 mg/L, at 4 weeks, we observed 100% regeneration.

Keywords : *Kadsura* spp., tissue culture, shoot regeneration, callus regenation, somatic embryogenesis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกๆท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม รวมถึงรุ่นพี่ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทุก ๆ คนที่คอยดูแลให้คำปรึกษาแนะนำที่ดีมาตลอดเวลาของการทำโครงงานพิเศษที่ผ่านมาและขอขอบคุณกรรมการการสอบโครงงานพิเศษ รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ ดร. วิมลมาศ บุญมี ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างต้นน้อยหน่าเครือสำหรับใช้ทดลองในโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม รุ่นพี่ และเพื่อน ๆ ทุกคนที่ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ให้ความช่วยเหลือให้ความรู้ให้คำแนะนำดี ๆ เสมอในระหว่างการทำโครงงานพิเศษจนทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องอุปกรณ์และเครื่องมือ นางสาวปรียานุช ศรีไพบูลย์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงานและให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ Professor John Morris ที่ให้การปรึกษาในด้านการใช้ภาษาต่างประเทศในรายงานการวิจัยเล่มนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ช่วยให้ได้รับการศึกษาตลอดจนคอยดูแลอบรมสั่งสอนเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จ รวมถึงเพื่อน ๆ และบุคคลอื่น ๆ ที่ไม่ได้กล่าวถึงในที่นี้ด้วย คณะผู้จัดทำโครงงานทุกคนขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ฝากฝัน พันธุ์พิทย์แพทย์
สิรี รวมทรัพย์
อัษฎาวุธ แป้นเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ต้นน้อยหน่าเครือ (*Kadsura* spp.)	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.2 ข้อมูลโภชนาการ	4
2.1.3 ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ	4
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	5
2.3 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	5
2.4 ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	6
2.4.1 สารอนินทรีย์	6
2.4.2 สารอินทรีย์	6
2.5 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ	7
2.6 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ	8
2.7 วิธีการเพาะเลี้ยง	9
2.8 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อ	10
2.8.1 ปัจจัยภายใน	10
2.8.2 ปัจจัยภายนอก	10
2.9 ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	10
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	15
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	15
3.1.1 ตัวอย่างพืช	15
3.1.2 ภาชนะเครื่องแก้ว	15
3.1.3 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหาร	15
3.1.4 อุปกรณ์สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อและย้ายตัวอย่างเนื้อเยื่อ	15
3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	16
3.1.6 สารเคมี	16
3.2 วิธีการดำเนินงาน	17
3.2.1 วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อพืช	17
3.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ	17
3.2.3 การชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด	17
3.2.4 การชักนำแคลลัสให้เกิดเอ็มบริโอ	18
3.2.5 การศึกษาผลของตำแหน่งข้อต่อลักษณะการเจริญเติบโต	18
3.2.6 วิธีการคำนวณ	18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	19
4.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส024และ025ให้เกิดยอด	19
4.2 การศึกษากระบวนการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสบนแคลลัสจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 001	27
4.3 ศึกษาผลกระทบจากตำแหน่งของข้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนน้อยหน่าเครือ	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	35
5.1 สรุปผลการวิจัย	35
5.2 ข้อเสนอแนะ	36
บรรณานุกรม	37
ภาคผนวก ก	40
ภาคผนวก ข	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ร้อยละของการเกิดยอดใหม่ การเกิดแคลลัส การเกิดยอดร่วมกับแคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย ความยาวยอดที่เกิดร่วมกับแคลลัสเฉลี่ยจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ 21

4.2 ร้อยละของการเกิดยอดใหม่ การเกิดแคลลัส การเกิดยอดร่วมกับแคลลัสความยาวยอดเฉลี่ย ความยาวยอดที่เกิดร่วมกับแคลลัสเฉลี่ยจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่เวลา 8 สัปดาห์ 24

4.3 ผลของตำแหน่งข้อที่มีต่อลักษณะการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อน้อยหน่าเครือรหัส 025 ในอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ 29

4.4 ผลของความยาวเฉลี่ยและขนาดแคลลัสเฉลี่ยของตำแหน่งตัวอย่างข้อต่อลักษณะการเจริญเติบโตจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ถูกเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญชนิด *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ 30

4.5 การเกิดเอ็มบริโอจากแคลลัสของต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 001 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS สูตรเติมถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญต่าง ๆ เป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	ลักษณะการเจริญเติบโตของข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024	20
4.2	ร้อยละของการต่อการเจริญเติบโตในสูตรอาหารที่แตกต่างกันของน้อยหน่าเครือรหัส 024 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์	23
4.3	ร้อยละของการเจริญเติบโตในสูตรอาหารที่แตกต่างกันของน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์	26
4.4	ลักษณะการเจริญเติบโตของข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025	27
4.5	ตัวอย่างชิ้นส่วนข้อตำแหน่งต่าง ๆ ของน้อยหน่าเครือรหัส 025	28
4.6	ร้อยละของการเจริญเติบโตของตำแหน่งต่าง ๆ ในอาหารสังเคราะห์ MS เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์	28
4.7	ลักษณะการเจริญเติบโตของตัวอย่างข้อที่ตำแหน่งต่าง ๆ จากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสูตรควบคุมการ เจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์	29
4.8	แคลลัสจากน้อยหน่าเครือรหัส 001 ที่เกิดการพัฒนาเนื้อเยื่อพร้อมเจริญที่มีลักษณะคล้ายใบ	31
4.9	แสดงร้อยละการเกิดเอ็มบริโอในอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านและสารควบคุมการเจริญสูตรต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
BA	6-Benzyladenine
BAP	6-Benzylaminopurine
IAA	Indol-3-butyric acid
IBA	3-indolebutyric acid
Kin	Kinetin
MS	Murashige and Skoog, 1962
mT	*m*eta-Topolin
NAA	1-naphthalenenacetic acid
PPM	Plant Preservative Mixture
TDZ	N-pheryl-1,2,3-thidiazol-5-yl urea
VW	Vacin and Went
Zt	Zeatin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

น้อยหน่าเครือมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kadsura* spp. เป็นไม้เถาเลื้อยในตระกูล Schisandraceae พบอยู่ตามพื้นที่สูงตามจังหวัดต่าง ๆ ในภาคเหนือของไทย เช่นในจังหวัด น่าน ลำปาง แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่เป็นต้น และนอกจากประเทศไทยแล้วยังพบว่าต้นน้อยหน่าเครือสามารถเจริญเติบโตในต่างประเทศ เช่น ประเทศจีนอีกด้วย ลักษณะของพืชชนิดนี้ผลมีรูปร่าง และกลิ่นคล้ายผลของน้อยหน่า ผลมีสี ขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตแตกต่างกันไป เช่น พันธุ์ผลสีเขียว ผลมีขนาดใหญ่ เนื้อสีแดง เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว เนื้อมีรสชาติเปรี้ยวฝาด เยื่อหุ้มเมล็ดมีรสหวานอมเปรี้ยว เก็บเกี่ยวช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน หรือพันธุ์ผลสีแดง ผลมีขนาดเล็ก เนื้อสีแดง เช่นเดียวกับสีของเปลือก เยื่อหุ้มเมล็ดสีชมพู เนื้อมีรสชาติหวาน ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดมีรสหวานอมเปรี้ยว เก็บเกี่ยวช่วงเดือนธันวาคมถึงมกราคมเป็นต้น ซึ่งทั้งสองพันธุ์ที่กล่าวมาเป็นที่นิยมรับประทาน และนอกจากนี้ยังมีพันธุ์ผลสีม่วงที่นิยมนำมาใช้ทำเป็นยาจีนอีกด้วย ผลจากพืชชนิดนี้จะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีทั้งโปรตีน (protein) ไขมัน (lipid) แคลเซียม (calcium) แมงกานีส (manganese) แมกนีเซียม (magnesium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) สังกะสี (zinc) เหล็ก (iron) และวิตามินซี (vitamin C) ในปริมาณมาก นอกจากนี้ในส่วนต้นและรากถูกนำไปทำเป็นยาสมุนไพรตำหรับจีนมีสรรพคุณ แก้โรคทางเดินอาหาร และโรคไขข้ออักเสบ ส่วนเถาและเมล็ดมีสารกลุ่มลิกนิน และไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoid) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง และต้านเชื้อ HIV (human T-lymphotropic virus) ชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิของไขมัน (lipid oxidation) และช่วยต้านการอักเสบ ถือเป็นพืชที่มีความน่าสนใจมากชนิดหนึ่ง เพราะมีประโยชน์หลาย ๆ ด้านทั้งในด้านสรรพคุณทางยา ในด้านการนำมาเป็นผลผลิตทางการเกษตรเพื่อการบริโภค นำไปแปรรูปทำเป็นอาหารเสริม หรือแม้แต่ในด้านการนำมาปลูกเป็นไม้ประดับก็ตาม

น้อยหน่าเครือเป็นพืชที่ใกล้สูญพันธุ์และเพาะพันธุ์ได้ค่อนข้างยากในสภาวะภายนอกของประเทศไทย โดยถูกจัดเป็นไม้ป่าพันธุ์หายากใกล้สูญพันธุ์ที่มีชื่ออยู่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยจำแนกออกเป็น 2 สายพันธุ์ ที่สามารพบได้ในภาคเหนือและจัดจำแนกน้อยหน่าเครือได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้ *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C.Sm ได้แก่ รหัส 001 ในประเทศไทยเรียกน้อยหน่าเครือชนิดนี้ว่า ชากรวยซา ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีผลขนาดใหญ่ และอีกชนิดคือ *Kadsura heteroclite* (Roxb.) A.C.Sm ได้แก่ รหัส 024 และ 025 ในประเทศไทยนิยมเรียกว่ามณฑาเครือ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีมีผลขนาดเล็ก อีกทั้งยังมีชื่ออยู่ในบัญชีของสหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union of Conservation or Nature and Natural Resources; IUCN) อีกด้วยซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำน้อยหน่าเครือมาขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถแก้ปัญหานี้ได้ เพราะสามารถใช้เพาะพันธุ์เพิ่มจำนวนต้นน้อยหน่าเครือเป็นจำนวนมากได้ในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต้นพืชได้ ป้องกันพืชจากศัตรูพืชในทางธรรมชาติได้ง่าย ทำให้พืชมีโอกาสที่จะรอดและเจริญเป็นต้นใหม่ได้มากขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณพันธุ์พืชหายากให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทดลองเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืชในครั้งต่อไปได้อย่างสะดวกครบถ้วน และเป็นการขยายพันธุ์เพื่อประโยชน์ทางการเกษตร และทางเศรษฐกิจเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิต และถือว่าเป็นการช่วยอนุรักษ์พันธุ์พืชหายากไปในตัว นอกจากนี้อาจนำตัวอย่างพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปต่อยอดในการปรับปรุงพันธุ์ให้พืชชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายในสภาวะแวดล้อมภายนอก และให้ปริมาณผลผลิตมากขึ้นได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือ 2 รหัส ได้แก่ 024 และ 025 ให้เกิดเป็นยอด
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อการเจริญเติบโตจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 และ 025 ได้
3. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญของพืชที่สามารถชักนำแคลลัสของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 001 ให้เกิดเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ได้ดีที่สุด
4. เพื่อศึกษาผลกระทบด้านการเจริญเติบโตจากตำแหน่งของข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยนี้จะทำการศึกษาชนิดของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด และศึกษาชนิดของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเอ็มบริโอ รวมถึงศึกษาผลของตำแหน่งของชิ้นส่วนข้อต่อการเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือในการชักนำข้อให้เกิดยอด และศึกษาผลของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ทั้งชนิดที่เติมผงถ่านและปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญในการเพาะเลี้ยง ศึกษาผลกระทบจากตำแหน่งข้อที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในการทดลอง ศึกษาการชักนำเอ็มบริโอจากแคลลัส โดยใช้แคลลัสจากน้อยหน่าเครือ ในการชักนำให้เกิดกระบวนการเกิดเอ็มบริโอที่พร้อมเจริญเป็นต้นอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นยอดจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 และรหัส 025
2. ทราบตำแหน่งของชิ้นส่วนข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่เหมาะสมที่สุดต่อการนำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. ทราบชนิดของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำแคลลัสของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 001 ให้เกิดเอ็มบริโอที่พร้อมเจริญเป็นต้นอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นน้อยหน่าเครือ (*Kadsura* spp.)

น้อยหน่าเครือ หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Kadsura* spp. ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Schisandraceae เป็นพืชเถาที่อยู่ในโครงอนุรักษ์พันธุ์พืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เนื่องจากเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ตามบัญชีสหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (IUCN) ดั้งเดิมน้อยหน่าเครือเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศจีน น้อยหน่าเครือมีชื่อเรียกตามท้องถิ่นต่าง ๆ โดยพันธุ์ผลใหญ่จะมีชื่อเรียกดังนี้ บักน่อแน่เครือ น้อแน่-ดอย สะคีซ่า เซอร์กิโต หรือเส่อคริซ่า ส่วนพันธุ์ผลเล็กจะเรียกว่า หะกระรอก ห่ำหอก หรือกระรอกแดง มีการนำส่วนของ ลำต้น เมล็ด ราก หรือเถามาใช้ประโยชน์ในด้านสมุนไพรในการรักษาอาการป่วยของโรคมะเร็ง หรือบรรเทาอาการปวดเมื่อย เนื่องจากน้อยหน่าเครืออุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่สูง

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

น้อยหน่าเครือเป็นพืชเถา ใบเลี้ยงคู่ มีลักษณะเป็นผลกลุ่ม โดยมีลักษณะของผลและกลิ่นคล้ายคลึงกันกับผลของน้อยหน่า มักเจริญเติบโตในที่สูง เช่น พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง เชียงราย แม่ฮ่องสอน และน่าน สามารถแบ่งแยกตามขนาดผลเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ พันธุ์ผลเล็กและพันธุ์ผลใหญ่ สำหรับน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลใหญ่นั้นจะมีเปลือกสีเขียวอมเหลือง มีเนื้อภายในสีชมพูถึงสีแดง ให้รสชาติที่ฝาดและเปรี้ยว ในส่วนของพันธุ์ผลเล็กนั้นทั้งเปลือกและเนื้อจะมีสีแดงสด ให้รสชาติหวาน เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีชมพูใสมีรสชาติหวามแซมเปรี้ยวแต่จะหวานกว่าน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลใหญ่ โดยน้อยหน่าเครือทั้ง 2 พันธุ์จะให้ผลเพียงปีละครั้ง

2.1.2 ข้อมูลทางโภชนาการ

น้อยหน่าเครือนั้นมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากอุดมไปวิตามินซี วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) และ สารแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ในปริมาณมาก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณโปรตีน (protein) ร้อยละ 1.47 ปริมาณไขมัน (lipid) ร้อยละ 1.73 อีกทั้งยังมีปริมาณกากใย (fiber) ร้อยละ 1.17 รวมถึงมีปริมาณน้ำสูงถึงร้อยละ 88.25 และยังพบว่าผลของน้อยหน่าเครือนั้นประกอบไปด้วยแร่ธาตุ แมงกานีส แคลเซียม สังกะสี ฟอสฟอรัส และเหล็ก ในปริมาณมาก รวมไปถึงสารลิกนิน สารไตรเทอร์พีนอยด์ อีกด้วย

2.1.3 ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ

ในด้านของสรรพคุณทางยา ส่วนประกอบของน้อยหน่าเครือไม่ว่าจะเป็น ลำต้น ราก เถา ผล เครือ หรือเมล็ด ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษา บรรเทาอาการเจ็บป่วย และต่อต้านเชื้อไวรัส ใช้เป็นยาบรรเทาโรคมะเร็ง ต่อต้านการอักเสบ ต่อต้านเชื้อ HIV ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเดชันของไขมัน รักษาอาการปวดเมื่อย ลดความดันโลหิตสูง ป้องกันเส้นเลือดอุดตันในสมอง รักษาโรคเบาหวาน ชะลอความเสื่อมของเซลล์ ลดอัตราการเกิดโรคหัวใจ ลดอัตราเสี่ยงของการเกิดเนื้องอก ชะลอความเสื่อมของเซลล์ประสาทตา มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น เอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli*) ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงอาหารเป็นพิษ ต่อต้านเชื้อไวรัสตับอักเสบ (Pu. *et al* 2008 ; Liu. *et al.*, 2014)

ในด้านของอาหาร นอกจากการนำผลของน้อยหน่าเครือมากินผลสดแล้ว ยังมีการนำผลของน้อยหน่าเครือที่มีรสเปรี้ยวมาแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำผลไม้เข้มข้น ผลิตภัณฑ์ไวน์ Sun. *et al.* (2009) แยม และผลิตภัณฑ์ให้ความหวานแทนน้ำตาลซูโครส (sucrose) อีกด้วย ฉวีวรรณ และคณะ (2017)

2.2 การพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

รังสฤษฎ์ (2541) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยอาศัยคุณสมบัติที่โททิโพเทนซี (totipotency) ของเซลล์พืชที่ไม่ว่าจะนำชิ้นส่วน หรืออวัยวะใดของพืชก็ตามมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ล้วนสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยต้องดำเนินการทำงานในสภาวะปลอดเชื้อและมีการควบคุมสภาวะอื่นในขณะเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับพืชชนิดนั้น ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการพัฒนา และยังมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้กับงานด้านอื่น ๆ อีกมากมายอาทิเช่น การขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืช การเก็บรักษาพันธุ์พืช เป็นต้น

2.3 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

รังสฤษฎ์ (2541) กล่าวว่า อาหารที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายประเภทซึ่งหลักการในการเลือกใช้อาหารเราต้องคำนึงถึง ชิ้นส่วนพืช พันธุ์พืช ความสมบูรณ์ของพืช เพราะแต่ละส่วนมีการเจริญที่ไม่เหมือนกัน โดยสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการเลือกใช้สูตรอาหารมาเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือองค์ประกอบในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพราะองค์ประกอบในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นเป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้พืชนั้นเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาไปในรูปแบบที่ต้องการ องค์ประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควรมีธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง ซึ่งอาจจะเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และวิตามินลงไปตามความเหมาะสม

ศิวพงศ์ (2541) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่เดิมนั้นถูกพัฒนามาเรื่อย ๆ จนกลายเป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกันทั่วไปในปัจจุบัน สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชมีความแตกต่างกันในด้านขององค์ประกอบ ที่สามารถนำไปปรับใช้ตามความเหมาะสมโดยคำนึงถึงประเภทของชิ้นส่วนพืช พันธุ์พืช ความสมบูรณ์ของพืช เพื่อปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมกับสภาพของพืช เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และเพื่อการนำไปปรับใช้ตามความเหมาะสม โดยต้องคำนึงถึงประเภทของชิ้นส่วนพืช พันธุ์พืช ความสมบูรณ์ของพืช เพื่อการเจริญเติบโตที่เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

อารีย์ (2552) อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีส่วนช่วยในการทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบผลสำเร็จ ซึ่งอาหารที่ใช้ควรมีความเหมาะสมกับสายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ในปัจจุบันมีการคิดค้นสูตรอาหารที่เหมาะสมกับพืชขึ้นมามากมาย ซึ่งในแต่ละสูตรก็จะมีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่พืชต้องการค่อนข้างครบถ้วนแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช

พัชรา (2550) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเกิดผลสัมฤทธิ์ ซึ่งอาหารสังเคราะห์ที่ผู้ทำการเพาะเลี้ยงเตรียมขึ้นจะต้องมีประสิทธิภาพในการชักนำทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตได้ จึงมีการค้นคว้าและพัฒนาจากผู้เชี่ยวชาญอย่างต่อเนื่องจนได้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีประสิทธิภาพโดยสูตรอาหารสามารถปรับใช้ตามสภาพ สายพันธุ์ หรือประเภทของชิ้นส่วน ตามความเหมาะสม

จากข้อมูลข้างต้นกล่าวได้ว่าสิ่งสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้สัมฤทธิ์ผลได้นั้นคือชนิดอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในปัจจุบันมีการพัฒนาสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพซึ่งมีองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นต่อการพัฒนาหรือการเจริญเติบโตโดยคำนึงถึง ชนิดของพืชและชนิดของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชควบคู่กับการเพาะเลี้ยง มีส่วนช่วยในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ไปในทิศทางที่ต้องการได้

2.4 ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.4.1 สารอนินทรีย์

ศิวพงศ์ (2541) ในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นจำเป็นต้องมีเกลือแร่เป็นส่วนประกอบ ซึ่งต้องมีสัดส่วนของเกลือแร่ในอาหารที่เหมาะสมเพราะถ้าหากมีปริมาณที่มากเกินไปก็อาจเป็นอันตรายแก่พืชได้ หรือถ้าหากพืชได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต การเจริญเติบโตของพืชก็อาจจะไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร โดยจำนวนแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชมีอยู่ทั้งหมด 16 ตัว แต่จะพบหลัก ๆ มี 7 ธาตุด้วยกันคือ ไนโตรเจน (nitrogen) ฟอสฟอรัส (phosphorus) โพแทสเซียม (potssium) กำมะถัน (sulfer) แคลเซียม (calcium) และเหล็ก (iron) อีก 3 ชนิดที่เหลือคือสารอินทรีย์ ได้แก่ ไฮโดรเจน (hydrogen) คาร์บอน (carbon) และออกซิเจน (oxigen)

2.4.2 สารอินทรีย์

ศิวพงศ์ (2541) เป็นสารเคมีที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ แต่สารเหล่านี้ไม่นิยมเติมให้กับพืชเพราะพืชสามารถสร้างเองได้ แต่ด้วยปัจจัยหลาย ๆ อย่างทำให้จำเป็นที่จะต้องเสริมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง

1. คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชมักใช้เป็นน้ำตาล โดยตัวอย่างน้ำตาลที่ใช้เช่น ซูโครส กลูโคส (glucose) และฟรักโทส (fructose)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิตามินบีรวม (multi vitamin B) มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (matabolism) ของพืชโดยปกติพืชจะสามารถสังเคราะห์มาใช้เองได้ แต่บางทีสภาพของพืชก็อาจจะไม่เอื้ออำนวยจึงต้องมีการเสริมเข้าไปในอาหาร

3. วิตามินเฮช (vitamin H) หรือเรียกอีกอย่างว่าไบโอติน (biotin) เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ในกระบวนเมแทบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism)

4. วิตามินซี ไว้ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นสารที่สามารถผลิตได้ในธรรมชาติโดยเรียกว่าฮอร์โมน (hormone) หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และมีในรูปแบบเฉพาะในการสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งพืชนั้นสามารถสร้างขึ้นเองได้ตามอวัยวะต่าง ๆ ของมัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่นิยมใช้กัน คือ ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ซึ่งจะมีการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันในสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสองตัวนี้ จึงต้องคำนึงถึงอัตราส่วนที่จะใช้ด้วย

6. กรดอะมิโน (amino acid) มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชโดยจะใช้กรดอะมิโน ในรูปของ L มากกว่ากว่าในรูปของ D

7. สารอินทรีย์อื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว มักนำไปใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีรายงานว่าการใช้น้ำมะพร้าวในการเพาะเลี้ยงหัวผักกาด จะได้ผลที่เกิดแคลลัสมากกว่าการใช้ ซิสเทอีน (cysteine) และ IAA (Indole-3-acetic acid) นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำผลไม้ชนิดอื่น ๆ ได้นอกเหนือจากน้ำมะพร้าว เช่น น้ำองุ่น น้ำกล้วย และน้ำมะเขือเทศ

8. วุ้น (agar) มีคุณสมบัติทำให้อาหารแข็งตัวมีลักษณะอาหารคล้ายกับดินช่วยในการยึดเกาะของเนื้อเยื่อพืช แต่ต้องให้สารอาหารสามารถดูดซึมเข้าไปยังเนื้อเยื่อพืชได้ ในการเลือกวุ้นเราต้องคำนึงถึงความบริสุทธิ์ของวุ้นด้วยซึ่งวุ้นจะไม่แข็งตัวเมื่อมีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 และชนิดของวุ้นยังสามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้

2.5 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ

ชลดา (2555) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่มีความสำคัญมาก ทั้งในด้านการเพิ่มจำนวนพืชเศรษฐกิจและพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ประสบความสำเร็จนั้น ขึ้นอยู่กับการเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เช่น องค์ประกอบของอาหาร สารควบคุมการเจริญ แสง ซึ่งการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อราทั้งที่เกิดจากขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ หรือเกิดการปนเปื้อนในขั้นตอนต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงนั้นเป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การแก้ปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีด้วยกันหลายวิธี ทั้งการเปลี่ยนสารฟอกฆ่าเชื้อจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (clorox) มาเป็นสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric (II) chloride) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสูงขึ้น แต่การทิ้งของเสีย (waste) ก็เป็นปัญหาในการกำจัดเพราะสารตัวนี้ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมสูงมาก และเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานด้วยหากนำไปใช้โดยขาดความรู้หรือการป้องกันที่ดีพอ อีกวิธีหนึ่งของการฟอกฆ่าเชื้อคือการใช้สารแอนติไบโอติก ในการกำจัดเชื้อรา แต่การใช้สารแอนติไบโอติกก็มีข้อเสียโดยจะอาจเป็นพิษต่อพืชได้เช่นเดียวกัน

ศิวพงศ์ (2541) กล่าวว่า ในบางครั้งชิ้นส่วนของพืชก็มีการปนเปื้อนได้โดยที่เราไม่สามารถเห็นได้เมื่อมองจากภายนอก โดยเราสามารถลดการปนเปื้อนได้ทั้งภายในและภายนอกซึ่งภายในเราอาจทำการแช่ชิ้นส่วนของพืชในสารแอนติไบโอติกไว้ 1 คืน หากปนเปื้อนจากภายนอกให้นำมาทำความสะอาดผิวของชิ้นส่วนพืช โดยตัดชิ้นพืชให้เล็กลง จากนั้นก็นำไปทำความสะอาดตามขั้นตอนคือ นำชิ้นส่วนมาล้างด้วยสารทำความสะอาด เช่น ผงซักฟอก ขั้นตอนต่อไปคือนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 พร้อมเขย่า 15 วินาที จากนั้นนำไปแช่ในแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (calcium hypochlorite) พร้อมทั้งเขย่าประมาณ 10–30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อประมาณ 3-4 รอบ โดยในการเขย่าแต่ละครั้งใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นต้น

ปริญญา (2558) กล่าวว่า การศึกษาเทคนิคในการฟอกฆ่าเชื้อในชิ้นส่วนของขมิ้นชัน พบว่าการนำชิ้นส่วนไปล้างผ่านน้ำ เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลานาน 1 นาที ตามด้วยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และหยดทวีน 20 (tween-20) ตามลงไป เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ด้วยสารละลาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 รอบ ๆ ละ 5 นาที จะทำให้ชิ้นส่วนของตัวอย่างพืชมีความปลอดเชื้อสูงถึงร้อยละ 68.5

2.6 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่า เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นที่ใช้คือร้อยละ 70 และ 95 โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นที่ใช้คือร้อยละ 70 ในการแช่ตัวอย่างพืชไว้ประมาณ 2–10 นาที จะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นมาก และใช้เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นที่ใช้คือร้อยละ 95 ในการแช่อุปกรณ์ก่อนนำไปผ่านไฟเพื่อทำการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ในการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นงนุช (2560) สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ถูกใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชที่จะนำไปทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์เป็นสารที่เป็นอันตรายและก่อให้เกิดผลเสียอย่างร้ายแรงต่อสุขภาพจากการได้รับสารเป็นเวลานานเมื่อสัมผัสกับผิวหนัง และเมื่อกลืนกินเข้าไปจะเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมสูงมาก แต่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสูง พบว่าการฟอกกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวภายนอกของชิ้นเนื้อเยื่อต้นบูเซปที่เหมาะสม ได้แก่ การฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 10 นาที ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดของตัวอย่างมีสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัชราวดี (2559) สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จากการศึกษาผลของการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมะแขว่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างกัน (ร้อยละ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมะแขว่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารในสภาวะที่มีแสง พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดมะแขว่นมีอัตราการรอดและปลอดเชื้อถึงร้อยละ 75 และมีอัตราการงอกของเมล็ดมะแขว่นเพิ่มขึ้นอีกด้วย

ปวีณา (2559) สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ PPM เป็นสารผสมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากสารเคมีผสมกันหลายตัว โดยได้นำมาใช้ในการทดลองฟอกเมล็ดงาขี้ม้อนเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ส่งผลกระทบต่อชิ้นส่วนของเมล็ดงาขี้ม้อนที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง โดยในการฟอกฆ่าเชื้อได้ใช้ PPM ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับการแช่เมอร์คิวริกคลอไรด์สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้สูง และเมล็ดมีการงอกได้ดีที่สุด

ชัชรี (2555) การใช้เซฟโฟแทกซีม (cefotaxime) ในจากศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อและปลายยอดของต้นชะเงาเต่า โดยใช้เซฟโฟแทกซีม ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยการแช่ชิ้นส่วนพืชเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วมีอัตราการปนเปื้อนน้อย การใช้เซฟโฟแทกซีมจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการฟอกฆ่าเชื้อส่วนของข้อและปลายยอด

สุจิตรา (2553) การใช้สารแอนติไบโอติก ใส่ลงไปในน้ำฟอกเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ชิ้นส่วนของต้นไม้น้ำใบพายนำไปเขย่า 30 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลานาน 15 นาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ซึ่งมีผลทำให้จำนวนยอดอ่อนที่ปลอดเชื้อสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด

2.7 วิธีการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งจากพืช อาจจะเป็นอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วย น้ำตาลแร่ธาตุ วิตามิน และสารควบคุมความเจริญ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และสามารถควบคุมแสง อุณหภูมิ ความชื้น โดยชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง สามาถพัฒนาเป็นไปได้หลายลักษณะ ไม่ว่าจะพัฒนาเป็นอวัยวะใหม่ เกิดเป็นกลุ่มแคลลัส หรือ คัพภะที่เรียกว่า เอ็มบริโอ ซึ่งในสุดท้ายก็จะสามารถควบคุมให้ส่วนต่าง ๆ เหล่านี้เกิดเป็นต้นอ่อนใหม่ที่มีรากสมบูรณ์เพื่อนำไปปลูกลงดินต่อไปได้

ต้นที่เจริญเติบโตจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะมีลักษณะเช่นเดียวกับพืชต้นแม่พันธุ์ที่ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงทุกประการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช และการรักษาและอนุรักษ์พันธุ์พืชต่าง ๆ โดยอาศัยการเก็บแคลลัสภายใต้ไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิเย็นจัด -196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บพืชได้เป็นเวลานานโดยไม่กลาย

เอกสารนี้เป็นสิ่งที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ หรืออาจใช้ในการเก็บให้พืชโตช้า ๆ เพื่อการรวบรวมพันธุ์พืชในขวดแก้วเล็ก ๆ ซึ่งการอนุรักษ์พันธุ์พืชลักษณะนี้ จะใช้พื้นที่น้อยกว่าการเก็บต้นพืชโดยตรง

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ยังมีประโยชน์ในการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชระหว่างประเทศที่จะสะดวกขึ้น พันธุ์พืชที่อยู่ในขวดจะสะอาดปราศจากเชื้อราและจุลินทรีย์ที่สามารถทำอันตรายต่อพืช โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในรูปแบบเซลล์แขวนลอยของสมุนไพร ยังช่วยในการผลิตสารต่าง ๆ ที่ใช้เป็นยารักษาโรคหรือสารที่ใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้ อีกทั้งยังเป็นประโยชน์มหาศาลในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้พืชให้ต้านทานแมลงและโรคพืชได้ดีขึ้น หรือเพิ่มให้ผลผลิตมากขึ้น โดยอาศัยเทคนิคในการเลี้ยงต้นอ่อนขนาดเล็ก เทคนิคในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรพืชและอับละอองเกสร หรือเทคนิคในการชักนำให้พืชพัฒนาเป็นพันธุ์ใหม่ ๆ โดยอาศัยการฉายรังสีหรือสารเคมี

2.8 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อ

อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชแบ่งเป็น 2 ปัจจัยหลัก ๆ คือปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก

2.8.1 ปัจจัยภายใน

จากพันธุกรรม พืชแต่ละชนิดจะมียีนที่ต่างกัน ด้วยเหตุนี้เมื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะได้เนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตหรือพัฒนาได้แตกต่างกันตามชนิดของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่พืชสร้างขึ้น พืชแต่ละชนิดจะมีการสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเก็บไว้ในตัวพืชตามส่วนต่าง ๆ ซึ่งมีความเข้มข้นที่ต่างกันตามชนิดของพืชและชิ้นส่วนซึ่งจะเป็นตัวควบคุมการพัฒนาของเนื้อเยื่อ

2.8.2 ปัจจัยภายนอก

1. แสง การให้แสงขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อถูกชักนำให้เป็นรากหรือยอด โดยต้องมีการควบคุมสภาวะของแสงได้แก่ คุณภาพของแสง ความเข้มแสง ระยะเวลาการให้แสงโดยทั่วไปจะใช้ประมาณ 16 ชั่วโมง

2. อุณหภูมิ โดยทั่วไปมักควบคุมให้อุณหภูมิอยู่ที่ 25-28 องศาเซลเซียส และพืชแต่ละชนิดอาจเจริญได้ในสภาวะอุณหภูมิอื่นตามแต่ความเหมาะสมได้

2.9 ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดัดแปลงจากอารีย์ (2552)

1. การขยายพันธุ์ เป็นการเพิ่มปริมาณพืชโดยการเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ สามารถทำได้ในปริมาณมาก และพืชมีสภาพที่ปนเปื้อนน้อยปลอดโรค

2. การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมพืช ทำได้ในระหว่างชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นพืช โดยอาศัยจุลินทรีย์ในการนำพายีนเข้าไปยังกลุ่มก้อนของเซลล์พืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การผลิตสารทุติยภูมิ ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและได้ในจำนวนที่มากพร้อมทั้งมีการปนเปื้อนที่น้อยจึงเหมาะที่จะนำมาสกัดสารทุติยภูมิที่เราต้องการเช่น สารสี (pigment) สารแอนติไบโอติก สารหอมระเหย (essential oil) เป็นต้น

4. การช่วยเหลืออาการแท้งในพืช มักเกิดในการผสมข้ามสายพันธุ์ของพืชเพื่อถ่ายทอดลักษณะเด่นที่มนุษย์ต้องการ แต่มักจะไม่สามารถเจริญเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ดังนั้นเราสามารถนำเอ็มบริโอ (embryo) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งได้

5. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยกล่าวถึงอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มของออกซินและไซโทไคนิน ถ้าหากออกซินมากก็จะชักนำให้พัฒนาเป็นราก และหากไซโตไคนินมากจะชักนำให้พัฒนาเป็นยอด แต่ก็สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ทั้งสองรูปแบบ

6. ปัจจัยอื่นๆ

- ขนาดของชิ้นส่วน ล้วนแต่มีข้อดีข้อเสียหากชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่ก็จะมีโอกาสปนเปื้อนได้มากกว่าขนาดเล็กแต่ขนาดเล็กจะเกิดการเจริญได้น้อยกว่าขนาดใหญ่

- ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยง โดยทั่วไปจะปรับค่า pH ให้อยู่ที่ 5.6-5.8

- องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการเกิดยอดและรากหากใช้ไนโตรเจนโดยเติมในรูปแบบแอมโมเนียม (ammonium) จะทำให้การเกิดเอ็มบริโอมาก

- การย้ายเนื้อเยื่อไปยังอาหารใหม่ การย้ายเนื้อเยื่อพืช หรือแคลลัสไปยังอาหารใหม่หากทำบ่อยก็ทำให้ประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตลดลง

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Agnieszka. *et al.* (2012) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากต้น *Schisandra Chinensis* หรือต้นแมกโนเลียจีนเพื่อทดสอบหาแหล่งที่มาของกรดฟีนอลิก (phenolic) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยใช้ชิ้นส่วนใบจากต้นที่ถูกปลูกในธรรมชาติมาทำการทดลองเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้สารควบคุมการเจริญ BAP และ NAA โดยใช้สารควบคุมการเจริญ 2 ชนิดนี้ร่วมกัน ใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงโดยให้แสงตลอดทั้งวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์จากนั้นวัดน้ำหนักแห้งของแคลลัสก่อนนำแคลลัสที่ได้ไปวัดปริมาณกรดฟีนอลิกต่อไป พบว่าแคลลัสมีนำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเป็น 2.1 ถึง 6.1 เท่าเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์

Agnieszka. *et al.* (2013) การเพาะเลี้ยงแคลลัสที่มีคุณสมบัติของการเกิดยอดใหม่ที่แตกต่างกัน (shoot-differentiating) และไม่แตกต่างกัน undifferentiating จาก *Schisandra chinensis* บนอาหารแข็งที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนิน (cytokinin) คือ BA และออกซิน (auxin) คือ NAA และนำตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงมาสกัดเอาฟีนอลิก เพื่อทำการตรวจสอบว่าจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการผลิตลิกนินได้ปริมาณเท่าใด โดยลิกนินที่ตรวจสอบจะมี ดีออกซีชิแซนดริน (deoxyschizandrin) และชิแซนดริน (schizandrin) โดยใช้ HPLC ผลปรากฏว่าแคลลัสแบบ shoot-differentiating จะให้ปริมาณของ ดีออกซีชิแซนดริน และชิแซนดรินที่สูงกว่าแคลลัสแบบที่เกิดยอดได้ไม่แตกต่างกัน

Agnieszka. *et al.* (2015) ทำการทดสอบวัดปริมาณสาร schisantherin A และสาร gomisin G จากต้น *Schisandra Chinensis* ที่ถูกเลี้ยงภายใต้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ชิ้นส่วนใบมาชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสโดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิดนี้ร่วมกันคือ BAP และ NAA ที่ความเข้มข้น 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงโดยให้แสงตลอดทั้งวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์จากนั้นวัดน้ำหนักแห้งของแคลลัสก่อนนำแคลลัสที่ได้ไปวัดปริมาณสาร schisantherin A และสาร gomisin G ต่อไป พบว่าแคลลัสมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์

Kim. *et al.* (2005) การทำให้เกิดเอ็มบริโอจากเนื้อเยื่อโดยการแยกส่วนที่เป็นไซโกต จากเมล็ดของ *Schisandra chinensis* โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS โดยปราศจากสารควบคุมการเจริญ และอาหารสูตร Merkleand Sommer เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญ 2,4-D และ Zt เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าแคลลัสเกิดได้ดีในอาหารสูตร Merkle and Sommer เสริมด้วย 2,4-D เมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS อย่างเดียว

Kohda. *et al.* (2011) แคลลัสที่ถูกชักนำมาจากใบของ *Schisandra chinensis* Baillon (Schisandraceae) โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อความเข้มข้นครึ่งหนึ่งและเต็มความเข้มข้น MS หรือ WPM ทำให้แข็งตัวด้วยวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 0.25 และเสริมด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 2 และทำการทดลองการทำงานร่วมกันของสารควบคุมการเจริญ 2,4-D Kin IBA และ BAP สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำแคลลัสและการเจริญเติบโตของพืชคือ อาหารความเข้มข้นครึ่งสูตร MS ที่ประกอบไปด้วย Kin ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สารประกอบชีวภาพที่แยกออกมาได้จากแคลลัส คือ gomisin A และ gomisin F เปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้สารควบคุมการเจริญร่วมชนิดอื่น ทำการเปลี่ยนถ่ายไปยังอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสใหม่ เนื่องจากปริมาณ gomisin A และ gomisin F ที่ลดลง สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิกนินจากแคลลัสถูกพบว่าต้องใช้อาหารความเข้มข้นครึ่งสูตร MS ที่เสริมด้วย Kin ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ความ-เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าภายใต้สภาวะนี้จะมีปริมาณ gomisin A และ gomisin F ในปริมาณร้อยละ 0.05 และ 0.04 ของน้ำหนักแคลลัสตามลำดับ

Smiskova. *et al.* (2005) ทำการเพาะเลี้ยงคัพภะของ *Schisandra chinensis* ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 50.0 ไมโครโมลาร์ เมื่อผ่านไป 3 สัปดาห์ นำย้ายไปยังอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 10.0 ไมโครโมลาร์ และ BAP ความเข้มข้น 4.0 ไมโครโมลาร์ จนครบเวลา 1 ปี เมื่อได้แคลลัสที่ต้องการย้ายลงในอาหาร WV ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์ เสริมด้วย PEG (polyethyleneglycol4000) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ abscisic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 30.0 ไมโครโมลาร์ ซึ่งส่งผลกับการเจริญของคัพภะ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 49 วันย้ายลงในอาหาร WV ความเข้มข้น 5.0 ไมโครไมลาร์ ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญจนกว่าจะได้ระยะตอปิโด จากนั้นแยกออกมาเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย IAA ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้

Sun. *et al.* (2013) การทำให้เกิดเอ็มบริโอจากเนื้อเยื่อเพื่อเลี้ยงให้กลายเป็นต้นใหม่ของ *Schisandra chinensis* โดยการเพิ่มจำนวนแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เสริมด้วย TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D นอกเหนือจากนี้ยังใส่ Zt เพื่อช่วยในการเกิดของแคลลัส ซึ่งเมื่อนำอาหาร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตรเสริมด้วย TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Zt ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดเอ็มบริโอจากเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก และสามารถพัฒนากลายเป็นต้นอ่อนต่อไปในอาหาร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตร ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ

Sun. *et al.* (2017) *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill มีคุณสมบัติเป็นยา ที่ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการบำบัดอาการป่วยด้วยพืช การศึกษาในครั้งนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาการผลิตลิกนิน ในขณะที่เกิดเอ็มบริโอของ *S. Chinensis* การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณและผลิตลิกนิน ในการทดลองการเกิดเอ็มบริโอ สามารถสรุปได้โดยการเก็บข้อมูลที่สภาวะที่มีความเหมาะสมที่สุดคือสภาวะที่มีการให้อากาศและแสง ความหนาแน่นที่ 20.0 กรัมต่อลิตร การเกิดเอ็มบริโอ เพิ่มการผลิตลิกนิน 30.0 กรัมต่อลิตร การเกิดเอ็มบริโอเพิ่มมวลให้เอ็มบริโอ ในระหว่างการเกิดเอ็มบริโอมีการให้อากาศ 0.2 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณลิกนิน อัตราการผลิตลิกนินทั้งหมดในการเกิดเอ็มบริโอ ทำในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในอาหารแข็ง การศึกษาในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของ *S. Chinensis* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตลิกนินในระดับอุตสาหกรรม

Yang. *et al.* (2011) และคณะทำการทดลองใช้ส่วนดอกตูมที่ยังอ่อนอยู่ของต้น *Schisandra Chinensis* หรือต้นแมกโนเลียจีนมาทำการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ โดยเริ่มจากการทดลองชักนำส่วนต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นส่วนดอกตูมที่ยังอ่อนอยู่ และส่วนของดอกที่บานให้เกิดเป็นแคลลัสแล้วพบว่าการเพาะเลี้ยงดอกตูมที่ยังอ่อนอยู่บนอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 3 ร่วมกับสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดโดยเกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวและมีอัตราการเกิดแคลลัสอยู่ที่ร้อยละ 1.4 ส่วนดอกที่บานแล้วไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้

Zang. *et al.* (2011) การศึกษาวิธีเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารที่ใช้ชักนำแคลลัสใน *Schisandra chinensis* Baill โดยมีอัตราการเหนี่ยวนำแคลลัสเป็นตัวบ่งชี้ โดยการทดลองจะทดลองดูประสิทธิภาพของสารควบคุมการเจริญโดยที่จะนำมาสผมกับสารควบคุมการเจริญชนิดอื่น ๆ ที่ปัจจัยและระดับต่าง ๆ ในการเหนี่ยวนำแคลลัส ซึ่งการผสมกันของสารควบคุมการเจริญต้องคำนึงถึงชิ้นส่วนของพืชตัวอย่างด้วย โดยอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงใบอ่อนและก้านใบมี MS เสริมด้วย 6-BA ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลำต้นใบ มี MS เสริมด้วย 6-BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ผลออกมาว่าอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสได้ในเวลาที่น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างพืช

- ต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 และ 025 ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างพืชจาก โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และแคลลัสจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 001 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาวณัฐนิชา เจ๊ะดอ-เราะ

3.1.2 ภาชนะเครื่องแก้ว

- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- ขวดแก้วพร้อมฝาปิดทนความร้อน (glass bottles and lid)
- จานแก้ว (petridish)

3.1.3 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหาร

- ไมโครปิเปต (micropipette)
- ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip)
- ช้อนตักสาร (plastic spoon)
- ถ้วยพลาสติกสำหรับใส่สาร (plastic cup)
- เตาไมโครเวฟ (microwave)
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)
- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวง (cylinder)
- เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ (electronic Scales)

3.1.4 อุปกรณ์สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อและย้ายตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

- ไฟแช็ค (lighter)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
- เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
- เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
- กระบอกฉีด (spray)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- กรรไกร (scissors)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- มีดผ่าตัด (scalpel)
- ปากคีบ (forceps)
- แล็คสำหรับวางอุปกรณ์ (racks)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- กระดาษชำระ (tissue)
- กระดาษซับน้ำ (blotting paper)

3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- เครื่องปรับอากาศ (air-conditioner)
- ชั้นวางตัวอย่างพืชพร้อมระบบให้แสงสว่าง (shelve)
- ตะกร้าสำหรับวางตัวอย่าง (basket)
- ม่านบังแสง (curtain)
- เทอร์มอมิเตอร์ (thermometer)

3.1.6 สารเคมี

- เมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric (II) chloride) บริษัท QReC
- น้ำกลั่น (distilled water)
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (distilled water)
- สารละลายแอนติไบโอติกแอนติไมโคติก บริษัท Sigma
- สารเซฟโฟแทกซีม (cefotaxime) บริษัท Nida
- สารลดการติดเชื้อ PPM (plant preservative mixture)
- น้ำยาล้างจาน (dishwashing liquid)
- อาหารสังเคราะห์สูตร MS บริษัท Phytotechlab
- ผงถ่าน
- เจลแลนกัม บริษัท Sigma
- น้ำตาลทราย (sugar)
- สารควบคุมการเจริญ BAP (6-benzylaminopurine) บริษัท Phytotechlab
- สารควบคุมการเจริญ *m*T (meta-Topolin) บริษัท Phytotechlab
- สารควบคุมการเจริญ TDZ (N-pheryl-1,2,3-thidiazol-5-yl urea) บริษัท Phytotechlab
- สารควบคุมการเจริญ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) บริษัท Phytotechlab

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อพืช

ใช้ชิ้นส่วนข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 และ 025 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และชิ้นส่วนแคลลัสจากแคลลัสน้อยหน่าเครือรหัส 001 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากนางสาวณัฐนิชา เจ๊ะดอเลาะ

3.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง

นำชิ้นส่วนข้อที่มีอายุน้อย จากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 และ 025 โดยตัดชิ้นส่วนข้อเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำตัวอย่างที่ตัดเตรียมไว้แล้วมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ เริ่มจากการใช้แปรงสีฟันร่วมกับน้ำยาล้างจานขัดทำความสะอาดชิ้นส่วนตัวอย่างเบา ๆ ระวังอย่าให้ตัวอย่างช้ำ เมื่อขัดเสร็จนำตัวอย่างไปล้างผ่านน้ำเป็นเวลา 30 นาที ขั้นต่อไปนำตัวอย่างไปล้างในเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 1 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปฟอกในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สารเซฟโฟแทกซีมความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลายแอนติไบโอติกแอนติไมโคติก ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสาร PPM ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 80 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 30 นาที เมื่อเสร็จขั้นตอนนี้แล้วนำตัวอย่างไปฟอกต่อในน้ำฟอกที่มีส่วนผสมของ สารเซฟโฟแทกซีมที่มีความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลายแอนติไบโอติกแอนติไมโคติก ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ เติมสาร PPM ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 10 นาที ขั้นตอนต่อไปนำตัวอย่างไปฟอกต่อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของสารละลายแอนติไบโอติกแอนติไมโคติก ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ สาร PPM ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 10 นาที ขั้นสุดท้ายจึงนำตัวอย่างไปล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีแล้วจึงนำตัวอย่างไปตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อจนตัวอย่างแห้งสนิทโดยตั้งแต่ขั้นตอนการล้างในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นต้นไปจนถึงขั้นตอนการล้างด้วยน้ำกลั่นต้องทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบที่เขย่า 200 รอบต่อนาทีในการฟอกฆ่าเชื้อ

3.2.3 การชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด

นำชิ้นส่วนตัวอย่างน้อยหน่าเครือรหัส 024 และ 025 ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ และผึ่งจนแห้งแล้ว มาใช้งานโดยใช้มีดผ่าตัดตัดปลายชิ้นส่วนตัวอย่างที่ช้ำทิ้ง แล้วนำตัวอย่างที่ไม่ช้ำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ทั้งชนิดที่เติมมผงถ่านและปราศจากผงถ่านโดยใช้สารควบคุมการเจริญ BAP และ *m*T ความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบันทึกผลทุก ๆ

เอกสารนี้เป็นสิ่งที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 สัปดาห์ จนครบเวลา 8 สัปดาห์ โดยจะทำการบันทึกผล ร้อยละของการเกิดยอด และแคลลัส รวมถึงความยาวยอด ที่เกิดขึ้นโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ในการวัดขนาด

3.2.4 การชักนำแคลลัสให้เกิดเอ็มบริโอ

นำแคลลัสที่เกิดจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 001 ที่ผ่านการปรับสภาพในอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญมาแล้ว มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมผงถ่าน โดยใช้สารควบคุมการเจริญ 3 ชนิดในการทดลองคือ TDZ *m*T และ BAP ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาใช้ในการทดลองโดยจะเก็บผลทุก 2 สัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ โดยจะทำการบันทึกผลเป็นร้อยละของการเกิดเอ็มบริโอ

3.2.5 การศึกษาผลของตำแหน่งข้อของตัวอย่างต่อลักษณะการเจริญเติบโต

นำชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการแยกตำแหน่งข้อของตัวอย่างในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยชิ้นส่วข้อที่ปลายยอดนับเป็นข้อที่ 1 และชิ้นส่วนข้อที่อยู่ต่ำถัดลงมานับเป็นตำแหน่งที่ 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ นำชิ้นส่วนทั้งหมดที่แยกไว้มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ และทำการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนข้อแต่ละตำแหน่ง โดยจะเก็บผลทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ โดยทำการบันทึกผลเป็นร้อยละของการเกิดยอด และความยาวยอดใหม่โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ในการวัดขนาดอีกด้วย

3.2.6 วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละการเกิดเอ็มบริโอ} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างแคลลัสที่เกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส}}{\text{จำนวนตัวอย่างแคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างพืชที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนตัวอย่างพืชทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละการเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างพืชที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างพืชทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละการเกิดยอดร่วมแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างพืชที่เกิดยอดร่วมแคลลัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างพืชทั้งหมด}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

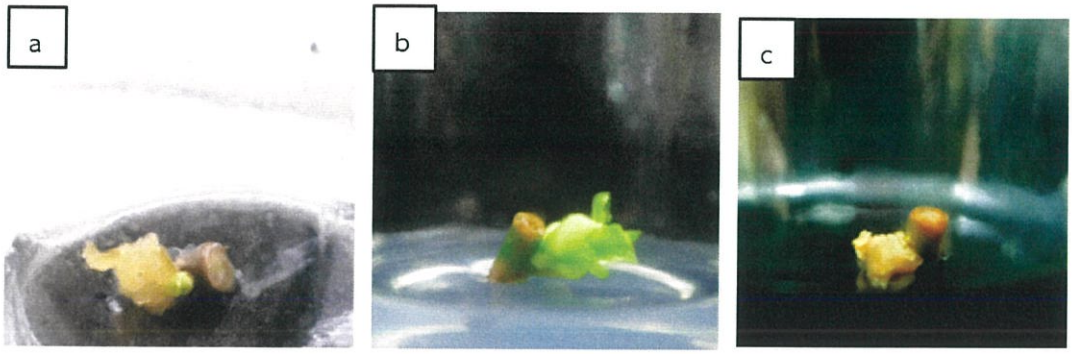
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 และ 025 ให้เกิดยอด

จากการนำชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือ 2 รหัส คือรหัส 024 และ 025 มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ทั้งชนิดที่เติมผงถ่าน และปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP และ *m*T ความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญจากอาหารที่เติมผงถ่านกับอาหารที่ปราศจากผงถ่าน และเพื่อค้นหาสูตรของอาหาร สารควบคุมการเจริญ และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 รหัส ให้เกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ 8 สัปดาห์ ชิ้นส่วนข้อของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 รหัส มีลักษณะการเจริญเติบโตหลากหลายรูปแบบทั้งที่ เจริญเป็นแคลลัส เจริญเป็นยอด และเจริญเกิดเป็นทั้งยอดและแคลลัสบนชิ้นตัวอย่างเดียวกัน

โดยผลการเจริญสำหรับน้อยหน่าเครือรหัส 024 นั้นพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ชนิดที่เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอดมากที่สุด คือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ให้ขนาดความยาวยอดเฉลี่ย 1.68 มิลลิเมตร แต่อาหารสังเคราะห์ MS ที่ปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นให้ร้อยละของการเกิดยอดต่ำที่ 33.33 เปอร์เซ็นต์ แต่กลับให้ความยาวยอดเฉลี่ยที่ยาว 2.16 มิลลิเมตร ส่วนอาหารสูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ร้อยละของการเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตรอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเกิดยอดและแคลลัสในชิ้นตัวอย่างเดียวกันมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ และให้ความยาวยอดเฉลี่ย 0.86 มิลลิเมตร (แสดงในตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ T.D.Kim. et al. (2005) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Schisandra chinensis* กล่าวว่าการใช้อาหารสังเคราะห์ร่วมกับสารควบคุมการเจริญสามารถทำให้เกิดการเจริญได้ดีกว่าอาหารสังเคราะห์ที่ปราศสารควบคุมการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 (a) ลักษณะการเกิดยอดร่วมกับแคลลัสจากอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (b) ลักษณะการเกิดยอดจากอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (c) ลักษณะการเกิดแคลลัสจากอาหาร

ผลการเจริญของชิ้นส่วนข้อน้อยหน่าเครือรหัส 025 นั้นพบว่าอาหารสังเคราะห์ MS ปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญทั้ง BAP และ *m*T ในเกือบทุกความเข้มข้นนั้นสามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ได้ทั้งหมด ยกเว้นอาหารสังเคราะห์ MS ปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่เกิดยอดใหม่เลย โดยอาหารสังเคราะห์ MS ปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญชนิด BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์ของการเกิดยอดใหม่มากที่สุดคือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และให้ความยาวยอดเฉลี่ยยาวที่สุดเช่นกันคือ 5.26 มิลลิเมตร ในส่วนของการเกิดแคลลัสพบว่าอาหาร MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหาร MS สูตรปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นให้เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งยอดใหม่และแคลลัสในชิ้นตัวอย่างเดียวกันมากที่สุดคือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวยอดเฉลี่ย 0.80 มิลลิเมตร แต่อาหาร MS สูตรปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ถึงจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นทั้งยอดใหม่และแคลลัสบนตัวอย่างชิ้นเดียวกันต่ำกว่า 33.33 เปอร์เซ็นต์แต่กลับให้ผลความยาวยอดเฉลี่ยที่ดีกว่าคือ 1.65 มิลลิเมตร ตามลำดับ (แสดงในตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Agnieszka Szopa and Halina Ekiert. (2012) ที่ทำการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Schisandra Chinensis* ที่กล่าวถึงการใช้สารควบคุมการเจริญกลุ่มออกซิน สามารถทำให้เกิดการเจริญได้ดีขึ้น

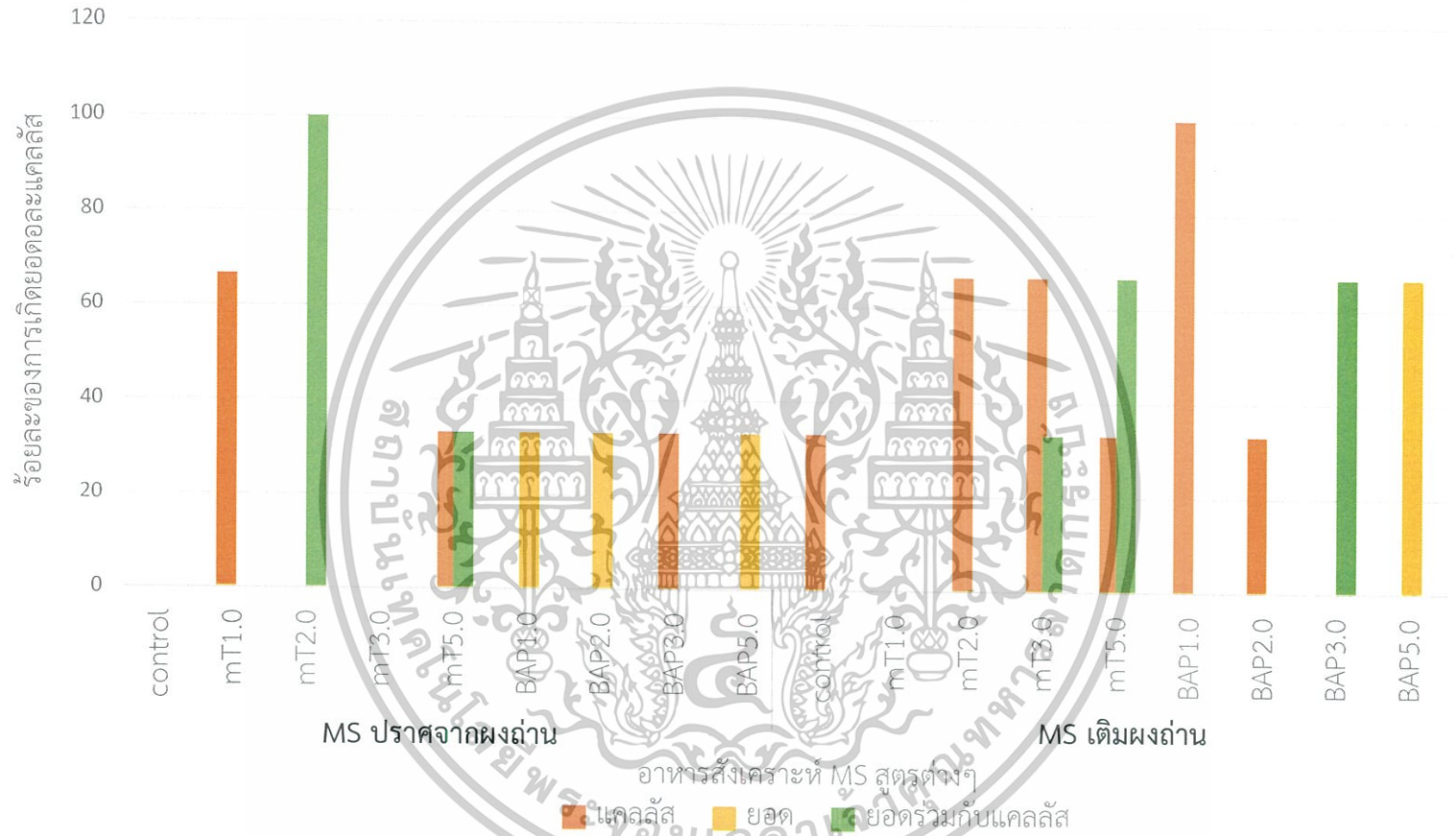
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของการเกิดยอดใหม่ การเกิดแคลลัส การเกิดยอดร่วมกับแคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย ความยาวยอดที่เกิดร่วมกับแคลลัสเฉลี่ยจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 ที่เวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญ (มก./ล.)		การเกิดยอดใหม่		การเกิดแคลลัส		การเกิดยอดใหม่ร่วมกับแคลลัส	
		จำนวนที่เกิด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	จำนวนที่เกิด (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์	เปอร์เซ็นต์	ความยาวยอด (มม.)
control		0	0	0	0	0	0
*m*T	1	0	0	2	66.67	0	0
	2	0	0	0	0	100	0.86
	3	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	1	33.33	33.33	0.81
BAP	1	33.33	ตุ่มยอด	0	0	0	0
	2	33.33	ตุ่มยอด	0	0	0	0
	3	0	0	1	33.33	0	0
	5	33.33	2.16	0	0	0	0

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของการเกิดยอดใหม่ การเกิดแคลลัส การเกิดยอดร่วมกับแคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย ความยาวยอดที่เกิดร่วมกับแคลลัสเฉลี่ยจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 024 ที่เวลา 8 สัปดาห์ (ต่อ)

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญ (มก./ล.)		การเกิดยอดใหม่		การเกิดแคลลัส		การเกิดยอดใหม่ร่วมกับแคลลัส	
		จำนวนที่เกิด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	จำนวนที่เกิด (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์	เปอร์เซ็นต์	ความยาวยอด (มม.)
control เติมผงถ่าน		0	0	1	33.33	0	0
*m*T เติมผงถ่าน	1	0	0	1	33.33	0	0
	2	0	0	2	66.67	0	0
	3	0	0	2	66.67	33.33	ตุ่มยอด
	5	0	0	1	33.33	66.67	ตุ่มยอด
BAP เติมผงถ่าน	1	0	0	3	100	0	0
	2	0	0	1	33.33	0	0
	3	0	0	0	0	66.67	ตุ่มยอด
	5	66.67	1.68	0	0	0	0



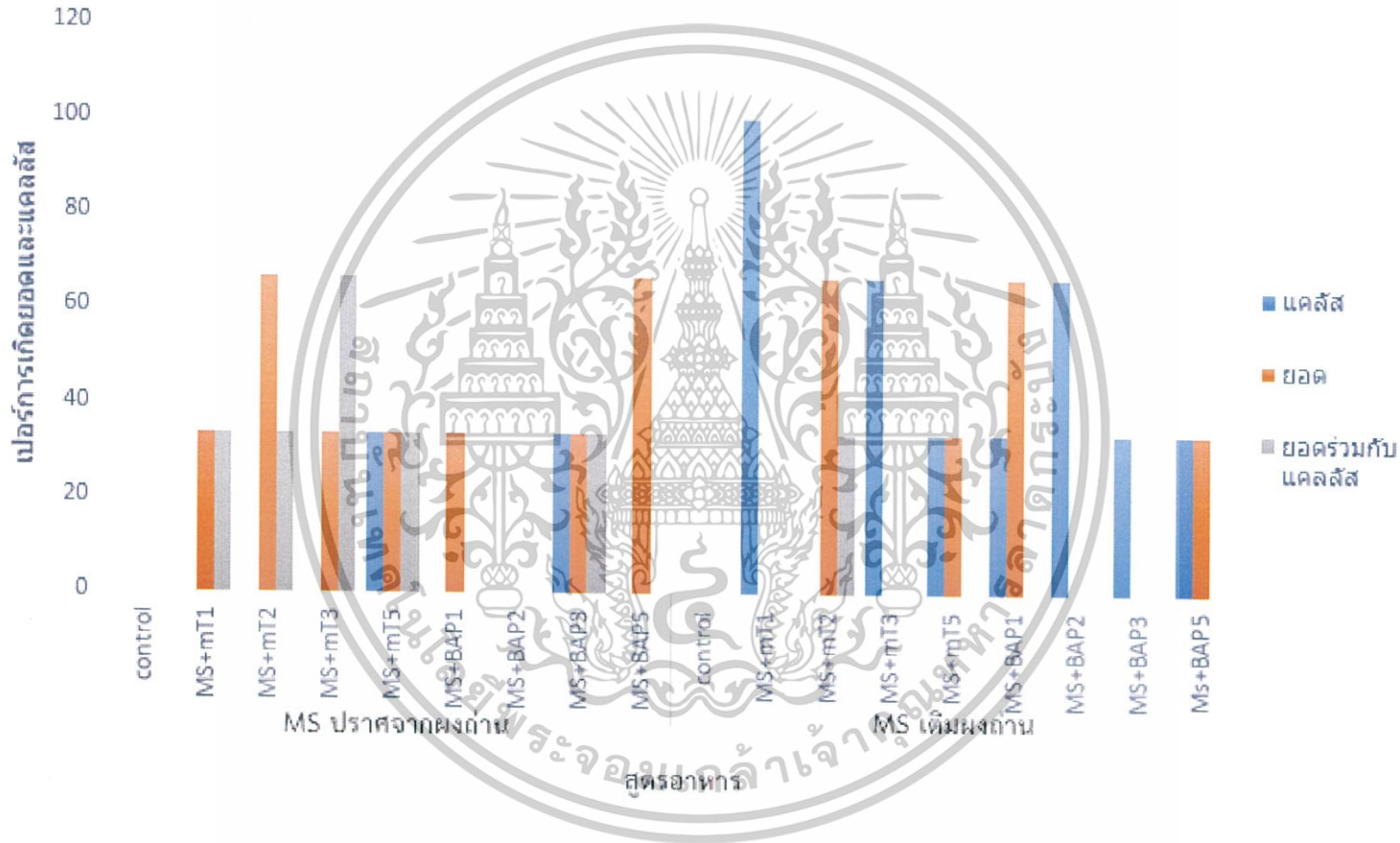
รูปที่ 4.2 ร้อยละการเจริญเติบโตในสูตรอาหารที่แตกต่างกันของน้อยหน่าเครือรหัส 024 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของการเกิดยอดใหม่ การเกิดแคลลัส การเกิดยอดร่วมกับแคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย ความยาวยอดที่เกิดร่วมกับแคลลัสเฉลี่ยจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์

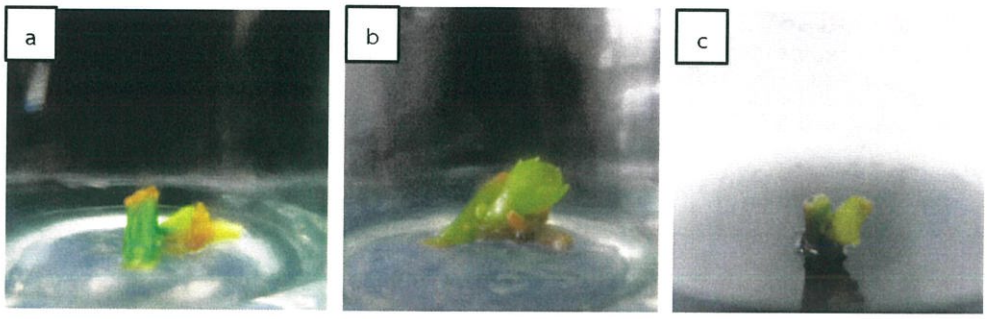
ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญ (มก./ล.)		การเกิดยอดใหม่		การเกิดแคลลัส		การเกิดยอดใหม่ร่วมกับแคลลัส	
		จำนวนที่เกิด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	จำนวนที่เกิด (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์	เปอร์เซ็นต์	ความยาวยอด (มม.)
control		0	0	0	0	0	0
*m*T	1	33.33	1.17	0	0	33.33	1.09
	2	66.67	4.63	0	0	33.33	1.65
	3	33.33	ตุ่มยอด	0	0	66.67	0.80
	5	33.33	1.38	1	33.33	33.33	ตุ่มยอด
BAP	1	33.33	0.87	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	33.33	3.94	1	33.33	33.33	1.42
	5	66.67	5.26	0	0	0	0

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของการเกิดยอดใหม่ การเกิดแคลลัส การเกิดยอดร่วมกับแคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย ความยาวยอดที่เกิดร่วมกับแคลลัสเฉลี่ยจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่เวลา 8 สัปดาห์ (ต่อ)

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญ (มก./ล.)		การเกิดยอดใหม่		การเกิดแคลลัส		การเกิดยอดใหม่ร่วมกับแคลลัส	
		จำนวนที่เกิด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	จำนวนที่เกิด (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์	เปอร์เซ็นต์	ความยาวยอด (มม.)
Control เติมผงถ่าน		0	0	0	0	0	0
*m*T เติมผงถ่าน	1	0	0	3	100	0	0
	2	66.67	ตุ่มยอด	0	0	33.33	ตุ่มยอด
	3	0	0	2	66.67	0	0
	5	33.33	ตุ่มยอด	1	33.33	0	0
BAP เติมผงถ่าน	1	66.67	1.24	1	33.33	0	0
	2	0	0	2	66.67	0	0
	3	0	0	1	33.33	0	0
	5	33.33	ตุ่มยอด	1	33.33	0	0



รูปที่ 4.3 ร้อยละของการเจริญเติบโตในสูตรอาหารที่แตกต่างกันของน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์



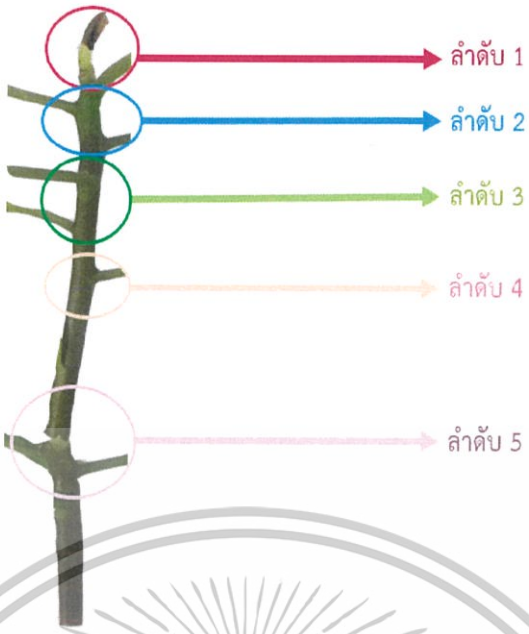
รูปที่ 4.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 (a) ลักษณะการเกิดยอดร่วมกับแคลลัสจากอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (b) ลักษณะการเกิดยอดจากอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (c) ลักษณะการเกิดแคลลัสจากอาหาร MS เติมผงถ่านและสารควบคุมการเจริญ *m*Tความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 ศึกษาผลกระทบจากตำแหน่งของข้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนน้อยหน่าเครือ

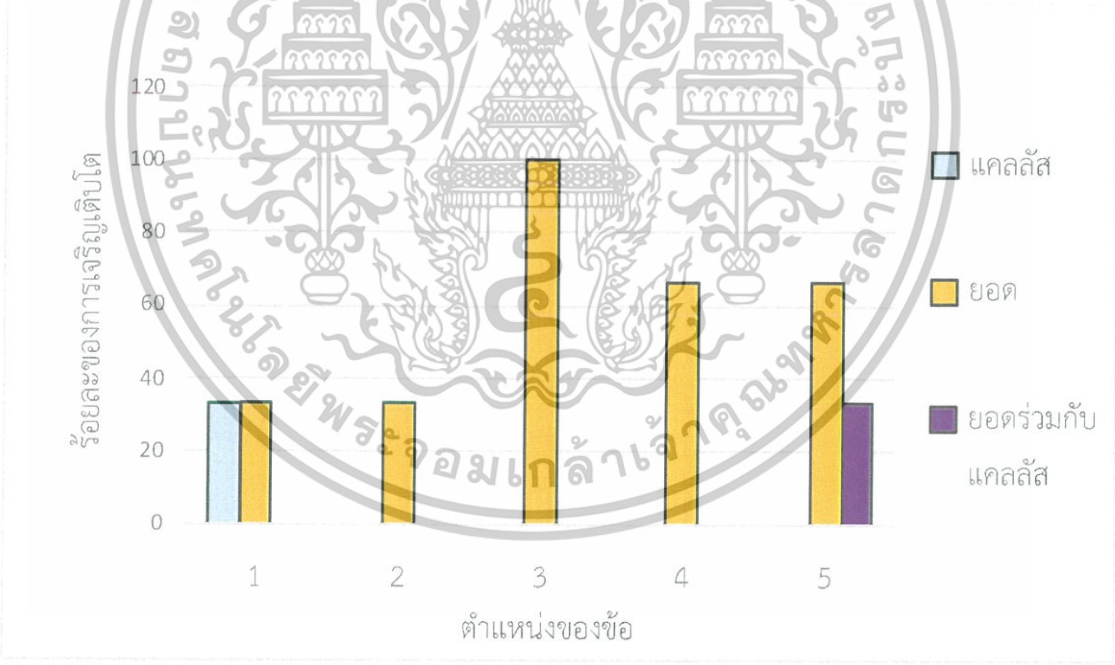
ทำการศึกษาผลกระทบจากตำแหน่งของข้อที่ใช้เพาะเลี้ยงว่ามีผลกระทบต่อลักษณะการเจริญเติบโตของตัวอย่างโดยใช้ชิ้นส่วนข้อจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในส่วนลำดับของตำแหน่งข้อนั้นจะนับข้อที่อยู่ด้านบนสุดของกิ่งเป็นข้อตำแหน่งที่ 1 และให้ข้อที่อยู่ต่ำถัดลงมาเป็นข้อตำแหน่งที่ 2 3 4 และ 5 ตามลำดับจุดประสงค์ของการทดลองนี้คือ เพื่อทดสอบว่าข้อที่ตำแหน่งใดสามารถเจริญได้ดีและเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของต้นน้อยหน่าเครือมากที่สุด

จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตัวอย่างข้อของต้นน้อยหน่าเครือเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ข้อทุกตำแหน่งตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึงตำแหน่งที่ 5 สามารถเจริญเป็นยอดได้ทั้งหมด เพียงแต่ร้อยละของการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยที่วัดได้ จะแตกต่างกันไปโดยข้อตำแหน่งที่ 3 นั้นจะมีโอกาสในการเกิดยอดสูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้อที่เกิดขึ้นจะเป็นเพียงแค่ตุ่มยอดเท่านั้น ชิ้นส่วนข้อตำแหน่งที่ 4 และตำแหน่งที่ 5 จะมีการเกิดยอดที่ต่ำรองลงมาคือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้อของทั้งสองคือตำแหน่งที่ 4 และตำแหน่งที่ 5 จะมีความยาวยอดเฉลี่ยที่ยาวกว่ากว่าตำแหน่งที่ 3 คือ ข้อตำแหน่งที่ 4 ให้ความยาวยอดเฉลี่ยที่ 0.83 มิลลิเมตร และข้อตำแหน่งที่ 5 ยังให้ความยาวยอดเฉลี่ยยาว 1.70 มิลลิเมตร นอกจากนี้ข้อตำแหน่งที่ 5 ยังให้การเกิดแคลลัสร่วมกับยอดบนชิ้นส่วนตำแหน่งเดียวกันมากที่สุดคือ 33.33 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ตัวอย่างชิ้นส่วนข้อตำแหน่งต่าง ๆ ของน้อยหน่าเครือรหัส 025

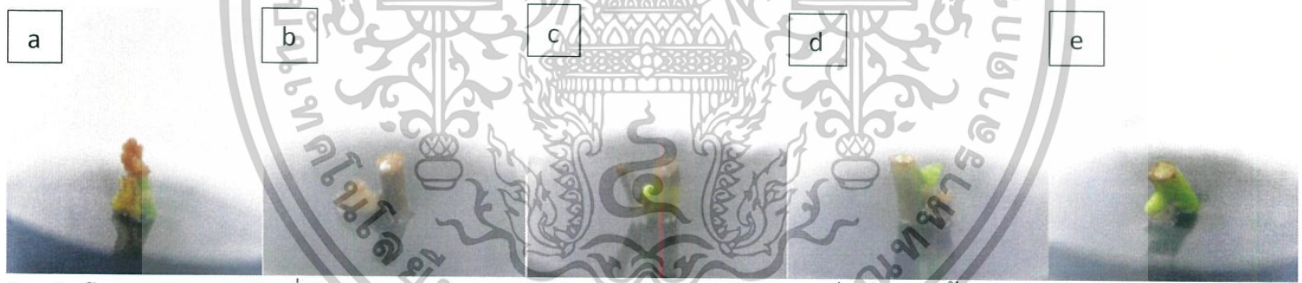


รูปที่ 4.6 ร้อยละของการเจริญเติบโตของข้อตำแหน่งต่าง ๆ ในอาหารสังเคราะห์ MS เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของตำแหน่งข้อที่มีต่อลักษณะการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อน้อยหน่าเครือรหัส 025 ในอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

ตำแหน่งข้อ	สัปดาห์ที่ 2						สัปดาห์ที่ 4					
	การเกิดยอดใหม่		การเกิดแคลลัส		เกิดยอดร่วมกับแคลลัส		การเกิดยอดใหม่		การเกิดแคลลัส		เกิดยอดร่วมกับแคลลัส	
	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์
1	0	0	1	33.33	0	0	1	33.33	1	33.33	0	0
2	0	0	0	0	0	0	1	33.33	0	0	0	0
3	2	66.67	0	0	0	0	3	100	0	0	0	0
4	2	66.67	0	0	0	0	2	66.67	0	0	0	0
5	2	66.67	0	0	1	33.33	2	66.67	0	0	1	33.33



รูปที่ 4.7 ลักษณะการเจริญเติบโตของตัวอย่างข้อที่ตำแหน่งต่าง ๆ จากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสูตรควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ (a) ข้อตำแหน่งที่ 1 (b) ข้อตำแหน่งที่ 2 (c) ข้อตำแหน่งที่ 3 (d) ข้อตำแหน่งที่ 4 (e) ข้อตำแหน่งที่ 5

ตารางที่ 4.4 ผลของความยาวเฉลี่ยและขนาดแคลลัสเฉลี่ยของตำแหน่งตัวอย่างข้อต่อลักษณะการเจริญเติบโตจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ถูกเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญชนิด *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

ตำแหน่งของข้อ	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4	
	ขนาดแคลลัส	ความยาวยอด	ขนาดแคลลัส	ความยาวยอด
1	0	0	6.88	มีตุ่มยอด
2	0	0	0	มีตุ่มยอด
3	0	มีตุ่มยอด	0	มีตุ่มยอด
4	0	มีตุ่มยอด	0	0.83
5	1.95	มีตุ่มยอด	12.5	1.70

4.3 การศึกษาการเกิดเอ็มบริโอบนแคลลัสจากต้นน้อยหน่าเครือรหัส 001

จากการทดลองนำชิ้นส่วนแคลลัสจากน้อยหน่าเครือรหัส 001 มาทำการทดลองชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่าน ร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T TDZ และ BAP ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะทำการบันทึกผลทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 6 สัปดาห์ พบว่าเริ่มมีการพัฒนาเนื้อเยื่อเป็นเอ็มบริโอเมื่อเวลาผ่านไปได้ 4 สัปดาห์ และเริ่มมีเนื้อเยื่อที่พร้อมเจริญที่คล้ายใบและเห็นออแกโนเจเนซีสได้ชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ โดยจะเกิดผลกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 0.5 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญ TDZ ความเข้มข้น 0.5 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกิดผลกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 2.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญ BAP ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ผลร้อยละการเกิดเอ็มบริโอดีที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในตารางที่ 4.3) ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Dan. et al. (2013) ที่ทำการชักนำแคลลัสให้เป็นต้นใหม่ด้วยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญ TDZ แล้วทำให้เกิดเอ็มบริโอจำนวนมาก

รูปที่ 4.8 แคลลัสจากน้อยหน่าเครือรหัส 001 ที่เกิดการพัฒนาเนื้อเยื่อพร้อมเจริญที่มีลักษณะคล้ายใบ

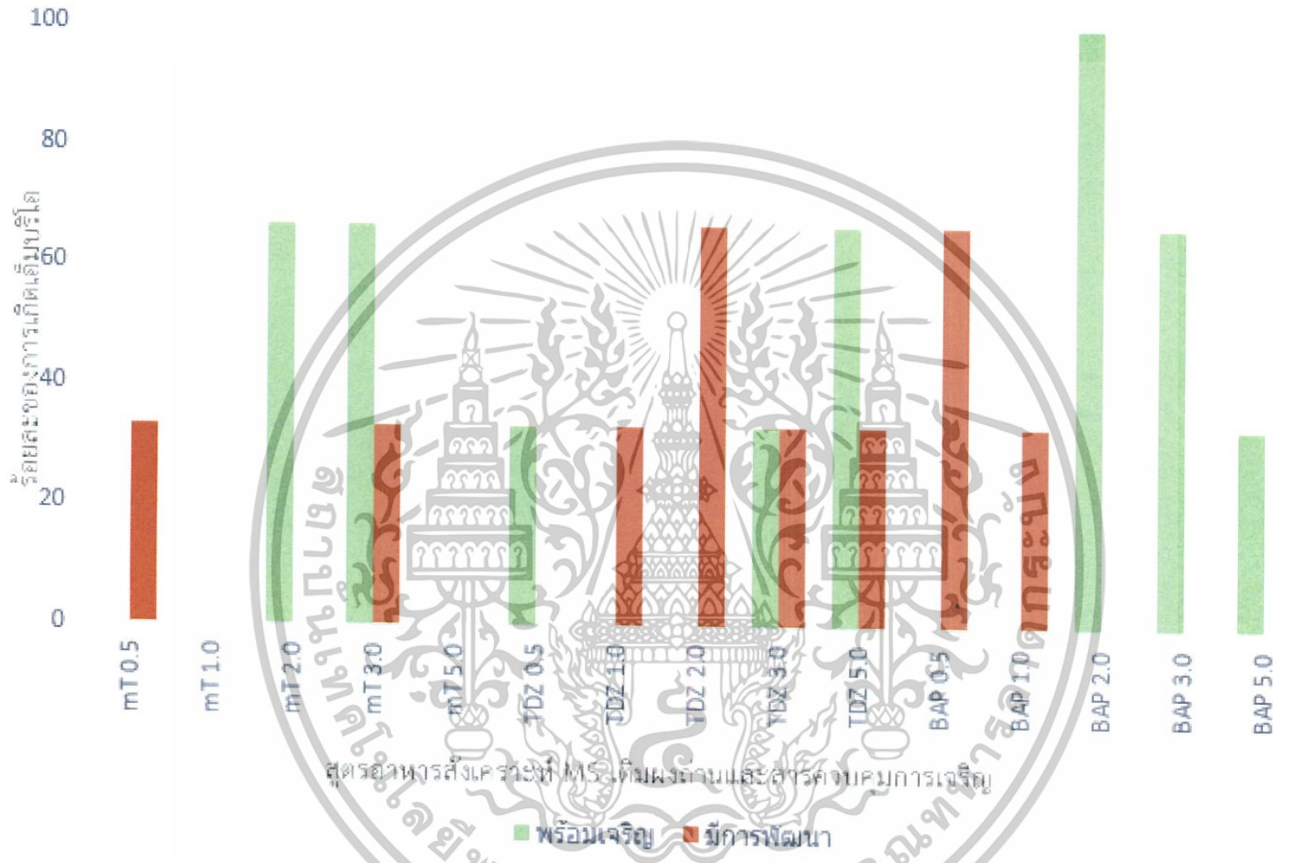
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การเกิดเอ็มบริโอจากแคลลัสของต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 001 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS สูตรเติมถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญต่าง ๆ เป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มก./ล.)		สัปดาห์ที่ 2			สัปดาห์ที่ 4			สัปดาห์ที่ 6		
		มีเนื้อเยื่อพร้อมเจริญ (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	ไม่เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	มีเนื้อเยื่อพร้อมเจริญ (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	ไม่เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	มีเนื้อเยื่อพร้อมเจริญ (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	ไม่เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)
*m*T	0.5	0	0	(3) 100	0	(1) 33.33	(2) 66.67	0	(1) 33.33	(2) 66.67
	1	0	0	(3) 100	0	0	(3) 100	0	0	(3) 100
	2	0	0	(3) 100	(1) 33.33	0	(2) 66.67	(2) 66.67	0	(1) 33.33
	3	0	0	(3) 100	(1) 33.33	(2) 66.67	0	(2) 66.67	(1) 33.33	0
	5	0	0	(3) 100	0	0	(3) 100	0	0	(3) 100
TDZ	0.5	0	0	(3) 100	0	0	(3) 100	(1) 33.33	0	(2) 66.67
	1	0	0	(3) 100	0	0	(3) 100	0	(1) 33.33	(2) 66.67
	2	0	0	(3) 100	0	(2) 66.67	(1) 33.33	0	(2) 66.67	(1) 33.33
	3	0	0	(3) 100	(1) 33.33	0	(2) 66.67	(1) 33.33	(1) 33.33	(1) 33.33
	5	0	0	(3) 100	(1) 33.33	(2) 66.67	0	(2) 66.67	(1) 33.33	0

ตารางที่ 4.5 การเกิดเอ็มบริโอจากแคลลัสของต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 001 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS สูตรเติมถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญต่าง ๆ เป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ (ต่อ)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช(มก./ล.)		สัปดาห์ที่ 2			สัปดาห์ที่ 4			สัปดาห์ที่ 6		
		มีเนื้อเยื่อพร้อมเจริญ (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	ไม่เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	มีเนื้อเยื่อพร้อมเจริญ (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	ไม่เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	มีเนื้อเยื่อพร้อมเจริญ (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)	ไม่เกิดการพัฒนา (ขวด) (เปอร์เซ็นต์)
BAP	0.5	0	0	(3) 100	0	(2) 66.67	(1) 33.33	0	(2) 66.67	(1) 33.33
	1	0	0	(3) 100	0	(1) 33.33	(2) 66.67	0	(1) 33.33	(2) 66.67
	2	0	0	(3) 100	(3) 100	0	0	(3) 100	0	0
	3	0	0	(3) 100	(2) 66.67	0	(1) 33.33	(2) 66.67	0	(1) 33.33
	5	0	0	(3) 100		0	(2) 66.67	(1) 33.33	0	(2) 66.67



รูปที่ 4.9 แสดงร้อยละการเกิดเอ็มบริโอในอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านและสารควบคุมการเจริญสูตรต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1. สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำน้อยหน่าเครือ 2 รหัส คือรหัส 024 และ 025 ให้เกิดการเจริญภายใต้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อนำน้อยหน่าเครือรหัส 024 มาทำการชักนำให้เกิดการเจริญ สูตรอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุดคือ อาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเกิดยอดใหม่ถึง 66.67 เปอร์เซ็นต์ และให้ความยาวยอดเฉลี่ย 1.68 มิลลิเมตร ในส่วนของสูตรอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ที่มีความยาวมากที่สุดคือ อาหารสังเคราะห์ MS สูตรไม่เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 2.16 มิลลิเมตร และในการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดแคลลัสนั้นควรใช้อาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การเกิดแคลลัสสูงที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารสังเคราะห์ MS เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเกิดยอดร่วมกับแคลลัสมากที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำน้อยหน่าเครือรหัส 025 มาทำการชักนำให้เกิดการเจริญ สูตรอาหารสังเคราะห์ที่สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุดและยาวที่สุดคือ อาหารสังเคราะห์ MS สูตรปราศจากผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเกิดยอดใหม่ถึง 66.67 เปอร์เซ็นต์ และให้ความยาวยอดเฉลี่ย 5.26 มิลลิเมตร และในการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดแคลลัสนั้นควรใช้อาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด *m*T ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การเกิดแคลลัสสูงที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารสังเคราะห์ MS เติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *m*T ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเกิดยอดร่วมกับแคลลัสมากที่สุดถึง 66.67 เปอร์เซ็นต์

ในการทดลองค้นหาลำดับของข้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการนำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด *m*T ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเก็บผลที่ 4 สัปดาห์ พบว่าข้อลำดับที่ 3 นั้นจะให้ค่าร้อยละของการเกิดยอดสูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้อที่เกิดขึ้นจะเป็นเพียงตุ่มยอดเล็ก ๆ เท่านั้นส่วนข้อลำดับที่ 5 ถึงแม้ว่าจะให้ร้อยละการเกิดยอดที่ต่ำกว่าคือ 66.67 เปอร์เซ็นต์แต่จะให้ค่าความยาวยอดเฉลี่ยสูงถึง 1.70 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองนำชิ้นส่วนแคลลัสจากน้อยหน่าเครือรหัส 001 มาทำการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าผลร้อยละการเกิดเอ็มบริโอมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากในการทดลองศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำน้อยหน่าเครือให้เกิดการเจริญภายใต้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยทำการทดลองกับต้นน้อยหน่าเครือ 2 รหัส พบว่าการนำชิ้นส่วนข้อจากต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 024 และ 025 มาทำการทดลองชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตนั้น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สำเร็จแต่ยอดที่เกิดขึ้นมานั้นใช้ระยะเวลานานในการเจริญเติบโตจะเห็นว่าจากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยหน่าเครือรหัส 025 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงไปถึง 8 สัปดาห์แต่ยอดของน้อยหน่าเครือกลับเจริญยาวเฉลี่ยสูงสุดได้เพียง 5.26 มิลลิเมตรเท่านั้น ในอนาคตหากต้องการจะทำการทดลองนี้ต่อก็ควรมีการแก้ไขอย่างเช่นการเปลี่ยนชนิดของอาหารหรือสารควบคุมการเจิญเติบโตของพืชเป็นชนิดอื่นหรือเริ่มทำการทดลองให้เร็วขึ้นเป็นต้น หรือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยหน่าเครือรหัส 024 จะพบว่ามีการเจริญในอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่านจะสามารถชักนำยอดได้มาก แต่สูตรที่ปราศจากผงถ่านจะให้ความยาวยอดที่ดีกว่า จึงมีข้อเสนอแนะที่ควรจะเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารสูตรเติมผงถ่านเพื่อเป็นการชักนำให้เกิดยอดก่อนจึงค่อยทำการเปลี่ยนถ่ายไปยังอาหารสูตรที่ปราศจากผงถ่านเพื่อเพิ่มความยาวยอด และในการทดลองยังไม่สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ดังนั้นในอนาคตอาจนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ไปประยุกต์ใช้งานโดยเริ่มจากการนำตัวอย่างไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการเกิดยอดจนมียอดใหม่ที่สมบูรณ์เกิดขึ้นแล้วจึงนำตัวอย่างไปเพาะเลี้ยงต่อในสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่าตำแหน่งข้อของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีผลต่อลักษณะการเจริญเติบโต ดังนั้นควรเลือกใช้ตำแหน่งของข้อที่เหมาะสมตามที่เขียนไว้ในข้อมูลจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ในการทดลอง ในส่วนของการทดลองชักนำแคลลัสของน้อยหน่าเครือรหัส 001 ให้เกิดเอ็มบริโอนั้นสามารถทำได้สำเร็จแต่ยังไม่สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดหรือทำให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ดังนั้นในอนาคตอาจต้องเพิ่มเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มจนมียอดเกิดขึ้นแล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน หรืออาจจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญร่วมระหว่างออกซิน และไซโตไคนิน เพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่สมบูรณ์ต่อไป นอกจากนี้ในการทดลองยังพบปัญหาเรื่องจำนวนตัวอย่างเนื่องจากพืชชนิดนี้เป็นพืชหายากดังนั้นก่อนทำการทดลองควรหาตัวอย่างไว้ก่อนล่วงหน้าเป็นปริมาณมากหรืออาจจะนำตัวอย่างจำนวนน้อยที่มีอยู่มาทำการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ในธรรมชาติก่อนเพื่อเพิ่มจำนวนต้นหรืออย่างน้อยก็เพิ่มขนาดต้นเพื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่างที่มีเอาไว้ก่อนเริ่มทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชัชรี แก้วสุรลิขิต และจันทนา ไพรบูรณ์. 2555. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่าเพื่อการอนุรักษ์หญ้าทะเล**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

ชลดา ธีรการุณวงศ์. 2555. **วิธีใช้เทคโนโลยีชีวภาพให้ควบคู่กับการเกษตร**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http:/ /st.nsru.ac.th/index_science1.php?tag=detail_research&&id=000002.

ปริญา สุคนธรัตน์. 2558. **การทำให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ และการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.natres.psu.ac.th/Department/ PlantScience/sjps/fulltexts/file1429176550201504161331.pdf

พัชรา แก้วสุรลิขิต. 2550. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : www. fisheries.go.th/genetic/research.

ภรัณยา ธิยะใจ, ณัฐิรา อ่อนน้อม, อธิชา เนตรบุตร, ธารีรัตน์ วัชรชัยโสพลศิริ, อุทัยวรรณ สุทธิศันสนีย์, วรรัตน์ สุวรรณวัฒนา, ธันยาภรณ์ พงษ์คุณากร, วรางคณา ศรีจำนง และสมศรี เจริญเกียรติกุล. **การสำรวจข้อมูลด้านการบริโภค การใช้ประโยชน์ด้านสมุนไพร และปริมาณวิตามินซีของน้อยหน่าเครือ (*Kadsura* spp.)** SURVEY OF CONSUMPTION, MEDICINAL USE AND DETERMINATION OF VITAMIN C CONTENTS IN NOI-NA-KREUA (*Kadsura spp.*). พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม. สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

รังสฤษฎ์ กาวิตัะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลักการและเทคนิค**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วารุต อยู่คง. 2555. **การขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. พะเยา. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยพะเยา

สุจิตตรา เพชรคง, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์ และชมพูนุช มรรคทรพย์. 2553. **ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้น้ำใบพาย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สถาบันวิจัยและการพัฒนาสัตว์น้ำ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2542. "ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช" หน้า 16.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **เทคโนลีชีวภาพของพืช**. กรุงเทพฯ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อารีย์ วัรัญญูรัตน์. 2552. **การเพาะเลี้ยงเน้อเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

A.Smiskova, H.Vlasinova,L.Havel. 2005. “Somatic Embryogenesis From Zygotic Embryos of *Schisandra chinensis.*” *Biologia Plantarum.* 49 : 451-454.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

Agnieszka, S. and Halina, E. 2012. "In Vitro Cultures of *Schisandra chinensis.* (Turcz.) Baill. (Chinese Magnolia Vine)-a Potential Biotechnological Rich Source." *Applied biochemistry and biotechnology.* 166 : 1941-1948.

Agnieszka, S. and Halina, E. 2013. "Production of deoxyschizandrin and –schizandrin in shoot-differentiating and undifferentiating callus cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine)." *Journal of Biotechnology.* 165 : 3-4.

Agnieszka, S. and Halina, E. 2015. "Production of Schisantherin A and Gomisin G In In Vitro Cultures of *Schisandra chinensis.*" *Phytochemistry Letters.* 11 : 440-444.

Agnieszka, S. Radosław, E. and Halina, E. 2016. "Current Knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a Medicinal Plant Species: a Review on The Bioactive Components, Pharmacological Properties, Analytical and Biotechnological Studies." *Phytochemistry Reviews.* 16 : 195-218.

Anonymous. 2015. **การขยายพันธุ์น้อยหน่าเครือ.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.kasetporpeang.com/forums/index.php?topic=122633.0

Anonymous. 2017. **น้อยหน่าเครือ" ผลไม้แปลกประหลาดหายาก ที่คุณอาจไม่เคยรู้จักมาก่อน มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://www.tnews.co.th/social/380161/น้อยหน่าเครือ-ผลไม้แปลกประหลาดหายาก-ที่คุณอาจไม่เคยรู้จักมาก่อน-มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร-%28รายละเอียด%29

Anonymous. 2517. **น้อยหน่าเครือพีชอนุรักษ์ อพ.สธ.** จุลสารสวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน. 22(6).1

Hiroshi, K. Makoto, O. and Akira, N. 2011. "Production of Lignans in Calluses of *Schisandra chinensis.*" *Journal of Natural Medicines.* 66 : 373-376.

Kim, T. D. Ramesh, V. Anbazhagan. and Park, J. I. 2005. "Somatic Embryogenesis in *Schisandra chineasis* (TURCZ.) Baili." *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* 41 : 253-257.

Jia, Z. Dong chun, J. Hai lin, H. Quan gang, L. 2011. "Optimization of Callus Induction Medium for *Schisandga chinensis* Baill via Uniform Design." *Agricultural Science & Technology – Hunan.* 12 : 141-143.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

Sun, D. Xiang Lang, W. Bo Li, H. Mei Lan, L. and Zhong Yun, P. 2013. "An Improve Method for Somatic Embryogenesis of *Schisandra chinesis* (Turcz.) Baillon." *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16 : 127-134

Sun, D. Zhenxing, W. Yunfei, Y. Changyu, L. Hongyan, Q. Peilei, X. Ying, Z. Yingxue, L. Yiming, Y. Shutian, F. and Jun, A. 2018. "Optimization of Culturing Conditions for Production of Somatic Embryos and Lignins of *Schisandra chinensis*. (Turcz.) Baill." *Acta Physiologiae Plantarum*. 40 : 166

Yang Jing, L. Yu Da, N. Chuan Ping, Y. Gui Feng, L. Cheng Hao, L. 2011. "Induction of Somatic Embryogenesis from Female Flower Buds of Elite *Schisandra chinensis*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 106 : 391-399.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ก-1 ความยาวยอดเฉลี่ย จากชิ้นส่วนตาข้างของต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 024 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มก./ล.)		สัปดาห์ที่ 2 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 4 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 6 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 8 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)
control		0	0	0	0
mT	1	0	0	0	0
	2	0	0	ตุ่มยอด	1.79
	3	0	0	0	0
	5	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด	0.73	0.81
BAP	1	0	0	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด
	2	0	0	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด
	3	0	0	0	0
	5	0	0.96	1.67	2.16

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ก-1 ความยาวยอดเฉลี่ย จากชิ้นส่วนตาข้างของต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 024 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 8 สัปดาห์ (ต่อ)

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มก./ล.)		สัปดาห์ที่ 2 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 4 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 6 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 8 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)
control + ถ่าน		0	0	0	0
mT + ถ่าน	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด
	5	0	1.19	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด
BAP + ถ่าน	1	0	0	1.66	1.19
	2	0	0	0	0
	3	0	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด
	5	0	1.21	1.55	1.68

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ก-2 ความยาวยอดเฉลี่ย จากชิ้นส่วนตาข้างของต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 025 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มก./ล.)		สัปดาห์ที่ 2 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 4 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 6 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 8 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)
control		0	0	0	0
mT	1	0	ตุ่มยอด	1.98	2.26
	2	0	1.62	3.83	6.28
	3	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด	0.80	0.80
	5	0	0.79	1.18	1.38
BAP	1	0	0	0.79	0.87
	2	0	0	0	0
	3	0	0	2.21	2.68
	5	0	0.96	3.33	5.26

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ก-2 ความยาวยอดเฉลี่ย จากชิ้นส่วนตาข้างของต้นน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ 025 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 8 สัปดาห์ (ต่อ)

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มก./ล.)		สัปดาห์ที่ 2 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 4 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 6 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	สัปดาห์ที่ 8 ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)
control + ถ่าน		0	0	0	0
mT + ถ่าน	1	0	0	0	0
	2	0	0	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด
	3	0	0	0	0
	5	0	0	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด
BAP + ถ่าน	1	0	ตุ่มยอด	1.12	1.24
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	5	0	0	ตุ่มยอด	ตุ่มยอด

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ข-1 ผลของตำแหน่งตัวอย่างชิ้นส่วนข้อต่อลักษณะการเจริญเติบโตจากชิ้นส่วนข้อของต้นน้อยหน่าเครือรหัส 025 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS สูตรเติมผงถ่าน ร่วมกับสารควบคุมการเจริญ *mT* ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

ตำแหน่งของข้อ	สัปดาห์ที่2						สัปดาห์ที่ 4			
	การเกิดแคลลัส		การเกิดยอด		มียอดเกิดร่วมกับแคลลัส		การเกิดแคลลัส		การเกิดยอด		มียอดเกิดร่วมกับแคลลัส	
	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์	ชิ้น	เปอร์เซ็นต์
1	1	33.33	0	0	0	0	1	33.33	1	33.33	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	33.33	0	0
3	0	0	2	66.67	0	0	0	0	3	100	0	0
4	0	0	2	66.67	0	0	0	0	2	66.67	0	0
5	0	0	2	66.67	1	33.33	0	0	2	66.67	1	33.33