อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.)

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS FOR *Crotalaria medicaginea* Lam. BY TISSUE CULTURE

นนต์นันท์ รานอก

เบญญาฤทธิ์ นาคงาม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS FOR *Crotalaria medicaginea* Lam. BY TISSUE CULTURE

NONNANT RANOK

BENYARIT NAKNGAM

A SPECIAL PROJEC SUBMITTED IN PARTIAL

FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT

FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTHECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.) Effect of plant growth regulators for *Crotalaria medicaginea* Lam. by tissue culture
ชื่อนักศึกษา	นางสาว นนต์นันท์ รานอก รหัสนักศึกษา 62050494 นางสาว เบญญาฤทธิ์ นาคงาม รหัสนักศึกษา 62050510
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.)

ชื่อนักศึกษา นางสาว นนต์นันท์ รานอก รหัสนักศึกษา 62050494

นางสาว เบญญาฤทธิ์ นาคงาม รหัสนักศึกษา 62050510

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการงอกของเมล็ดผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea*) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ Kn เมล็ดของผักแว่นต้นที่ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการงอกสูงสุด 85.71 เปอร์เซ็นต์ และที่ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยความสูงของต้นมากที่สุดคือ 34.88 มิลลิเมตรต่อเมล็ด

การศึกษาการชักนำข้อให้เกิดยอด บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3 ยอด 2 ยอด และ 1 ยอด ตามลำดับ และพบการเกิดยอดสูงสุด 16.67 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการชักนำยอดให้เกิดราก บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งความเข้มข้นที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 โดยมีความยาวรากเฉลี่ย 17.51 มิลลิเมตร และ 17.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดราก 9.09 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความยาวรากเฉลี่ย 10.24 มิลลิเมตร และพบการเกิดรากสูงสุด 18.18 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : การชักนำยอด การชักนำราก ผักแว่นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Effect of plant growth regulators for *Crotalaria medicaginea* Lam. by tissue culture

Students Miss Nonnant Ranok Student ID 62050494

Miss Benyarit Nakngam Student ID 62050510

Degree Bachelor of Science (Biotechnology)

Department Biology

School Science

University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2022

Advisor Assoc. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

From the experiment, shoots inoculated on MS medium with BA or Kn**.** seeds of *Crotalaria medicaginea* Lam. in BA concentrations of 2 mg/L showed maximum shoot induction of 85.71%, and in BA concentrations of 0.5 mg/L, maximum average shoot length of 34.88 mm per seed.

The experiment of shoot induction from nodal on MS medium with BA concentrations of 3 mg/L and in combination with NAA 0.5 mg/L, TDZ concentrations of 3 mg/L, combination with NAA 0.5 mg/L, and BA concentrations of 0.1 mg/L had shown response explants maximum shoot induction of 3 shoots, 2 shoots and 1, respectively, and had shown response explant maximum shoot induction of 16.67%

The experiment involved root induction on half-strength MS medium with NAA concentrations of 0.5 and 1 mg/L, with average root lengths of 17.51 and 17.26 mm, respectively. In BA concentrations of 1 mg/L, root formation was 9.09% with an average root length of 10.24 mm, and response explants showed maximum shoot induction of 16.67%.

Keywords : Shoot induction, Root induction, *Crotalaria medicaginea*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่อง “อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.)” ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามจุดประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ด้วยดี คณะผู้จัดทำได้รับความกรุณาในการดูแลช่วยเหลือ และการให้การปรึกษาจากผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษนี้ ผู้ให้คำปรึกษา เสนอแนวทางแก้ไข ให้กำลังใจและประสบการณ์ที่ดีกับคณะผู้จัดทำ ตลอดจนสนับสนุนในการจัดทำโครงงานพิเศษจนประสบความสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ และขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี ที่ร่วมเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อมาเป็นคณะกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ รวมทั้งชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาและช่วยตรวจสอบความถูกต้องเพื่อให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่อาคารและสถาบันที่คณะวิทยาศาสตร์ และท่านที่มิได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และญาติมิตร ด้วยความเคารพรักอย่างยิ่งสำหรับคำปรึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด รวมถึงเพื่อน และพี่ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือตลอดการทดลองจนกระทั่งโครงงานพิเศษฉบับนี้นประสบความสำเร็จมา ณ โอกาสนี้

นนต์นันท์ รานอก
เบญญาฤทธิ์ นาคงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญรูป ..... ช

คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ข้อมูลทั่วไปของผักแว่นต้น 3

2.1.1 อนุกรมวิธานของผักแว่นต้น 3

2.1.2 ถิ่นกำเนิดและลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ของผักแว่นต้น 3

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 4

2.2.1 แนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 4

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4

2.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 5

2.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช 7

2.3.1 สารฟอกฆ่าเชื้อ 7

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 10

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา 10

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 10

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงาน 12

3.3.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด 12

3.3.1.1 การชักนำเมล็ดให้เกิดยอด 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.1.2 การชักนำข้อให้เกิดยอด 14
3.3.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก 15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 16
4.1 ผลการศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโต 16
4.2 ผลการศึกษาการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ 21
4.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดราก 24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 27
5.1 สรุปผลการวิจัย 27
5.1.1 ผลการศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโต 27
5.1.2 ผลการศึกษาการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ 27
5.1.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดราก 28
5.2 ข้อเสนอแนะ 28
เอกสารอ้างอิง 29
ภาคผนวก 31
ภาคผนวก ก 32
ภาคผนวก ข 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ Kn ต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอด..... 12
3.2 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ที่เสริมหรือไม่เสริมด้วย NAA ต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอด..... 14
3.3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ NAA ต่อการชักนำยอดให้เกิดราก 15
4.1 แสดงผลการชักนำการเจริญเติบโตของเมล็ดผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 17
4.2 แสดงผลการศึกษาการชักนำข้อของผักแว่นต้นให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ TDZ ที่เสริมหรือไม่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 22
4.3 แสดงผลการชักนำรากของผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตร ที่ประกอบด้วย NAA หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของผักแว่นต้น.....	3
4.1	แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	18
4.2	แสดงความยาวยอดเฉลี่ยของเมล็ดผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	18
4.3	แสดงลักษณะเจริญเติบโตของเมล็ดผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) และที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข - ฌ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์....	19
4.4	แสดงลักษณะเจริญเติบโตของเมล็ดผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย Kn ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก - ฉ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	20
4.5	แสดงลักษณะการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA และ NAA ความเข้มข้น 3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ และ NAA ความเข้มข้น 3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	23
4.6	แสดงการเจริญของรากผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข – ง) ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ – ช).....	25
4.7	แสดงลักษณะรากของผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข – ง) ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ - ช).....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2-IP	Isonentenyl adenine
BA	6-Benzylaminopurine
IBA	Indole-3-butyric acid
Kn	6-furfurylaminopurine (Kinetin)
MS	Murashige and Skoog Nutrients
NAA	α-Naphthaleneacetic acid
PPM	Plant Preservative Mixture
TDZ	Thidiazuron

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

พืชตระกูลถั่วมีแหล่งกำเนิด และมีการแพร่กระจายสายพันธุ์แตกต่างกัน (Williams, 1983) ซึ่ง Crotalaria เป็นหนึ่งในสกุลที่ได้รับการยอมรับทางการแพทย์ซึ่งอยู่ในวงศ์ Fabaceae ส่วนใหญ่พบในเขตร้อน (Daimon et al., 2002) อีกทั้งบางสายพันธุ์ยังมีบทบาทในเชิงเภสัชกรรมทางสัตวแพทย์ (Nuhu et al., 2009) โดยหนึ่งในสายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นยา ได้แก่ ผักแว่นต้น (*Crotalaria medicagineae*) ซึ่งมีสรรพคุณในการรักษาโรคเบาหวาน (Naidu and Pullaiah, 2003) ผักแว่นต้นมีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ใบประกอบแบบมีใบย่อย 3 ใบ รูปไข่กลับ ทั้งต้นมีสรรพคุณด้านสมุนไพรแก้ปวดเมื่อย เมาค้าง บำรุงกำลัง มีเขตการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่แถบตะวันออกกลางถึงอินเดีย จีน ภูมิภาคมาเลเซีย และออสเตรเลีย (Ninkaew et al., 2018)

เนื่องจากสรรพคุณทางยาและความต้องการที่เพิ่มขึ้นของอุตสาหกรรมเภสัชกรรม ประกอบกับข้อจำกัดในการเพาะปลูก อีกทั้งยังมีทดลองปลูกที่น้อย ทำให้พืชสายพันธุ์นี้มีจำนวนลดลงอย่างมากในธรรมชาติ (Saurabh et al., 2002) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตพืชจำนวนมากได้ภายในระยะเวลาอันสั้น และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ด หรือการผลิตกล้าจากวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีอื่นไม่ประสบความสำเร็จหรือกระทำได้ยาก (Gavinlertvatana et al., 1987) ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์ผักแว่นต้นสืบต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอด

2. เพื่อศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดและข้อให้เกิดยอด จากการใช้อาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตทีมีชนิด และความเข้มข้นต่างกัน เพื่อหาชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดได้ดีที่สุด

2. ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก จากการใช้อาหาร MS ครึ่งสูตร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตทีมีชนิด และความเข้มข้นต่างกัน เพื่อหาชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดรากได้ดีที่สุด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดและข้อให้เกิดยอด

2. ทราบชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของผักแว่นต้น

2.1.1 อนุกรมวิธานของผักแว่นต้น (Andrella et al., 1786)

Kingdom: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Crotalaria* L.

Species: *Crotalaria medicaginea* Lam.

2.1.2 ถิ่นกำเนิดและลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ของผักแว่นต้น

ผักแว่นต้น หรือ กำลังวัวเฉลิม *Crotalaria medicaginea* Lam. (Fabaceae, Leguminosae) ไม้ล้มลุก ใบประกอบแบบมีใบย่อย 3 ใบ รูปไข่กลับ ทั้งต้นมีสรรพคุณด้านสมุนไพรแก้ปวดเมื่อย เมาค้าง บำรุงกำลัง มีเขตการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่แถบตะวันออกกลางถึงอินเดีย จีน ภูมิภาคมาเลเซีย และออสเตรเลีย (Ninkaew et al., 2018)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของผักแว่นต้น
ที่มา : https://shorturl.asia/mhdEA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) คือการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศประเภทหนึ่งโดยการนำ ชิ้นส่วนพืช (explant) ซึ่งอาจเป็นโปรโตพลาสต์ (protoplast) เซลล์ (cell) เนื้อเยื่อ (tissue) หรือ อวัยวะ (organ) ของพืช มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (media) ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ แสง อุณหภูมิ และความชื้น เพื่อให้ชิ้นส่วนเหล่านั้นเจริญพัฒนาเป็นต้นใหม่ต่อไป (Bonga, 1982)

2.2.1 แนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ณัฏฐากร, 2552)

แนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 แนวทางคือ

1. การผลิตต้นจากเนื้อเยื่อเจริญ (Meristem culture) คือการผลิตต้น โดยการเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ) ส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชที่มีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ เช่น ยอด ตา ลำต้น ข้อ ปล้อง คัพภะ มาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นมา

2. การผลิตต้นจากแคลลัส เซลล์ หรือ โปรโตพลาสต์ คือการผลิตต้น โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัส เซลล์ หรือโปรโตพลาสต์ ให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นมมา

แนวทางทั้งสองมีข้อดีข้อ เสียตลอดจนศักยภาพที่สนองวัตถุประสงค์ต่างกันไป กล่าวคือการขยายพันธุ์จากเนื้อเยื่อเจริญ เช่น การเพาะเลี้ยงตายอด โดยผ่านขบวนการชักนำให้เกิดตาเทียมหรือตาพิเศษ (adventitious bud) แล้วพัฒนาเป็นยอดกระจุก (multiple shoots) จำนวนมาก จากนั้นจึงแยกยอดไปชักนำให้เกิดราก กล้าที่ได้จากวิธีนี้ยังคงมีลักษณะของต้นแม่อยู่อย่างสมบูรณ์ จึงเหมาะสำหรับงานด้านขยายพันธุ์ การผลิตพืชปราศจากโรค และการเก็บรักษาพันธุ์

สำหรับการผลิตต้นจากแคลลัส เซลล์ หรือ โปรโตพลาสต์วิธีนี้มีโอกาสกลายพันธุ์สูง ลักษณะจะแตกต่างไปจากต้นแม่ จึงมีประโยชน์ในแง่ของการสร้างสายพันธุ์ใหม่ หรือการสร้างลูกผสม สร้างพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) หรือโครโมโซมหลายชุด (polyploid)

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. งานด้านการขยายพันธุ์ (Clonal propagation)

การผลิตกล้าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตกล้าได้เป็นปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น ต้นทุนการผลิตต่ำ ใช้พื้นที่ตลอดจนแรงงานน้อยกว่าการเตรียมกล้าจากเมล็ด นอกจากนี้คุณภาพของกล้าที่ผลิตได้มีความสม่ำเสมอกัน จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ผลิตพืชในเชิงการค้า เช่น การขยายพันธุ์กล้วยไม้ และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ดหรือการผลิตกล้าจากวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีอื่นไม่ประสบความสำเร็จหรือกระทำได้ยาก (Gavinlertvatana and Matheson, 1987)

2. งานด้านการปรับปรุงพันธุ์ (Crop improvement)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีหนึ่ง ที่สามารถถ่ายทอดลักษณะเดิมของแม่ไม้มายังรุ่นลูกได้ดังนั้นจึงเหมาะในการนำ มาใช้กับงานการผลิตกล้าที่ต้องการคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเด่นของแม่ไม้ไว้ สำหรับการสร้างสวนผลิตเมล็ดพันธุ์ หรือการปลูกป่าโดยตรง การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศให้ผลตอบแทน (gain) มากกว่า การขยายพันธุ์โดยเมล็ดทั้งนี้เนื่องมาจากผลตอบแทนที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยเมล็ดขึ้นอยู่กับความผันแปรของ additive gene ในขณะที่การขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศมาจากความผันแปรของ gene ทั้งหมด คือ additivegene + non-additive gene (Biondi and Thrope, 1981)

3. การผลิตพืชปราศจากโรค (Disease-free plant)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้สำหรับการผลิตพืชปราศจากโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัสซึ่งยากแก่การกำจัดให้หมดไปจากชิ้นส่วนพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายยอด (apical meristem) หรือเนื้อเยื่อจากคัพภะ ซึ่งเป็นส่วนของพืชที่ปลอดไวรัสเนื่องจากการเคลื่อนย้ายของไวรัสไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของพืชจะอาศัยทางท่อน้ำ และท่ออาหาร แต่ในส่วนของปลายยอด และเนื้อเยื่อคัพภะไม่มีโครงสร้างเหล่านี้อยู่ พืชที่ปราศจากโรคนอกจากมีความแข็งแรงและให้ผลผลิตสูงขึ้นแล้วยังเหมาะสำหรับการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชอีกด้วย (ณัฏฐากร, 2552)

2.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ณัฏฐากร, 2552)

พืชต้องการธาตุอาหารเป็นปัจจัยหลักในขบวนการทำงานต่าง ๆ เพื่อเสริมสร้างการเจริญเติบโตเนื้อเยื่อพืชก็มีความต้องการธาตุอาหารในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน เนื้อเยื่อของพืชมีความต้องการปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตตามชนิดีหรือแม้แต่เนื้อเยื่อพืชที่มาจากส่วนที่ต่างกันเช่น เมล็ด ใบ ลำ ต้น ก็มีความต้องการปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันไปเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากมาย เพื่อให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด เช่น สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS)

1. สารอนินทรีย์ (Inorganic nutrient)

สารอนินทรีย์เป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นมากสำหรับการทำงานและการเจริญเติบโตของพืช เช่น แมกนีเซียม เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ ไนโตรเจน เป็นส่วนสำคัญของกรดอะมิโน เหล็ก สังกะสี และโมลิบดีนัม เป็นส่วนประกอบของเอ็มไซม์ พืชมีความต้องการธาตุอาหารแต่ละชนิดในปริมาณที่แตกต่างกันไป International Association for Plant Physiology ได้กำหนดไว้ว่า แร่ธาตุที่พืชต้องการในปริมาณที่มากกว่า 0.5 มิลลิโมลาร์ จัดเป็นแร่ธาตุอาหารหลัก (Macro หรือ Major element) ในขณะที่แร่ธาตุที่พืชต้องการเล็กน้อยในปริมาณที่น้อยกว่า 0.5 มิลลิโมลาร์ จัดเป็นแร่ธาตุอาหารรอง (Micro-element) ธาตุอาหารหลักเป็นแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ C H O N P K S Mg และ Ca และธาตุอาหารรองเป็นแร่ธาตุมีความสำคัญต่อขบวนการการทำงานของพืช ได้แก่ Fe Mn Cu Zn B และ Mo

2. สารอินทรีย์ (Organic nutrient)

สารอนินทรีย์ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) สารอินทรีย์สำคัญแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 วิตามิน (Vitamins) เนื้อเยื่อพืชต้องการวิตามินในปริมาณที่เพียงพอต่อการเสริมสร้างการเจริญเติบโต วิตามินที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ Thiamine (วิตามิน B1) Pyridoxine (วิตามิน B6) Nicotinic acid (วิตามิน B3) Calcium pantothenate (วิตามิน B5) และ Inositol

2.2 กรดอะมิโน (Amino acid) นิยมใช้คือ L-glycine กรดอะมิโนอื่นใช้บ้างในบางกรณีเช่น Glutamic acid และ Aspartic acid เป็นต้น

2.3 น้ำตาล (Sugar) น้ำตาลเป็นแหล่งที่ให้พลังงาน น้ำตาลที่นิยมใช้คือ Sucrose พืชบางชนิดเจริญได้ดีในน้ำตาล Glucose และ Fructose นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลชนิดอื่น เช่น Sorbite Maltose Galactose Mannose และ Lactose น้ำตาลที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ประมาณ 2 - 5 เปอร์เซ็นต์

2.4 สารอินทรีย์อื่น ๆ เป็นสารซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ของพืชซึ่งไม่รู้องค์ประกอบที่แน่นอน เป็นสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ มันฝรั่ง กล้วย สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth hormones หรือ Growth regulators) สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการกระตุ้น ยับยั้ง หรือเปลี่ยนแปลงขบวนการทางสรีระบางอย่างของพืช ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช การแบ่งเซลล์ การขยายตัวของเซลล์พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

3.1 Auxin สารในกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และยืดตัวของเซลล์ กระตุ้นการร่วงของใบ ยังยั้งการเจริญของตาข้าง (Apical dominance) กระตุ้นการเกิดราก และกระตุ้นการพัฒนาของท่อน้ำและท่ออาหาร (Vascular tissue differentiation) สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม Auxin มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น Naphthaleneacetic acid (NAA) Indole-3-butyric acid (IBA) และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

3.2 Cytokinins สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซลล์ การขยายตัวของเซลล์ (Cell enlargement) กระตุ้น ให้เกิดยอดกระจุกยับยั้งการเกิดตายอด สารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้ในงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ 6-Benzylaminopurine (BA) Isonentenyl adenine (2-IP) และ 6-Furfurylamino purine (Kinetin)

3.3 Gibberellins สารกลุ่มนี้มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ การพัฒนาของเมล็ด การงอกของเมล็ด กระตุ้นการออกดอกและติดผล Gibberellins ที่รู้จักกัน มีมากกว่า 20 ชนิด แต่ที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ GA_3 โดยปกติทั่วไปมักใช้ GA ร่วมกับ auxin และ cytokinin ชนิดอื่น

4. วุ้น เป็นเพียงส่วนที่ทำให้อาหารแข็ง หรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พอจะพยุงเนื้อเยื่อพืชไม่ให้จมอยู่ในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช (ณัฏฐากร, 2552)

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชนับว่าเป็นด่านแรกสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจากผ่านขั้นตอนการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชเรียบร้อยแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทำความสะอาดผิวให้ปลอดเชื้อก่อนจึงจะนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงต่อไปได้ ขั้นตอนเหล่านี้ต้องทำภายในสภาวะปลอดเชื้อ

2.3.1 สารฟอกฆ่าเชื้อ

ชิ้นส่วนพืชที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายชนิด ตั้งแต่ ดอก เมล็ด กล้า ตา ลำต้น ใบ ราก ไปจนถึงระดับของเซลล์ เนื้อเยื่อเหล่านี้มีความแข็งและอ่อนแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้ความทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อย่อมแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามประสิทธิผลของการฆ่าเชื้อบริเวณผิวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการคือ ชนิดของชิ้นส่วนพืชความสกปรกของชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันไปตามสภาพของชิ้นส่วนพืชและสภาวะแวดล้อม ชนิดและความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อตลอดจนระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงต้องเลือกวิธีการให้เหมาะสมกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา

1. ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อ น้ำยาที่ใช้สำหรับการทำความสะอาดบริเวณผิวมีด้วยกันหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแตกต่างกันไป

1.1 สารละลาย Hypochlorite ได้แก่ Sodium หรือ Calcium hypochlorite มีประสิทธิภาพดีกว่า สารฆ่าเชื้อชนิดอื่น การใช้สารละลาย Sodium hypochlorite ที่มีความเข้มข้น 0.3 - 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 15 - 30 นาทีสามารถฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อหลายชนิด

1.2 สารละลาย Mercuric chloride ในน้ำ หรือ แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำมาใช้ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชได้อย่างประสิทธิภาพ เช่น ตายอด ของพืชหลายชนิด เช่น ไม้ไผ่ เมล็ดไม้สน ซึ่งในกรณีของเมล็ดไม้สน สารละลาย Mercuric chloride ยังมีประสิทธิภาพในการเร่งเร้าขบวนการ imbibition และการงอกของเมล็ดอีกด้วย การใช้สารละลาย Mercuric chloride ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเมล็ดนั้น ประจุของปรอทจะถูกดูดซับไว้ที่เปลือกหุ้มเมล็ด (Seed coat) จึงต้องล้างประจุออก การล้างประจุออกต้องล้างด้วยสารละลาย Potussium chloride

การเตรียมสารน้ำ ยาฆ่าเชื้อ หลังจากที่ผสมน้ำยาลงในน้ำกล่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วควรผสมสารสำหรับลดแรงตึงผิว (Surfactant) ได้แก่ Triton–x Tween-80 หรือน้ำยาล้างจาน ประมาณ 2 - 3 หยด ในสารละลายที่เตรียมไว้สารลดแรงตึงผิวจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อให้ดียิ่งขึ้น โดยสารลดแรงตึงผิวจะช่วยลดแรงที่จับตัวกันของของโมเลกุลน้ำ ทำให้โมเลกุลน้ำกระจาย เพิ่มผิวสัมผัสระหว่างโมเลกุลของน้ำ และผิวของชิ้นส่วนพืชมีมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของ Nakka et al. (2021) การชักนำใบให้เกิดยอด นำใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งความเข้มข้น ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 2.21 - 17.75 ไมโครโมลาร์ หรือ BA ที่ความเข้มข้น 2.68 - 21.50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.53 - 4.30 ไมโครโมลาร์ โดยผลที่ได้คือ *Crotalaria medicaginea* มีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดยอดสูงสุดอยู่ที่ 87.3±0.07 ในอาหาร BA ความเข้มข้น 15.53 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดต่อต้นเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 8.4±0.04 ในอาหาร BA ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลาร์ และความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 3.4±0.62 เซนติเมตรในอาหาร BA ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลาร์ ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 2.15 ไมโครโมลาร์

จากการศึกษาของ Nakka et al. (2021) การชักนำยอดให้เกิดราก ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 2 4 7 9 และ 19 ไมโครโมลาร์ และ NAA ที่ความเข้มข้น 2 5 8 10 และ 21 ไมโครโมลาร์ เพื่อการชักนำราก

จากการศึกษาของ Nakka et al. (2021) สำหรับการชักนำราก ยอดที่มีความยาวต่ำกว่า 3.0 เซนติเมตร ไม่ได้มีการสร้างรากใด ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ยอดที่มีการเกิดรากบนอาหารที่ประกอบ IBA และ NAA ทุกความเข้มข้น โดยผลที่ได้คือ *Crotalaria medicaginea* มีเปอร์เซ็นต์การชักนำยอดให้เกิดรากสูงสุด 98.2±1.02 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนรากต่อยอดเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 3.2±1.64 ในอาหาร IBA ความเข้มข้น 9.84 ไมโครโมลาร์ IBA ให้ผลค่อนข้างดีกว่า NAA ในแง่ของเปอร์เซ็นต์ในการชักนำรากและอัตราการเกิดรากต่อยอด มีรายงานผลลัพธ์ที่คล้ายกันในต้น *Clematis gouriana* และ *Naravelia zeylanica* (Naika and Krishna, 2008)

จากการศึกษาของ Rao et al. (2017) ในงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานการตอบสนองในหลอดทดลองของเมล็ด ยอด และราก *Crotalaria hebecarpa* ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย Kn ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอด โดยมีความยาวยอดเฉลี่ย 9.23 เซนติเมตร ขณะที่ Zeatin ได้ยอดและรากมีความยาวเฉลี่ย 10 เซนติเมตร และ 7 เซนติเมตร ตามลำดับ พบยอดอ่อนจำนวนสูงสุดจากแคลลัสที่ BA (6-Benzyladenine) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.01 ยอด และที่ Kn ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดเฉลี่ย 5.45 ยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Seventhilingam et al. (2021) *Crotalaria longipes* เป็นพืชตระกูลถั่วเฉพาะถิ่นและใกล้สูญพันธุ์ของอินเดีย นำมาชักนำข้อให้เกิดยอด โดยนำข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย Thidiazuron (TDZ) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการชักนำยอดสูงสุด จากนั้นนำยอดที่ได้มาเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ บนอาหารชนิดเดียวกัน นำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตร ที่ประกอบด้วย indole-3-butyric acid (IBA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำราก

จากการศึกษาของ Seventhilingam et al. (2021) สำหรับการเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงให้วัดยอดอ่อนของพืช โดยวัดความยาว 30 - 45 เซนติเมตร ล้างให้สะอาด ใต้น้ำไหลเป็นเวลา 10 นาที เพื่อขจัดสิ่งสกปรกที่เกาะติดบนพื้นผิว ตัดส่วนยอดมา 2 - 3 เซนติเมตร ล้างด้วยสารละลายเดทตอล 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 นาที และล้างให้สะอาดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) ที่มี Tween-20 1 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ และฆ่าเชื้อขั้นสุดท้ายใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำมาศึกษาโดยการตัดแต่งและเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS

จากการศึกษาของ Town et al. (2008) ขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพและทำซ้ำได้สำหรับการขยายพันธุ์ *Crotalaria verrucosa* มีการสร้างยอดอ่อนจำนวนมากจากข้อใบเลี้ยงของต้นกล้าปลอดเชื้ออายุ 15 วัน บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ หรือ BA บันทึกจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.0 ยอดต่อข้อใบเลี้ยง และมีการเกิดยอด 93.3 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

จากการศึกษาของ Town et al. (2008) เก็บฝักแก่จากต้น *C.verrucosa* ปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัย Sri Venkateswara เมืองตีรูปาติ ประเทศอินเดีย นำเมล็ดออกจากเปลือกหุ้มจากนั้นล้างด้วยสารละลายน้ำยาล้างจาน 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นฆ่าเชื้อเมล็ดโดยการแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการแช่ในสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง เมล็ดจะถูกย้ายไปยังหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร แต่ละหลอดบรรจุอาหารแข็ง 15 มิลลิลิตร (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์) ปรับค่า pH ของอาหารเป็น 5.8 ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ หลอดเพาะเลี้ยงถูกบ่มที่ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสีขาวโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ และมีความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ นำต้นอ่อนอายุ 15 วันไปเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงและปลายยอดในหลอดขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร ที่มีอาหาร MS ที่มี TDZ หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพียงอย่างเดียว และร่วมกับออกซิน (IAA IBA และ NAA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

ผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea*) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 สารเคมี

1. ยากันรา (Carbendazim)
2. น้ำยาล้างจาน (Dish washer)
3. น้ำกลั่น (Distilled water)
4. น้ำประปา (Tap water)
5. น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
6. ผงวุ้น (Agar)
7. เซฟโฟแทกซีม (Cefotaxime)
8. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite; NaOCl)
9. เมอร์คิวริกคลอไรด์ (Mercuric chloride; $HgCl_2$)
10. สารจับใบ (Tweeen-20)
11. สารฆ่า/ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ รา และแบคทีเรีย (Plant Preservative Mixture; PPM)
12. แอมพิซิลลิน (Ampicillin)
13. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
14. อาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
15. สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรดด่าง
    15.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH)
    15.2 กรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid; HCl)
16. สารควบคุมการเจริญเติบโต
    16.1 กลุ่มออกซิน (Auxin) ได้แก่ กรดแนฟทาลีนแอซีติก (Naphthaleneacetic acid; NAA)
    16.2 กลุ่มไซโทไคนิน (Cytokinin) ได้แก่ เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-Benzylamino-purine; BA) ไคเนติน (Kinetin; Kn) และ ไทเดียซูรอน (Thidiazuron; TDZ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 เครื่องแก้ว และอุปกรณ์

1. กระบอกตวง (cylinder)
2. กระดาษทิชชู่ (tissue paper)
3. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture bottle)
4. ปากคีบ (forceps)
5. จานแก้ว (petri dish)
6. ช้อนตักสารเคมี (spatula)
7. ไซริงค์แก้ว (glass syringe: 50 mL)
8. ไซริงค์พลาสติก (plastic syringe: 10 mL)
9. ไมโครปิเปต (micropipette: 10 - 20 μL และ 20 - 200 μL)
10. ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip)
11. บีกเกอร์ (beaker)
12. ใบมีดผ่าตัดพร้อมด้ามมีดเบอร์ 11 และ 24 (scalpel no.11 and 24)
13. พาราฟิล์ม (parafilm)
14. แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์ (aluminium foil)
15. ฝาปิดขวดเพาะเลี้ยง (bottle cover)
16. ไฟแช็ค (lighter)
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
18. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (rack)
19. ถ้วยชั่งสาร (weighing boat)
20. เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper)

3.2.3 เครื่องมือ

1. เครื่องเขย่าสาร (shaker)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance)
3. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
4. เครื่องโอโซน (ozone generator)
5. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
6. ตู้เย็น (refrigerator)
7. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
8. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
9. ไมโครเวฟ (microwave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.3.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด

3.3.1.1 การชักนำเมล็ดให้เกิดยอด

คัดเลือกเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มมาฟอกฆ่าเชื้อผิวนอกด้วยเครื่องผลิตโอโซน 10 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ที่เติมเซโฟแทกซีม และ PPM ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ Tween-20 จำนวน 2 - 3 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนกระดาษทิชชูปลอดเชื้อให้แห้งภายในตู้ ปลอดเชื้อ จากนั้นจึงนำเปลือกหุ้มเมล็ดออก และวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด ได้แก่ BA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ Kn ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 3.1 เพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ Kn ต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอด

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น (มก./ล.)	
	BA	Kn
1	0.5	-
2	1	-
3	1.5	-
4	2	-
5	2.5	-
6	3	-
7	3.5	-
8	4	-
9	-	1
10	-	2
11	-	3
12	-	4
13	-	5
14	-	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

คำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดและข้อที่เกิดยอดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์เมล็ด/ข้อที่เกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ด/ข้อที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนเมล็ด/ข้อที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.2 การชักนำข้อให้เกิดยอด

คัดเลือกข้อที่แข็งแรงมาตัดเป็นรูปตัววาย (Y) ขนาด 2 - 2.5 เซนติเมตร นำมาล้างด้วยน้ำยาล้างจานจนทั่วชิ้นส่วน ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำประปา จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อผิวนอกด้วยเครื่องผลิตโอโซน 20 นาที แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าตลอดเวลา 10 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่เติมแอมพิซิลลิน เซโฟแทกซีม และ PPM ความเข้มข้นอย่างละ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ Tween-20 จำนวน 2 - 3 หยด เขย่าตลอดเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนกระดาษทิชชูปลอดเชื้อให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นจึงตัดบริเวณขอบที่ตายออก และวางลงบนอาหารอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ที่เสริมหรือไม่เสริมด้วย NAA ดังตารางที่ 3.2 เพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ที่เสริมหรือไม่เสริมด้วย NAA ต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอด

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น (มก./ล.)		
	BA	TDZ	NAA
1	0.5	-	0.5
2	1	-	0.5
3	2	-	0.5
4	3	-	0.5
5	-	0.5	0.5
6	-	1	0.5
7	-	2	0.5
8	-	3	0.5
9	0.02	-	-
10	0.1	-	-
11	0.2	-	-
12	0.4	-	-
13	-	0.02	-
14	-	0.1	-
15	-	0.2	-
16	-	0.4	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก

ทำการปรับสภาพโดยทำการตัดส่วนปลายยอดความยาว 2 - 3 เซนติเมตร วางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นครึ่งสูตรเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดมาตัดแคลลัสบริเวณฐานออก และวางลงบนอาหารอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 ดังตารางที่ 3.3 เพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ NAA ต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น (มก./ล.)	
	BA	NAA
1	0.5	-
2	1	-
3	1.5	-
4	-	0.5
5	-	1
6	-	1.5

คำนวณความยาวรากเฉลี่ยจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยอดที่เกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนยอดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

คำนวณค่าเฉลี่ยยอดที่เกิดรากจากสูตร

$$\text{ค่าเฉลี่ยยอดที่เกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนรากทั้งหมด}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโต

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของผักแว่นต้นเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ Kn ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเจริญของเมล็ดได้ดีกว่า Kn โดยมีการงอกของเมล็ด 85.71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงที่สุด (รูปที่ 4.1) ซึ่ง รองลงมาคือ BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอกของเมล็ด 57.14 เปอร์เซ็นต์ และพบยอดที่สูงที่สุดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความยาวยอดเฉลี่ย 34.88 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.2) อาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย Kn มีการงอกของของเมล็ด 14.29 - 21.43 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) โดย Kn ความเข้มข้น 1 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอกของเมล็ดสูงที่สุด 21.43 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ Kn ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสูงสุด 30.59 มิลลิเมตร โดยทุกเมล็ดมีจำนวนยอดเท่ากับ 1 ยอดต่อเมล็ด ลักษณะใบ เป็นใบประกอบแบบมีใบย่อย 3 ใบ รูปไข่กลับ (รูปที่ 4.3 – 4.4)

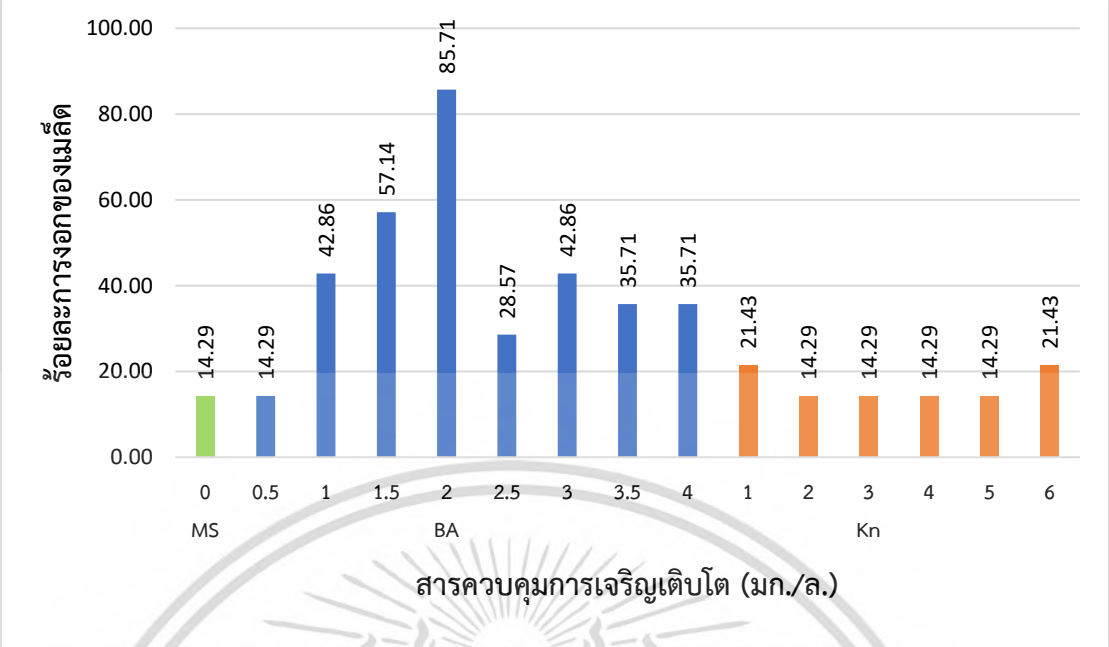
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการชักนำการเจริญเติบโตของเมล็ดผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

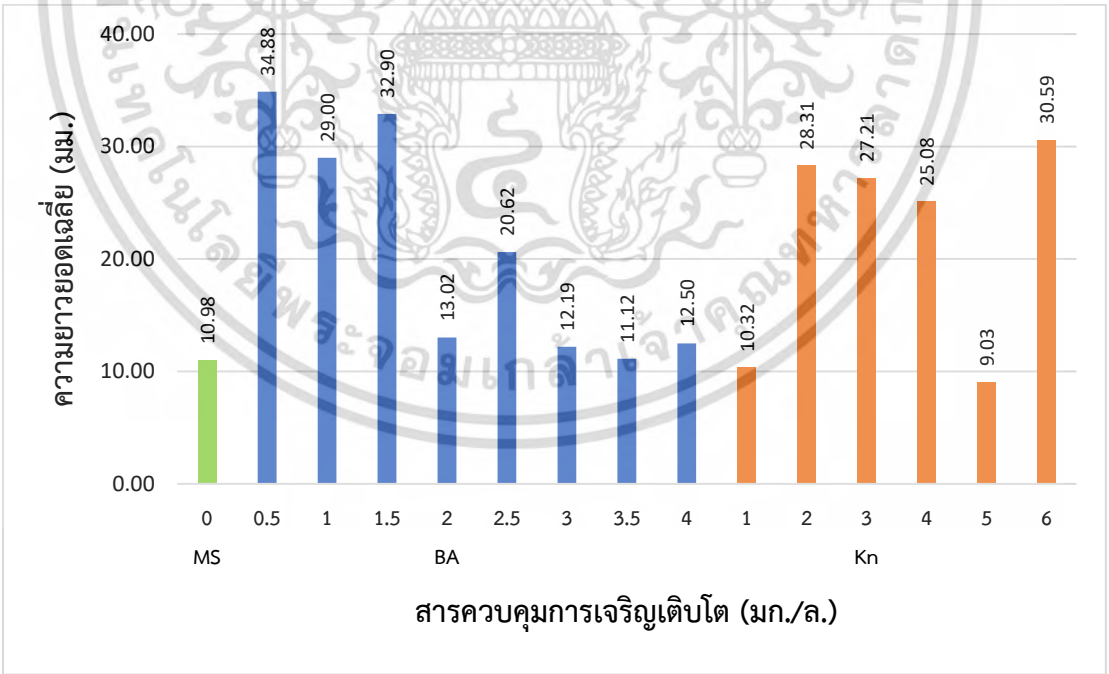
สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด[1]	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	แคลลัส	
				เกิด	ไม่เกิด
control	0	14.29	10.98		/
BA	0.5	14.29	34.88	/	
	1	42.86	29.00	/	
	1.5	57.14	32.90	/	
	2	85.71	13.02	/	
	2.5	28.57	20.62	/	
	3	42.86	12.19		/
	3.5	35.71	11.12	/	
	4	35.71	12.50	/	
Kn	1	21.43	10.32		/
	2	14.29	28.31		/
	3	14.29	27.21		/
	4	14.29	25.08		/
	5	14.29	9.03		/
	6	21.43	30.59		/

หมายเหตุ [1]/ ทำการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร 14 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

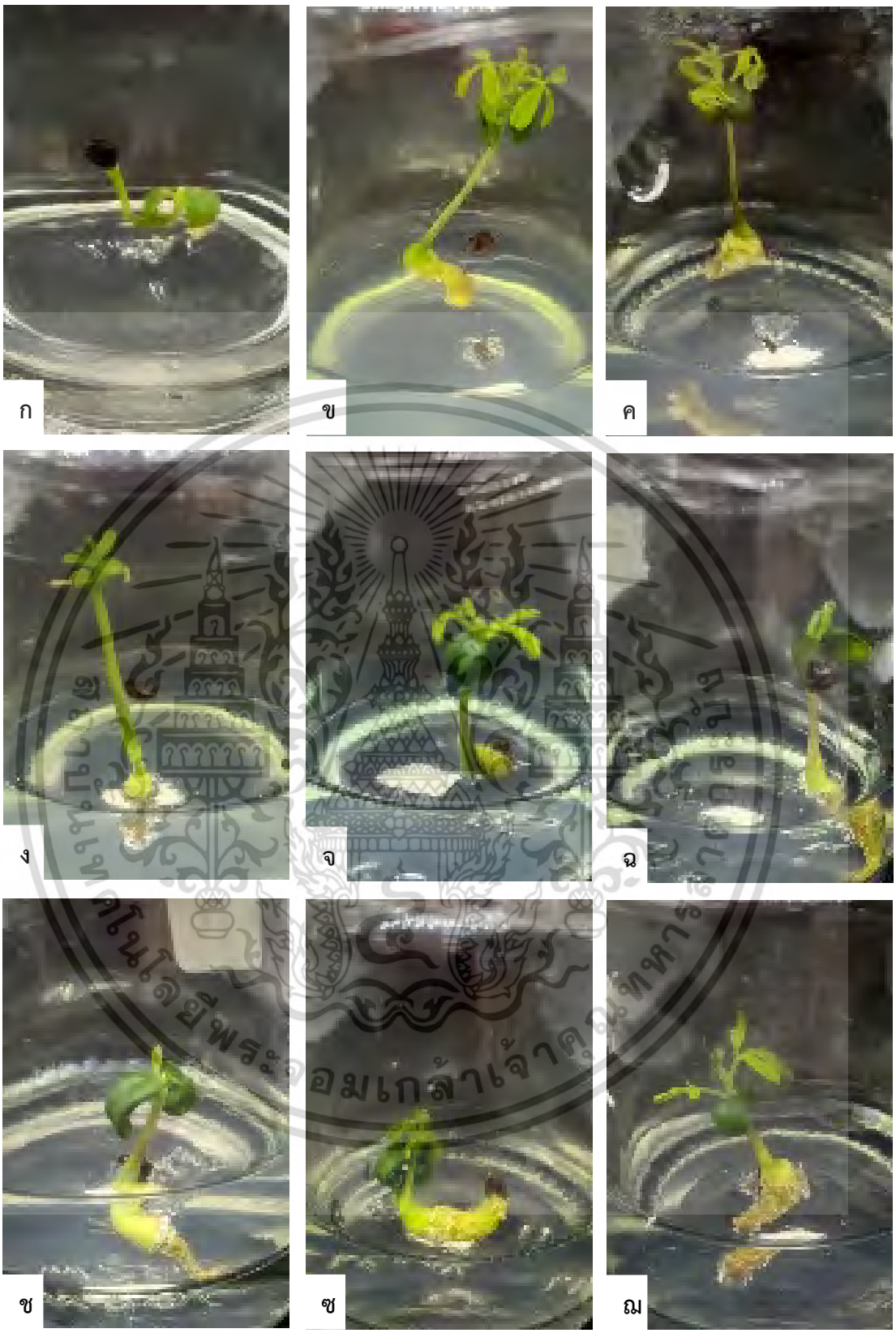


รูปที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ



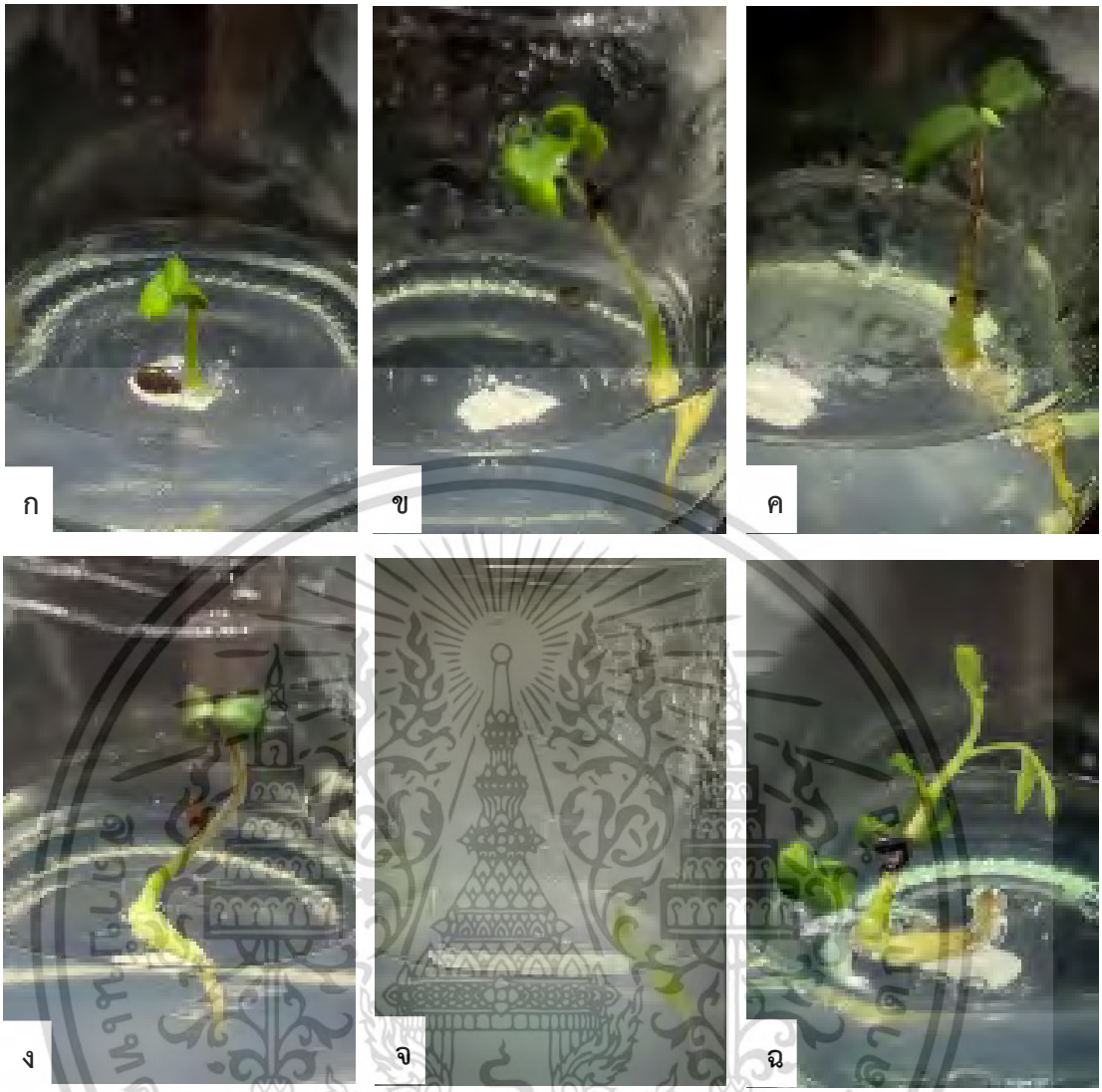
รูปที่ 4.2 แสดงความยาวยอดเฉลี่ยของเมล็ดผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะเจริญเติบโตของเมล็ดผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) และที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข - ฌ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะเจริญเติบโตของเมล็ดผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย Kn ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก - ฉ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ

จากการศึกษาพบว่า ในอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดสูงสุด 3 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.26 มิลลิเมตร ในอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 2 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ย 4.11 มิลลิเมตร และ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวน 1 ยอด มีความยาวยอด 1.08 มิลลิเมตร จากสูตรอาหารดังกล่าวพบข้อที่ชักนำให้เกิดยอดได้ 16.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) และ ในอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมาคือ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสูตรอาหารดังกล่าวพบการเกิดแคลลัส 16.67 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5)

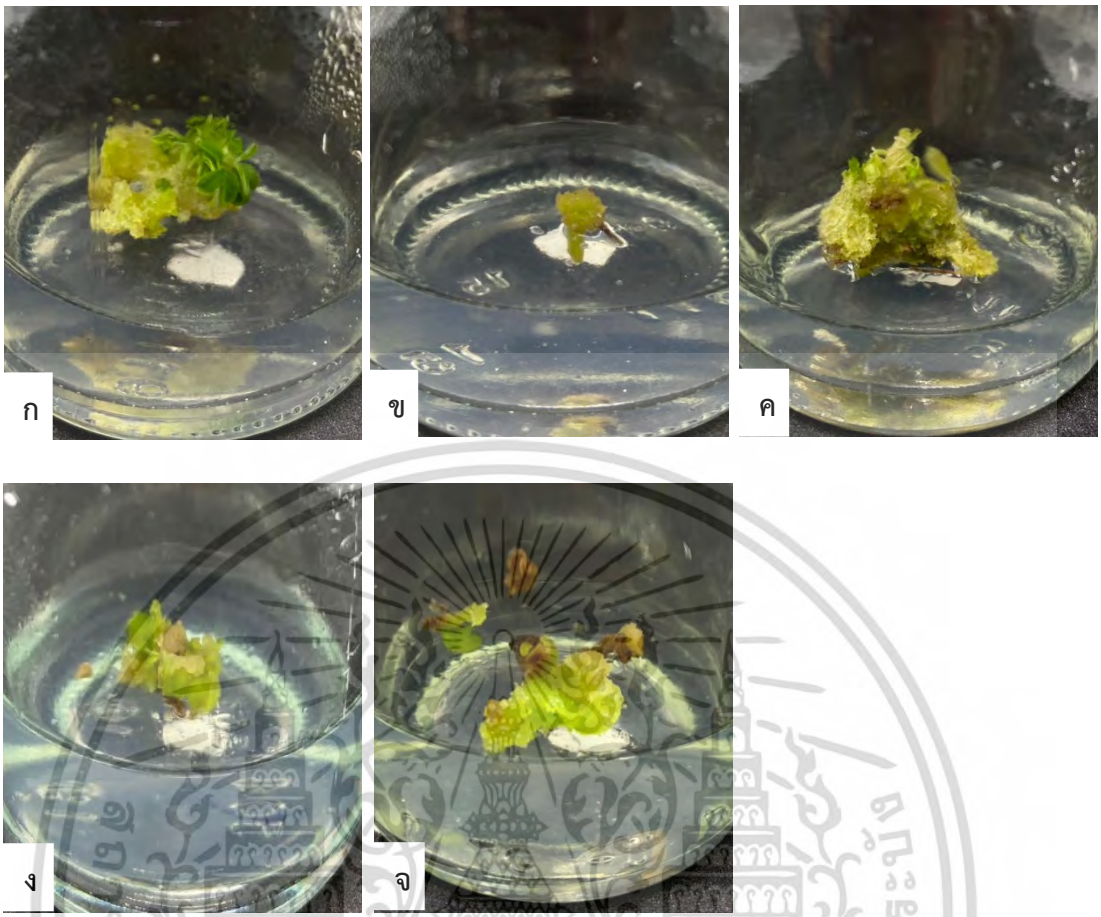
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาการชักนำข้อของผักแว่นต้นให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA หรือ TDZ ที่เสริมหรือไม่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้นต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต			**เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด**	**จำนวนยอดเฉลี่ย**	**ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)**	**แคลลัส**	
BA	TDZ	NAA				**เกิด**	**ไม่เกิด**
-	-	-	0.00				/
0.5	-	0.5	0.00				/
1	-	0.5	0.00				/
2	-	0.5	0.00				/
3	-	0.5	16.67	3	7.26	/	
-	0.5	0.5	0.00			/	
-	1	0.5	0.00				/
-	2	0.5	0.00				/
-	3	0.5	16.67	2	4.11	/	
0.02	-	-	0.00				/
0.1	-	-	16.67	1	1.08	/	
0.2	-	-	0.00				/
0.4	-	-	0.00				/
-	0.02	-	0.00				/
-	0.1	-	0.00			/	
-	0.2	-	0.00				/
-	0.4	-	0.00				/

หมายเหตุ [1]/ ทำการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร 6 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
(ก) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA และ NAA ความเข้มข้น 3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ข) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ และ NAA ความเข้มข้น 3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ง) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
(จ) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดราก

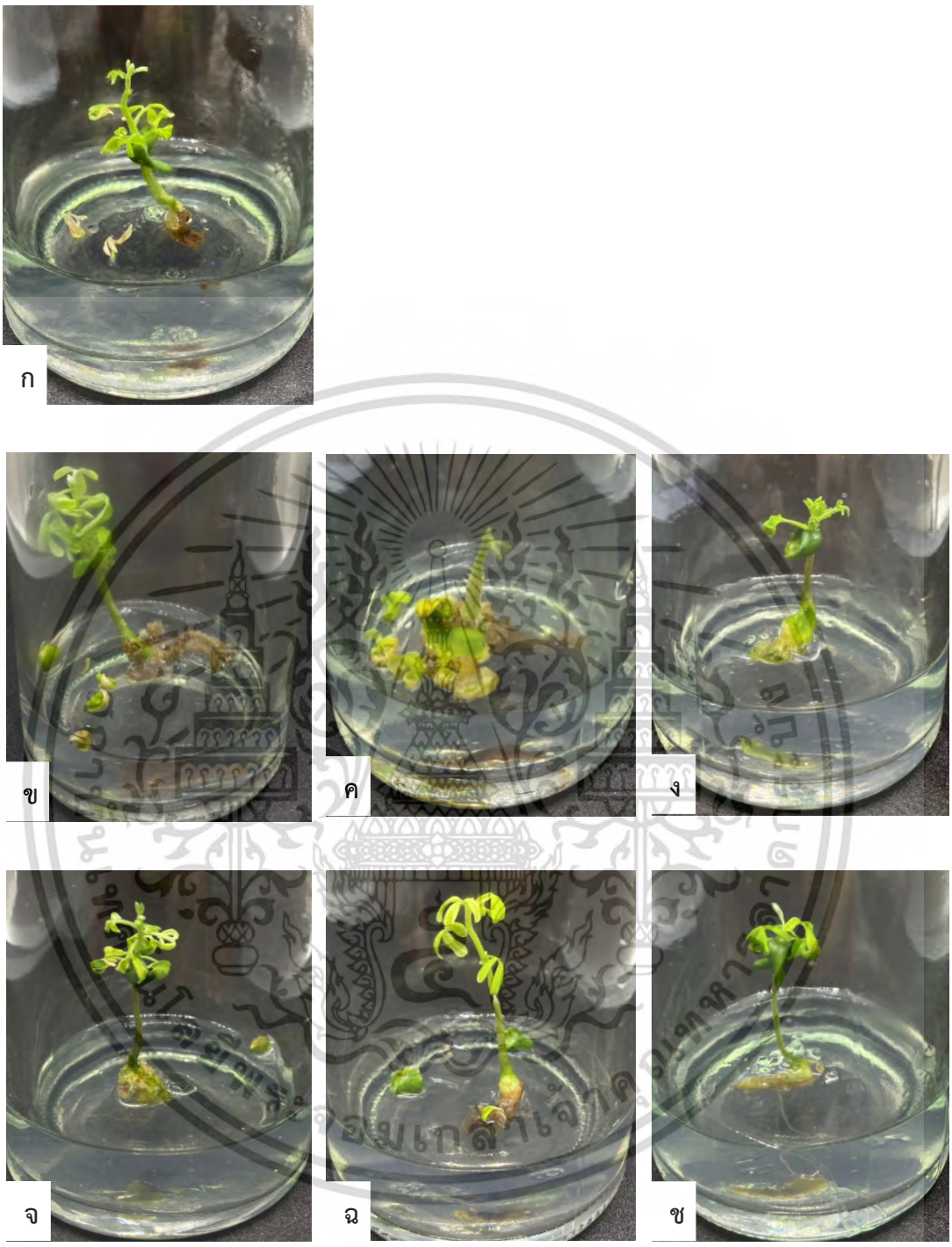
จากการศึกษาการชักนำให้เกิดรากของผักแว่นต้นพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากัน ซึ่งเท่ากับ 18.18 เปอร์เซ็นต์ และความยาวรากเฉลี่ยใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 17.51 และ 17.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 9.09 เปอร์เซ็นต์ และความยาวรากเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 10.24 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการชักนำรากของผักแว่นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตรที่ประกอบด้วย NAA หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	ความยาวรากเฉลี่ย (มม.)	แคลลัส	
				เกิด	ไม่เกิด
0 (control)		9.09	5.49	/	
NAA	0.5	18.18	17.51		/
	1	18.18	17.26		/
	1.5	0.00	0.00	/	
BA	0.5	0.00	0.00	/	
	1	9.09	10.24		/
	1.5	0.00	0.00	/	

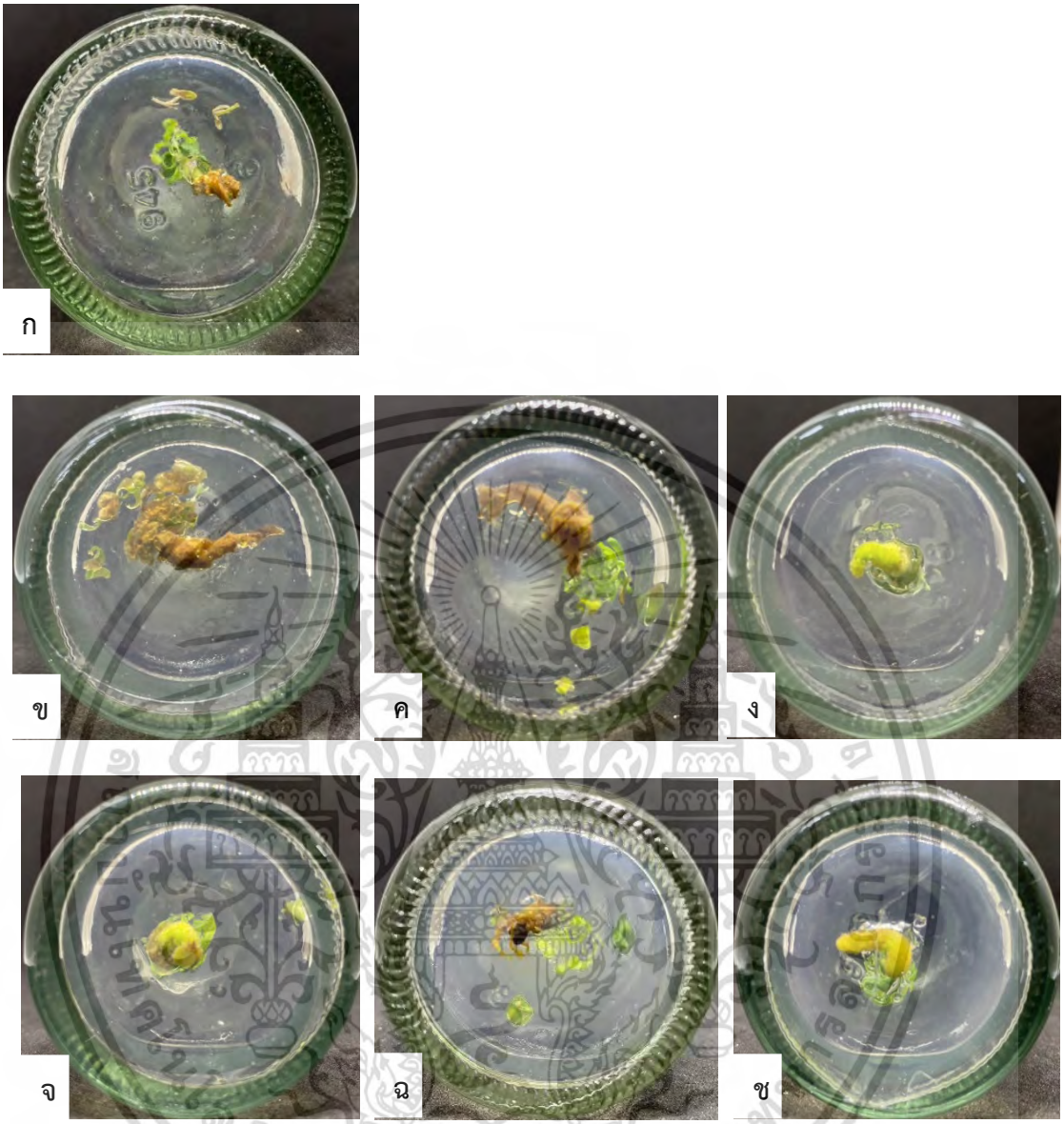
หมายเหตุ ทำการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร 11 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญของรากผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข – ง) ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ - ช)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะรากของผักแว่นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข – ง) ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ - ช)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ผลการศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโต

เมล็ดผักแว่นต้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 85.71 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเมล็ดที่งอกจำนวน 12 เมล็ดจากเมล็ดที่ทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 14 เมล็ด บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบยอดที่มีความยาวเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 34.88 มิลลิเมตร ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ที่ความเข้มข้น 1 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดเท่ากับ 21.43 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 30.59 มิลลิเมตร

5.1.2 ผลการศึกษาการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ

อาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดจำนวนสูงสุด 3 ยอด รองลงมาได้แก่ อาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดจำนวนสูงสุด 2 ยอด และ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดจำนวนสูงสุด 1 ยอด จากสูตรอาหารดังกล่าวพบการเกิดยอดสูงสุดจากข้อจำนวน 1 ข้อ จากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 6 ข้อ คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์

อาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมาคือ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสูตรอาหารดังกล่าวพบการเกิดแคลลัสสูงสุดจากข้อจำนวน 1 ข้อ จากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 6 ข้อ คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดราก

ยอดของผักแว่นต้นถูกชักนำให้เกิดรากได้ดีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้นครึ่งสูตร ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากได้ 18.18 เปอร์เซ็นต์ จากยอดที่เกิดรากจำนวน 2 ยอดจากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 11 ยอด โดยมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 17.51 และ 17.26 มิลลิเมตรตามลำดับ และในอาหารที่ประกอบด้วย BA เกิดรากสูงสุดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากได้ 9.09 เปอร์เซ็นต์จากยอดที่เกิดรากทั้งหมด 1 ยอด จากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 11 ยอด โดยมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 10.24 มิลลิเมตร และยอดที่ไม่เกิดรากมีแคลลัสสีเขียวอ่อนขนาดไม่ใหญ่มากเกิดขึ้นบริเวณส่วนฐานของยอด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

5.2.2 ควรศึกษาเพิ่มเติมในชิ้นส่วนอื่นของผักแว่นต้น เช่น ส่วนใบนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสเพื่อนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำยอดต่อ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิดยอดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2559. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

ณัฏฐากร เสมสันทัด. 2552 คู่มือการฝึกอบรมหลักสูตรการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธ์ไม้ป่า. กลุ่มงานวนวัฒนวิจัยสำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

Andrella, G. C., Atahuachi Burgos, M., Bagnatori Sartori, Â. L., Balan, A., Bandyopadhyay, S., Barbosa Pinto, R., Barrett, R. L., Boatwright, J. S., Borges, L. M., Broich, S. L, Brullo, S., Bruneau, A, Cardinal-McTeague, W., Cardoso, D., Castro Silva, I. C., Cervantes, A., Choo, L. M., Clarke, R., Cobra e Monteiro, T., ... Zhang, R. 1786. The world checklist of vascular plants (WCVP): Fabaceae. Encycl. 2: 201

Biondi, S. and Thorp, T. A. 1981. Clonal propagation of forest tree spices in proceedings of the international symposium. Singapore. National University of Singpore. p. 197-206

Bonga, J. M. 1982a. Tissue culture technique. In. Bonga, J. M. and Durzan, D. J. (Eds). Tissue culture in forestry. The Hague. Martinus Nijholl / Dr. W. Junk Publishers. p. 4-35

Bonga, J. M. 1982b. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In. Bonga, J. and Durzan, D. J. (Eds). Tissue culture in forestry. The Hague. Martinus Nijholl / Dr. W. Junk Publishers. p. 387-412.

Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K. and Bisaria, V. S. 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 7: 138-149.

Gavinlertvatana, P., Matheson, A. C. and Sim, E. P. 1987 Feasibility study on tissue culture for multipurpose forest tree species. Bangkok. Winrock International.

Hussain, T. M., Chandrasekhar, T. and Gopal, G. R. 2008. In vitro propagation of *Crotalaria verrucosa* L. an important ethnobotanical plant. Journal of Medicinal Plants Research. 2(9): 242-245.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum. 15(3): 473–497.

Naidu, K. C. and Pullaiah, T. 2003. Antidiabetic plants in India and herbal based antidiabetic research. New Delhi. Regency Publication.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Naika, H. R. and Krishna, V. 2008a. Plant regeneration from callus culture of Clematis gouriana Roxb.–A rare medicinal plant. Turkish Journal of Biology. 32(2): 99-103.

Naika, H. R. and Krishna, V. 2008b. Micropropagation, isolation and characterization of berberine from the leaves of *Naravelia zeylanica* (L.) DC. Research Journal of Medicinal Plant. 2: 1-9.

Nakka, S. and Devendra, B. N. 2021. A rapid in vitro propagation and estimation of secondary metabolites for in vivo and in vitro propagated Crotalaria species, a Fabaceae member. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2(3): 897-916.

Ninkaew, S., Balslev, H. and Chantaranothai, P. 2018. Crotalaria L. In. K. Chayamarit and Balslev, H. (Eds). Flora of Thailand. 4(3.1): 260 – 261.

Nuhu, H., Abdurrahman, E. M. and Shok, M. 2009. Ethnomedical studies of Crotalaria species found in Zaria, northern Nigeria. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences. 8(2): 46-53.

Rao, A. S., Saheb, S. B., Hanoon, L. K., and Mallikarjuna, K. 2017. In vitro response of *Crotalaria hebecarpa* (DC.) Rudd. World Journal of Pharmaceutical Research. 6(8): 1305-1314.

Seventhilingam, K., Selvam, H. and Kalaivanan, B. V. 2021. Micropropagation and clonal fidelity assessment of acclimatized plantlets of *Crotalaria longipes* Wight & Arn. using ISSR markers. Vegetos. 34: 325-331.

Town, M. H., Thummala, C., and Ghanta, R. G. 2008. In vitro propagation of *Crotalaria verrucosa* L. an important ethnobotanical plant. Journal of Medicinal Plants Research. 2(9): 242-245.

Williams, R. J. 1983. Tropical legumes. In. Mcivor, J.G. and Bray, R.A. (Eds). Genetic resources of forage plants. Australia. The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. p. 17–37.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS (Murashige and Skoog, 1962)

	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก		
	NH_4NO_3	1,650
	KNO_3	1,900
	$CaCl_2•2H_2O$	440
	$MgSO_4•7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
ธาตุอาหารรอง		
	$MnSO_4•4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4•5H_2O$	8.6
	H_3BO_3	6.2
	KI	0.33
	$Na_2MoO_4•2H_2O$	0.25
	$CuSO_4•5H_2O$	0.025
	$CoCl_2•H2O$	0.025
เหล็ก		
	$Na_2EDTA•2H_2O$	37.25
	$FeSO_4•7H_2O$	27.85
วิตามินและสารอินทรีย์		
	Myo-Inosital	100
	Nicotinic acid	0.5
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Glycine	2.0
	Thiamine-HCl	0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ชั่งอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้น 4.43 หรือ 2.205 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาละลายน้ำปริมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่ต้องการ

2. ปรับปริมาตรอาหารให้ได้ตามปริมาตรอาหารที่ต้องการ

3. แบ่งอาหารใส่บีกเกอร์ตามจำนวนความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต้องการ

4. ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต้องการทดสอบในการทดลองต่าง ๆ โดยคำนวณปริมาตรของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต้องเติมลงในอาหารในแต่ละความเข้มข้น จากสูตรดังต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

หรือ ปริมาตรที่ใช้ = $\frac{\text{ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม} \times \text{ปริมาตรอาหารทั้งหมด}}{\text{ความเข้มข้นจาก stock เริ่มต้น}}$

5. ดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตจาก stock เติมลงในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรอาหารให้ได้ตามปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียมในแต่ละความเข้มข้น

6. นำอาหารไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 5.7 - 5.8

7. เติมผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารแต่ละบีกเกอร์ แล้วทำการละลายวุ้นด้วย ไมโครเวฟ นาน 1 - 3 นาที

8. แบ่งใส่ขวดแก้วที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริมาตร 10 - 20 มิลลิลิตร

9. นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

10. นำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยง นาน 2 - 3 วัน เพื่อสังเกตการณ์ปนเปื้อนในอาหารก่อนการนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 30 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว นนต์นันท์ รานอก รหัสประจำตัว 62050494
นางสาว เบญญาฤทธิ์ นาคงาม รหัสประจำตัว 62050510

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.)

ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of plant growth regulators for *Crotalaria medicaginea* Lam. by tissue culture

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 7.79% หรือโปรแกรม Turnitin -

ลงชื่อ.....นนต์นันท์ รานอก.....
(นางสาว นนต์นันท์ รานอก)
นักศึกษา

ลงชื่อ.....เบญญาฤทธิ์ นาคงาม.....
(นางสาว เบญญาฤทธิ์ นาคงาม)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....
(รศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้