การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของหนานเฉาเหว่ย

STUDY ON STERILIZATION AND OPTIMUM PLANT GROWTH REGULATOR CONDITION FOR PLANT REGENERATION OF *Vernonia amygdalina* Del.

ปาริชาติ พิมพ์พร

อังสิมา จิตต์เวทย์กุล

บุญสิตา วิทยาวงศรุจิ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON STERILIZATION AND OPTIMUM PLANT GROWTH REGULATOR CONDITION FOR PLANT REGENERATION OF *Vernonia amygdalina* Del.

PARICHART PIMPORN

ANGSIMA JITWETKUL

BUNSITA WITAYAWONGSARUJI

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 INSTITIUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของหนานเฉาเหว่ย Study on Sterilization and Optimum Plant Growth Regulator Condition for Plant Regeneration of *Vernonia amygdalina* Del.		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปาริชาติ	พิมพ์พร	รหัสนักศึกษา 58050781
	นางสาวอังสิมา	จิตต์เวทย์กุล	รหัสนักศึกษา 58050843
	นางสาวบุญสิตา	วิทยาวงศรุจิ	รหัสนักศึกษา 58051356
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม		
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. วิมลมาศ บุญมี		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2561

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของหนานเฉาเหว่ย			
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปาริชาติ	พิมพ์พร	รหัสนักศึกษา	58050781
	นางสาวอังสิมา	จิตต์เวทย์กุล	รหัสนักศึกษา	58050843
	นางสาวบุญสิตา	วิทยาวงศรุจิ	รหัสนักศึกษา	58051356
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
คณะ	วิทยาศาสตร์			
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)			
ปีการศึกษา	2561			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม			
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. วิมลมาศ บุญมี			

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของ *Vernonia amygdalina* หรือหนานเฉาเหว่ย ตั้งแต่วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ การชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง การชักนำให้เกิดรากและการย้ายออกปลูก โดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบนั้นมีการใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถทำให้ชิ้นส่วนพืชเจริญต่อไปได้และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ ได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใบที่ผ่านการฟอกด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 2395.38 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด เมื่อแบ่งตามตำแหน่งใบจะดีที่สุดในตำแหน่งที่ 2 ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยขนาดแคลลัสเฉลี่ย 4992.94 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ส่วนใบที่ผ่านการฟอกด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 2445.18 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด เมื่อแบ่งตามตำแหน่งใบจะดีที่สุดในตำแหน่งที่ 3 ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยขนาดแคลลัสเฉลี่ย 5666.53 ลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น friable และมีสีขาว การศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง ได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.60 ยอด ซึ่งให้จำนวนยอดมาก

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สุด และมีความยาวยอดเฉลี่ย 22.24 มิลลิเมตร เมื่อแบ่งตามตำแหน่งตาข้าง พบว่าที่ตำแหน่งที่ 1 ที่ BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 11.4 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ย 8.10 มิลลิเมตร และตำแหน่งที่ 4 ที่ BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 40.02 มิลลิเมตร การศึกษาการชักนำให้เกิดราก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดถึง 14.25 ราก มีความยาวรากเฉลี่ย 11.82 มิลลิเมตร การชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างจนได้ต้นที่สมบูรณ์ และสามารถนำออกปลูกสู่สภาวะธรรมชาติ จำนวน 10 ต้น พบว่า มีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์

คำสำคัญ : หนานเฉาเหว่ย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส การชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดราก การย้ายออกปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on Sterilization and Optimum Plant Growth Regulator Condition for Plant Regeneration of *Vernonia amygdalina* Del.		
Students	Miss Parichart	Pimporn	Student ID 58050781
	Miss Angsima	Jitwetkul	Student ID 58050843
	Miss Bunsita	Witayawongsaruji	Student ID 58051356
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		
Co-advisor	Dr. Wimonmat Boonmee		

Abstract

Tissue culture protocal for *Vernonnia amygdalina* was studied, starting from sterilization methods, callus induction, shoot induction, root induction, and transplanting to the field. The result showed that sterilization methods of explant from leaf and node by using mercuric chloride 0.1 % and 0.2 % were used to made plant grow and no contamination of microorganisms. Callus induction from leaf was cultured on MS that supplemented with 2,4-D concentration 0, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/L. It was found that the leaves that were sterilization methods with mercuric chloride 0.1 %, In 2,4-D 0.2 mg/L gave the best results with the average of callus size was 2395.38 mm^3 and best in section 1 with size 4992.94 mm^3. In the second method gave the best results with the average of callus size was 4992.94 mm^3 and 5666.53 mm^3 in section 3. The callus occurring as a friable and white color. Then, shoot induction from node were cultured on MS with BAP concentrations 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 mg/L, We were found the best result in BAP 0.5 mg/L gave the highest average number of shoot was 1.60 shoots with an average length of 22.24 mm. In section 1 at BAP 3.0 mg/L gave the highest average number of shoot was 11.4 shoots with an average length of 8.10 mm and section 4 at BAP 1.0 mg/L gave the highest average length with 40.02 mm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

After that studied on root induction with IBA 0, 0.2, 0.3, 0.5 and 1.0 mg/L. and BAP 0.5 mg/L combined with IBA 0.25 0.5 0.75 and 1.0 mg/L. We found the best result at IBA 0.2 mg/L, Gave the number of roots with 14.25 roots and average length was 11.82 mm. Percentage of regenerated rooting was 100 %, Finally we cultured until the complete tree can transplanting to nature with 100 % of survival from 10 trees for a total of 12 weeks from induction shoot.

Keywords : *Vernonia amygdalina* Del. , tissue culture, callus, shoot induction, root induction and tranplanting

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัย ในหัวข้อการศึกษาสภาวะการระฟอกฆ่าเชื้อและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของต้นหนานเฉาเหว่ย ซึ่งคณะผู้จัดทำขึ้นอย่างเต็มความรู้ความสามารถ โดยใช้เวลาในการศึกษาค้นคว้าหาข้อมูล วิเคราะห์และทดลอง ตลอดจนโครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โครงงานพิเศษฉบับนี้จะไม่บรรลุวัตถุประสงค์ไปได้หากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาอนุเคราะห์ช่วยเหลือ ทั้งในด้านวิชาการ และการออกแบบการทดลองจาก ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษา และดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมและกรรมการโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ ที่สละเวลาในการตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆเพื่อให้โครงงานพิเศษนี้ถูกต้องและเสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา และความช่วยเหลือในด้านวิชาการจาก รศ.ดร.สรัญญา วัชโรทัย อาจารย์ภาควิชาพฤกษสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และนางอุบลวรรณ บุญเปล่ง ผู้ปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์ (ผู้ชำนาญงานพิเศษ) ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของคณะผู้จัดทำ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดจนโครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ปาริชาติ พิมพ์พร
อังสิมา จิตต์เวทย์กุล
บุญสิตา วิทยาวงศรุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ฌ

คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ต้นหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina* Del.) 3

2.2 ประโยชน์ของหนานเฉาเหว่ย 4

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 6

2.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 8

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 9

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 14

3.1 ตัวอย่างพืช และแหล่งที่มา 14

3.2 อุปกรณ์ และสารเคมี 14

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ 14

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 14

3.2.3 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือ 15

3.3 วิธีการดำเนินงาน 16

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช 16

3.3.2 การฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืช 16

3.3.3 การชักนำแคลลัส 18

3.3.4 การชักนำเป็นต้นใหม่ 19

3.3.5 การออกปลูก 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.6 วิธีการบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลอง 20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 21
4.1 ผลของการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ และตาข้างโดยใช้วิธีที่ 1 2 3 และ 4 21
4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ 21
4.2.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ 21
4.2.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส จากใบในแต่ละตำแหน่งโดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ 23
4.2.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 28
4.2.4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส จากใบในแต่ละตำแหน่งโดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 29
4.2.5 ผลของการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญของแคลลัส 34
4.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด 35
4.3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด 35
4.3.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอดในแต่ละตำแหน่ง 37
4.4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดราก 43
4.5 ผลการออกปลูก 46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 49
5.1 สรุปผลการวิจัย 49
5.2 ข้อเสนอแนะ 50
เอกสารอ้างอิง 51
ภาคผนวก 53
ภาคผนวก ก 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงร้อยละการรอดชีวิตของการฟอกชิ้นส่วนใบ และตาข้างโดยใช้วิธีที่ 1 2 3 และ 4 21

4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนการเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากใบ
โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ 22

4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนการเกิดแคลลัสจากใบในแต่ละตำแหน่ง
โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ 24

4.4 แสดงสีของแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยในแต่ละตำแหน่ง
โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ 25

4.5 แสดงร้อยละจำนวนการเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากใบ
โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 28

4.6 แสดงร้อยละจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบในแต่ละตำแหน่ง
โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 30

4.7 แสดงสีของแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยในแต่ละตำแหน่ง
โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 31

4.8 แสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากการฟอกฆ่าเชื้อด้วย
เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 34

4.9 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้าง 35

4.10 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง 37

4.11 แสดงจำนวนการเกิดราก และความยาวรากเฉลี่ย 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นหนานเฉาเหว่ย	4
3.1	ตำแหน่งตาข้าง และใบของต้นหนานเฉาเหว่ย	16
4.1	แสดงการเกิดแคลลัสของใบ โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์	22
4.2	กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบ โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์	23
4.3	แสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากใบในแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์	26
4.4	กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากใบในแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์	27
4.5	แสดงการเกิดแคลลัสของใบ โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์	28
4.6	กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบ โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์	29
4.7	แสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากใบในแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์	32
4.8	กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากใบในแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์	33
4.9	กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยจากการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์	34
4.10	กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากตาข้าง	36
4.11	กราฟแสดงความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้าง	36
4.12	แสดงการเปรียบเทียบการเกิดยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง	40
4.13	กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง	41
4.14	กราฟแสดงการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง	42
4.15	กราฟแสดงจำวนการเกิดรากเฉลี่ย	44
4.16	กราฟแสดงความยาวรากเฉลี่ย	45
4.17	แสดงการเปรียบเทียบการเกิดราก	45
4.18	แสดงลักษณะต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์ทั้งยอด และราก	47
4.19	แสดงการปรับสภาพของต้นอ่อน	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.20 แสดงลักษณะพืชที่สามารถปลูกในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BAP	6-Benzylaminopurine
$HgCl_2$	Mercury (II) chloride
IAA	Indol-3-yl acetic acid
IBA	3-idole butyric acid
Kin	6-furfurylaminopurine (kinetin)
MS	อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and skoog, 1962
NAA	α-Napthalene acetic acid
PPM	Plant Preservative Mixture
TDZ	thidiazuron

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หนานเฉาเหว่ย หรือ หนานเฟยฉ่าว มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vernonia amygdalina* Delile หรือ *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip. ex Walp. มีแหล่งกำเนิด และเป็นพืชพื้นเมืองในแถบแอฟริกา ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีความสูง 6 ถึง 8 เมตร ลักษณะเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปรีปลายแหลม โคนป้าน หรือเกือบมน ใบอ่อน และใบแก่มีรสขมจัด ดอกมีสีขาว ออกเป็นช่อตามซอกใบ และปลายยอด ผลเป็นทรงกลม และมีเมล็ด โดยจะเริ่มออกดอกและผล ในช่วงเดือนธันวาคมถึงมีนาคม

ศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ของพืชพันธุ์ *Vernonieae* มีการกระจายอย่างกว้างขว้างทั้งในแถบตะวันตก และตะวันออก (Keeley and Turner, 1990) โดยแถบตะวันตก มีศูนย์กลางการกระจายพันธุ์อยู่ที่ประเทศบราซิล ขยายไปทางตอนใต้จนถึงประเทศอาร์เจนตินา และขยายไปทางตอนเหนือจนถึงประเทศแคนนาดา ส่วนแถบตะวันออก ก็มีการกระจายพันธุ์ที่คล้ายกัน โดยมีศูนย์กลางการกระจายพันธุ์อยู่ที่แอฟริกาตะวันออก และแพร่กระจายไปยังหมู่เกาะมาดากัสการ์ ไปจนถึงประเทศจีน (Keeley and Jansen, 1994) และเข้ามายังประเทศไทย

หนานเฉาเหว่ยเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ได้หลายส่วนไม่ว่าจะเป็นใบ เปลือกไม้ และราก ซึ่งสรรพคุณของหนานเฉาเหว่ยในตำรับยาพื้นบ้านได้กล่าวไว้ว่าส่วนต่าง ๆ ของหนานเฉาเหว่ยนั้นสามารถนำมาใช้เป็นยาได้ โดยใบมีรสขม ช่วยบำรุงร่างกาย และป้องกันตับ เปลือกไม้ แก้โรคตับพิการ แก้ปอดพิการ รักษาอาการลมเป็นพิษ รักษาโรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน มีฤทธิ์เป็นยาถ่าย ยาระบาย รักษาเหงือกอักเสบ บำรุงสุขภาพฟัน และเหงือกให้แข็งแรง แก้อาการคันตามผิวหนัง ถ่ายน้ำเหลือง แก้พิษในกระดูก ฆ่าพยาธิ แก้โรคเรื้อน คุดทะราด และรักษากามโรคได้ ส่วนราก ใช้แก้ลม แก้อาการคันตามผิวหนัง แก้พิษในกระดูก แก้โรคผิวหนัง และรักษาน้ำเหลืองเสีย และสรรพคุณของหนานเฉาเหว่ยในตำรายาจีนได้กล่าวไว้ว่า สามารถช่วยลดน้ำตาลในเลือด รักษาโรคเบาหวาน แก้อาการของโรคเกาต์ และสามารถลดความดันโลหิตสูงได้

จากข้างต้นที่กล่าวมานั้นทำให้ทราบว่าหนานเฉาเหว่ย มีสรรพคุณหลายประการทำให้หนานเฉาเหว่ยเป็นที่ต้องการอย่างมากจากทั่วโลก ดังนั้นคณะผู้จัดทำจึงเลือกพืชชนิดนี้มาใช้ในการวิจัยทดลองเพื่อเพิ่มปริมาณพืชชนิดนี้ให้ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค รวมทั้งการนำไปใช้ด้านการแพทย์ และเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นได้มากยิ่งขึ้นในภายภาคหน้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่สุดต่อชิ้นส่วนตาข้าง และใบของหนานเฉาเหว่ย

1.2.2 เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนใบของหนานเฉาเหว่ยให้เกิดเป็นแคลลัส

1.2.3 เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนตาข้างของหนานเฉาเหว่ยให้กลายเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์

1.2.4. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำราก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อการชักนำให้เกิดยอด เกิดราก กลายเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง และการชักนำให้เกิดแคลลัส จากใบของหนานเฉาเหว่ย เมื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and skoog, 1962) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์ และบันทึกผลการทดลองหลังจากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมต่อชิ้นส่วนตาข้าง และใบของหนานเฉาเหว่ย

1.4.2 ทราบระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ

1.4.3 ทราบระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอด

1.4.4 ทราบระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำราก

1.4.5 สามารถขยายพันธุ์หนานเฉาเหว่ยได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หนานเฉาเหว่ย

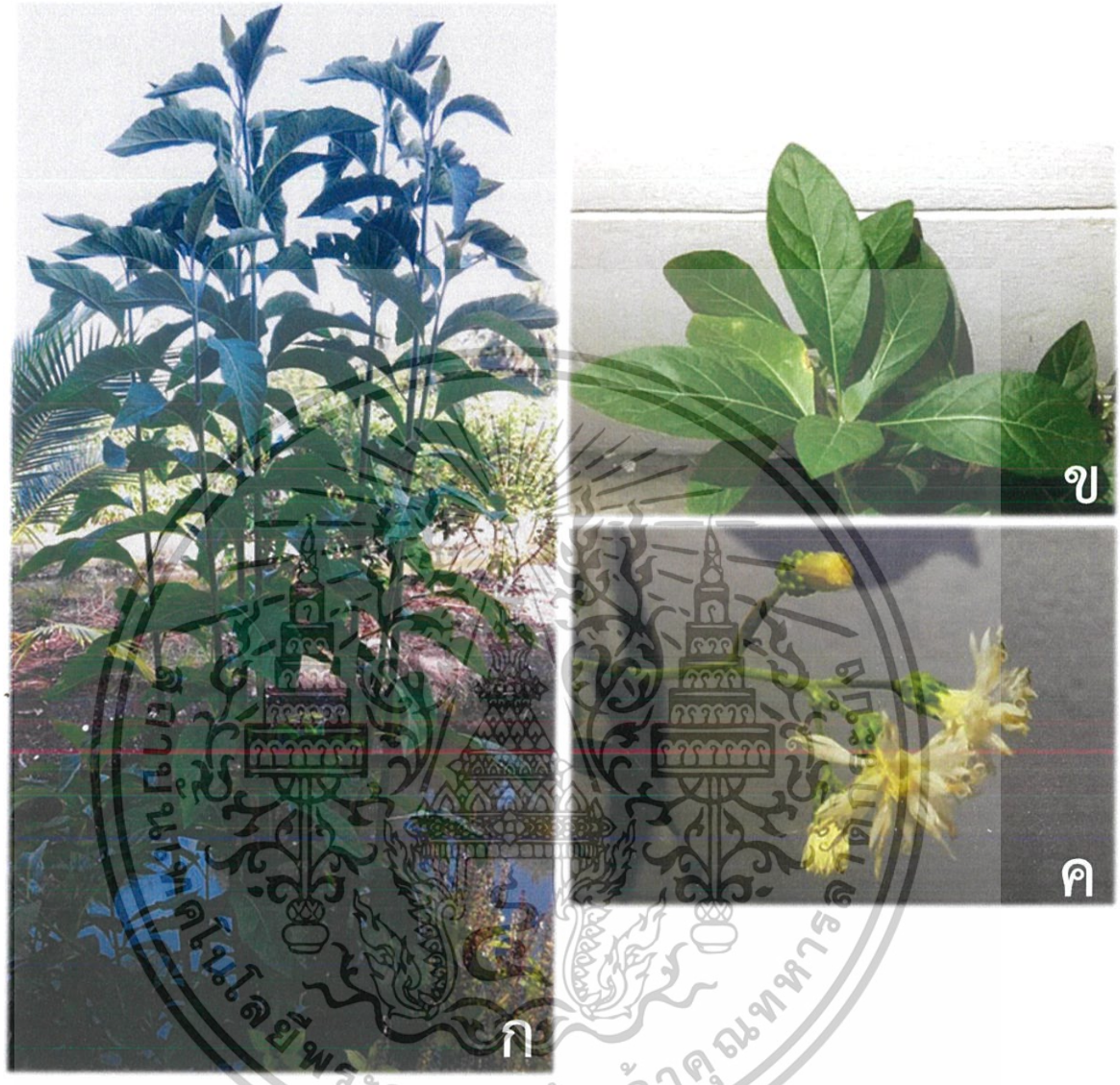
หนานเฉาเหว่ยเป็นพืชพื้นเมืองในแถบแอฟริกา จัดเป็นไม้ผลในวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) ในสกุล *Gymnanthemum, Vernonia* โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vernonia amygdalina* Delile หรือ *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip. ex Walp. (Bandana *et al*, 2013) (Jetti *et al*, 2015) โดยมีชื่อสามัญ เช่น African bitter leaf Bitterleaf tree vernonia tree ป่าช้าเหงา และป่าช้าหมอง เป็นต้น และมีชื่ออื่นเช่น ป่าเฮว่หมอง และบิสมิลลาฮ์ เป็นต้น โดยนักวิทยาศาสตร์ได้จำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ดังนี้ (ที่มา :http://th.wikipedia.org/wiki /หนานเฉาเหว่ย, https://en.wikipedia.org/wiki/ Vernonia_amygdalina)

Kingdom: Plantae
Division: Angiosperms
Class: Eudicots
Order: Asterales
Family: Asteraceae
Subfamily: Cichorioideae
Tribe: Vernonieae
Genus: *Vernonia*
Species: *V. amygdalina*

หนานเฉาเหว่ยเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีความสูง 6 ถึง 8 เมตร (รูปที่ 2.1 (ก)) ลักษณะเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปรีปลายแหลม โคนป้าน หรือเกือบมน ขนาดใบกว้างประมาณ 3 ถึง 8 เซนติเมตร และยาวประมาณ 9 ถึง 22 เซนติเมตร โดยใบอ่อน และใบแก่มีรสขมจัด (รูปที่ 2.1 (ข)) ดอกมีสีขาว เป็นช่อสั้น ๆ ตามซอกใบ และปลายยอด ดอกตัวผู้จะมีขนาดเล็กสีเขียวอ่อน หรือเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอม ออกรวมกันเป็นกระจุกเล็ก ๆ กว้างประมาณ 12 มิลลิเมตร มีกลีบรองดอก 5 กลีบ ไม่มีกลีบดอก มีเกสรอยู่มาก ดอกตัวเมียมีลักษณะคล้ายกันกับดอกตัวผู้ แต่จะมีรังไข่ที่เหนือวงกลีบ และมีขนดอกหนาแน่น (รูปที่ 2.1 (ค)) ผลมีลักษณะเกือบกลม ผิวเกลี้ยง ขนาดผลประมาณ 2 เซนติเมตร และแบ่งออกเป็นพูเล็กๆ จำนวน 3 พู ผลอ่อนจะมีเนื้อสีเขียว ส่วนผลแก่จะมีเนื้อสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดมีขนาดค่อนข้างใหญ่ คือประมาณ 7 ถึง 8 มิลลิเมตร โดยหนึ่งผลจะมี 3 เมล็ด โดยอยู่ในแต่ละพูของผล มีเนื้อเยื่อขาวๆ หุ้มอยู่ และจะมีการติดผลในเดือนธันวาคมถึงมีนาคม



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นหนานเฉาเหว่ย
โดย ลำต้น (ก) ใบ (ข) ดอก (ค)
(ที่มา : (ก) https://www.nanagarden.com/product/230052 (ข) (ค) คณะผู้จัดทำ)

2.2 ประโยชน์ของหนานเฉาเหว่ย (ศรีสมพร, 2561)

การศึกษาประโยชน์ทางยาของพืชนี้เกิดจากการสังเกตพฤติกรรมของลิงชิมแปนซีที่เก็บพืชชนิดนี้กิน เมื่อมีอาการเจ็บป่วยจากพยาธิที่ก่อให้เกิดอาการท้องผูก หรือท้องเสีย ทำให้มีเรี่ยวแรง และมีความอยากอาหารเพิ่มขึ้น (Huffman *et al*, 1993) นอกจากนี้การศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อสนับสนุนประโยชน์ทางยา โดยมีงานวิจัยตีพิมพ์จำนวนมาก ซึ่งการศึกษาที่น่าสนใจ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรีย โดยให้หนูทดลองติดเชื้อ *Plasmodial berghei* แล้วรักษาด้วยสมุนไพรนี้ขนาด 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 4 วัน มีผลลดจำนวนเชื้อลงได้ถึง 82.3 เปอร์เซ็นต์ (Omoregie *et al*, 2010) ส่วนการทำการทดลองทางคลินิก (Challand *et al*, 2009) มีผลลดเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดได้เพียง 32 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้ยาในปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน

ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย มีผลการทดลองต่างกันไปตามประเภทของสารสกัด เช่น สารสกัดเมทานอลมีผลยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ (Akinpelu, 1999) เช่น *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Klebsella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Shigella dysentaria* และ *Escherichia coli* เพื่อยืนยันการใช้เป็นสมุนไพรทำความสะอาดช่องปากโดยการเคี้ยว ได้มีการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแอนแอโรบิคในช่องปากได้แก่ *Bacteroides gingivalis, B. asacharolyticus, B. melaninogenicus* และ *B. oralis* ของการสกัดเย็นด้วยน้ำจากเปลือก และลำต้นพบว่าได้ผลดี (Rotimi and Mosadomi, 1987)

ฤทธิ์ในการถ่ายพยาธิ สารสกัดเมทานอลของพืชนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งต่อ *Trichomonas vaginalis* (Hakizamungu *et al*, 1992) *Leishmania aethiopica* (Tadesse *et al*, 1993) สารสกัดเอทานอลออกฤทธิ์ยับยั้งต่อ *Stronggyoides papiliosus* (Musongong *et al*, 2004) สารสกัดน้ำมีผลลดจำนวนไข่ของพยาธิไส้เดือน (*Toxocara canis*) และพยาธิปากขอ (*Ancylosma caninum*) (Adedapo *et al*, 2007) ฤทธิ์ถ่ายพยาธิมาจากสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ Vernodalin and Vernonioside b1 สารสกัดจากใบ ลำต้น ราก และเปลือกรากมีผลต่อ *Hymenolepis diminuta* ภายใน 24 ชั่วโมงสารสกัดเมทานอลในขนาด 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลฆ่าพยาธิไส้เดือน 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 12 ชั่วโมง (Molgaard *et al*, 2001)

ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความเป็นพิษต่อเซลล์ พบฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งต่างๆ เช่น MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) ของสารสกัดน้ำ (Izevbigie *et al*, 2004) สารสกัดปิโตรเลียมอีเธอร์ และเอทธิลอะซีเตทมีผลต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (ECV-304) สารสกัดคลอโรฟอร์ม และสารสกัดเมทานอลมีผลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (THP-1)

ฤทธิ์ยับยั้งการจับตัวของลิ่มเลือด สารสกัดเมทานอลความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลยับยั้งการจับตัวเป็นลิ่มเลือดในหนูทดลองได้ 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่าการออกฤทธิ์นั้นเกิดจากผลการยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือด (Awe *et al*, 1998)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ สารสกัดน้ำจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบเมื่อหนูทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของอุ้งเท้าด้วยสารคาราจีแนน (Iroanya *et al*, 2010) สารสกัดเอทานอลในขนาด 25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการทำงานของพอลิมอร์ไฟนิวเคลียร์ และโมโนนิวเคลียร์เซลล์โดยไม่ทำให้เซลล์ตาย (Koko *et al*, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น (Huffman *et al*, 1993) สารสกัดในชั้นเอทานอลในความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีผลต้านออกซิเดชั่นเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH การสกัดด้วยเอทานอลจะให้ผลดีกว่าการสกัดด้วยน้ำเย็น และน้ำร้อน ตามลำดับ และสารสกัดเมทานอลให้ผลดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และอะซีโตนตามลำดับ (Erasto *et al*, 2007)

ฤทธิ์ในการปกป้องตับ การให้สัตว์ทดลองกินสารสกัดน้ำพบว่ามีผลลดเอนไซม์แอสพาเตท-อะมิโนทรานสเฟอเรส (AST) อะลานีนทรานสมิเนส (ALT) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และเอนไซม์อื่นๆ ที่เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของตับ (Arhoghro *et al*, 2009) การให้สารสกัดเมทานอลกับหนูก็มีผลในการลดเอนไซม์ดังกล่าว และช่วยทำให้ตับไม่ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระโดยดูจากค่าโปรตีน และกลูต้าไธโอนของหนูที่ได้รับรังสีแกมมามีระดับเพิ่มขึ้น (Adaramoye *et al*, 2008)

ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Ong *et al*, 2011) มีรายงานฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานสารสกัดเอทานอลขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ทางปากเป็นเวลา 28 วันมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดลงได้ถึง 32.1 เปอร์เซ็นต์ กลไกการยับยั้งเบาหวานเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์ hepatic G6Pase ทำให้เกิดการแสดงออก และการเปลี่ยนที่ของ GLUT4 ในกล้ามเนื้อลาย และการเพิ่มระดับของอินซูลินในตับ และในพลาสจากผลต่อการปกป้องเซลล์เบต้าในตับอ่อน คาดว่าสารกลุ่ม polyphenol ที่มีปริมาณมากในสารสกัดเอทานอลเป็นตัวออกฤทธิ์

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ เรณู อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอก เป็นต้น โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆที่พืชต้องการเช่น น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้สภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้นได้ เป็นต้น โดยชิ้นส่วนต่างๆของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้จะสามารถเติบโต และพัฒนาได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะพัฒนาเป็นส่วนอวัยวะ เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส หรือ คัพภะ (ต้นอ่อนขนาดเล็ก) ที่เรียกว่า เอ็มบริโอ สุดท้ายชิ้นส่วนต่างๆ เหล่านี้จะเจริญเป็นต้นใหม่ที่มีรากที่สมบูรณ์สำหรับการนำไปปลูกลงดินต่อไปได้ รวมทั้งพืชที่เกิดขึ้นมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเหมือนกับพืชต้นพันธุ์ที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงทุกประการ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช และการเก็บรักษาและอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชต่างๆ

ทรงศักดิ์ (2546) ศึกษาการเกิดยอดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบของผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ Asteraceae โดยนำเมล็ดผักกาดหอมพันธุ์ใบหยักมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween 20 1 ถึง 2 หยด เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะบนอาหารสูตร MS เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 28 ไมโครโมล่อตารางเมตรต่อวินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หลังจากครบ 15 วัน จึงนำส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบมาตัด แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ เลี้ยงในสภาพเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น เป็นเวลา 45 วัน พบว่าถ้าทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย Kin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อได้มากที่สุด และพบว่าถ้าใช้อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย Kin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบได้มากที่สุด

Khalafalla. *et al.* (2007) ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนตาข้างของหนานเฉาเหว่ย (*Vernonia Amygdalina* Delile) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ Asteraceae โดยนำชิ้นส่วนตาข้างมาตัดให้เป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.5 ถึง 1 เซนติเมตร แล้วนำไปแช่น้ำที่ไหลผ่านตลอด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 วินาที แล้วนำไปแช่ในสารละลาย NaClO ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่างออกซินความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับไซโตไคนินความเข้มข้น 0.5 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากครบ 4 สัปดาห์ นำมาบันทึกผลการทดลอง โดยผลจากชิ้นส่วนตาข้างที่ได้พบว่าอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำยอดคืออาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด 7.3 ± 0.88 ยอด และนำยอดที่ได้ไปชักนำรากต่อบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่างออกซินความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากครบ 4 สัปดาห์ นำมาบันทึกผลการทดลอง โดยอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการชักนำรากคืออาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนราก 10.5 ± 3.87 ราก หรือคิดเป็น 95.8 เปอร์เซ็นต์

จากข้างต้น อาจให้คำจำกัดความได้ว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดพืช และสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง โดยอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะต้องมีองค์ประกอบที่ใกล้เคียงกับที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ เพื่อให้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชได้ ซึ่งสูตรอาหารต่างๆ ที่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วสามารถจำแนกองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ (ดัดแปลงมาจาก อนุรักษ์, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1. ธาตุอาหารพวกสารอนินทรีย์ (inorganic salts)

ธาตุอาหารหลัก (macro elements) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก และขาดไม่ได้ เช่น คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) เป็นต้น โดยทั่วไปพืชอาจต้องการในปริมาณที่มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ธาตุอาหารรอง (microelements) เป็นธาตุอาหารนี้พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) เป็นต้น โดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณที่น้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.2. ธาตุอาหารพวกสารอินทรีย์ (organic salts)

เช่น คาร์โบไฮเดรต (แหล่งคาร์บอน) วิตามิน กรดอะมิโน สารอินทรีย์อื่นๆ วุ้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หมายรวมถึงฮอร์โมนพืชด้วย ได้แก่

-ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ การรวมกันเป็นกลุ่มของแคลลัส รวมทั้งกระตุ้นการเกิดราก และการพัฒนาเป็นรากแขนงที่สมบูรณ์ ซึ่งออกซินเป็นฮอร์โมนที่มีทั้งแบบพืชสังเคราะห์ขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น กรดอินโดลอะซิติก (IAA) และแบบมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น เช่น กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-D) หรือ กรดอินโดล-3-บิวทีริก (IBA)

-ไซโตไคนิน (cytokinin) ช่วยชักนำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว กระตุ้นการเจริญของตาข้าง รวมทั้งชะลอการแก่ของพืช และกระตุ้นการเจริญทางด้านข้างของพืช โดยทั่วไปนิยมใช้สารกลุ่มนี้ เช่น ซีเอทิน (Zea) 6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน (Kinetin) และ 6-เบนซิลริลอะมิโนเพียวรีน (BAP)

-จิบเบอร์เรลลิน (gibberellin) สารกลุ่มนี้นำมาใช้น้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ รวมทั้งขยายขนาดเซลล์ และชักนำให้เมล็ดงอก โดยทั่วไปนิยมใช้สารกลุ่มนี้ คือ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid หรือ GA_3)

2.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.4.1 เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว

2.4.2 เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค

2.4.3 เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

2.4.4 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน

2.4.5 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน

2.4.6 เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช

2.4.7 เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืชมิให้สูญพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุคนธ์ทิพย์ และคณะ (2547) พรรณไม้กลุ่ม Vernonieae ในประเทศไทยเป็นพืชอีกลุ่มหนึ่งที่การศึกษาทบทวนยังไม่เสร็จบูรณ์จึงยังไม่มีรูปวิธานของพืชเผ่านี้ในประเทศไทยทำให้ยากต่อการนำพืชมาตรวจสอบเพื่อหาชื่อวิทยาศาสตร์ ซึ่งข้อมูลเดิมที่มีอยู่นั่นมีเฉพาะรายชื่อพรรณไม้และคำบรรยายลักษณะเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากการเก็บตัวอย่างภาคสนาม และการตรวจสอบตัวอย่างพรรณไม้ และพรรณไม้ต้นแบบ (type specimens) จากพิพิธภัณฑ์พืชทั้ง 8 แห่ง สามารถระบุชนิดพืชกลุ่ม Vernonieae ในประเทศไทยได้จำนวน 32 ชนิด 40 แทกซา ดังนี้ สกุล *Camchaya* Gagnep. มี 5 ชนิด 7แทกซา ได้แก่ *C. kampotensis* Gagnep., *C. loloana* Kerr, *C. loloana* var. *mukdahanensis* H.*Koyama* เป็นต้น สกุล *Elephantopus* L. มี 3 ชนิด 5 แทกซาได้แก่ *E. scaber* L., *E. scaber* var. *sinuata* Miq., *E. scaber* var *penicillatus* Gagnep. เป็นต้น สกุล *Ethulia* L.f. มี 1 ชนิด คือ *E. conyzoides* L. สกุล *Iodocephalus* Thorel et Gagnep. มี 2 ชนิด ได้แก่ *I. eberhardtii* Gagnep. และ *I. gracilis* Thorel et Gagnep. สกุล *Struchium* P.Br. มี 1 ชนิด คือ *S. sparganophorum* (L.) Kuntze และ สกุล *Vermonia* Schreb. มี 20 ชนิด 24 แทกซา ได้แก่ *V. arborea* Ham., *V. arborca* var. *javanica* (Blume) C.B.Clarke เป็นต้น

Khalafalla. *et al.* (2009) ศึกษาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเร่งการเจริญของรากให้เติบโตอย่างรวดเร็วของ *Vernonia amygdalina* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของแอฟริกา โดยใช้ตาข้างของลำต้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และใช้อาหารสูตร MS แบบครึ่งสูตร ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ของ IAA IBA และ NAA ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.25 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าผลการชักนำรากที่ยาวที่สุด มีความยาว 2.7 ± 1.1 เซนติเมตร และจำนวนสูงสุดของรากต่อชิ้นส่วนคือ 38.3 ± 1.1 ราก ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ รากที่สมบูรณ์ และแข็งแรงดีถูกแยกออกจากกัน โดยรากสดนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 100 มิลลิกรัม ในอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไปเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที พบว่ามวลชีวภาพของการเลี้ยงรากเพิ่มขึ้นเป็น 2.1949 กรัม หลังจากผ่านไป 5 สัปดาห์

Bhattacharjee. *et al.* (2013) *Vernonia amygdalina* Delile (Asteraceae) เป็นพืชสมุนไพรแอฟริกา นิยมเพาะปลูกในสถานที่ต่าง ๆ ของภาคกลาง และตะวันออกของอินเดีย รวมทั้งนิยมนำมาศึกษาคุณสมบัติในด้านอาหารเสริมสุขภาพ และพืชสมุนไพร โดยมีสกุลคือ *Vernonia* Schreb. (Asteraceae) โดยมีการค้นพบกว่า 1,000 สายพันธุ์ และมีการขยายพันธุ์ไปในเอเชีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขตร้อนของทวีปแอฟริกา อเมริกาเหนือ และใต้ ในอินเดียพบ 56 ชนิดและ 15 สายพันธุ์ (Karthikeyan *et al*, 2009) ซึ่งโรบินสัน (1999, 2007) ได้เสนอการแยกประเภทสกุลในสกุลที่เล็กกว่าหลายชนิด [เช่น *Acilepis* D. Don, *Baccharoides* Moench, *Cyanthillium* Blume, *Decaneuropsis* H. Rob. & Skvarla, *Distephanus* Cass., *Gymnanthemum* Cass., *Khasianthus* H. Rob. & Skvarla, *Monosis* DC., *Strobocalyx* (Blume ex DC.) Spach, *Tarlmounia* H. Rob.] ส่วนใหญ่ค่อนข้างยากที่จะกำหนดขอบเขต ดังนั้นเราจึงใช้ตาม Chen & Gilbert (2011) โดยให้ *Gymnanthemum* เป็นชื่อพ้องของ *Vernonia*

ทิพย์สุคนธ์ และคณะ (2558) ศึกษาการขยายพันธุ์หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ Asteraceae โดยศึกษาการเกิดยอดจากตาข้าง ซึ่งนำเมล็ดหญ้าหวานมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้สารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween-20 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งแล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ทำการตัดชิ้นส่วนตาข้างของหญ้าหวาน ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ยอดอ่อนจำนวนมาก จากนั้นทำการแยกยอดอ่อนของหญ้าหวาน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พอครบ 4 สัปดาห์ นำส่วนข้อของหญ้าหวานไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พอครบ 4 สัปดาห์ ทำการย้ายชิ้นส่วนยอดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำรากคือ อาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช จะทำให้ได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์พร้อมที่จะย้ายออกปลูกได้ต่อไป สำหรับแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถนำไปใช้ในการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดยอดมากขึ้น

Hariprasath *et al.* (2015) วัตถุประสงค์ของการศึกษาดัสตี้มิลเลอร์ (*Senecio candicans* DC.) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ Asteraceae คือการออกแบบขั้นตอนการทดลองที่ได้มาตรฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองของ *S. candicans* จากชิ้นส่วนใบ และเปรียบเทียบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแคลลัส โดยนำใบอ่อนที่มีสุขภาพดี และปราศจากโรคมาล้างให้สะอาดโดยใช้น้ำประปาล้างเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแช่สาร NaClO 1 เปอร์เซ็นต์ และปรอทคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยนำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มาเขย่าเป็นเวลา 15 ถึง 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วจึงใส่ปรอทคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มาเขย่าเป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที สุดท้ายล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง (5 นาทีต่อครั้ง) แล้วตากให้แห้งในตู้ lamina air flow และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่างออกซินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโตไคนินตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์ของการเหนี่ยวนำแคลลัส (PCI) และน้ำหนักสดจะบันทึกหลังจาก 28 วันของการเพาะเลี้ยง และน้ำหนักสดจะบันทึกอีกครั้งหลังจาก 4 สัปดาห์ของการเปลี่ยนอาหารเพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตของน้ำหนักสด (RFWG) PCI ที่สูงที่สุดคือ 87 เปอร์เซ็นต์ และ RFWG ที่ 3.245 ที่เกิดจากอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้หลังจากเพาะเลี้ยง 28 วัน บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน โดยความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 4.28 ± 0.27 เซนติเมตร และเปอร์เซ็นต์การเหนี่ยวนำสูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์ ได้จากอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเหนี่ยวนำรากสูงสุดอยู่ที่ 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เกิดจากยอดได้จากอาหารสูตร MS แบบครึ่งสูตร ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระในใบมีค่าสูงเมื่อเทียบกับแคลลัส ในหลอดทดลอง

หนูเดือน และฐิติพร (2560) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ Asteraceae เพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ ซึ่งฟอกฆ่าเชื้อนั้นจะนำดอกระยะ R5.1 มาตัดกลีบดอกรอบนอกสุดให้เหลือเฉพาะฐานดอก และดอกย่อยที่ยังไม่บาน และบานแต่อับเรณูยังไม่แตกไปล้างด้วยการเปิดน้ำไหลผ่านเบาๆนาน ประมาณ 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำที่ผสมน้ำยาล้างจาน (1 ช้อนชาต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ถึง 3 รอบนาน 1 นาทีต่อรอบ นำตัวอย่างไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นผึ่งให้แอลกอฮอล์ระเหยให้หมดแล้วฟอกในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 ถึง 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งในตู้ lamina air flow สุดท้ายผึ่งให้ดอกแห้ง ก่อนนำไปแยกเอาอับเรณูไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ พบว่าไมโครสปอร์ที่ได้จากวงดอกย่อยที่ 2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับทานตะวันแต่ละสายพันธุ์ด้วย

Mei-Yin and Sani (2017) ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง และการชักนำแคลลัสของหน่านเฉาเหว่ย (*Vernonia Amygdalina* Delile) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ Asteraceae

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยนำชิ้นส่วนตาข้างมาตัดแต่งให้เป็นท่อน ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาทีจากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย Clorox ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่างออกซินความเข้มข้น 0.5 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับไซโตไคนินความเข้มข้น 0.5 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือออกซิน หรือไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 32.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นชักนำยอด 4 สัปดาห์ และชักนำราก 4 สัปดาห์ ดังนั้นหลังจากครบ 8 สัปดาห์ นำมาบันทึกผลการทดลอง โดยผลจากชิ้นส่วนตาข้างที่ได้ พบว่าอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำยอดคืออาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด 2.73 ± 0.47 ยอด อาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนใบคืออาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนใบ 10.20 ± 1.18 ใบ อาหารที่ดีที่สุดสำหรับการเพิ่มความยาวยอดคือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอด 6.55 ± 0.44 เซนติเมตร และอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการชักนำรากคือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนราก 20.93 ± 1.93 ราก ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบนั้นไม่มี เนื่องจากนำเอาใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อมาใช้ โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่างออกซินความเข้มข้น 0.5 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับไซโตไคนินความเข้มข้น 0.5 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือออกซิน หรือไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 8 สัปดาห์ หลังจากครบ 8 สัปดาห์ นำมาบันทึกผลการทดลอง โดยผลจากชิ้นส่วนใบที่ได้พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D นั้นจะเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (100 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP กับ NAA จะเกิดแคลลัสดีที่สุดเพียง 72 เปอร์เซ็นต์

Amin *et al.* (2018) ได้ทำการศึกษา *Inula royleana* (*Inula racemosa*) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ Asteraceae โดยเป็นพืชสมุนไพรยืนต้นทางทิศตะวันตกของเทือกเขาหิมาลัย สำหรับการเพาะเลี้ยง เริ่มต้นโดย ล้างชิ้นส่วนพืชให้สะอาดด้วยน้ำประปาเพื่อขจัดสิ่งสกปรกและฝุ่น จากนั้นฆ่าเชื้อโดยใช้ผงซักฟอก Labolene (Proxor Group) และ surfingant Tween-20 นาน 30 ถึง 45 นาที และล้างออก 3 ถึง 4 ครั้งกับน้ำกลั่น หลังจากการฆ่าเชื้อผิวแล้วมาฆ่าเชื้อใน Laminar Air Flow Hood โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 นาที แล้วนำมาตัดแต่งตามด้วยล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อขจัดคราบไฮโปคลอไรท์ก่อนการลงบนอาหาร หลังจากทำการกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษแล้ว ใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อนำมาลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ Agar 0.8 เปอร์เซ็นต์ และประกอบด้วยความเข้มข้น BAP และ IAA ที่ต่างกัน อาหารมีการปรับค่า pH เป็น 5.8 ± 0.1 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บไว้ภายใต้ช่วงเวลา 16 ชั่วโมงที่มีความเข้มแสง 25 ถึง 30 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ขาวเย็น 40 วัตต์ อาหารถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 22 ± 4 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ (RH) 50 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบ มีการใช้ฮอร์โมนพืชที่แตกต่างจากชิ้นส่วนราก โดยความเข้มข้นสัมพัทธ์ของ BAP ต่อ IAA มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก ให้ผลที่ดีที่สุด เมื่อใช้อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่เกิดขึ้นใหม่นำไปอยู่บนอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงรากของ White และประสบความสำเร็จในการย้าย ร่วมทั้งสามารถปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อมปกติด้วยอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชและแหล่งที่มาของตัวอย่าง

- ต้นหนานเฉาเหว่ย ได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม โดยได้รับการยืนยันลักษณะต้นจากภาควิชาพฤกษสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศน์ จังหวัดปราจีนบุรี

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- น้ำยาล้างจาน (detergent)
- เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95
- เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)
- สารลดแรงตึงผิว (tween-20)
- Plant Preservative Mixture (PPM) ; Plant Cell Technology
- Nystatin Suspension ; Sigma Life Science
- Antibiotic Antimycotic Solution (100x) ; Sigma Life Science
- Cefotaxime ; Nida Pharma Incorporation Co., Ltd.
- น้ำกลั่น (distilled water)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- อาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and skoog, 1962) ; Phyto Technology Laboratories
- น้ำตาลทรายซูโครส
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
- สารละลายกรดไฮดรอกคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 และ 1 นอร์มอล
- ผงวุ้นเจลแลน กัม (Gellan gum) ; Phyto Technology Laboratories
- น้ำกลั่น (Distilled water)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- กรรไกรตัดกิ่งไม้ (secateurs)
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- กระบอกตวง (cylinder)
- เครื่องเขย่าสาร (shaker)
- ปากคีบ (forceps)
- ไมโครปิเปต (micropipettes)
- ทิปขนาดต่างๆ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
- ไฟแช็ค (lighter)
- แล็คสำหรับวางอุปกรณ์ (racks)
- กระบอกฉีดน้ำ (foggy spray)
- จานแก้ว (petri dish)
- มีดผ่าตัด (knife)
- กรรไกร (scissors)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- พาราฟิล์ม (parafilm)
- ชั้นวางเนื้อเยื่อพร้อมระบบให้แสงสว่าง (shelves)
- เครื่องปรับอากาศ (air conditioner)
- ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องชั่งสาร (analytical balance)
- ช้อนตักสาร (spatula)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- ไมโครเวฟ (microwave oven)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)
- ถุงมือกันความร้อน (heat resistant gloves)
- เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (water distriller)
- กระดาษทิชชู่ (tissue paper)
- กล้องถ่ายรูป (camera)

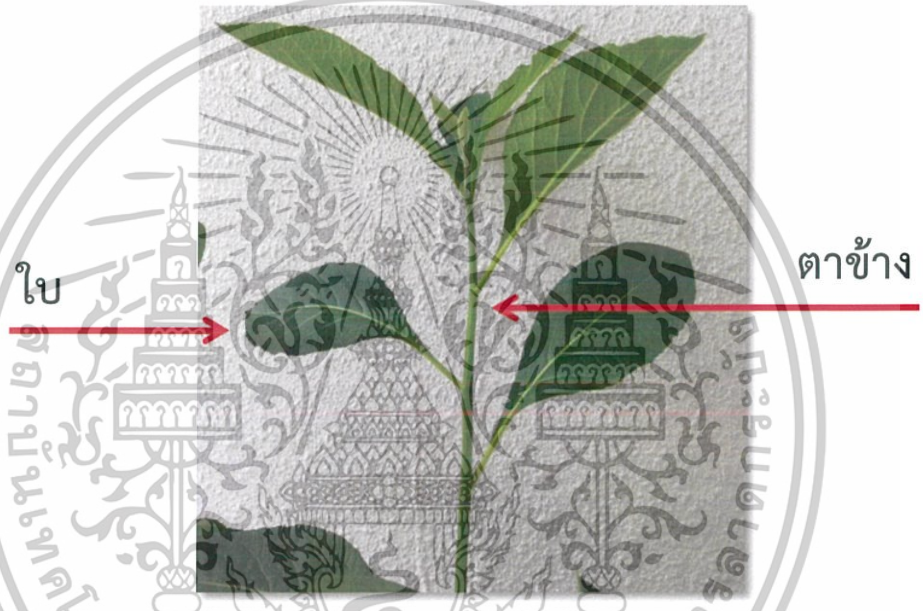
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องวัดเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier calipers)

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือส่วนตาข้าง และใบของต้นหนานเฉาเหว่ยที่ปลูกในธรรมชาติ โดยทำการเก็บ และคัดเลือกชิ้นส่วนตาข้าง และใบของต้นหนานเฉาเหว่ย ที่มีสภาพสมบูรณ์ที่สุด ไม่ติดโรค ไม่มีรอยแผล และควรเป็นชิ้นส่วนที่เพิ่งแตกใหม่ จากนั้นนำเอาชิ้นส่วนที่เก็บ และคัดเลือกแล้วมาตัดแต่งให้เป็นชิ้นส่วนที่เล็กลง โดยมีการแบ่งตำแหน่งของตาข้าง และใบของหนานเฉาเหว่ยที่นำมาใช้ในงานวิจัย (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งตาข้าง และใบของต้นหนานเฉาเหว่ย

(ที่มา : คณะผู้จัดทำ)

3.3.2 การฟอกฆ่าเชื้อตาข้าง ใบของต้นหนานเฉาเหว่ย (ดัดแปลงมาจากห้องพืช)

3.3.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อตาข้างของต้นหนานเฉาเหว่ย

- เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์

นำส่วนตาข้างของต้นหนานเฉาเหว่ยที่เตรียมไว้ไปล้างด้วยน้ำสะอาด และน้ำยาล้างจาน จนกระทั่งตาข้างนั้นสะอาด ไม่มีเมือก หรือเศษต่างๆติดอยู่ จากนั้นทำการตัดแต่งตาข้างให้เป็นท่อนเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 ถึง 4 เซนติเมตร นำมาเขย่าแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 15 วินาที แล้วนำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ $HgCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับ tween-20 จำนวน 3 หยด PPM และ cefotaxime ปริมาตรสารละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

80 ไมโครลิตร และ Nystatin ปริมาตร 160 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ PPM และ cefotaxime ปริมาตรสารละ 80 ไมโครลิตร และ Nystatin ปริมาตร 160 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออก ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปวางผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทั้งนี้ในการย้ายขวดน้ำฟอกฆ่าเชื้อ และผึ่งแห้งของตาข้าง ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ

- เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0. 2 เปอร์เซ็นต์

นำส่วนตาข้างของต้นหนานเฉาเหว่ยที่เตรียมไว้ไปล้างด้วยน้ำสะอาด และน้ำยาล้างจาน จนกระทั่งตาข้างนั้นสะอาด ไม่มีเมือก หรือเศษต่างๆติดอยู่ จากนั้นทำการตัดแต่งตาข้างให้เป็นท่อนเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 ถึง 4 เซนติเมตร นำมาเขย่าแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 15 วินาที แล้วนำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ $HgCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ร่วมกับ tween-20 จำนวน 3 หยด PPM และ cefotaxime ปริมาตรสารละ 80 ไมโครลิตร และ Nystatin ปริมาตร 160 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ PPM และ cefotaxime ปริมาตรสารละ 80 ไมโครลิตร และ Nystatin ปริมาตร 160 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเรื่องเขย่าสาร ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออก ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปวางผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทั้งนี้ในการย้ายขวดน้ำฟอกฆ่าเชื้อ และผึ่งแห้งของตาข้าง ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ

3.3.2.2 **การฟอกฆ่าเชื้อใบของต้นหนานเฉาเหว่ย**

- เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์

นำส่วนใบของต้นหนานเฉาเหว่ยที่เตรียมไว้ไปล้างด้วยน้ำสะอาด และน้ำยาล้างจาน จนกระทั่งใบนั้นสะอาด หรือไม่มีเศษต่างๆติดอยู่ จากนั้นทำการตัดแต่งใบให้เป็นขนาดประมาณ 1 คูณ 1 เซนติเมตร นำมาเขย่าแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 15 วินาทีแล้วนำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ $HgCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 tween-20 จำนวน 3 หยด PPM และ cefotaxime ปริมาตรสารละ 80 ไมโครลิตร และ Nystatin ปริมาตรสารละ 160 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ PPM และ cefotaxime ปริมาตรสารละ 80 ไมโครลิตร และ Nystatin ปริมาตรสารละ 160 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออก ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปวางผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทั้งนี้ในการย้ายขวดน้ำฟอกฆ่าเชื้อ และผึ่งแห้งของใบต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ

- เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0. 2 เปอร์เซ็นต์

นำส่วนใบของต้นหนานเฉาเหว่ยที่เตรียมไว้ไปล้างด้วยน้ำสะอาด แช่น้ำสะอาดไว้ประมาณ 10 นาทีเพื่อให้เศษเล็กๆที่ติดอยู่หลุดออก จนกระทั่งใบนั้นสะอาด จากนั้นทำการตัดแต่งใบให้เป็นขนาดประมาณ 1 คูณ 1 เซนติเมตร แล้วนำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ $HgCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 tween-20 จำนวน 3 หยด Nystatin และ cefotaxime ปริมาตรสารละ 80 ไมโครลิตร และ antibiotic ปริมาตรสารละ 160 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปฟอกฆ่าเชื้อ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ Nystatin และ cefotaxime ปริมาตรสารละ 80 ไมโครลิตร และ antibiotic ปริมาตรสารละ 160 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออก ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 และ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปวางผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทั้งนี้ในการย้ายขวดน้ำฟอกฆ่าเชื้อ และผึ่งแห้งของใบ ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ

3.3.3 การชักนำแคลลัสจากใบ

จากการฟอกฆ่าเชื้อใบตามข้อที่ 3.3.2.2 แล้วนำเอาตัวอย่างที่ได้วางลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้นเจลแลน กัม 2.6 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการปรับความเป็นกรดด่าง ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 5.6 ถึง 5.8 โดยทำการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 5 ขวด เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมง และสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการเก็บผลทุกๆสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แล้วทำการบันทึกผลการทดลองด้วยการวัดขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การชักนำต้นใหม่ของของต้นหนานเฉาเหว่ย

3.3.4.1 การชักนำต้นใหม่จากตาข้าง

จากการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างตามข้อที่ 3.3.2.1 แล้วนำเอาตัวอย่างที่ได้วางลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้นเจลแลน กัม 2.6 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการปรับความเป็นกรดด่าง ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 5.6 ถึง 5.8 ทำการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 5 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมง และสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการเก็บผลทุกๆสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยบันทึกผลการทดลองด้วยการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น และวัดความยาวของยอดที่ได้

3.3.4.2 การชักนำราก

จากยอดที่เกิดขึ้นในข้อที่ 3.3.4.1 ทำการตัดส่วนยอดที่เกิดขึ้น แล้วนำมาตัดแต่งให้มีขนาดประมาณ 2 ถึง 3 เซนติเมตร แล้วนำเอายอดที่ได้วางลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้นเจลแลน กัม 2.6 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ IBA ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการปรับความเป็นกรดด่าง ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 5.6 ถึง 5.8 ทำการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 5 ขวด รวมทั้งทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมง และสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการเก็บผลทุกๆสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยบันทึกผลการทดลองด้วยการนับจำนวนรากที่เกิดขึ้น และวัดความยาวรากที่ได้

3.3.5 วิธีการนำต้นอ่อนออกปลูก

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนได้เป็นต้นอ่อนที่มียอด และรากที่สมบูรณ์จนสามารถนำออกปลูกได้ มีวิธีการโดยทำการเปิดฝาขวด 1 คืน เพื่อปรับสภาพก่อนเอาออกจากอาหารเพาะเลี้ยง แล้วนำเอาต้นอ่อนไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ไม่มีวุ้นอาหารติดอยู่ ตามด้วยนำไปแช่คาร์เบนดาซิมต่อน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และย้ายต้นอ่อนลงกระถาง ที่มีดินผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ร่วมกับ ดินภูเขาไฟ และเพอร์ไรท์ (อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1) คลุมต้นอ่อนด้วยถุงพลาสติกโปร่งใสเจาะรูให้ทั่วถุงพลาสติก และเลี้ยงในห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาลรด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ทำการเปิดถุงคลุมพลาสติกวันละประมาณ 30 นาที จนพืชสามารถตั้งตัวได้ จึงนำถุงคลุมพลาสติกออก และเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 วิธีการบันทึกผลและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.3.6.1 การสังเกตลักษณะภายนอกของการเกิดแคลลัส การเกิดเป็นต้นใหม่ และการเกิดราก ทำการบันทึกผลการทดลองโดยการสังเกตลักษณะแคลลัส ลักษณะของยอด และรากที่เกิดขึ้นรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสี ขนาด และความยาวที่เกิดขึ้น ในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน

3.3.6.2 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบ}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนใบที่นำมาเพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.6.3 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนตาข้าง}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนตาข้างที่นำมาเพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.6.4 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนรากที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนยอดที่นำมาเพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.6.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

การคำนวณและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการทดลองหนานเฉาเหว่ยที่ทางคณะผู้ทดลองได้ทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของใบ และชิ้นส่วนของตาข้าง ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส เกิดยอด และนำยอดที่ได้มาศึกษาการเจริญของราก โดยศึกษาวิธีการทดลองจากงานวิจัยที่ได้ทำมาแล้ว

4.1 ผลของการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ และตาข้างโดยใช้วิธีที่ 1 2 3 และ 4

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ และชิ้นส่วนตาข้างของหนานเฉาเหว่ยด้วยวิธีที่ 1 2 3 และ 4 หลังการฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนใบเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง และชิ้นส่วนตาข้างเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยคำนวณเป็นร้อยละของการรอดชีวิต พบว่าชิ้นส่วนใบที่ฟอกด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 พบร้อยละการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับชิ้นส่วนตาข้างมีร้อยละของการรอดชีวิต แค่การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 3 เท่านั้น (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงร้อยละการรอดชีวิตจากการฟอกชิ้นส่วนใบ และตาข้างโดยใช้วิธีที่ 1 2 3 และ 4

ชิ้นส่วนพืช	วิธีที่ 1		วิธีที่ 2		วิธีที่ 3		วิธีที่ 4	
	จำนวนชิ้นที่ลง	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนชิ้นที่ลง	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนชิ้นที่ลง	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนชิ้นที่ลง	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
ใบ	20	20 (100)	20	20 (100)	-	-	-	-
ตาข้าง	-	-	-	-	20	20 (100)	20	0 (0)

4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของหนาน-เฉาเหว่ย

4.2.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของหนาน-เฉาเหว่ย โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ การชักนำแคลลัสจากใบของหนานเฉาเหว่ย เมื่อนำใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

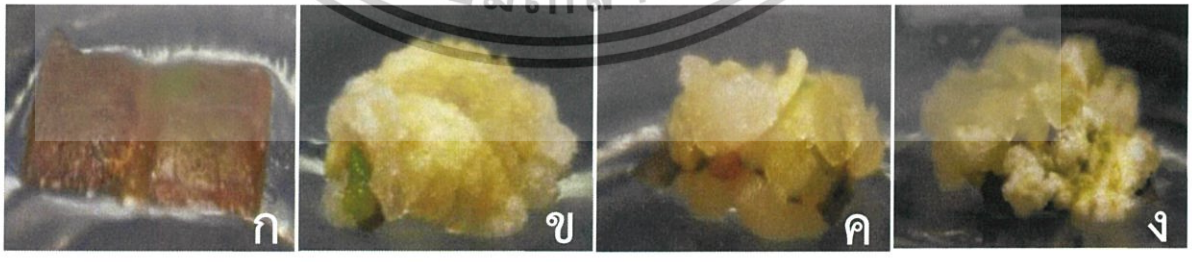
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นจากใบ และวัดขนาดแคลลัสโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ คำนวณผลเป็นจำนวนแคลลัสเฉลี่ยโดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 2395.38 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด (ตารางที่ 4.2) ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ Obute *et al*, 2016 ที่ทำการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของ 2,4-D เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ โดยที่ 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนแคลลัสมากที่สุด เพื่อให้เห็นความแตกต่าง จึงได้นำผลในตารางมาแสดงการเกิดแคลลัสดังรูป 4.1 และแสดงเป็นกราฟโดยมีกราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ย (รูปที่ 4.2) จากการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนการเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบหนานเฉาเหว่ยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

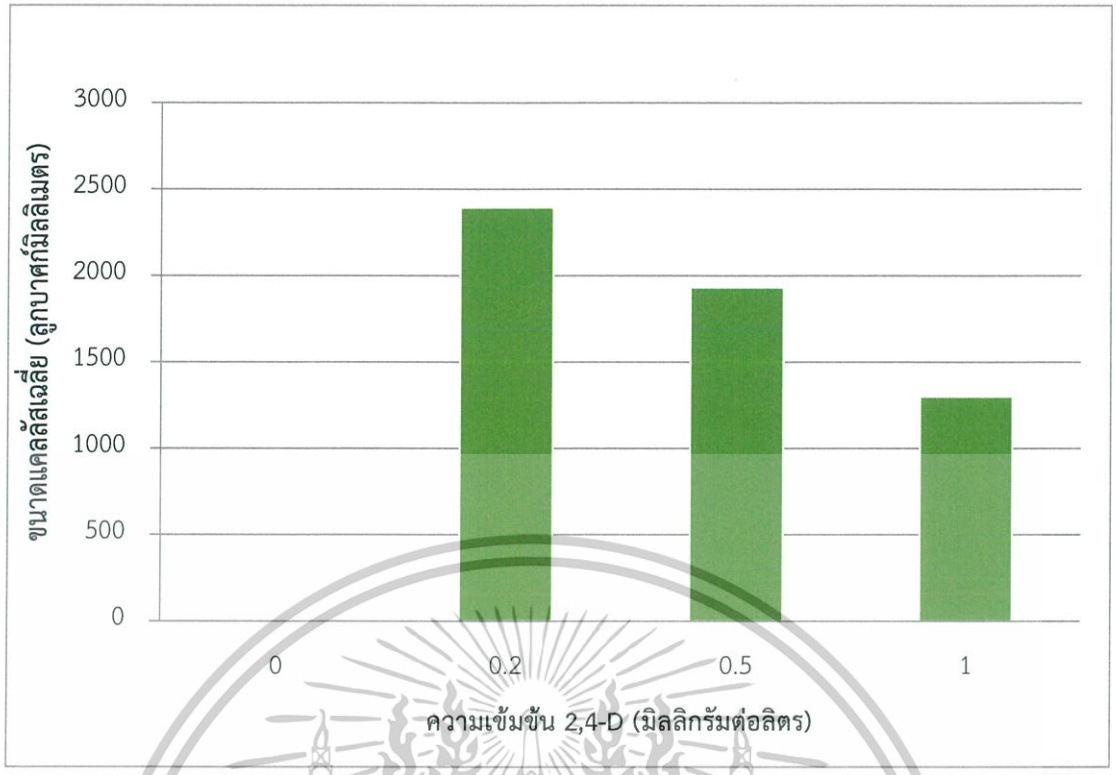
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนซ้ำทั้งหมด	จำนวนการเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0	35	0	0
0.2	35	35 (100)	2395.38[a]
0.5	35	32 (91.43)	1932.19[ab]
1	35	32 (91.43)	1301.77[b]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.1 แสดงการเกิดแคลลัสของใบหนานเฉาเหว่ย บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 (ก) 0.2 (ข) 0.5 (ค) และ 1.0 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบหนานเฉาเหว่ย โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.2.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบหนานเฉาเหว่ยแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ การชักนำแคลลัสจากใบของหนานเฉาเหว่ย เมื่อนำใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยคำนวณเป็นร้อยละจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบหนานฉาเหว่ยในแต่ละตำแหน่ง พบว่าที่ตำแหน่งที่ 2 3 5 6 และ 7 นั้นพบจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของ 2,4-D แต่สำหรับตำแหน่งที่ 1 พบจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และตำแหน่งที่ 4 พบจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น (ตารางที่ 4.3) และเก็บผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นจากใบ และวัดขนาดแคลลัสโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ คำนวณผลเป็นจำนวนแคลลัสเฉลี่ยโดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าแคลลัสตำแหน่งใบที่ 2 ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 4992.94 ลูกบาศก์

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ห้ามดัดแปลงเนื้อหา ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด (ตารางที่ 4.4) ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ Obute *et al*, 2016 ที่ทำการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของ 2,4-D เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ โดยที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนแคลลัสมากที่สุด เพื่อให้เห็นความแตกต่าง จึงได้นำผลในตารางมาแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่งดังรูป 4.3 และแสดงเป็นกราฟโดยมีกราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่ง (รูปที่ 4.4) จากการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนการเกิดแคลลัสจากใบหนานเฉาเหว่ยในแต่ละตำแหน่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

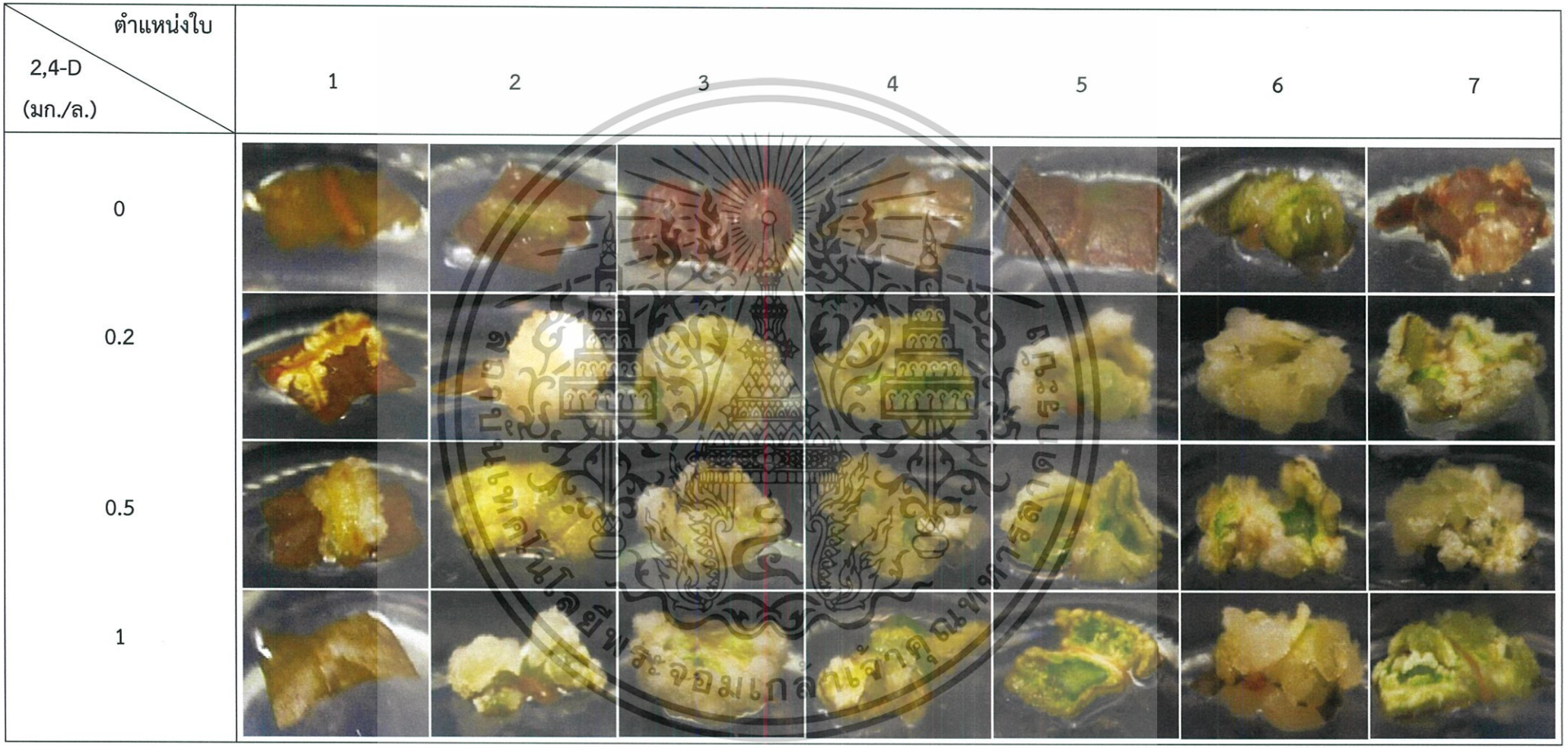
ตำแหน่งของใบบนต้น	จำนวนซ้ำทั้งหมด	จำนวนการเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)			
		ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		0	0.2	0.5	1
1	20	0 (0)	5 (100)	2 (40)	4 (80)
2	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
3	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
4	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	3 (60)
5	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
6	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
7	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

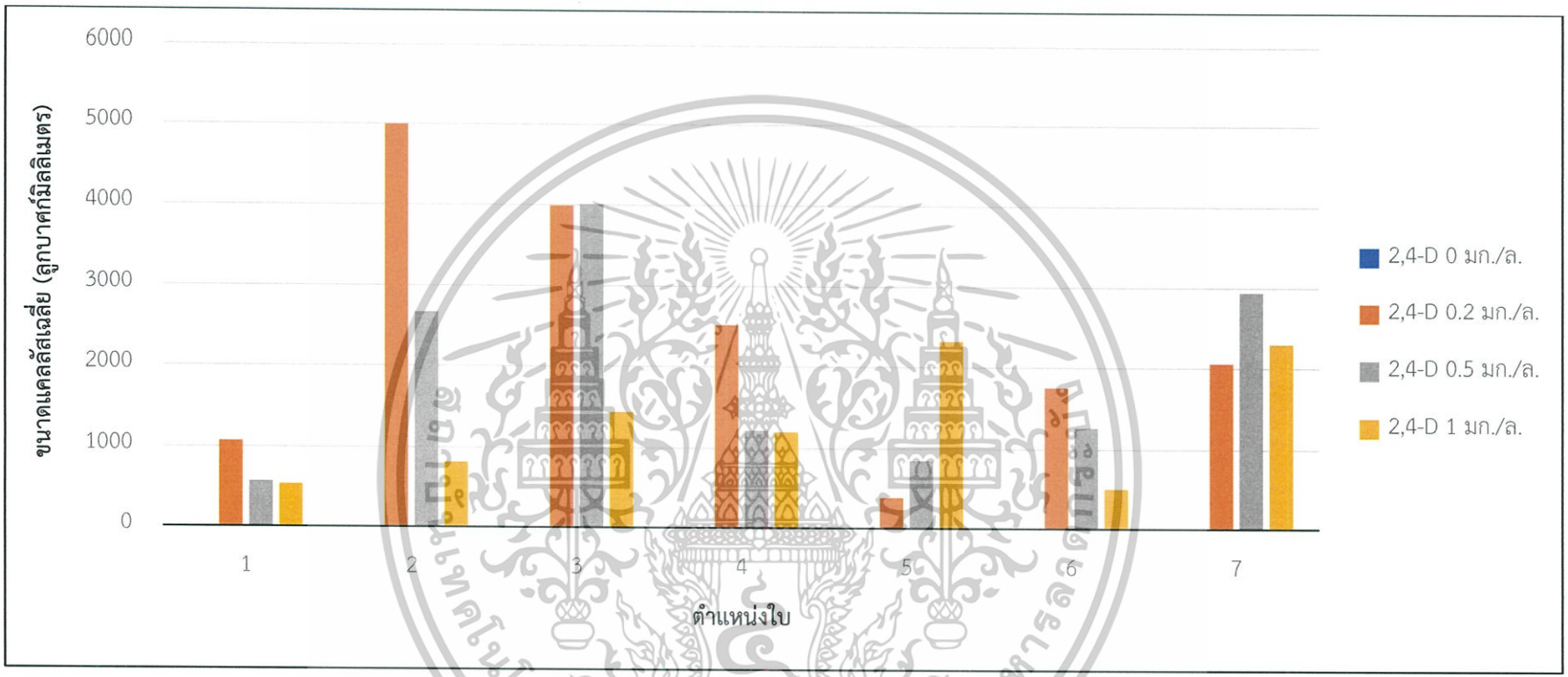
ตารางที่ 4.4 แสดงสีของแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ย เพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแต่ละตำแหน่งของใบบนต้น โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตำแหน่งของใบบนต้น	สีของแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส	แคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร) ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
			0	0.2	0.5	1
1	ขาว	Friable	0	1067.94^{a} ± 470.18	568.81^{ab} ± 779.76	533.09^{ab} ± 436.47
2	ขาว	Friable	0	4992.94^{a} ± 2733.18	2671.01^{ab} ± 3167.74	815.43^{b} ± 416.05
3	ขาว	Friable	0	3993.01^{a} ± 1913.67	4008.81^{a} ± 739.75	1439.33^{b} ± 960.47
4	ขาว	Friable	0	2515.93^{a} ± 2142.19	1217.90^{ab} ± 961.51	1200.30^{ab} ± 1632.58
5	ขาว	Friable	0	387.36^{b} ± 33.94	854.59^{ab} ± 1057.90	2322.00^{a} ± 2444.21
6	ขาว	Friable	0	1753.72^{a} ± 1086.57	1261.85^{ab} ± 1173.58	504.90^{bc} ± 429.14
7	ขาว	Friable	0	2056.76^{a} ± 738.63	2942.36^{a} ± 1451.06	2297.32^{a} ± 1709.38

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

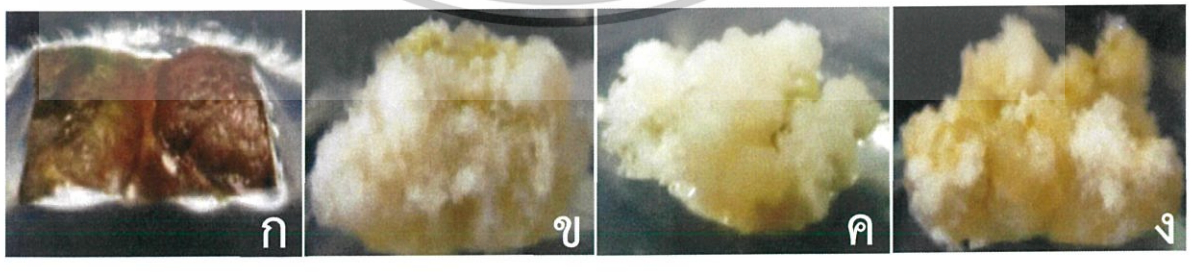
4.2.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของหนาน-เฉาเหว่ย โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์การชักนำแคลลัสจากใบของหนานเฉาเหว่ย เมื่อนำใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นจากใบ และวัดขนาดแคลลัสโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ คำนวณผลเป็นจำนวนแคลลัสเฉลี่ยโดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าที่ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 2445.18 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสที่ใหญ่ที่สุด (ตารางที่ 4.5) เพื่อให้เห็นความแตกต่างจึงได้นำผลในตารางมาแสดงการเกิดแคลลัสดังรูป 4.5 และแสดงเป็นกราฟโดยมีกราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ย (รูปที่ 4.6) จากการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.5 แสดงร้อยละจำนวนการเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบหนานเฉาเหว่ยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

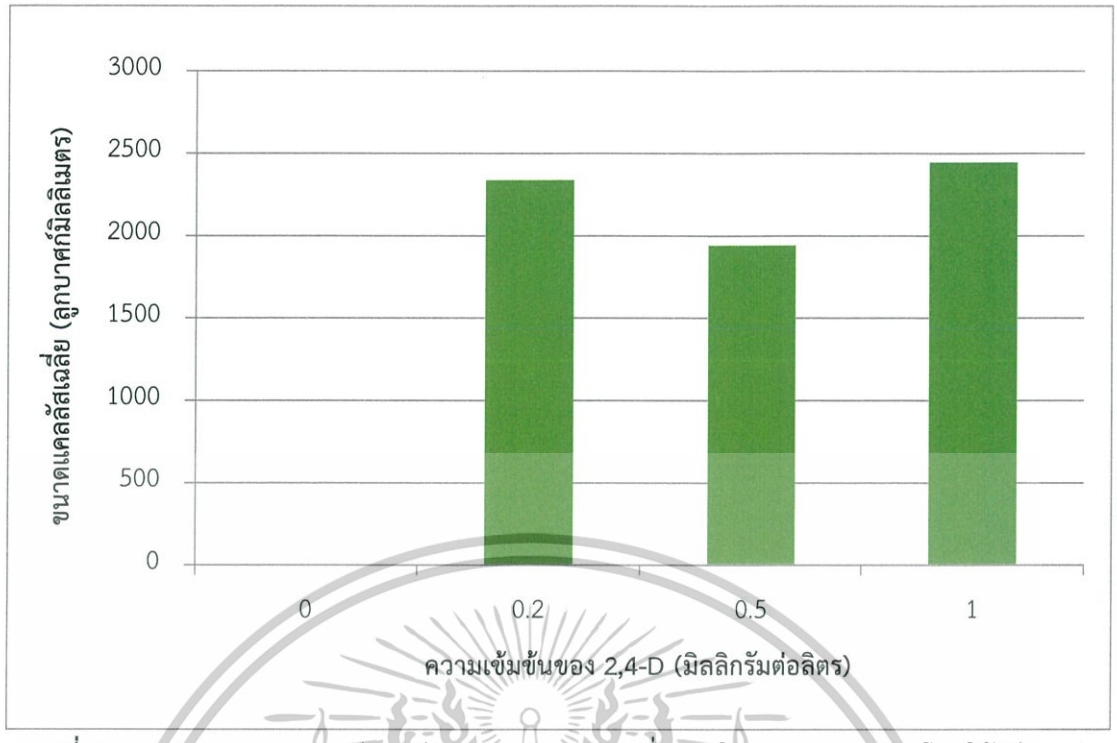
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนซ้ำทั้งหมด	จำนวนการเกิดแคลลัส(เปอร์เซ็นต์)	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0	35	0	0
0.2	35	34 (97.14)	2338.24[a]
0.5	35	35 (100)	1940.68[a]
1	35	33 (94.29)	2445.18[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.5 แสดงการเกิดแคลลัสของใบหนานเฉาเหว่ย บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 (ก) 0.2 (ข) 0.5 (ค) และ 1.0 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบหนานเฉาเหว่ย โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.2.4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบหนานเฉาเหว่ยแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ การชักนำแคลลัสจากใบของหนานเฉาเหว่ย เมื่อนำใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยคำนวณเป็นร้อยละจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบหนานฉาเหว่ยในแต่ละตำแหน่ง พบว่าที่ตำแหน่งที่ 1 3 4 5 6 และ 7 นั้นพบจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกระดับความเข้มข้นของ 2,4-D แต่สำหรับตำแหน่งที่ 2 พบจำนวนการเกิดแคลลัสจากใบ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.6) และเก็บผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นจากใบ และวัดขนาดแคลลัสโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ คำนวณผลเป็นจำนวนแคลลัสเฉลี่ยโดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าแคลลัสตำแหน่งใบที่ 3 ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 5666.53 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด (ตารางที่ 4.7) ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ Obute *et al*, 2016 ที่ทำการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของ 2,4-D เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ โดยที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตรให้จำนวนแคลลัสมากที่สุด เพื่อให้เห็นความแตกต่าง จึงได้นำผลในตารางมาแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่งดังรูป 4.7 และแสดงเป็นกราฟโดยมีกราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่ง (รูปที่ 4.8) จากการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.6 แสดงร้อยละจำนวนการเกิดแคลลัสของใบหนานเฉาเหว่ยแต่ละตำแหน่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

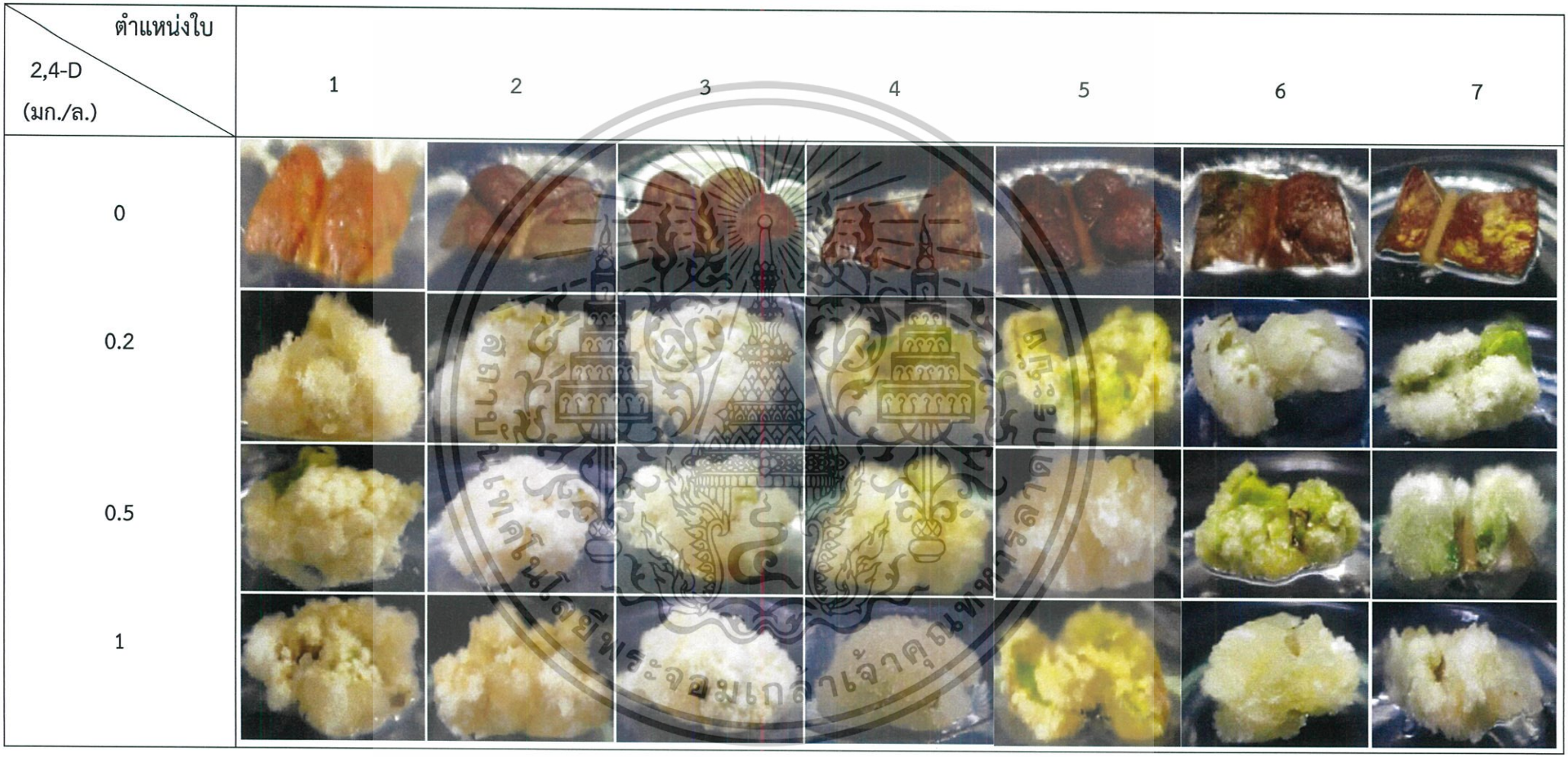
ตำแหน่งของใบบนต้น	จำนวนซ้ำทั้งหมด	จำนวนการเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)			
		ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		0	0.2	0.5	1
1	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
2	20	0 (0)	4 (80)	5 (100)	3 (60)
3	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
4	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
5	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
6	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
7	20	0 (0)	5 (100)	5 (100)	5 (100)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

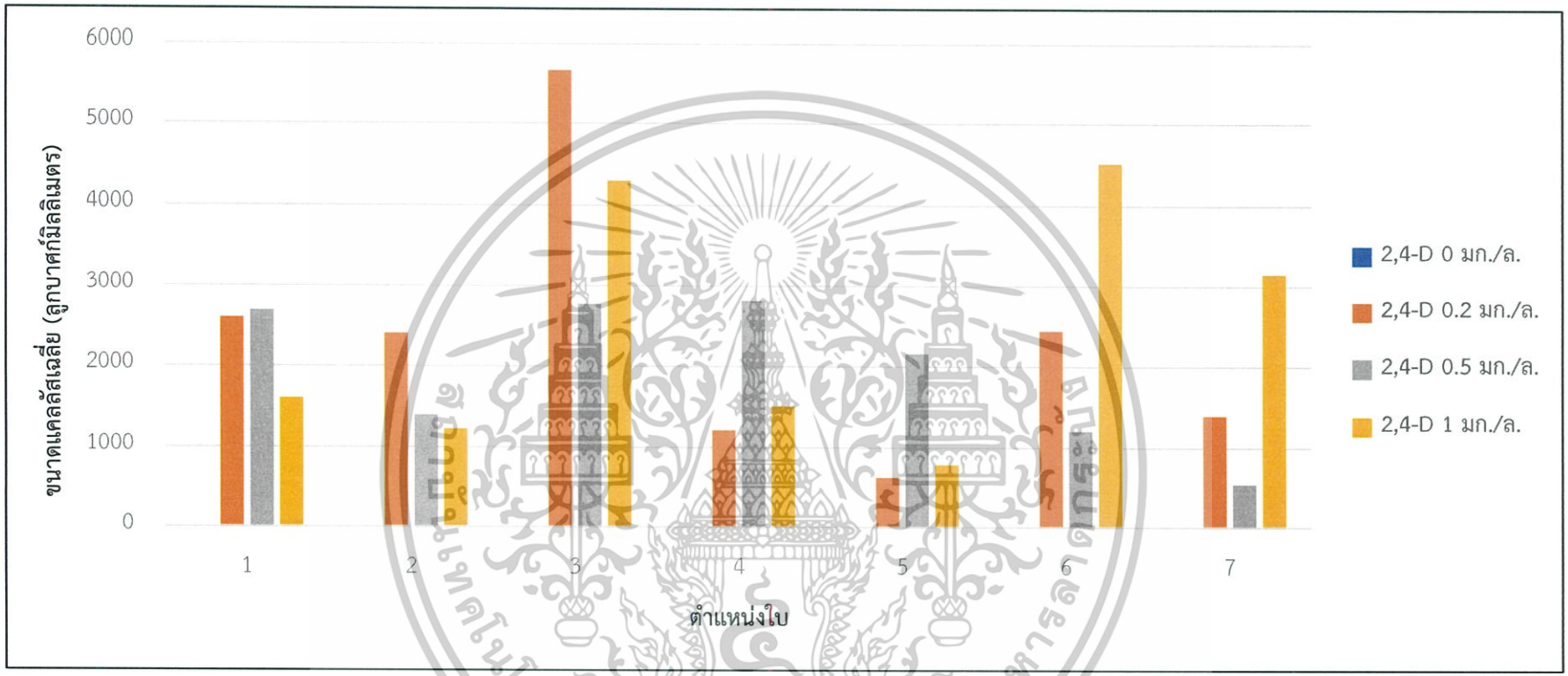
ตารางที่ 4.7 แสดงสีของแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ย เพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแต่ละตำแหน่งของใบบนต้น โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตำแหน่งของใบบนต้น	สีของแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส	แคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)			
			ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
			0	0.2	0.5	1
1	ขาว	Friable	0	$2601.21^{a} \pm 4168.70$	$2689.10^{a} \pm 1813.39$	$1609.53^{a} \pm 1627.47$
2	ขาว	Friable	0	$2406.17^{a} \pm 2992.45$	$1399.18^{a} \pm 1189.89$	$1230.26^{a} \pm 1189.89$
3	ขาว	Friable	0	$5666.53^{a} \pm 2819.79$	$2773.94^{b} \pm 2026.76$	$4299.47^{ab} \pm 944.9335$
4	ขาว	Friable	0	$1219.11^{ab} \pm 914.65$	$2813.24^{a} \pm 2990.54$	$1516.07^{ab} \pm 996.58$
5	ขาว	Friable	0	$628.27^{b} \pm 223.73$	$2156.96^{a} \pm 1907.99$	$790.95^{b} \pm 427.74$
6	ขาว	Friable	0	$2445.01^{ab} \pm 1938.84$	$1209.68^{b} \pm 1145.71$	$4513.64^{a} \pm 2901.86$
7	ขาว	Friable	0	$1401.33^{ab} \pm 1195.02$	$542.67^{b} \pm 178.55$	$3156.36^{a} \pm 2375.28$

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของใบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

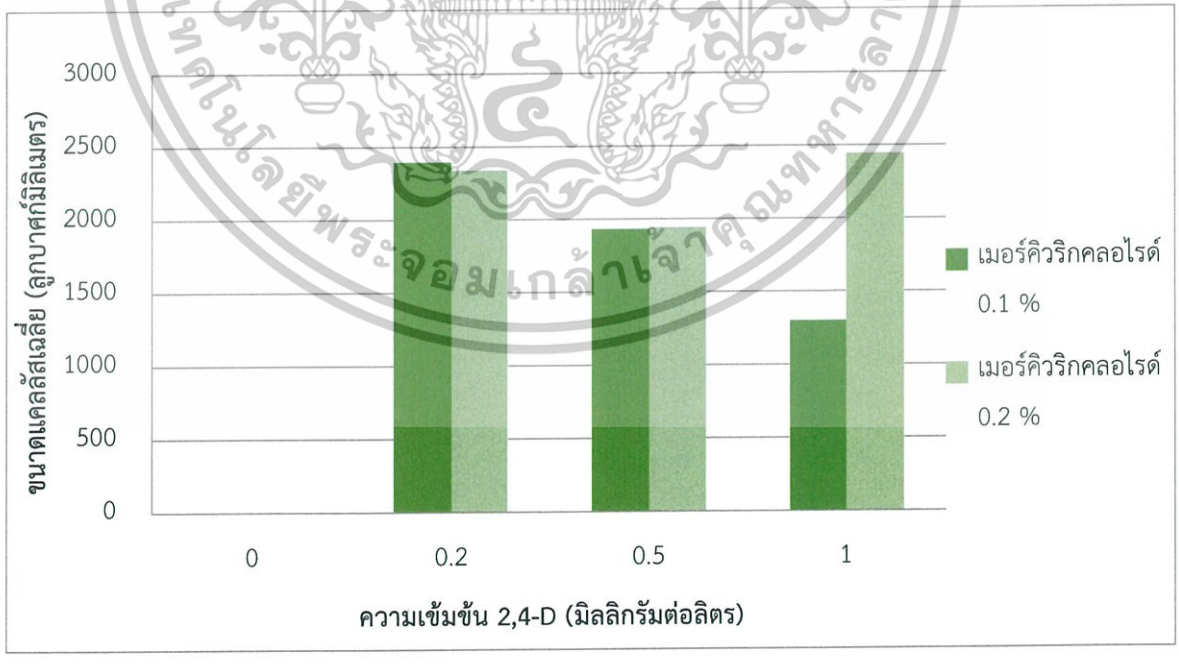
4.2.5 ผลของการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ต่อการเจริญของแคลลัส

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อทั้งสองวิธีและทำการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำแคลลัสทั้งสองแบบตามหัวข้อที่ 4.2.1 และ 4.2.3 นำผลมาทำการเปรียบเทียบกัน พบว่าให้ขนาดของแคลลัสที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการฟอกด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ให้ขนาดแคลลัสได้มากกว่า ดังตารางที่ 4.8 และกราฟ (รูปที่ 4.9)

ตารางที่ 4.8 ตารางเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ย จากการฟอกด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ 0.2 เปอรเซ็นต์

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	ขนาดของแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลเมตร)			
	ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	0	0.2	0.5	1
เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์	0	2395.38^{a}	1932.19^{ab}	1301.77^{b}
เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์	0	2338.24^{a}	1940.68^{a}	2445.18^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่ได้ จากการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ 0.2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด

4.3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด

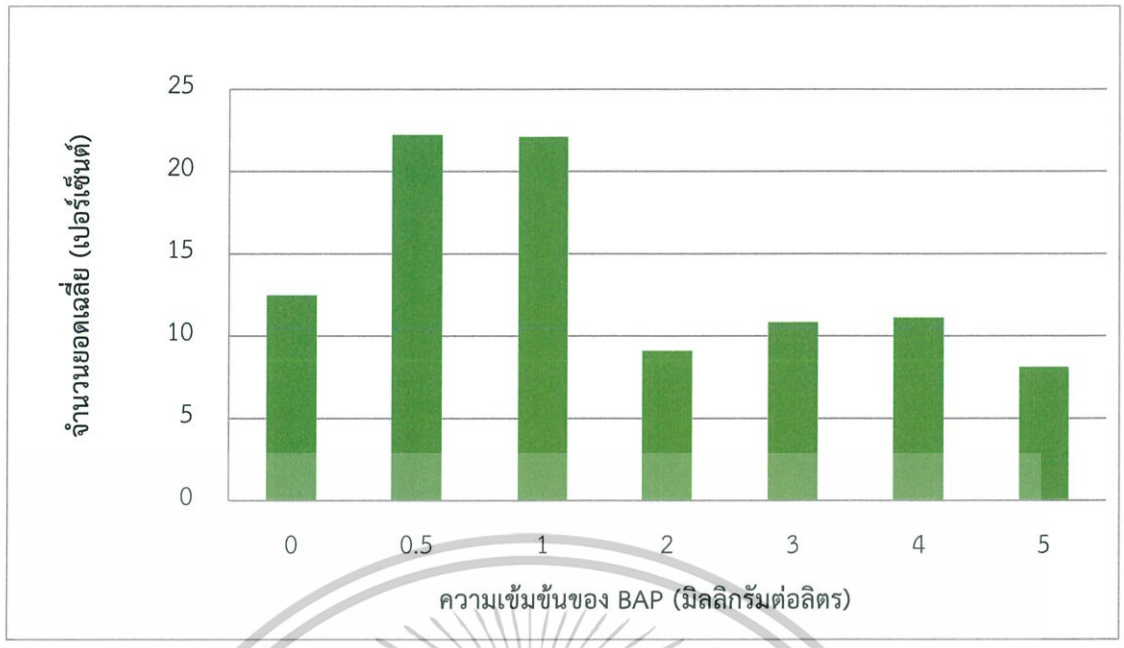
การชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของหนานเฉาเหว่ย เมื่อนำตาข้างมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น และวัดความยาวยอดโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ คำนวณผลเป็นจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยโดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.60 ยอด ซึ่งให้จำนวนยอดมากที่สุด และมีความยาวยอดเฉลี่ยอยู่ที่ 22.24 มิลลิเมตร(ตารางที่ 4.9) ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ Khalafalla *et al*, 2007 ที่ทำการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของ BAP เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง โดยที่ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนยอดมากที่สุด เพื่อให้เห็นความแตกต่าง จึงได้นำผลในตารางมาแสดงผลเป็นกราฟ โดยมีกราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย (รูปที่ 4.10) และกราฟแสดงความยาวยอดเฉลี่ย (รูปที่ 4.11) จากการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.9 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้าง เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

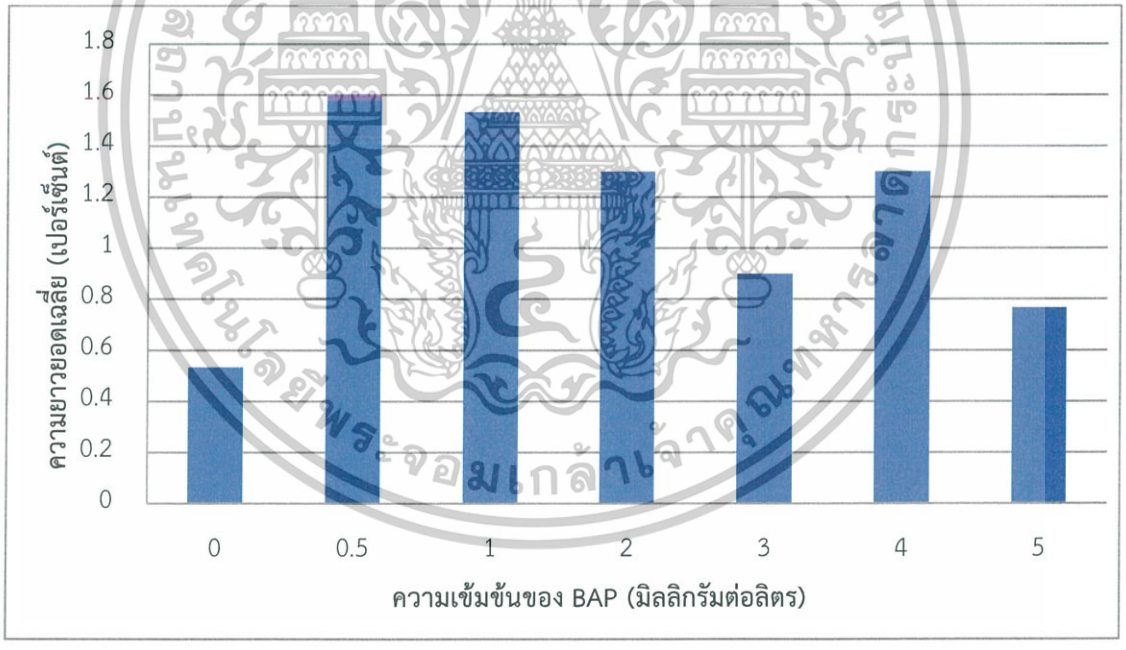
ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนชิ้นที่ลง	จำนวนการเกิดยอด(เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
0	30	16 (53.33)	$0.53^{c} \pm 0.51$	$12.49^{b} \pm 17.09$
0.5	30	22 (73.33)	$1.60^{a} \pm 1.59$	$22.24^{a} \pm 17.72$
1	30	24 (80.00)	$1.53^{a} \pm 1.20$	$22.11^{a} \pm 16.59$
2	30	14 (46.67)	$1.30^{ab} \pm 1.74$	$9.12^{b} \pm 12.01$
3	30	14 (46.67)	$0.90^{abc} \pm 1.27$	$10.84^{b} \pm 14.64$
4	30	16 (53.33)	$1.30^{ab} \pm 1.49$	$11.12^{b} \pm 12.64$
5	30	9 (30.00)	$0.77^{bc} \pm .77$	$8.12^{b} \pm 12.79$
Total	210	115 (54.76)	$1.13^{abc} \pm 1.33$	$13.72^{ab} \pm 15.73$

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความยาวยอดเฉลี่ย เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอดแต่ละตำแหน่ง

การชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของต้นหนานเฉาเหว่ย พบว่าเมื่อนำตาข้างที่คัดแยกตามแต่ละตำแหน่งบนต้นหนานเฉาเหว่ย ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึงตำแหน่งที่ 6 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น และวัดความยาวยอดโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ คำนวณผลเป็นจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยโดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าที่ตำแหน่งที่ 1 ที่ BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 11.4 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ย 8.10 มิลลิเมตร และตำแหน่งที่ 4 ที่ BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 40.02 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.10 จึงได้แสดงรูปโดยรูปแสดงการเปรียบเทียบการเกิดยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง (รูปที่ 4.12) และแสดงกราฟโดยกราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง (รูปที่ 4.13) กราฟแสดงการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง (รูปที่ 4.14) จากการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างตามแต่ละตำแหน่ง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตำแหน่งของตาข้าง	ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
1	0	5	$2.08^{d} \pm 4.65$
	0.5	2	$31.68^{a} \pm 4.56$
	1	2	$22.97^{ab} \pm 12.53$
	2	1	$8.09^{cd} \pm 7.75$
	3	11.4	$8.10^{cd} \pm 9.04$
	4	2	$15.61^{bc} \pm 7.91$
	5	2.8	$4.77^{cd} \pm 10.67$

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 (ต่อ) แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยตามแต่ละตำแหน่งของตาข้าง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตำแหน่งของตาข้าง	ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
2	0	0 (เกิดแคลลัส)	$0.48^{a} \pm 1.07$
	0.5	0 (เกิดแคลลัส)	$13.37^{a} \pm 19.03$
	1	2	$16.77^{a} \pm 15.84$
	2	0	$0.00^{a} \pm 0.00$
	3	0	$0.00^{a} \pm 0.00$
	4	0	$0.00^{a} \pm 0.00$
	5	0 (เกิดแคลลัส)	$10.66^{a} \pm 17.41$
3	0	0 (เกิดแคลลัส)	$12.58^{a} \pm 20.53$
	0.5	0 (เกิดแคลลัส)	$23.14^{a} \pm 21.14$
	1	0 (เกิดแคลลัส)	$9.28^{a} \pm 20.76$
	2	0 (เกิดแคลลัส)	$1.01^{a} \pm 2.26$
	3	0 (เกิดแคลลัส)	$7.03^{a} \pm 15.73$
	4	0 (เกิดแคลลัส)	$6.56^{a} \pm 9.62$
	5	0 (เกิดแคลลัส)	$1.93^{a} \pm 4.31$
4	0	0 (เกิดแคลลัส)	$7.11^{c} \pm 11.16$
	0.5	4	$30.20^{ab} \pm 18.74$
	1	1	$40.02^{a} \pm 5.71$
	2	1	$7.90^{c} \pm 8.96$
	3	1	$4.25^{c} \pm 4.37$
	4	2	$19.30^{bc} \pm 20.60$
	5	0 (เกิดแคลลัส)	$8.84^{c} \pm 13.21$

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

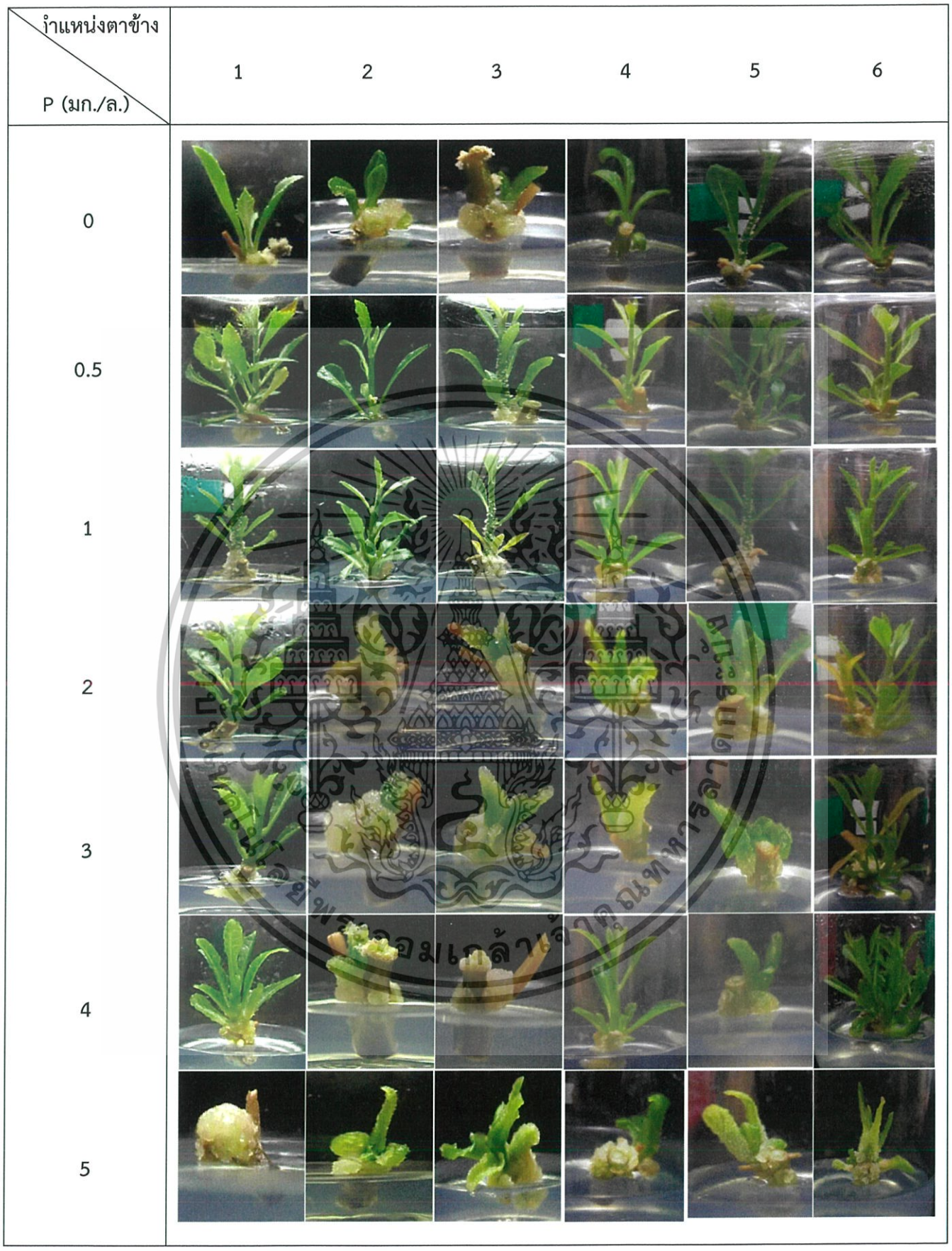
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 (ต่อ) แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยตามแต่ละตำแหน่งของตาข้าง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตำแหน่งของตาข้าง	ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
5	0	1	$32.24^{a} \pm 20.01$
	0.5	0 (เกิดแคลลัส)	$20.15^{ab} \pm 19.81$
	1	1	$22.30^{ab} \pm 10.83$
	2	1	$17.59^{ab} \pm 16.02$
	3	2	$21.86^{ab} \pm 12.18$
	4	0 (เกิดแคลลัส)	$11.54^{ab} \pm 14.26$
	5	0 (เกิดแคลลัส)	$6.21^{b} \pm 8.34$
6	0	1	$20.42^{a} \pm 15.13$
	0.5	1	$14.87^{a} \pm 18.45$
	1	1	$21.29^{a} \pm 19.08$
	2	1	$20.11^{a} \pm 14.61$
	3	1	$23.79^{a} \pm 21.62$
	4	1	$13.70^{a} \pm 8.79$
	5	1	$16.33^{a} \pm 18.65$

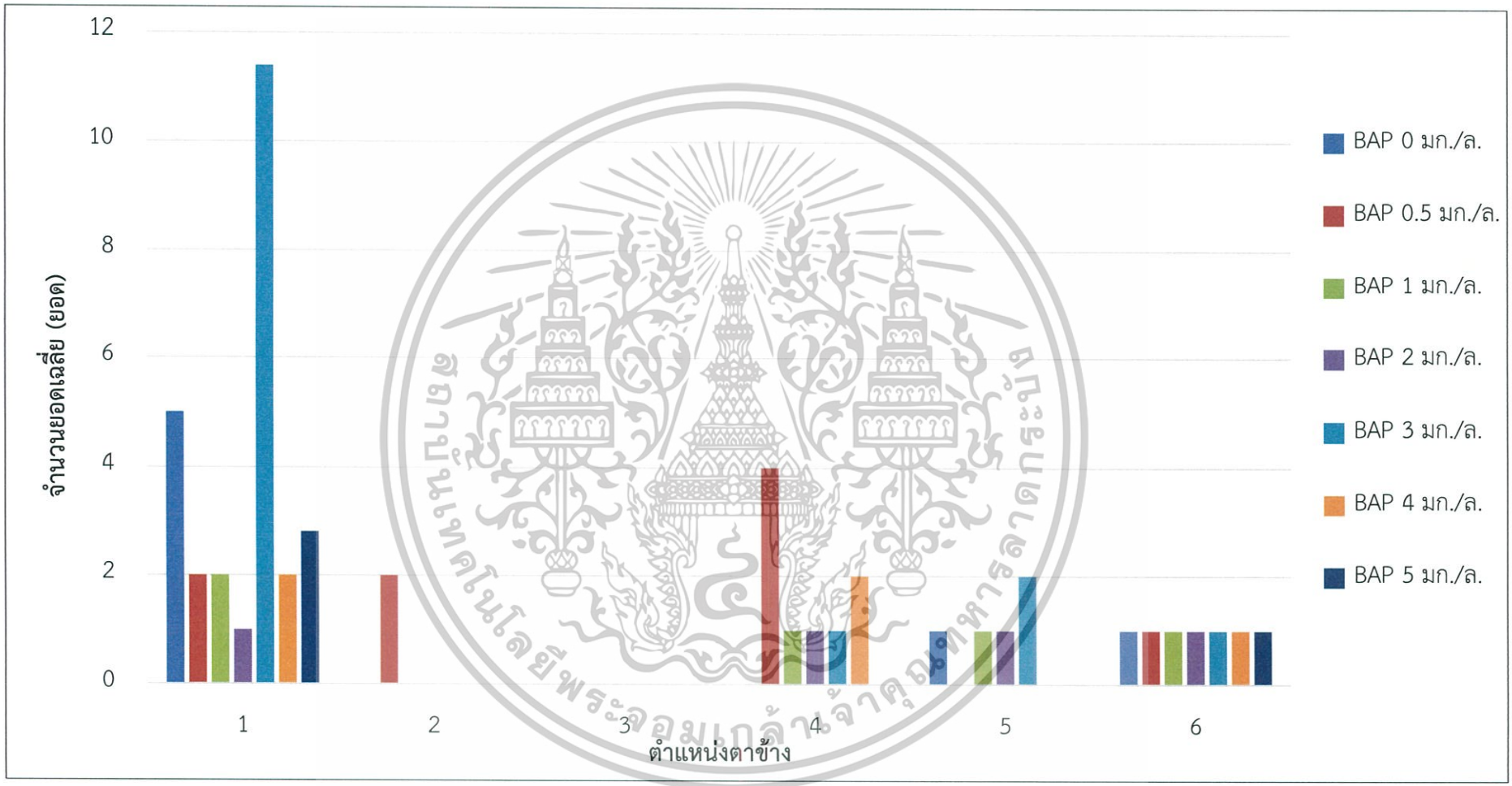
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

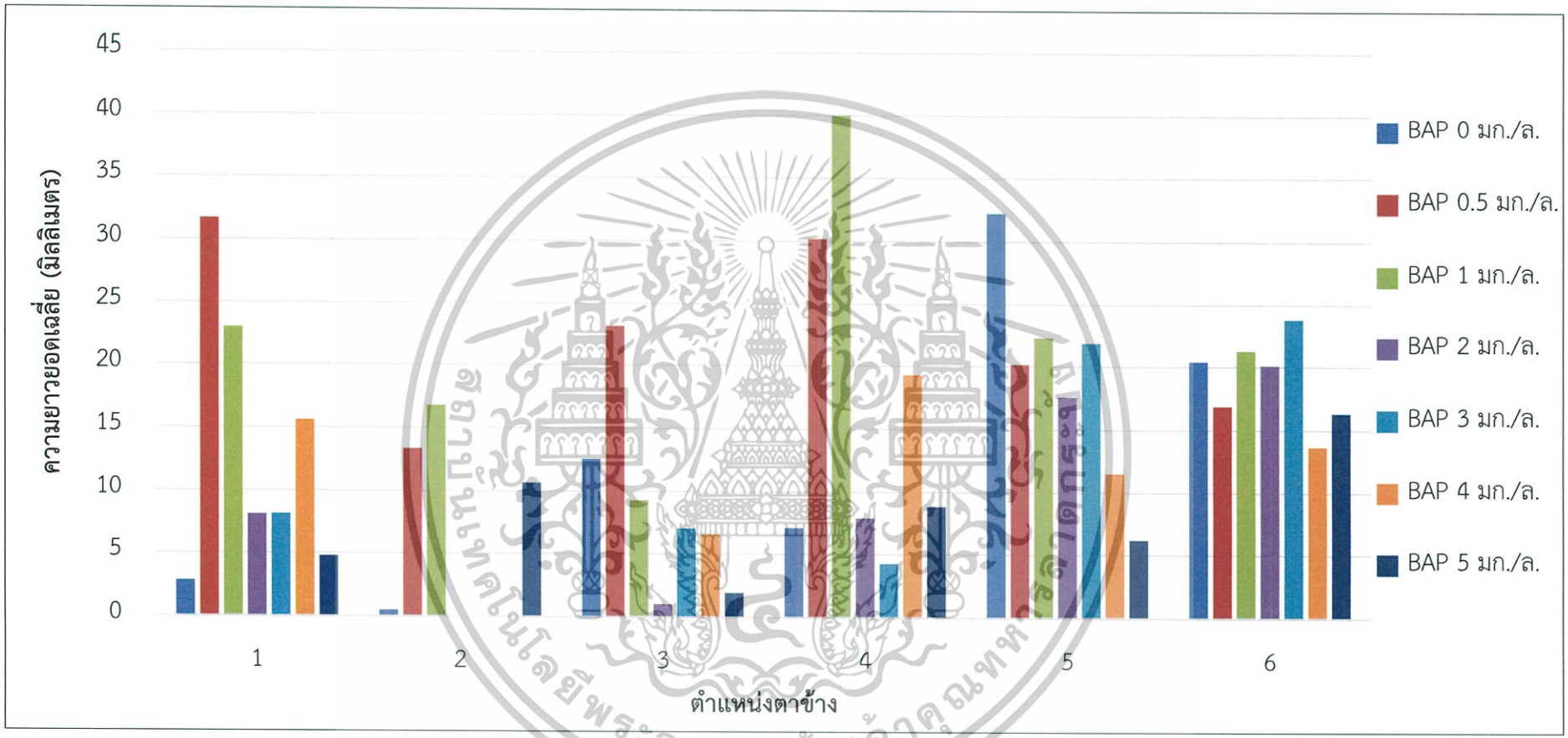


รูปที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างในแต่ละตำแหน่ง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดราก

ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดรากในแต่ละตำแหน่ง โดยการนำยอดที่ได้จากการศึกษาการชักนำให้เกิดยอด มาทำการทดลองโดยตัดแต่งยอด และนำมาลงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในที่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลโดยการนับจำนวนราก และวัดความยาวรากโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ คำนวณผลเป็นจำนวนการเกิดรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยโดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Duncan ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าที่ IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดถึง 14.25 ราก มีความยาวรากเฉลี่ย 11.82 มิลลิเมตร และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.11 สำหรับการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้เช่นกัน แต่ส่วนใหญ่จะเกิดเป็นแคลลัส ซึ่งจากงานวิจัยของ Khalafalla *et al*, 2009 ในการศึกษาการชักนำให้เกิดรากจากสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ เพื่อให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน จึงได้แสดงกราฟโดยกราฟแสดงจำนวนรากเฉลี่ย (รูปที่ 4.15) และกราฟแสดงความยาวรากเฉลี่ย (รูปที่ 4.16) และแสดงรูปเปรียบเทียบการชักนำรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.17)

ตารางที่ 4.11 แสดงจำนวนการเกิดราก และความยาวรากเฉลี่ย โดยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนชิ้นที่ลง	การเกิดราก (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนตาข้าง	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
IBA 0	8	8 (100)	$3.88^{a} \pm 3.31$	$11.49^{c} \pm 2.27$
IBA 0.2	8	8 (100)	$14.25^{a} \pm 6.54$	$11.82^{b} \pm 1.64$
IBA 0.3	8	7 (87.5)	$5.50^{a} \pm 5.37$	$7.61^{b} \pm 4.60$
IBA 0.5	8	8 (100)	$5.63^{a} \pm 6.16$	$7.69^{a} \pm 4.16$
IBA 1.0	8	5 (62.5)	$5.25^{a} \pm 6.15$	$3.92^{a} \pm 3.37$

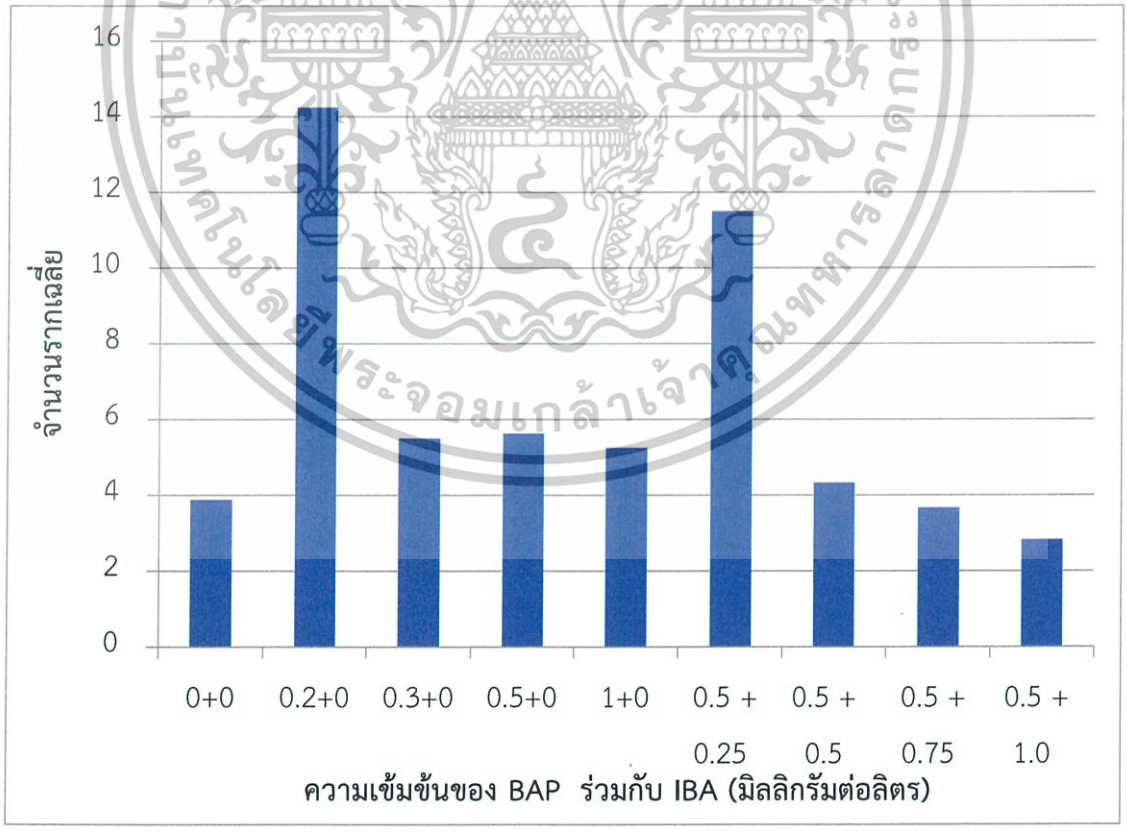
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) แสดงจำนวนการเกิดราก และความยาวรากเฉลี่ย โดยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

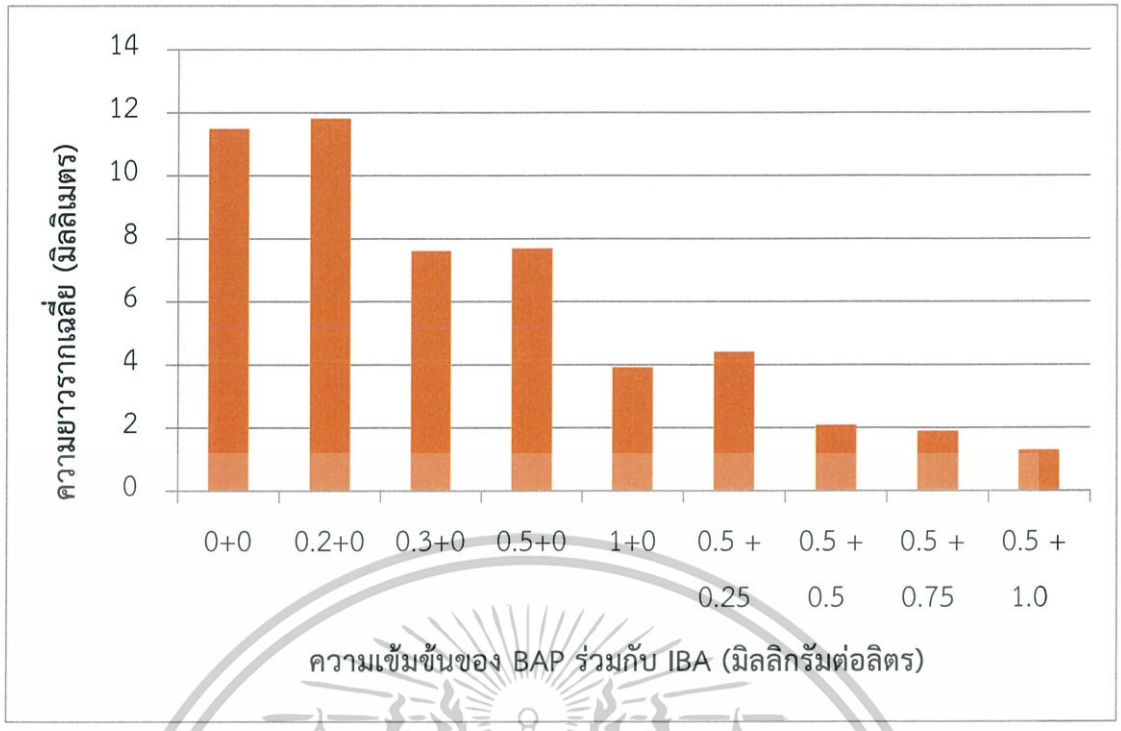
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนชิ้นที่ลง	การเกิดราก (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนตาข้าง	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
BAP 0.5 + IBA 0.25	6	3 (50)	11.50[a] ± 14.14	4.41[a] ± 5.43
BAP 0.5 + IBA 0.5	6	3 (50)	4.33[a] ± 7.55	2.09[a] ± 2.95
BAP 0.5 + IBA 0.75	6	3 (50)	3.67[a] ± 4.03	1.89[a] ± 2.43
BAP 0.5 + IBA 1.0	6	3 (50)	2.83[a] ± 5.53	1.29[a] ± 1.61

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

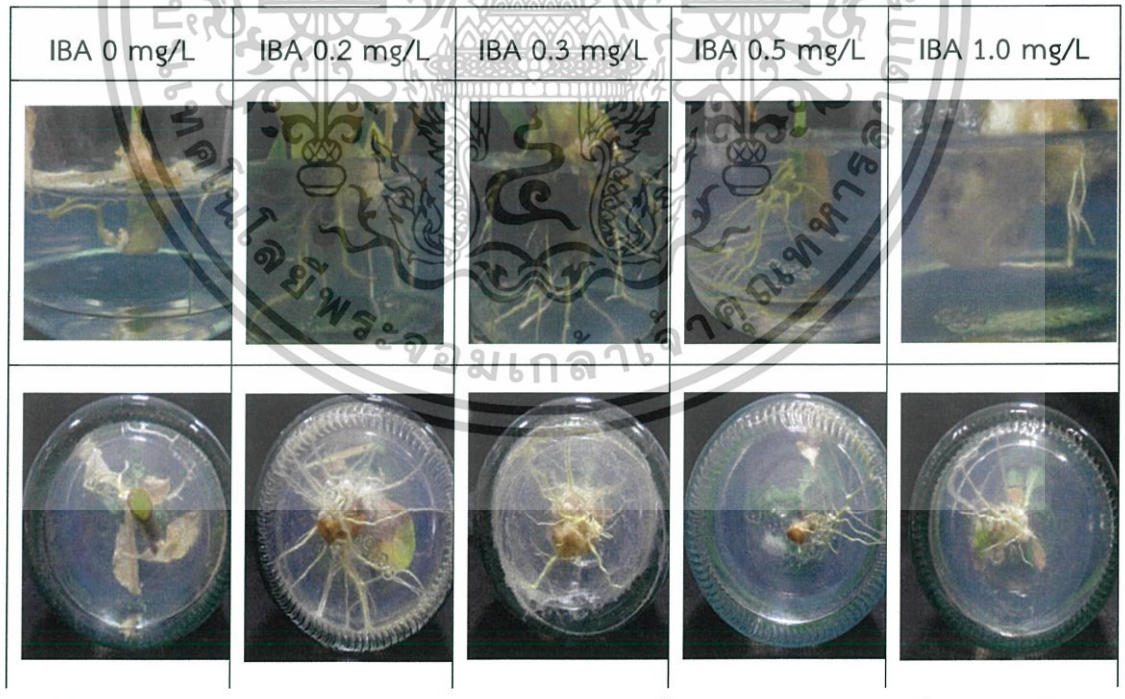


รูปที่ 4.15 แสดงจำนวนรากเฉลี่ย โดยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

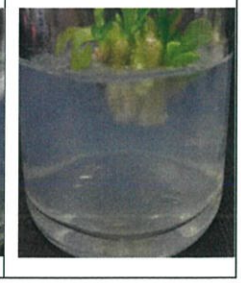


รูปที่ 4.16 แสดงความยาวรากเฉลี่ย โดยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.17 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดราก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

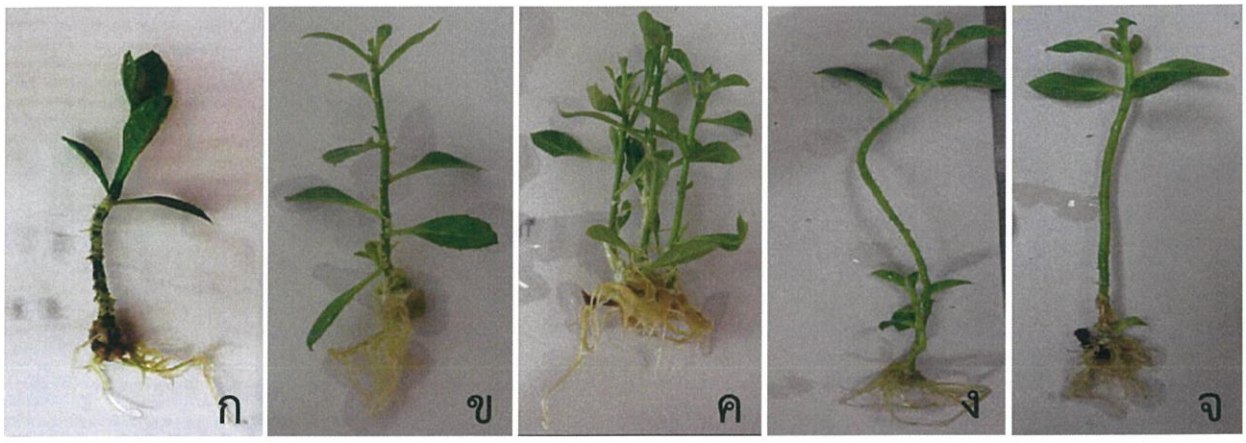
	BAP 0.5 + IBA 0.25 mg/L	BAP 0.5 + IBA 0.5 mg/L	BAP 0.5 + IBA 0.75 mg/L	BAP 0.5 + IBA 1.0 mg/L
				

รูปที่ 4.17 (ต่อ) แสดงการเปรียบเทียบการเกิดราก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

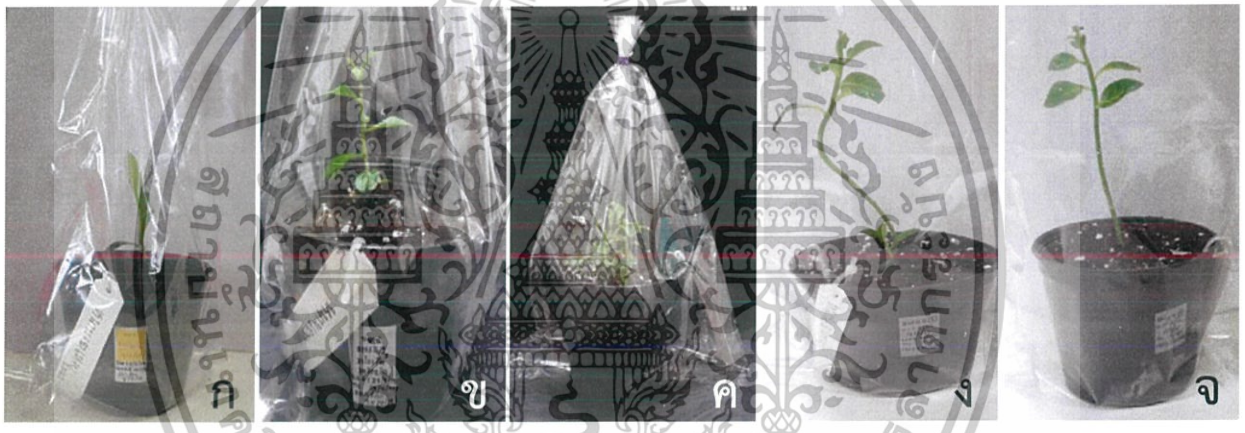
4.5 ผลการออกปลูก

จากกการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนได้เป็นต้นอ่อนที่มียอด และรากที่สมบูรณ์จนสามารถนำออกปลูกได้ (รูปที่ 4.18) มีวิธีการโดยทำการเปิดฝาขวด 1 คืน เพื่อปรับสภาพก่อนเอาออกจากอาหารเพาะเลี้ยง แล้วนำเอาต้นอ่อนไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ไม่มีวุ้นอาหารติดอยู่ ตามด้วยนำไปแช่คาร์เบนดาซิมต่อน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1และย้ายต้นอ่อนลงกระถาง ที่มีดินผ่านการฆ่าเชื้อแล้วร่วมกับ ดินภูเขาไฟ และ เพอร์ไรท์ (อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1) คลุมต้นอ่อนด้วยถุงพลาสติกโปร่งใสเจาะรูให้ทั่วถุงพลาสติก (รูปที่ 4.19) และเลี้ยงในห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาลรด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ทำการเปิดถุงคลุมพลาสติกวันละประมาณ 30 นาที จนพืชสามารถตั้งตัวได้ จึงนำถุงคลุมพลาสติกออก และเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมปกติ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% จากที่นำออกปลูก 10 ต้น (รูปที่ 4.20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

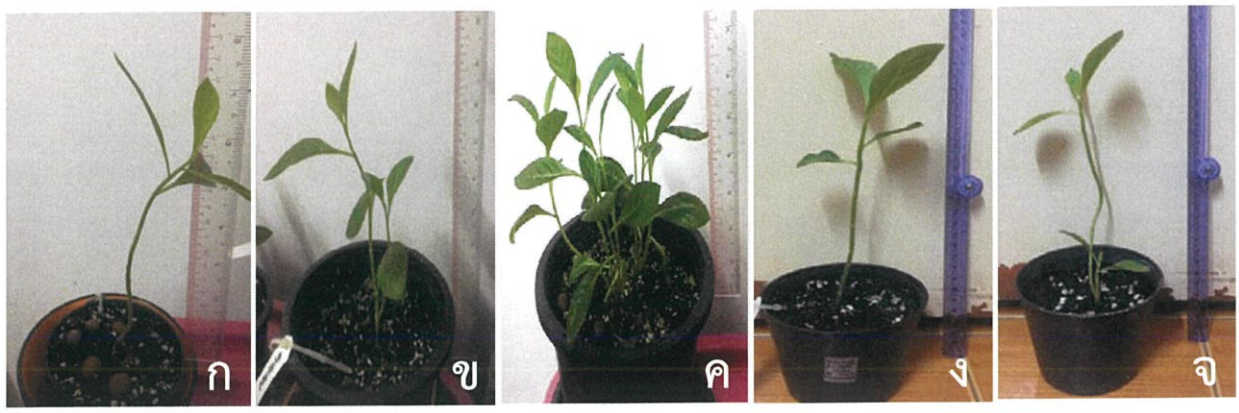


รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์ทั้งยอด และรากเพื่อนำออกปลูก โดยเพาะเลี้ยงจากอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 (ก) 0.2 (ข) 0.3 (ค) 0.5 (ง) และ 1.0 (จ) มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเป็นระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์หลังจากชักนำให้เกิดราก



รูปที่ 4.19 แสดงการปรับสภาพของต้นอ่อนโดยคลุมถุงพลาสติกที่เจาะรูเล็กน้อย และเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงก่อนออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมธรรมชาติ โดยเพาะเลี้ยงจากอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 (ก) 0.2 (ข) 0.3 (ค) 0.5 (ง) และ 1.0 (จ) มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเป็นระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์หลังจากชักนำให้เกิดราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะต้นพืชสามารถตั้งตัวได้ และสามารถปลูกในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ โดยเพาะเลี้ยงจากอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 (ก) 0.2 (ข) 0.3 (ค) 0.5 (ง) และ 1.0 (จ) มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเป็นระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์หลังจากทำการออกปลูก

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการชักนำแคลลัสจากใบของหนานเฉาเหว่ย เมื่อนำใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าใบที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 2395.38 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด และเมื่อแบ่งตามตำแหน่งของใบบนต้นหนานเฉาเหว่ย ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึงตำแหน่งที่ 7 พบว่าอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลดีที่สุด และตำแหน่งใบจะดีที่สุดในตำแหน่งที่ 2 ด้วยขนาดแคลลัสเฉลี่ย 4992.94 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ส่วนใบที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 2445.18 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งให้ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด และเมื่อแบ่งตามตำแหน่งของใบบนต้นหนานเฉาเหว่ย ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึงตำแหน่งที่ 7 พบว่าอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลดีที่สุด และตำแหน่งใบจะดีที่สุดในตำแหน่งที่ 3 ด้วยขนาดแคลลัสเฉลี่ย 5666.53 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และจากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อทั้งสองวิธี และทำการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำแคลลัสทั้งสองแบบตามหัวข้อที่ 4.2.1 และ 4.2.3 นำผลมาทำการเปรียบเทียบกัน พบว่าให้ขนาดของแคลลัสที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการฟอกด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์จะให้ขนาดแคลลัสได้มากกว่า จากการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง ได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.60 ยอด ซึ่งให้จำนวนยอดมากที่สุด และมีความยาวยอดเฉลี่ย 22.24 มิลลิเมตร เมื่อแบ่งตามตำแหน่งของตาข้างบนต้นหนานเฉาเหว่ย ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึงตำแหน่งที่ 6 พบว่าตำแหน่งที่ 1 BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 11.4 ยอด และตำแหน่งที่ 4 BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 40.02 มิลลิเมตร และเมื่อทำการศึกษาการชักนำให้เกิดรากโดยใช้ยอดที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดถึง 14.25 ราก โดยมีความยาวรากเฉลี่ย 11.82 มิลลิเมตร และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้เช่นกัน แต่ส่วนใหญ่จะเกิดเป็นแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงจนได้ต้นที่สมบูรณ์ทั้งยอด และราก จึงทำการออกปลูกโดยมีร้อยละของการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ จากการนำออกปลูกเป็นจำนวน 10 ต้น รวมเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ นับตั้งแต่การชักนำยอดจากชิ้นส่วนตาข้าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของหนานเฉาเหว่ย ในการศึกษาครั้งต่อไปเพื่อให้ได้ค่าทางสถิติที่น่าเชื่อถือควรเพิ่มจำนวนซ้ำที่มากขึ้น ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ เพื่อให้ได้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับหนานเฉาเหว่ยที่หลากหลาย นอกจากนั้นควรทำการแบ่งตำแหน่งชิ้นส่วนที่นำมาศึกษาทดลองให้มากตำแหน่ง เพื่อจะได้ให้ทราบว่าในแต่ละตำแหน่งของตาข้างหรือใบ มีความแตกต่างกันอย่างไร เพื่อให้ได้ผลการศึกษาในครั้งหน้าดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์, กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ และกัลทิมา พิชัย. 2558. "การขยายพันธุ์หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana Bertoni.*) ในสภาพปลอดเชื้อ In vitro propagation of Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni.*)." *Journal of Thai Interdisciplinary Research.* 10(1) : 8-16.

ทรงศักดิ์ พรรุ่งโรจน์. 2546. "การเกิดยอดจาก hypocotyl และใบของผักกาดหอม Shoots Regeneration from Hypocotyl and Leaf Explants of Lettuce." ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีสมพร ปรีเปรม. 2561. **การศึกษาด้านเภสัชเวทของหนานเฉาเหว่ย.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : file:///C:/Users/Home/Desktop/Project/หนาน/ข้อมูล/หนาน%20ศึกษาเภสัชเวท.pdf.

สุคนธ์ทิพย์ บุญวงค์, ประนอม จันทรโณทัย และอัจฉรา ธรรมถาวร. 2547. "อนุกรมวิธานพืชเผ่า Vernonieae (Asteraceae) ในประเทศไทย Taxonomy of Tribe Vernonieae (Asteraceae) in Thailand." *Khon Kaen Research Journal (Graduate Studies).* 4 : 1-11.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. **ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://www.nstda.or.th/th/nstda-knowledge/2386-20110509-plant-tissue-culture.

หนูเดือน เมืองแสน. 2560. "การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) for Inbred Line Production." รายงานการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสรุนารี.

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

Amin,A., Wani,T.A., Kaloo,Z.A., Singh,S., John,R., Majeed,U. and Shapoo,G.A. 2018. "Genetic stability using RAPD and ISSR markers in efficiently in vitro regenerated plants of *Inula royleana* DC." *Meta Gene.* 18 : 100-106.

Angkanachong. 2556. **ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://angkanachong.wordpress.com/category/ประโยชน์ของการเพาะเลี้/.

Bhattacharjee,B., Lakshminarasimhan,P., Bhattacharjee,A., Agrawala,D.K. and Pathak,M.K. 2013. "*Vernonia amygdalina* Delile (Asteraceae) – An African

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

medicinal plant introduced in India." *Zoo's Print Communicating Science for Conservation.* 28(5) : 18-20.

Hariprasath,L., Jegadeesh,R., Arjun,P. and Raaman,N. 2015. "In vitro propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the in vivo plant and in vitro-derived callus." *South African Journal of Botany.* 98 : 134-141.

Keeley,S.C. and Jansen,R.K. 1994. "Chloroplast DNA restriction site variation in the *Vernonieae (Asteraceae)*, an initial appraisal of the relationship of New and Old World taxa and the monophyly of *Vernonial*." *Plant Systematics and Evolution.* 193 : 249-265.

Keeley,S.C. and Turner,B.L. 1990. "A preliminary cladistic analysis of the genus *Vernonia* (*Vernonieae: Asteraceae*)." *Plant Systematics and Evolution.* 45-66.

Khalafalla,M.M., Daffalla,H.M., El-Shemy,H.A. and Abdellatef,E. 2009. "Establishment of in vitro fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina* - a potent African medicinal plant." *African Journal of Biotechnology.* 8(21) : 5952-5957.

Khalafalla,M.M., Elgali,E.I. and Ahmed,M.M. 2007. "*In vitro* Multiple Shoot Regeneration from Nodal Explants of *Vernonia amygdalina*-An important medicinal plant." *African Crop Science Conference Proceedings.* 8 : 747-752.

Mei-Yin,C. and Sani,H. 2017. "*In Vitro* Plantlet Regeneration From Nodal Explant And Callus Induction Of *Vernonia amygdalina* Del." *International Journal of Agricultural and Environmental Research.* 3(4) : 385–391.

Obute, Chibuzo,G., Ezeani-Cornelius and Sandra. 2016. "In Vitro Callus Induction in Vernonia Amygdalina Del. (Asteraceae) Using Leaves as Explants." *International Journal of Research and Science Publication.* 1(2) : 66-73.

Swamy,J., Prabhakar,G., Rasingam,L. and Kamalakar,P. 2015. "Gymnanthemum amygdalinum (Asteraceae) - A New Addition to the Flora of Peninsular India." *International Journal of Advanced Research in Science and Technology.* 4(7) : 499-451.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

องค์ประกอบอาหาร การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการคำนวณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ภาคผนวก 1ก. องค์ประกอบอาหารสูตร MS

องค์ประกอบ	**ปริมาตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
NH_3NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_2.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCL_4.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.8
Inositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Glycine	2
Sucrose	3%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2ก. ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS 1 ลิตร สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ใส่น้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ในภาชนะขนาด 1 – 2 ลิตร
2. ชั่งอาหารสูตร MS สำเร็จรูป 4.43 กรัม ใส่ลงในภาชนะ แล้วคนให้ละลาย
3. ชั่งน้ำตาล 30 กรัม ใส่ลงในภาชนะ แล้วคนให้ละลาย
4. ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชตามที่คำนวณได้ (หากไม่ใส่ ข้ามไปข้อ 5.)
5. นำภาชนะที่ใส่สารละลายทั้งหมดไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
6. นำไปปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ปรับ pH ให้มีค่าในช่วง 5.6 - 5.8 โดยใช้สารละลายกรดไฮดรอกคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 หรือ 1 นอร์มอล
7. ถ้าต้องการอาหารเหลว สามารถเทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เลย แต่ถ้าต้องการอาหารแข็งให้ชั่งวุ้น 2.6 กรัม ใส่ลงในภาชนะ แล้วคน
8. นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ เพื่อละลายวุ้นให้เป็นเนื้อเดียวกับอาหาร
9. เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
10. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใส่ลงในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
11. เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูงเสร็จแล้ว นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปิดฝาให้แน่นอีกครั้ง และเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประมาณ 3-5 วัน ก่อนนำไปใช้งาน เพื่อทำให้มั่นใจว่าอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วนั้นไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์

ภาคผนวก 3ก. วิธีการคำนวณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

คำนวณโดยใช้สูตร $C_1 V_1 = C_2 V_2$

C_1 = ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น

C_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม

V_1 = ปริมาณของสารเริ่มต้น

V_2 = ปริมาณของสารที่ต้องการเตรียม

ตัวอย่าง ถ้าต้องการเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีทำ จากสูตร $C_1 V_1 = C_2 V_2$

$$\frac{10 \text{ มก.}}{1 \text{ มล.}} \times V_1 = \frac{0.2 \text{ มก.}}{1000 \text{ มล.}} \times 500 \text{ มล.}$$

$$V_1 = \frac{\frac{0.2 \text{ มก.}}{1000 \text{ มล.}}}{\frac{10 \text{ มก.}}{1 \text{ มล.}}} \times 500 \text{ มล.}$$

V_1 = 0.01 มิลลิลิตร หรือ 10 ไมโครลิตร

ดังนั้นใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้