

# ปัญหาพิเศษ

## เรื่อง

การทดสอบเครื่องมือและอาหารแบบง่ายเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช  
(Testing of Simple Equipments and Media for Plant Tissue Culture.)

โดย  
นายสุรชัย ปุสสงษ์

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.สุเม อรัญนารถ

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

## ปัญหาพิเศษ

### เรื่อง

การทดสอบเครื่องมือและอาหารแบบง่าย เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

Testing of Simple Equipments and Media for Plant Tissue Culture.



T096874

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์ แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปพ.

พุทธศักราช 2540

ศ 847 ก

2540

เลขหมู่

96874

เลขทะเบียน

วันเดือนปี

5 Jun 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1722

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี  
ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การทดสอบเครื่องมือและอาหารแบบง่าย เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช  
Testing of Simple Equipments and Media for Plant Tissue Culture.

โดย  
นาย สุรชัย ปุสสงวนษ์

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

(ผศ.ดร. สุม อรัญนารถ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

(ผศ.ดร. สมชาย กล้าหาญ)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ เดือน พ.ศ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Title** : **Testing of Simple Equipments and Media for Plant Tissue Culture.**

**By** : **Mr. Surachai Pusswonge.**

**Advisor** : **Assist. Prof. Dr. Sumay Arunyanart.**

**Department** : **Horticulture**

**Faculty** : **Agricultural Technology**

### **Abstract**

The modified air flow cabinet from fish tank, air purifier and pressure cooker were tested for simple equipments of plant tissue culture. The simple media of Bridgen and Brand media was examined for african violet and OD(1987) media was quantified for orchid. The results showed that the modified equipment was not significantly different from the laminar-air flow cabinet and autoclave. On the other hand, african violet was not developed on Bridgen and Brand media whereas orchid seed slightly grew on OD(1987) media when compared to Vacin and Went(1949) medium which performed good development.

## คำนิยาม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์ โดยได้รับคำปรึกษา คำแนะนำ และการสนับสนุนจากบุคคลหลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผศ.ดร. สุเมธ อรัญนารถ ที่ได้ให้แนวความคิดในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ ทั้งยังให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดการทำงานที่ผ่านมา ไม่ว่าจะเป็นการให้คำปรึกษา ชี้แนะวิธีการแก้ปัญหา และตรวจตราแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนกระทั่งปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และที่สำคัญท่านเป็นผู้ให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ พี่จินดา พร้อมวิหาร สถานีทดลองพืชสวนบางกอกน้อย ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนได้ให้ความอนุเคราะห์ที่พักกล้วยไม้ ที่ข้าพเจ้านำมาใช้ทำการทดลองจนสำเร็จ

ขอขอบคุณภาควิชาพืชสวน ที่ได้เป็นแหล่งศึกษาหาความรู้ของข้าพเจ้าตลอดมาเป็นระยะเวลา 4 ปี และได้ให้ข้าพเจ้าได้ใช้เป็นที่ในการทำปัญหาพิเศษจนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณบุคคลอีกหลายท่าน ที่ได้ให้คำปรึกษาแก่ข้าพเจ้า อีกทั้งให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษมาโดยตลอด และขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ และผู้ปกครอง ที่ได้ให้ความอุปการะ ดูแล และให้ความสนับสนุนเรื่อยมาจนข้าพเจ้าได้เป็นบัณฑิตในวันนี้

สุรชัย นุสสงวนย์

เมษายน 2541

(ก)

## สารบัญ

| เรื่อง              | หน้า |
|---------------------|------|
| สารบัญตาราง         | (ข)  |
| สารบัญตารางภาคผนวก  | (ค)  |
| สารบัญภาพ           | (ง)  |
| คำย่อที่ใช้ในรายงาน | 1.   |
| คำนำ                | 2.   |
| การตรวจเอกสาร       | 3.   |
| อุปกรณ์และวิธีการ   | 12.  |
| ผลการทดลอง          | 22.  |
| วิจารณ์ผลการทดลอง   | 31.  |
| สรุปผลการทดลอง      | 34.  |
| เอกสารอ้างอิง       | 35.  |
| ภาคผนวก             | 37.  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

|  | หน้า |
|--|------|
| <b>ตารางที่ 1</b> ผลการทดสอบตู้ย้ายชิ้นส่วนพีซัดแปลง.....  | 22.  |
| <b>ตารางที่ 2</b> แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน<br>ในชิ้นส่วนแอฟริกันไวโอเลต ในระยะเวลา 6 สัปดาห์.....   | 24.  |
| <b>ตารางที่ 3</b> แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การตาย<br>ในชิ้นส่วนแอฟริกันไวโอเลตจนถึงสัปดาห์ที่ 9.....  | 24.  |
| <b>ตารางที่ 4</b> แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อจำนวนยอดของ<br>แอฟริกันไวโอเลต เมื่ออายุ 9 สัปดาห์.....   | 25.  |
| <b>ตารางที่ 5</b> แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน<br>ในชิ้นส่วนเมล็ดกล้วยไม้ช้างกระ ในระยะเวลา 6 สัปดาห์.....  | 26.  |
| <b>ตารางที่ 6</b> แสดงผลของอุปกรณ์และอาหารต่อจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียว<br>ของเมล็ดกล้วยไม้ช้างกระ เมื่ออายุ 10 สัปดาห์.....   | 26.  |
| <b>ตารางที่ 7</b> แสดงผลของอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในชิ้นส่วน<br>เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ ในระยะเวลา 6 สัปดาห์.....   | 27.  |
| <b>ตารางที่ 8</b> แสดงผลของอาหาร Vacin and Went และอาหารดัดแปลง OD<br>ต่อจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียว และจำนวนยอด จากการเพาะเลี้ยง<br>เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เป็นเวลา 18 สัปดาห์..... | 28.  |

## สารบัญตารางภาคผนวก

| ตารางภาคผนวกที่  | หน้า |
|--|------|
| 1. สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)<br>(สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลต).....  | 38.  |
| 2. สูตรอาหาร Vacin and Went (1994)<br>(สำหรับเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้).....   | 39.  |
| 3. สูตรอาหารดัดแปลงของ Bridgen and Brand<br>(สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลต).....   | 40.  |
| 4. สูตรอาหารดัดแปลง OD (1987)<br>(สำหรับเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้).....  | 40.  |
| 5. ส่วนประกอบของสารเคมีในยา Lipochol 1 เม็ด.....   | 41.  |
| 6. การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอุปกรณ์และอาหาร ต่อการเกิดยอดของ<br>แอฟริกันไวโอเลต เมื่อมีอายุ 9 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูลแบบ $\log x+1$ .....                      | 42.  |
| 7. การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอุปกรณ์และอาหารต่อการเกิด โพรโตคอร์ม<br>สีเขียวของเมล็ดกล้วยไม้ข้างกระเมื่อมีอายุ 10 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูล<br>แบบ $\log x$ ..... | 42.  |
| 8. การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอาหารต่อการเกิด โพรโตคอร์มสีเขียวของ<br>เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เมื่อมีอายุ 18 สัปดาห์.....   | 43.  |
| 9. การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอาหาร ต่อการเกิดยอดของ<br>เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เมื่อมีอายุ 18 สัปดาห์.....   | 43.  |
| 10. การวิเคราะห์ทางสถิติผลของอุปกรณ์และอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน<br>ในชิ้นส่วนของ แอฟริกันไวโอเลต ภายใน 6 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูล<br>แบบ $\arcsine$ .....  | 44.  |

## สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

| ตารางภาคผนวกที่  | หน้า |
|--|------|
| 11. การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอุปกรณ์และอาหาร ต่อเปอร์เซ็นต์การตาย<br>ในชิ้นส่วนของ แอฟริกันไวโอเล็ต ภายใน 6 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูล<br>แบบ arcsine.....        | 44.  |
| 12. การวิเคราะห์ทางสถิติผลของอุปกรณ์และอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน<br>ในชิ้นส่วนของเมล็ดกล้วยไม้ ช้างกระ ภายใน 6 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูล<br>แบบ arcsine..... | 45.  |
| 13. การวิเคราะห์ทางสถิติผลของอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในชิ้นส่วนของ<br>เมล็ดกล้วยไม้เขากะ ภายใน 6 สัปดาห์โดยการแปลงข้อมูลแบบ arcsine.....                   | 45.  |

## สารบัญภาพ

|   | หน้า |
|---|------|
| <b>ภาพที่ 1</b> แสดงลักษณะของหม้อหุงอาหารความดัน (Pressure cooker).....   | 14.  |
| <b>ภาพที่ 2</b> แสดงลักษณะด้านหน้าของตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงเมื่อประกอบเสร็จ.....                                | 14.  |
| <b>ภาพที่ 3</b> แสดงลักษณะด้านข้างของตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงเมื่อประกอบเสร็จ.....                                | 15.  |
| <b>ภาพที่ 4</b> แสดงตำแหน่งของเครื่องฟอกอากาศที่ประกอบเข้ากับตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงเมื่อประกอบเสร็จ.....        | 15.  |
| <b>ภาพที่ 5</b> แสดงลักษณะชิ้นส่วนตายของเนื้อเยื่อแอฟริกัน ไวโอเลต .....  | 29.  |
| <b>ภาพที่ 6</b> แสดงลักษณะขอดที่เกิดบนชิ้นส่วนของแอฟริกัน ไวโอเลต เมื่ออายุ 9 สัปดาห์..                         | 29.  |
| <b>ภาพที่ 7</b> แสดงลักษณะโปรโตคอร์รมที่มีสีเขียว จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เมื่ออายุ 18 สัปดาห์..... | 30.  |
| <b>ภาพที่ 8</b> แสดงลักษณะขอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะเมื่ออายุ 18 สัปดาห์.....                | 30.  |

## คำย่อที่ใช้ในรายงาน

|              |  |
|--------------|--|
| ซม.          | เซนติเมตร                                  |
| BA,BAP       | 6-Benzylaminopurine                        |
| g/l          | gram per liter                             |
| HEPA         | High-efficiency particulate air            |
| M            | Mole                                       |
| $\mu$ M      | micromole                                  |
| mg           | milligram                                  |
| mg/l         | milligram per liter                        |
| MS           | Murashige and Skoog (1962)                 |
| N            | Normality                                  |
| NAA          | OC- Naphthalene acetic acid                |
| OD           | อาหารดัดแปลงของ ดร. อรดี สหวัชรินทร์(2538) |
| PDA          | Potato dextrose agar                       |
| SH           | Schenk and Hildebrandt (1972)              |
| UV           | Ultraviolet light                          |
| V&W          | Vacin and Went (1949)                      |
| $^{\circ}$ C | องศาเซลเซียส                               |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การทดสอบเครื่องมือและอาหารแขนง่าย เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

### Testing of Simple Equipments and Media for Plant Tissue Culture.

#### คำนำ

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เป็นวิธีการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้พืชเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น โดยเฉพาะในพืชที่ขยายพันธุ์ได้ยาก เพื่อการผลิตพันธุ์ที่ปลอดโรค และ ใช้ในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ๆ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกับต้นพ่อแม่ และมีความสมบูรณ์ใกล้เคียงกัน (Taji, 1996)

ในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่เป็นที่แพร่หลายนัก แม้ว่าในประเทศไทยจะมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาเข้าหลักสูตรในระดับมหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 และนำเข้ามาอยู่ในหลักสูตรระดับมัธยมศึกษาในปี พ.ศ. 2533 (อรดี, 2538) แต่ยังเป็นที่ยุ้จักและนำมาใช้ในวงแคบ เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการปฏิบัติงาน การศึกษาหาความรู้และวัสดุอุปกรณ์ค่อนข้างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุปกรณ์ที่มีความจำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบางชิ้นมีราคาสูง เช่น ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar-air flow cabinet) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) สารเคมีและฮอร์โมนพืชที่ใช้ในการประกอบอาหาร เป็นต้น ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการศึกษาและนำมาใช้ในบางสถานที่เท่านั้น เช่น อุตสาหกรรมไม้ดอกไม้ประดับขนาดใหญ่ สถานที่ราชการโดยเฉพาะมหาวิทยาลัย เป็นต้น หากอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีราคาไม่สูง ความสามารถในการศึกษาและเผยแพร่เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีมากขึ้น ผู้ที่สนใจสามารถจัดหาอุปกรณ์ต่างๆ นำมาใช้ในศึกษาและทำการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ด้วยตนเอง

สำหรับงานทดลองนี้ ได้ดัดแปลงอุปกรณ์ทั่วไปให้ม้การทำงานเหมือนกับอุปกรณ์ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยอุปกรณ์ที่นำมาดัดแปลงเป็นอุปกรณ์ที่หาได้ง่ายและมีราคาไม่สูงนัก เพื่อทดสอบความสามารถในการทำงาน หากอุปกรณ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับอุปกรณ์ที่ใช้ภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะเป็นประโยชน์ต่อการเผยแพร่ความรู้และใช้ประโยชน์ได้ในกาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

## การตรวจเอกสาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็น อวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล ไรโบฟลาวิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อ จุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะที่ควบคุมสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น (อรดี, 2538) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้กลายเป็นวิธีการค้าที่รวดเร็วในการขยายพันธุ์พืชพันธุ์ใหม่ พันธุ์ที่หายาก และพืชพวกที่ทำการขยายพันธุ์ได้ยาก และในปัจจุบันมีความต้องการเทคนิคการขยายพันธุ์โดยใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็กมากยิ่งขึ้น (Bridgen and Bartok. 1996)

หลักการที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ตัดชิ้นส่วนของพืชที่สะอาด นำมาเลี้ยงในขวดแก้วที่บรรจุอาหารวิทยาศาสตร์ที่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเซลล์จากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยงได้รับ แร่ธาตุ ไรโบฟลาวิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาล จากอาหารวิทยาศาสตร์ที่ใช้เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจะมีการเจริญเติบโต (อรดี, 2538) สภาพที่ปลอดเชื้อมีความจำเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากชิ้นส่วนพืชใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเป็นเวลานาน และอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสามารถทำให้เชื้อโรคมีการเจริญเติบโตซึ่งก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรคได้ (Street, 1973) เพราะฉะนั้นการรักษาสภาพแวดล้อมให้สะอาดปราศจากเชื้อโรคในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งและไม่ควรละเลย (Dodds and Roberts, 1995)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอุปกรณ์ในการทำงานหลายชิ้น Dixon and Gonzales (1994) ได้กล่าวถึงอุปกรณ์ที่สำคัญในการทำงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรประกอบด้วย

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH- meter)
2. เครื่องชั่งสาร (Chemical balance)
3. เครื่องแก้ว สำหรับการเตรียมอาหาร
4. ภาชนะใส่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น จานแก้ว ขวดแก้ว ขวดรูปชมพู่ เป็นต้น
5. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) สำหรับการนึ่งฆ่าเชื้อ
6. ตู้กรองอากาศ (Laminar-air flow hood) สำหรับการทำเทคนิคปลอดเชื้อ
7. เครื่องเขย่า สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว
8. ห้องควบคุมอุณหภูมิ หรือ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ในระดับอุณหภูมิ  $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 9. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความคุมทำงานด้วยเครื่องตั้งเวลา

Taji (1996) ได้กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นงานอดิเรก หรือ เพื่องานสวนภายในบ้าน สามารถทำได้โดยการนำเอาอุปกรณ์ภายในบ้านมาดัดแปลงเพื่อใช้ทำงานแทนอุปกรณ์ที่มีราคาแพงได้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับการทำเทคนิคปลอดเชื้อ สามารถใช้ตู้เลี้ยงปลาหรือตู้กระจกที่ด้านข้างมี ความยาว 50 ซม. ความสูง 40 ซม. และความลึก 40 ซม. ดัดแปลงใช้เป็นตัวสำหรับการทำเทคนิคปลอดเชื้อได้
2. หม้อตุ๋นอาหารความดัน(Pressure cooker) ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร และ อุปกรณ์ต่างๆ
3. ขวดแก้วพร้อมฝาปิดที่สามารถทนความร้อนในหม้อตุ๋นอาหารความดัน เช่น ขวดอาหารเด็ก ขวดน้ำพริกเผา เป็นต้น
4. มีดผ่าตัด และปากคีบ
5. กระจกฆ่าเชื้อสำหรับรองการทำงานในสภาพปลอดเชื้อ สามารถใช้กระจกถ่ายเอกสารขนาด A4 นำมาตัดให้ได้ขนาดที่สามารถนำไปฆ่าเชื้อ และใช้เป็นพื้นผิวในการตัดชิ้นส่วนพืช
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์ที่ใช้เอธานอลเป็นเชื้อเพลิง ใช้สำหรับการลนฆ่าเชื้ออุปกรณ์
7. ขวดสเปรย์บรรจุแอลกอฮอล์ 70 % ใช้สำหรับฉีดพ่นทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ ใรศภายในตู้ย้ายชิ้นส่วน และบนพื้นผิวอื่นๆ
8. สารละลายเจือจางคลอรีน เช่น สารละลายเจือจาง 4 เท่าของน้ำยาฟอกขาว ใช้สำหรับ การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืช
9. สารฆ่าเชื้อตามผิวหนังชนิดต่างๆ
10. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### ตู้ย้ายชิ้นส่วนพืช

สนั่น (2522) กล่าวถึง การขยายพันธุ์แบบ Micropopagation ไว้ว่า ควรทำงานภายในสภาพห้องที่สะอาดปราศจากฝุ่นละอองที่จะนำพาเชื้อจุลินทรีย์ได้ ในบางครั้งการทำงานที่ต้องการสภาพที่ปลอดเชื้อที่ใช้ระยะเวลาในการทำงานสั้นๆ มีความรวดเร็วและใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ สามารถกระทำได้ในสภาพห้องโล่งที่ปิดประตูหน้าต่างสนิท และมีการกรองอากาศที่ดีพอ แต่อย่างไรก็ตามการปฏิบัติที่ดีที่สุดสำหรับการทำงานที่ต้องการสภาพปลอดเชื้อควรกระทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในตู้เพาะเลี้ยงที่ปิดสนิท ภายใต้อากาศที่ผ่านการกรอง และได้ทำการฆ่าเชื้อภายในตู้เพาะเลี้ยงแล้ว

Dixon (1985) กล่าวว่า ตู้กรองอากาศ (Laminar - air flow cabinet) เป็นอุปกรณ์ที่สามารถทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่สะอาด ปราศจากเชื้อโรค สำหรับการย้ายชิ้นส่วนในสภาพปลอดเชื้อในการทำงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยลักษณะของตู้กรองอากาศ จะมีอากาศไหลผ่านแผ่นกรองเข้าสู่ภายในตู้ (Street, 1973) การทำงานของตู้กรองอากาศ (Laminar - air flow cabinet) อากาศจะไหลผ่านแผ่นกรองชั้นแรกซึ่งจะกรองฝุ่นละอองจากอากาศ อากาศที่ผ่านแผ่นกรองชั้นแรกแล้ว จะไหลผ่านแผ่นกรองชั้นที่สอง ซึ่งเป็นแผ่นกรองประสิทธิภาพสูง (HEPA filter) จากนั้นจึงไหลเข้าสู่ส่วนในของตู้ โดยทั่วไปแล้วทิศทางการไหลของอากาศภายในตู้ จะมีการไหลจากด้านบนลงสู่ด้านล่าง หรือจากด้านหลังออกสู่ด้านหน้า ผ่านพื้นที่ทำงานโดยตรง ผลจากการไหลของอากาศเช่นนี้ภายในตู้ตลอดเวลาจะช่วยป้องกันไม่ให้อากาศที่ไม่บริสุทธิ์ภายนอกไหลเข้าสู่ภายในของตู้ได้ (Dodds and Roberts, 1995)

Kyte(1987) กล่าวถึง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นงานอดิเรก สามารถใช้กล่องพลาสติกใส ที่มีขนาดใหญ่ หรือตู้ที่ปิดที่มีช่องกระจกและช่องเปิดสำหรับเข้าไปทำงานภายในตู้ มาเป็นพื้นที่ในการทำเทคนิคปลอดเชื้อได้

ธรรมรัตน์ (2539) ได้ทำการประดิษฐ์ตู้ปลอดเชื้อเพื่อใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีต้นทุนที่ไม่สูงนัก โดยใช้ระบบการไหลของอากาศผ่านแผ่นกรองในแนวตั้ง และติดตั้งหลอดไฟอุลตราไวโอเลต(UV) เพื่อนำเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นที่ทำงาน จากการทดสอบโดยวางจานอาหาร PDA ไม่พบมีการปนเปื้อนเกิดขึ้น

จิตราพรรณ (2536) กล่าวว่า ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ สามารถประกอบตู้ไม่ปิดสนิท ด้านหน้ามีกระจก มีรูระบายอากาศด้วยสาลี่ และมีช่องสำหรับสอดมือเข้าไปทำงานที่ติดตั้งถุงมือยาว เมื่อทำการฆ่าเชื้อภายในแล้วสามารถนำมาใช้ทำการย้ายชิ้นส่วนได้ หากเป็นการใช้เพียงชั่วคราวอาจดัดแปลงใช้กล่องกระดาษครอบด้วยพลาสติกแทนตู้ปลอดเชื้อได้ แต่ต้องระมัดระวังในเรื่องไฟ

ไพบุลย์ (2521) กล่าวถึงลักษณะตู้ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ว่าจะทำเป็นรูปแบบอย่างไรก็ได้แล้วแต่จะเห็นว่าเหมาะสม แต่ต้องไม่ให้อากาศภายนอกเล็ดลอดเข้าไปภายในตู้

### หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

Street (1973) กล่าวว่า วิธีการโดยทั่วไปในการฆ่าเชื้อในอาหารหรืออุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยจับเวลาหลังจากเริ่มเห็นไอน้ำเกิดขึ้น

การนึ่งฆ่าเชื้อสิ่งที่เป็นของเหลวจะใช้เวลาในการนึ่งฆ่าเชื่อนานเท่าใดนั้น ขึ้นอยู่กับ ปริมาตรของของเหลวนั้น ส่วนการนึ่งฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่างๆ และสำหรับสิ่งที่ไม่ใช่ของเหลวใช้เวลา 15 นาที นับหลังจากที่หม้อนึ่งมีความดันมีอุณหภูมิภายใน 121 °C และมีการไล่อากาศออกบางส่วนแล้ว (Dixon, 1985; Dodds and Roberts, 1995) อากาศที่เหลืออยู่ภายในจะเคลื่อนย้ายไปกับไอน้ำสัมผัสกับวัตถุต่าง ๆ ภายในหม้อนึ่งโดยตรง ภายหลังจากครบตามเวลาแล้วทำการปรับความดันภายในให้กลับสู่สภาพปกติอย่างช้าๆ เนื่องจากการปรับความดันอย่างรวดเร็วจะมีผลให้ของเหลวเกิดการเดือดและพุ่งออกนอกภาชนะบรรจุได้ (Dodds and Roberts, 1995) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งนั่นคือ ไอน้ำความร้อนภายในนั้นสูงกว่า 100 °C ซึ่งสูงกว่าระดับที่น้ำเดือด แต่น้ำภายในหม้อนึ่งความดันจะไม่มีเกิดการเดือดเกิดขึ้น เนื่องจากมีความดันอากาศกดเอาไว้ เมื่อทำการเปิดทันทีความดันภายในหม้อนึ่งความดันจะลดอย่างรวดเร็วซึ่งจะส่งผลให้ความร้อนมีมากขึ้นจนสามารถให้น้ำและฐานอาหารเดือด ซึ่งอาจทำให้เกิดอันตรายได้ (ไพบูลย์, 2521)

การนึ่งฆ่าเชื้ออาหารและอุปกรณ์ต่างๆ สามารถใช้หม้อต้มน้ำความดัน (Pressure cooker) ที่ใช้ประกอบอาหารแทนหม้อนึ่งความดัน(Autoclave)ได้ (Taji, 1996; Hartmann *et al.*, 1959; Dodds and Roberts, 1995; Kyte, 1987) และในการใช้หม้อต้มน้ำความดันนึ่งอาหารและอุปกรณ์นั้นไม่ควรทำการปิดช่องระบายอากาศ จนกว่าสังเกตเห็นไอน้ำปรากฏให้เห็นชัดเจน (Dodds and Roberts, 1995)

### อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Trigiano and Gray (1996) ได้กล่าวไว้ว่า อาหารวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ชิ้นส่วนพืชสามารถเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ ส่วนประกอบของอาหารวิทยาศาสตร์มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของชิ้นส่วนพืช (Conger, 1981) Dixon and Gonzales(1994) ได้แบ่งส่วนประกอบหลักของอาหารวิทยาศาสตร์ออกเป็น 6 กลุ่มด้วยกัน คือ

1. ธาตุอาหารหลักพวกอนินทรีย์สาร
2. ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย
3. สารที่เป็นแหล่งของธาตุเหล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารพวกไวตามิน
5. สารที่เป็นแหล่งของคาร์บอน
6. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ในการเลือกส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรพิจารณาถึงชนิดพันธุ์พืช ชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่นำมาเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น และวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ประกาศตร์, 2538; Dodds and Roberts, 1995) ในปัจจุบันสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีให้เลือกใช้หลายสูตร สูตรอาหาร MS และ SH เป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตทั้งในกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ และใบเลี้ยงเดี่ยวได้หลายชนิด (Dixon, 1985) อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรใดสูตรหนึ่งไม่สามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตและการพัฒนาได้อย่างสมบูรณ์ ในพืชชนิดเดียวกันเมื่อมีการพัฒนาในแต่ละช่วงของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนสูตรอาหารไปด้วย (Smith, 1992)

Taji (1996) ได้เสนอสูตรอาหารแบบง่าย ใช้สารเคมีต่าง ๆ ที่สามารถหาซื้อได้ตามซูเปอร์มาร์เก็ต ร้านขายยา และ ร้านค้าขายสารเคมีทั่ว ๆ ไปเป็นส่วนประกอบ เพื่อใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

|                                       |     |          |
|---------------------------------------|-----|----------|
| 1. น้ำฝน                              | 2   | ถ้วย     |
| 2. น้ำตาลทราย                         | 1/2 | ถ้วย     |
| 3. สารละลายของปุ๋ยน้ำ 10-10-10        | 1   | ถ้วย     |
| 1/2 ช้อนชา ในน้ำ 1 แกลลอน             |     |          |
| 4. ยาเม็ด Inositol ขนาด 500 มิลลิกรัม | 1/2 | เม็ด     |
| 5. ยาเม็ด วิตามินที่มี Thiamine       | 1/2 | เม็ด     |
| 6. ผงวุ้น                             | 4   | ช้อนโต๊ะ |

Kyte (1987) กล่าวถึง สูตรอาหารแบบง่ายของ Bridgen and Brand(University of Connecticut) ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงส่วนใบและก้านใบของแอฟริกันไวโอเล็ต โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้

|           |     |      |
|-----------|-----|------|
| 1. น้ำตาล | 1/8 | ถ้วย |
| 2. น้ำ    | 1   | ถ้วย |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|                                      |     |          |
|--------------------------------------|-----|----------|
| 3. สารละลายของปุ๋ยน้ำ 10-10-10       | 1/2 | ถ้วย     |
| 1/4 ช้อนชาในน้ำ 1 แกลลอน             |     |          |
| 4. ยามีค Inositol ขนาด 500 มิลลิกรัม | 1/2 | เม็ด     |
| 5. ยามีค ไวตามินที่มี Thiamine       | 1/2 | เม็ด     |
| 6. ผงรูน                             | 4   | ช้อนโต๊ะ |

ออร์ดี (2538) ได้แนะนำสูตรอาหารแบบง่าย สำหรับการฝึกเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น เพาะเลี้ยงแคลลัสจากฟักทอง การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ หรือเมล็ดอ่อนของกล้วยไม้ โดยเตรียมจากส่วนผสมที่หาง่าย ราคาถูก ดังนี้ คือ

อาหารสูตร OD 1987 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

|                                   |     |           |
|-----------------------------------|-----|-----------|
| 1. ปุ๋ยทวินเฟอรัตี้ สูตร 12-23-27 | 2   | กรัม      |
| 2. น้ำตาลทราย                     | 30  | กรัม      |
| 3. น้ามะพร้าว                     | 150 | มิลลิลิตร |
| 4. รูน                            | 6.2 | กรัม      |
| ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)          | 5.6 |           |

อาหารสูตร OD 1995 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

|                          |     |           |
|--------------------------|-----|-----------|
| 1. ปุ๋ยไบโพลาน 11-8-6    | 1   | กรัม      |
| 2. น้ำตาลทราย            | 30  | กรัม      |
| 3. เซอไพร์ส              | 2   | มิลลิลิตร |
| 4. รูน                   | 6.2 | กรัม      |
| ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) | 5.6 |           |

### อาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้

จิตราพรรณ (2536) ได้จัดแบ่งธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

#### 1. แร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (Mineral source) ประกอบด้วย

|                 |      |                         |
|-----------------|------|-------------------------|
| Nitrogen Source | เช่น | $KNO_3$ , $NH_4NO_3$    |
| Phosphate       | เช่น | $KH_2PO_4$ , $K_2HPO_4$ |
| Sulfate         | เช่น | $MgSO_4$ , $Fe_2SO_4$   |
| Chloride        | เช่น | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$    |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|           |      |   |
|-----------|------|---|
| Potassium | เช่น | $\text{KNO}_3$ , $\text{KCl}$                   |
| Calcium   | เช่น | $\text{CaNO}_3$ , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  |
| Magnesium | เช่น | $\text{MgSO}_4$                                 |
| Iron      | เช่น | $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , $\text{Fe-EDTA}$ |
| Manganese | เช่น | $\text{MnSO}_4$                                 |

เมื่อผสมธาตุอาหารที่จำเป็นต่างๆ เข้าด้วยกัน การใช้ธาตุอาหารต้องมีความเข้มข้นที่พอเหมาะ ส่วนมากจะไม่เกิน 1 กรัม/ลิตร และต้องปรับค่า pH ให้พอเหมาะเพื่อให้ดินอ่อนนำไปใช้ได้ และค่า pH ต้องคงที่ ถ้าค่า pH สูงขึ้น จะทำให้ธาตุอาหารหลายชนิดตกตะกอน และดินอ่อนนำไปใช้ไม่ได้ แต่ถ้าค่า pH ต่ำกว่า 4.8 จะทำให้วัชไมแข็งแรง จะเหลวเป็นน้ำหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อ

2. สารให้พลังงาน (Energy source) เพื่อเป็นวัตถุดิบใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น sucrose, glucose, fructose และ saccharose เป็นต้น สารให้พลังงานที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน คือ sucrose และ glucose รองลงมาคือ fructose การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ในปัจจุบันนิยมใช้น้ำตาลทราย (sucrose) เนื่องจากหลังจากทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จะสลายตัวเป็น glucose และ fructose

ความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้น พบว่าการใช้ความเข้มข้น 0.05 M จะช่วยให้ยอดมีการเจริญเติบโตดี หากใช้ความเข้มข้น 0.1-0.15 M พบว่ารากมีการเจริญดีกว่า ปริมาณน้ำตาลที่นิยมใช้ในสูตรอาหาร คือ 20 g/l

3. สารช่วยการเจริญเติบโต (Growth promoting substance) เป็นสารที่เพิ่มลงในวุ้นอาหารเพื่อช่วยให้การงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้น ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตขึ้น สนั่น (2522) ได้แบ่งออกเป็นกลุ่ม ดังนี้

### 3.1. สารเร่งการเจริญเติบโต (Growth regulator-auxin and cytokinin) สารออกซิน

สังเคราะห์ซึ่งมีใช้กันอยู่ในขณะนี้ ได้แก่ Naphtalene acetic acid (NAA)

0.1-10 mg/l และ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 0.05-0.5 mg/l หรือ

Indole acetic acid (IAA) 1-50 mg/l

พวกสารออกซินเหล่านี้ควรทำละลายด้วยแอลกอฮอล์ก่อน แล้วจึงเติมน้ำให้ได้ส่วนผสมเข้มข้น เช่น สาร 1-นอพทาลีนความเข้มข้น 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การเตรียมสารเข้มข้นครั้งแรกจะละลายใน HCl จำนวนเล็กน้อยก่อนแล้วจึงเติมให้ครบ สารต่างๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่จะละลายน้ำได้ และควร เตรียมไว้ในรูปสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ความเข้มข้น 100 เท่า และควรเก็บไว้ในตู้เย็น

3.2 วิตามินและสารอื่นๆ (Vitamin and other materials) เป็นสารที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อพิษทางชนิด และอาจใส่ไว้เป็นประจำก็ได้ เช่น

|                                   |         |      |
|-----------------------------------|---------|------|
| สารไทอะมีน (Thiamine)             | 0.1 - 1 | mg/l |
| กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid)     | 0.5     | mg/l |
| สารไพริดอกซีน (Pyridoxine)        | 0.5     | mg/l |
| สารอินโนซิโตล (Inositol)          | 100     | mg/l |
| กรดเพนโทเธนิก (Panthothenic acid) | 0.1     | mg/l |
| สารไบโอติน (Biotin)               | 0.1     | mg/l |

3.3 สารอินทรีย์ซับซ้อนชนิดอื่นๆ (Organic complexes) มีสารต่างๆ ดังนี้

|                  |           |      |
|------------------|-----------|------|
| น้ำมะพร้าว       | 150 - 200 | ml/l |
| กล้วยหอมบด       | 50 - 100  | g/l  |
| มันฝรั่งบด       | 25 - 50   | g/l  |
| น้ำสกัดมันฝรั่ง  | 100       | g/l  |
| เนื้อมะเขือเทศบด | 100       | g/l  |
| เห็ดหูหนู        | 25        | g/l  |

4. ฐัน (Agar) ใส่เพื่อให้อาหารแข็ง เมื่อเพาะเมล็ด เมล็ดจะได้ไม่จมน้ำ การใส่ฐันลงไป ในอาหารต้องใช้ในปริมาณที่พอเหมาะ ไม่ให้อาหารแข็งจนเกินไปเพราะจะทำให้การดูดอาหารไม่ดี และรากแทงลงในฐันอาหารไม่ได้ การใช้ปริมาณฐันในอาหารจะมากหรือน้อยขึ้นกับพื้นที่ผิวในขวด ถ้าขวดขนาดใหญ่ ใช้ 8-10 g/l หากขวดมีขนาดเล็กกว่านี้ใช้ 5-7 g/l

การเพิ่มผงถ่านบดละเอียดลงในสูตรอาหารจะช่วยให้รากมีการเจริญขึ้น และผงถ่านยังช่วยดูดซับ สารพิษต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตของต้นอีกด้วย

จิตรภาพรรณ (2536) กล่าวถึง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เมื่อเพิ่มน้ำมะพร้าวอ่อน กล้วยหอมบด และมันฝรั่งบด(หรือน้ำสกัดมันฝรั่ง) เป็นส่วนผสมของอาหารจะให้ผลดี โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารเร่งการเจริญเติบโต

อรดี (2538) ได้อธิบายถึงการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนกล้วยไม้ และได้กล่าวถึงสูตรอาหารที่สามารถใช้ในการเพาะเมล็ดไว้ 2 สูตร คือ สูตรอาหาร Vacin & Went (1949) และ สูตรอาหารดัดแปลง OD (1995)



Goh (1990) กล่าวว่า อาหารสูตร Vacin and Went (1949) และ Knudson C. เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ซึ่งอาหารทั้ง 2 สูตรนี้เป็นสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้

### การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลต

Start and Cumming (1976) รายงานถึง การชักนำให้เกิดยอดในแอฟริกันไวโอเลต เกิดจำนวนยอดมากที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA  $5.4 \mu\text{M}$  ( $0.1 \text{ mg/l}$ ) BA  $22 \mu\text{M}$  ( $5.0 \text{ mg/l}$ ) และ Adenine sulfate  $308 \mu\text{M}$  ( $125 \text{ mg/l}$ )

Groot(1990) ได้รายงานถึง การเพาะเลี้ยงส่วนใบแอฟริกันไวโอเลตโดยใช้อาหารสูตร MS(1962) ที่มีส่วนผสมของ วัสดุอาหาร 0.8 % น้ำตาล Sucrose  $87.6 \mu\text{M}$  NAA  $5.4 \mu\text{M}$  และ BAP  $4.4 \mu\text{M}$  มีค่า pH 5.8 สามารถทำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส และยอด โดยรอบของชิ้นส่วน และเมื่อมีอายุ 6 สัปดาห์ จะเกิดยอดขนาดเล็ก และพบส่วนของลักษณะใบซึ่งสามารถทำการแบ่งเพื่อเพิ่มปริมาณได้

Cooke (1977) รายงาน การฟอกฆ่าเชื้อที่ส่วนใบแอฟริกันไวโอเลต โดยใช้ Clorox 10 % ผสมกับ Tween 20 0.1 % แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว

Bridgen (1986) สามารถทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและก้านใบของแอฟริกันไวโอเลต โดยใช้อาหารดัดแปลงของ Bridgen and Brand (University of Connecticut) ได้สำเร็จ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. พืชทดสอบ

1.1 ส่วนใบ แอฟริกันไวโอเลต (*Saintpaulia ionantha*)

1.2 เมล็ดอ่อนกล้วยไม้

พันธุ์ "เขาแกะ x Open" (*Rhychostylis coelests.*)

พันธุ์ "ช้างกระ x Open" (*Rhychostylis gigantea Ridl.*)

#### 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

2.2 หม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker)

2.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar-air flow cabinet)

2.4 อุปกรณ์สำหรับตัดแปลงเป็นตู้ปลอดเชื้อ ประกอบด้วย

ตู้เลี้ยงปลา ขนาด 36 X 60 X 38.5 ซม.

เครื่องฟอกอากาศที่ใช้แผ่นกรอง HEPA filter

2.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย กระจบอกลง ปิดเปิด บีกเกอร์ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ช้อนตักสาร ช้อนคนสาร ทัพพีตักอาหาร ขวดแก้วพร้อมฝาปิด กรวยพลาสติก กระจบคาย ไซ ตะกร้า หนั่งยาง ถ้วยพลาสติก ชุดถ้วยตวง ชุดช้อนตวง

2.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการย้ายชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบด้วย งานแก้ว ปากกิบ มีดผ่าตัดพร้อมด้าม ตะเกียงแอลกอฮอล์ บีกเกอร์ กระจบอกลง แอลกอฮอล์ 70% และ 95%

#### 3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (ดูส่วนประกอบในภาคผนวก)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร V&W (ดูส่วนประกอบในภาคผนวก)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารตัดแปลง OD (1987) เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ (ดูส่วนประกอบในภาคผนวก)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารตัดแปลง Bridgem and Brand เพาะเลี้ยง แอฟริกันไวโอเลต (ดูส่วนประกอบในภาคผนวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5 สารเคมีที่ใช้ในการพอกฆ่าเชื้อ

Ethanol 70 %

Clorox 20 %

Tween 20

### 4. อุปกรณ์ในการบันทึกผลการทดลอง

กล้องจุลทรรศน์

ไม้บรรทัด

### วิธีการ

#### 1. การดัดแปลงอุปกรณ์

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร และอุปกรณ์ต่างๆ โดยนำหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) (ภาพที่ 1) มาใช้แทน หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

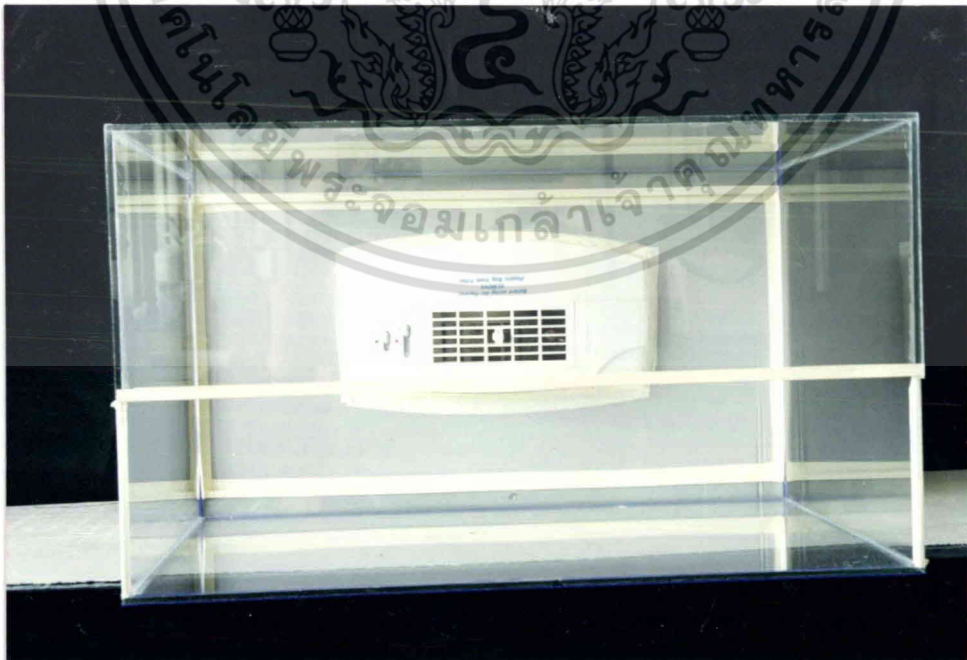
1.2 ตู้ย้ายชิ้นส่วนและทำเทคนิคปิดเชื้อ นำตู้เลี้ยงปลา ขนาด 36 x 60 x 38.5 ซม. และเครื่องฟอกอากาศขนาดเล็ก มาดัดแปลง (ภาพที่ 2 และ 3) มีขั้นตอน ดังนี้

- 1) วางตู้ให้ความยาวด้านข้างด้านหนึ่งเป็นพื้นตู้ และให้ด้านที่ไม่มีกระจกเป็นด้านหลังของผู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลง
- 2) ตัดกระจกทางด้านหน้าของตู้เป็นช่องเปิดตามแนวยาว ให้มีความสูงจากพื้นตู้ 15 ซม. เมื่อทำการตัดแล้วช่องเปิดจะมีขนาด 15 x 60 ซม. ซึ่งจะใช้เป็นช่องเปิดสำหรับการทำงานภายในตู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลง
- 3) ติดตั้งเครื่องฟอกอากาศเข้ากับด้านหลังของตู้ (ด้านที่ไม่มีกระจก) ดังภาพที่ 4 โดยจัดให้มีการไหลของอากาศเมื่อออกจากเครื่องฟอกอากาศแล้ว มีการไหลเข้าภายในและออกจากตู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลงทางช่องเปิดสำหรับการทำงานด้านหน้าอย่างทั่วถึงและต่อเนื่องในระหว่างการทำงาน
- 4) ทำการปิดรอยต่อต่างๆ และช่องเปิดอื่นๆ ที่นอกเหนือจากช่องเปิดสำหรับการทำงานด้านหน้าเพื่อป้องกันการรั่วไหลของอากาศเข้า-ออกภายในตู้ การไหลของอากาศภายในตู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลง จะมีทิศทางจากเครื่องฟอกอากาศที่อยู่ทางด้านหลังเข้าสู่ภายในตู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลงและไหลออกทางช่องเปิดด้านหน้าเท่านั้น

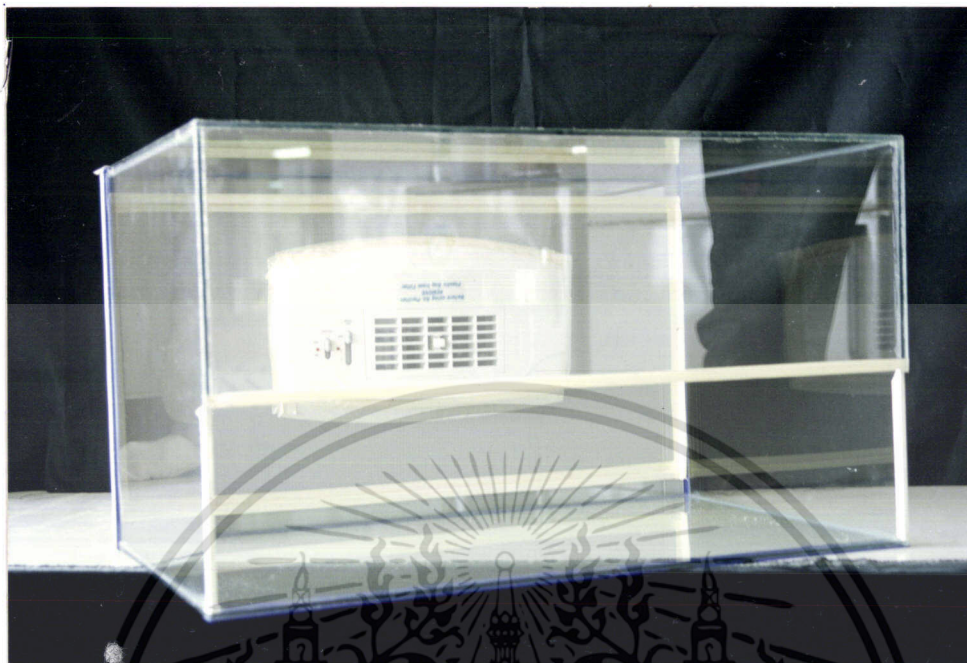
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



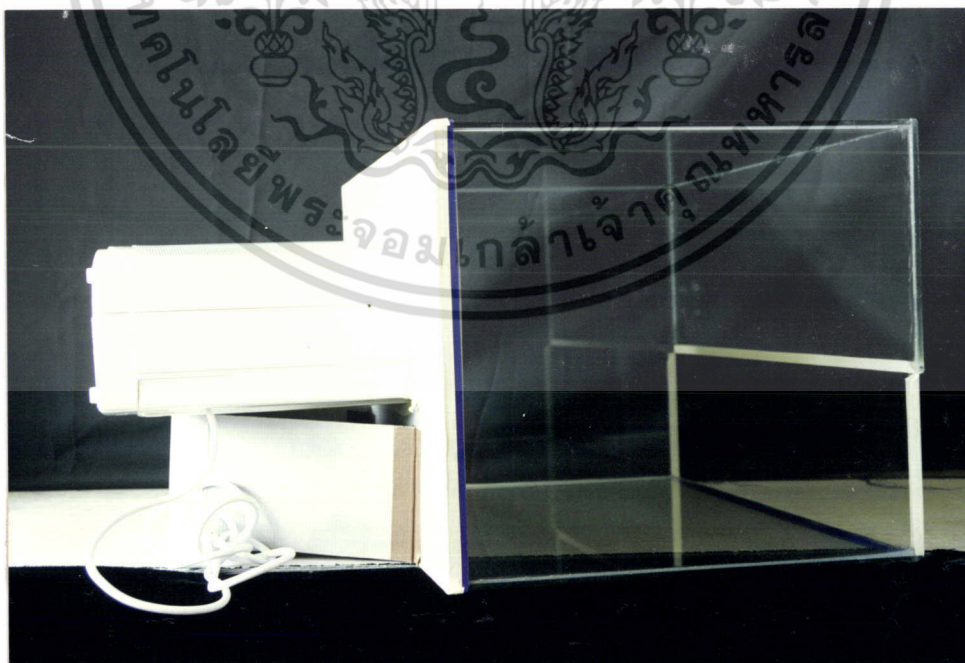
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของหม้อหุงข้าวความดัน (Pressure cooker)



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะด้านหน้าของตู้ย้ายชิ้นส่วนคัดแปลงเมื่อประกอบเสร็จ  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่ 3** แสดงลักษณะด้านข้างของผู้ขายชิ้นส่วนตัดแปลงเมื่อประกอบเสร็จ



**ภาพที่ 4** แสดงตำแหน่งของเครื่องฟอกอากาศที่ประกอบเข้ากับตู้ขายชิ้นส่วนตัดแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งเมื่อประกอบเสร็จใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การเตรียมอาหาร

### 2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ ประกอบด้วย

#### อาหารสูตร Vacin and Went (1949)

เตรียมจากสารละลายเข้มข้น (Stock solution) เป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้สำหรับ Macroelement และ 100 เท่า สำหรับ Microelement และ Organic Compound ในการเตรียมสารละลายที่ใช้จริง (final solution) กำหนดจากปริมาณของสารละลายเข้มข้น ด้วยสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$N_1$  = ความเข้มข้นของสารละลายเข้มข้น

$N_2$  = ความเข้มข้นสารละลายที่ใช้จริง

$V_1$  = ปริมาตรของสารละลายเข้มข้น

$V_2$  = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้จริง

การเตรียมอาหาร Vacin and Went จำนวน 1 ลิตร ทำได้โดย ตวงน้ำกลั่นลงในภาชนะ เติมสารละลายเข้มข้น สารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำมะพร้าว และน้ำตาล ตามที่ได้คำนวณไว้ใช้แทงแก้วคนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วย NaOH 1N และ HCl 1N ให้อยู่ในช่วง pH 5.0-5.5 แล้วเติมผงวุ้น นำไปต้มให้วุ้นละลาย ทำการบรรจุใส่ขวดแก้วปิดฝา นำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

อาหารดัดแปลงสูตร OD (1987) ของ ดร. อรดี สหวัชรินทร์

การเตรียมอาหารดัดแปลงสูตร OD 1 ลิตร ทำได้โดย ตวงน้ำกลั่น ลงในภาชนะ เติมปุ๋ยทวินเฟอर्टี้ สูตร 13-27-27 จำนวน 2 กรัม น้ำตาลทราย 30 กรัม น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัม ใช้แทงแก้วคนให้เข้ากัน พร้อมปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วย NaOH 1N และ HCl 1N ให้อยู่ในช่วง pH 5.6 แล้วเติมผงวุ้น นำไปต้มให้วุ้นละลาย ทำการบรรจุใส่ขวดแก้วปิดฝา นำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

### 2.2 อาหารเพาะเลี้ยงแอฟริกันไวโอเลต ประกอบด้วย

#### อาหารสูตร Murashige and Skoog(1962)

เตรียมจากสารละลายเข้มข้น (Stock solution) เป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้สำหรับ Macroelement และ 100 เท่า สำหรับ

Microelement และ Organic Compound ในการเตรียมสารละลายที่ใช้จริง (final solution) คำนวณจากปริมาณของสารละลายเข้มข้น ด้วยสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$N_1$  = ความเข้มข้นของสารละลายเข้มข้น

$N_2$  = ความเข้มข้นสารละลายที่ใช้จริง

$V_1$  = ปริมาตรของสารละลายเข้มข้น

$V_2$  = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้จริง

การเตรียมอาหาร Murashige and Skoog(MS) จำนวน 1 ลิตร ทำได้โดย ตวงน้ำกลั่นลงในภาชนะ เติมสารละลายเข้มข้น สารควบคุม การเจริญเติบโต และน้ำตาล ตามที่ได้คำนวณไว้ ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วย NaOH 1N และ HCl 1N ให้อยู่ในช่วง pH 5.0-5.5 แล้วเติมผงวุ้น นำไปต้มให้วุ้นละลาย ทำการบรรจุใส่ขวดแก้วปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ อาหารดัดแปลงของ Bridgen and Brand

การเตรียมอาหารดัดแปลงสูตร Bridgen and Brand ทำได้โดย ตวงน้ำตาล 1/8 ถ้วย น้ำกลั่น 1 ถ้วย สารละลายเจือจางของปุ๋ยน้ำ สูตร 10-10-10 1/4ช้อนชา กับน้ำ 1 แกลลอน จำนวน 1/2 ถ้วย ผงของยาเม็ด Lipochol จำนวน 0.25 กรัม ผงของเม็ดยาที่เป็นวิตามินรวมที่มีส่วนประกอบของ Thiamine จำนวน 0.07 กรัม ผงวุ้น 8 กรัม ใช้แท่งแก้วคน ให้เข้ากัน นำไปต้มให้วุ้นละลาย ทำการบรรจุใส่ขวดแก้วปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### 3. การนึ่งฆ่าเชื้อ

ทำการแบ่งอาหารสูตร Vacin and Went อาหารดัดแปลงสูตร OD อาหารสูตร Murashige and Skoog และอาหารดัดแปลงของ Bridgen and Brand ออกเป็นสูตรอาหารละ 2 ส่วน เท่าๆ กัน ดังนี้

ส่วนที่ 1 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที นำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 25 °C

**ส่วนที่ 2** นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) เป็นเวลา 20 นาที โดยเริ่มจับเวลาเมื่อพรมิไอน้ำพุ่งออกจากวาล์ว และทำการปิดวาล์วแล้ว นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C

#### 4. การเตรียมชิ้นส่วน

##### 4.1 เมล็ดกล้วยไม้

- 1) นำฝักอ่อนมาล้างด้วยน้ำสบู่อุ่นพร้อมตัดส่วนของก้านฝัก ดอก และกลีบของฝักออก โดยไม่ให้กระทบกระเทือน หรือมีรอยเปิดถึงเมล็ดที่อยู่ภายใน
- 2) นำชิ้นส่วนมาฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วนำมาลนไฟ 2-3 ครั้ง
- 3) ใช้มีดตัดแยกส่วนพวงเมล็ดออกจากกัน นำเมล็ดผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- 4) ใช้หลอดหยดสารคัดเมล็ดที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใส่ในขวดอาหาร เพื่อทำการเพาะเลี้ยง

##### 4.2 ส่วนใบแอฟริกันไวโอเล็ต

- 1) นำส่วนใบของแอฟริกันไวโอเล็ตที่เป็นใบอ่อนรุ่นที่ 2-3 มาล้างด้วยน้ำสบู่อุ่นพร้อมตัดส่วนก้านและชอกใบออก
- 2) นำชิ้นส่วนมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ ตามขั้นตอนดังนี้
 

|  |                   |
|--|-------------------|
| แช่ใน Ethanol 70 %                       | 30 วินาที         |
| แช่ใน Clorox 20% + Tween 20 2-3 หยด      | 20 นาที           |
| ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง | นานครั้งละ 5 นาที |
- 3) ใช้มีดตัดส่วนใบที่คายออก แบ่งส่วนของใบที่มีชีวิตให้มีขนาด 0.5x0.5 ซม.
- 4) ใช้ปากคีบจับชิ้นส่วนที่ตัดไว้ ปักลงในวุ้นอาหาร โดยให้ส่วนที่อยู่ใกล้ก้านใบมากกว่าเป็นส่วนที่อยู่ในวุ้นอาหาร

#### 5. การย้ายชิ้นส่วน

##### 5.1 เมล็ดกล้วยไม้

ทำการเปลี่ยนอาหารเมื่อสังเกตพบมีการเจริญเป็นโปรโตคอร์มที่มีลักษณะสีเขียว หรือเป็นยอด และทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4-5 สัปดาห์

##### 5.2 ชิ้นส่วนใบแอฟริกันไวโอเล็ต

ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4-5 สัปดาห์

## 6. สภาพห้องเลี้ยงเนื้อเชื้อ

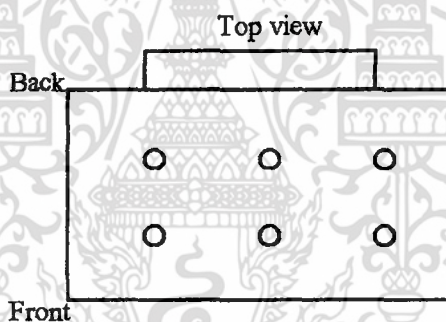
ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C ความเข้มแสง 2,500 Lux. โดยมิ  
ชั่วโมงแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

## 7. วิธีการทดลอง

### 7.1 การทดสอบตู้ย่ำขึ้นส่วนตัดแปลง

ทำการทดสอบตู้ย่ำขึ้นส่วนตัดแปลง โดยทำการเปิดเครื่องฟอก  
อากาศให้ทำงานก่อนทำการทดสอบ 30 นาที พร้อมทำความสะอาดภายใน  
ของตู้ย่ำขึ้นส่วนตัดแปลงด้วยแอลกอฮอล์ 70 % จากนั้นนำขวดอาหาร MS  
ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน วางทดสอบภายในตู้ย่ำขึ้นส่วนตัดแปลง จำนวน 5 ครั้ง  
ครั้งละ 6 ขวด โดยทำการวางขวดอาหารตามแผนผังการวางตำแหน่งขวด  
อาหารทดสอบ เป็นเวลา 30 นาที ต่อครั้ง

#### แผนผังการวางตำแหน่งขวดอาหารทดสอบ



สัญลักษณ์ ○ แทนตำแหน่งขวดอาหาร

### 7.2 การทดสอบอุปกรณ์และอาหารแบบง่าย

การทดสอบอุปกรณ์และอาหารแบบง่าย ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อ  
แอฟริกันไวโอเลต

โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Randomized Complete  
Block Design 3 ซ้ำๆ ละ 3 ชั้นส่วน กำหนดให้ Factor A เป็น อุปกรณ์  
มี 2 แบบ คือ

a1 เป็น การใช้ ตู้ย่ำขึ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) และ  
หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ในการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a2 เป็น การใช้ ตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลง และ หม้อต้มน้ำอาหาร  
ความดัน (Perssure cooker) ในการทำงาน  
และกำหนดให้ Factor B เป็น อาหาร มี 2 ชนิด คือ

b1 เป็น อาหาร MS+NAA 5.4  $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M

b2 เป็น อาหารตัดแปลงแบบง่ายของ Bridgen and Brand  
การทดสอบอุปกรณ์และอาหารแบบง่าย ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้วยไม้  
ข้างกระ

โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Randomized Complete  
Block Design 3 ซ้ำๆ ละ 3 ชิ้นส่วน กำหนดให้ Factor A เป็น อุปกรณ์  
มี 2 แบบ คือ

a1 เป็น การใช้ ตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) และ  
หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ในการทำงาน

a2 เป็น การใช้ ตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลง และ หม้อต้มน้ำอาหาร  
ความดัน (Perssure cooker) ในการทำงาน  
และกำหนดให้ Factor B เป็น อาหาร มี 2 ชนิด คือ

b1 เป็น อาหาร Vacin and Went (1949)

b2 เป็น อาหารตัดแปลงแบบง่ายสูตร OD(1987)

การทดสอบอุปกรณ์และอาหารแบบง่าย ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้วยไม้  
เขาแกะ

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block  
Design 6 ซ้ำๆ ละ 3 ชิ้นส่วน มี 2 Treatments คือ

Tr1 เป็น อาหาร Vacin and Went (1949)

Tr2 เป็น อาหารตัดแปลงแบบง่ายสูตร OD(1987)

### การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดการปนเปื้อนทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์
2. บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ประกอบด้วย
  - การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลต เป็นเวลา 9 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลโดย
    - จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดการตาย
    - การนับจำนวนยอด
  - การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ช้างกระ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลโดย
    - การนับจำนวนโปรโตคอร์มที่มีลักษณะสีเขียว
  - การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เป็นเวลา 18 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลโดย
    - การนับจำนวนโปรโตคอร์มที่มีลักษณะสีเขียว
    - การนับจำนวนยอด

### วันและสถานที่ทำการทดลอง

#### ระยะเวลาในการทดลอง

|                 |         |      |
|-----------------|---------|------|
| เริ่มการทดลอง   | พฤษภาคม | 2540 |
| สิ้นสุดการทดลอง | มีนาคม  | 2541 |

#### สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงหรือเผยแพร่ข้อมูลใดๆ แก่บุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

## ผลการทดลอง

### การทดสอบตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลง

การทดสอบตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลง ด้วยการนำขวดอาหาร MS จำนวน 6 ขวด ไปวางทดสอบภายในตู้ย้ายชิ้นส่วนที่ได้ทำการตัดแปลงขึ้นเป็นเวลา 30 นาที ภายหลังจากได้เปิดเครื่องฟอกอากาศให้ทำงานก่อนทำการทดสอบ 30 นาที พร้อมกับทำความสะอาดภายในของตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงด้วยแอลกอฮอล์ 70 % จากการทดสอบจำนวน 5 ครั้ง พบว่า การทดสอบครั้งที่ 1 มีการปนเปื้อนในขวดอาหารทดสอบ 83.33 % และ เมื่อทำการทดสอบครั้งที่ 2 มีการปนเปื้อน 16.66 % ซึ่งลดลงจากการทดสอบครั้งที่ 1 66.67% การทดสอบครั้งที่ 3 พบว่า มีการปนเปื้อนในขวดอาหารทดสอบ 83.33 % ซึ่งเท่ากับการทดสอบในครั้งที่ 1 การทดสอบในครั้งที่ 4 และครั้งที่ 5 พบว่าไม่มีการปนเปื้อนในขวดอาหารทดสอบ จากการทดสอบ ทั้ง 5 ครั้ง มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในขวดอาหารทดสอบมีค่าเฉลี่ยเป็น 36.66 % (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ผลการทดสอบตู้ย้ายชิ้นส่วนที่ชดัดแปลง

| ครั้งที่  | การปนเปื้อนในขวดอาหารทดสอบ (%) |
|-----------|--------------------------------|
| 1         | 83.33                          |
| 2         | 16.66                          |
| 3         | 83.33                          |
| 4         | 0.00                           |
| 5         | 0.00                           |
| ค่าเฉลี่ย | 36.66                          |

#### หมายเหตุ

- ก่อนทำการทดสอบครั้งที่ 4 ได้นำตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงไปผ่านแสง UV พร้อมเปิดเครื่องฟอกอากาศให้ทำงาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเปิดเครื่องฟอกอากาศก่อนทำการทดสอบ 3 ชั่วโมง

## การทดสอบอุปกรณ์และอาหารแบบง่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแอฟริกันไวโอเลต

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของแอฟริกันไวโอเลต เพื่อทดสอบอุปกรณ์ในการทำงาน ซึ่งประกอบด้วย การใช้หม้อตุ๋นอาหารความดัน(Pressure cooker) และตู้ย้ายชิ้นส่วนคัดแปลงในการทำงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเปรียบเทียบกับการทำงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) และตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) ร่วมกับการทดสอบอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลตแบบง่าย Bridgen and Brand โดยทำการเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลตด้วยอาหาร MS+NAA 5.4  $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลตเป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า

การใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) และหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ร่วมกับการใช้อาหาร MS+NAA 5.4  $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M ชิ้นส่วนมีการปนเปื้อนในสัปดาห์ที่ 1,3 และ 6 รวม 20 % (ตารางที่ 2) และมีการตายของชิ้นส่วน 6.67 % (ตารางที่ 3) โดยชิ้นส่วนที่ตายมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลคล้ำ และไม่มีการพัฒนาของชิ้นส่วนเป็น Callus ดังภาพที่ 5 ในสัปดาห์ที่ 4 ชิ้นส่วนมีการพัฒนาเป็น Callus สีเหลืองอ่อนบางบริเวณและเจริญเต็มชิ้นส่วนในสัปดาห์ต่อมา สัปดาห์ที่ 6 พบ Callus มีการพัฒนาเป็นใบสีเขียวขนาดเล็ก และพัฒนาเป็นยอดในสัปดาห์ที่ 7 ดังภาพที่ 6 ในส่วนของการใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) และหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ร่วมกับอาหารแบบง่าย Bridgen and Brand พบว่ามีการปนเปื้อนในสัปดาห์ที่ 1,2 และ 5 รวม 40.00 % (ตารางที่ 2) และพบว่าชิ้นส่วนมีการตาย 100% (ตารางที่ 3) นั่นคือ ชิ้นส่วนมีลักษณะสีน้ำตาลคล้ำ ไม่มีการพัฒนาเป็น Callus ดังภาพที่ 5 จึงไม่พบการเกิดยอด

การใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วนคัดแปลง และหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Perssure cooker) ร่วมกับการใช้อาหาร MS+NAA 5.4  $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M พบการปนเปื้อนในชิ้นส่วนในสัปดาห์ที่ 1 เป็น 6.67 % (ตารางที่ 2) และพบชิ้นส่วนตาย 6.67 % (ตารางที่ 3) และในสัปดาห์ที่ 9 มีจำนวนยอดเฉลี่ยเป็น 53.00 (ตารางที่ 4) โดยพบว่าชิ้นส่วนมีการพัฒนาเป็น Callus สีเขียวอ่อนในสัปดาห์ที่ 4 และพบการเกิดใบในสัปดาห์ที่ 7 ในส่วนของการใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วนคัดแปลง และหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Perssure cooker) ร่วมกับการใช้อาหารแบบง่าย Bridgen and Brand พบว่ามีการปนเปื้อนของชิ้นส่วนในสัปดาห์ที่ 3 เป็นจำนวน 26.67 % (ตารางที่ 2) และพบว่าชิ้นส่วนมีการตาย 100 % (ตารางที่ 3) จึงไม่พบการเกิด Callus และยอด

เมื่อพิจารณาในส่วนของอุปกรณ์ พบว่า เปรอ์เซนค์การปนเปื้อนในชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดย การใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) ร่วมกับหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) เกิดการปนเปื้อน 30.00 % และการใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วนคัดแปลง ร่วมกับหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Perssure cooker) เกิดการปนเปื้อน 16.67 % (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาในส่วนของการอาหาร พบว่า ผลของการอาหารต่อจำนวนยีสมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่า อาหาร MS+NAA 5.4  $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน อาหารตัดแปลงของ Bridgen and Brand มีการตายเกิดขึ้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนเป็น 100 % (ตารางที่ 3) ในขณะที่อาหาร MS+NAA 5.4  $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M พบมีเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนเพียง 6.67 % และพบว่ามียีสจำนวนยีสเฉลี่ย เป็น 52.61 (ตารางที่ 4) ในขณะที่อาหารตัดแปลงของ Bridgen and Brand ไม่พบการเกิดยีส

**ตารางที่ 2** แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในชิ้นส่วนแอฟริกัน ไวโอเล็ต ในระยะเวลา 6 สัปดาห์

| อุปกรณ์                               | % การปนเปื้อน ( $\pm$ SE)          |                                     | ค่าเฉลี่ย( $\pm$ SE)               |
|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
|                                       | อาหาร                              |                                     |                                    |
|                                       | MS+NAA 5.4 $\mu$ M+BA 4.4 $\mu$ M  | Bridgen and Brand                   |                                    |
| Laminar+Autoclave                     | 20.00 $\pm$ 16.33                  | 40.00 $\pm$ 25.82                   | 30.00 $\pm$ 14.94                  |
| ตู้ตัดแปลง+ หม้อคูนอาหาร              | 6.67 $\pm$ 7.70                    | 26.67 $\pm$ 16.78                   | 16.67 $\pm$ 9.17                   |
| <b>ค่าเฉลี่ย (<math>\pm</math>SE)</b> | <b>13.34 <math>\pm</math> 8.29</b> | <b>33.34 <math>\pm</math> 15.59</b> | <b>23.34 <math>\pm</math> 8.64</b> |

CV = 40.35 %

**ตารางที่ 3** แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การตายในชิ้นส่วนแอฟริกัน ไวโอเล็ต จนถึงสัปดาห์ที่ 9

| อุปกรณ์   | % การตาย ( $\pm$ SE)                |  | ค่าเฉลี่ย( $\pm$ SE)                |
|---|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
|   | อาหาร                               |  |                                     |
|   | MS+NAA 5.4 $\mu$ M+BA 4.4 $\mu$ M   | Bridgen and Brand                      |                                     |
| Laminar+Autoclave                                 | 6.67 $\pm$ 7.70                     | 100.00 $\pm$ 57.74                     | 53.34 $\pm$ 30.31                   |
| ตู้ตัดแปลง+ หม้อคูนอาหาร                          | 6.67 $\pm$ 7.70                     | 100.00 $\pm$ 57.74                     | 53.34 $\pm$ 30.31                   |
| <b>ค่าเฉลี่ย <sup>x</sup>(<math>\pm</math>SE)</b> | <b>6.67 <math>\pm</math> 5.02 b</b> | <b>100.00 <math>\pm</math> 40.82 a</b> | <b>53.34 <math>\pm</math> 20.95</b> |

CV = 11.64 %

x ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4** แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อจำนวนยอดของแอฟริกันไวโอเล็ต เมื่ออายุ 9 สัปดาห์

| อุปกรณ์                         | จำนวนยอด ( $\pm$ SE)              |                   | ค่าเฉลี่ย( $\pm$ SE) |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------|
|                                 | อาหาร                             |                   |                      |
|                                 | MS+NAA 5.4 $\mu$ M+BA 4.4 $\mu$ M | Bridgen and Brand |                      |
| Laminar+Autoclave               | 52.22 $\pm$ 36.37                 | 0.00 $\pm$ 0.00   | 26.11 $\pm$ 18.24    |
| ตู้ตัดแปลง+ หม้อตุ๋นอาหาร       | 53.00 $\pm$ 38.13                 | 0.00 $\pm$ 0.00   | 26.50 $\pm$ 19.00    |
| ค่าเฉลี่ย $\bar{x}$ ( $\pm$ SE) | 52.61 $\pm$ 25.45 a               | 0.00 $\pm$ 0.00 b | 26.31 $\pm$ 12.76    |

CV = 32.30 %

x ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

#### การทดสอบอุปกรณ์และอาหารแบบง่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ข้างกระ

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ข้างกระ เพื่อทดสอบอุปกรณ์ในการทำงาน ซึ่งประกอบด้วย การใช้หม้อตุ๋นอาหารความดัน(Pressure cooker) และตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงในการทำงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเปรียบเทียบกับการทำงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้หม้อหนึ่งความดัน (Autoclave) และตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) ร่วมกับการทดสอบอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ซึ่งประกอบด้วย อาหาร Vacin and Went และอาหารตัดแปลง OD ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ข้างกระเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า

เมื่อพิจารณาในส่วนของอุปกรณ์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดย การใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วน(Laminar-air flow cabinet) และหม้อหนึ่งความดัน (Autoclave) มีการปนเปื้อน 26.67 % ซึ่งเท่ากับการปนเปื้อนที่เกิดจากการใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงและหม้อตุ๋นอาหารความดัน(Pressure cooker) (ตารางที่ 5)

การใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) และหม้อหนึ่งความดัน (Autoclave)ในการทำงาน ร่วมกับใช้อาหาร Vacin and Went มีจำนวนโปรโตคอร์รมสีเขียวเฉลี่ยมากที่สุด (ตารางที่ 6) คือ 93.56 การใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลงและหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker)ในการทำงาน ร่วมกับใช้อาหาร Vacin and Went มีจำนวนโปรโตคอร์รมสีเขียวรองลงมา คือ 50.56 การใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) และหม้อหนึ่งความดัน (Autoclave)ในการทำงาน และการใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วนตัดแปลง และหม้อตุ๋นอาหารความดัน(Pressure cooker)ในการทำงาน ร่วมกับการใช้อาหารตัดแปลง OD พบว่ามีจำนวนโปรโตคอร์รมสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉลี่ยน้อย คือ 8.89 และ 8.22 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาในส่วนของอาหาร (ตารางที่ 6) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการใช้อาหาร Vacin and Went พบจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียว 72.06 ในขณะที่ การใช้อาหารคัดแปลง OD พบจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียวเพียง 8.55

**ตารางที่ 5** แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในชิ้นส่วนเมล็ดกล้วยไม้ ช้างกระ ในระยะเวลา 6 สัปดาห์

| อุปกรณ์                               | % การปนเปื้อน ( $\pm$ SE) |                   | ค่าเฉลี่ย( $\pm$ SE) |
|---------------------------------------|---------------------------|-------------------|----------------------|
|                                       | อาหาร                     |                   |                      |
|                                       | Vacin and Went            | อาหารคัดแปลง OD   |                      |
| Laminar+Autoclave                     | 40.00 $\pm$ 30.55         | 13.33 $\pm$ 10.18 | 26.67 $\pm$ 15.59    |
| ตู้คัดแปลง+ หม้อตุ๋นอาหาร             | 40.00 $\pm$ 28.82         | 13.33 $\pm$ 10.18 | 26.67 $\pm$ 13.77    |
| <b>ค่าเฉลี่ย (<math>\pm</math>SE)</b> | 40.00 $\pm$ 9.32          | 13.33 $\pm$ 6.88  | 26.67 $\pm$ 10.18    |

$$CV = 49.29 \%$$

**ตารางที่ 6** แสดงผลของอุปกรณ์และอาหารต่อจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียวของเมล็ดกล้วยไม้ ช้างกระ เมื่ออายุ 10 สัปดาห์

| อุปกรณ์   | จำนวนโปรโตคอร์มสีเขียว ( $\pm$ SE) |                   | ค่าเฉลี่ย( $\pm$ SE) |
|---|------------------------------------|-------------------|----------------------|
|   | อาหาร                              |                   |                      |
|   | Vacin and Went                     | อาหารคัดแปลง OD   |                      |
| Laminar+Autoclave                                 | 93.56 $\pm$ 55.76                  | 8.89 $\pm$ 5.42   | 51.23 $\pm$ 28.89    |
| ตู้คัดแปลง+ หม้อตุ๋นอาหาร                         | 50.56 $\pm$ 37.68                  | 8.22 $\pm$ 5.16   | 29.39 $\pm$ 18.56    |
| <b>ค่าเฉลี่ย<sup>x</sup> (<math>\pm</math>SE)</b> | 72.06 $\pm$ 33.31 a                | 8.55 $\pm$ 3.70 b | 40.31 $\pm$ 16.79    |

$$CV = 32.07 \%$$

x ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test



### การทดสอบอาหารแบบง่ายที่โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เพื่อทดสอบอาหาร ซึ่งประกอบด้วยอาหาร Vacin and Went และอาหารแบบง่ายสูตร OD(1987) โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะเป็นเวลา 18 สัปดาห์ เมื่อทำการวัดนับจำนวนโปรโตคอร์รมสีเขียวและจำนวนยอด (ตารางที่ 8) พบว่า อาหารทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยจำนวนโปรโตคอร์รมสีเขียวที่เกิดจากการใช้อาหาร Vacin and Went มีจำนวนเฉลี่ยเป็น 9.11 โดยจะเริ่มพบลักษณะของโปรโตคอร์รมสีเขียวบางส่วนในสัปดาห์ที่ 12 ดังภาพที่ 7 และเมล็ดบางส่วนได้พัฒนาเป็นโปรโตคอร์รมเช่นกันแต่มีสีเหลือง โปรโตคอร์รมที่พบมีลักษณะกลมรีมีปลายแหลม และพบเกิดลักษณะใบและยอดจากส่วนที่เป็นปลายแหลมของโปรโตคอร์รมในสัปดาห์ที่ 12 ซึ่งสังเกตว่าในขวดอาหารเดียวกันจะพบทั้งส่วนที่เป็นโปรโตคอร์รมสีเขียว สีเหลือง ส่วนของเมล็ดที่ไม่พัฒนา ซึ่งจะมีขนาดเล็กกว่าและมีสีจืด และบางส่วนมีการพัฒนาจนเป็นลักษณะของใบให้เห็น (ภาพที่ 7 และ 8) ในขณะที่อาหารคัดแปลง OD ไม่พบโปรโตคอร์รมที่มีสีเขียว ในสัปดาห์ที่ 18 พบว่าเมล็ดที่พบมีการพัฒนาขนาดขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 1 แต่ยังมีขนาดเล็กและไม่สามารถบอกลักษณะของสีได้ชัดเจน ในส่วนของจำนวนยอด (ตารางที่ 8 ) พบว่า อาหาร Vacin and Went มีจำนวนยอดเฉลี่ยเป็น 17.33 โดยจะสามารถสังเกตพบลักษณะยอดในบางส่วนเมื่ออายุได้ 16 สัปดาห์ ดังภาพที่ 8 ในขณะที่อาหารคัดแปลง OD ไม่พบการเกิดยอดเช่นเดียวกับโปรโตคอร์รมสีเขียว

**ตารางที่ 7** แสดงผลของอุปกรณ์ร่วมกับอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในชิ้นส่วนเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ ในระยะเวลา 6 สัปดาห์

| อาหาร           | เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน $\bar{x}(\pm SE)$ |
|-----------------|--|
| Vacin and Went  | 6.67 $\pm$ 7.70 b                        |
| อาหารคัดแปลง OD | 46.67 $\pm$ 32.20 a                      |
| F-test          | *  |
| CV              | 23.41 %                                  |

- x ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test
- \* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P < 0.05$

**ตารางที่ 8** แสดงผลของอาหาร Vacin and Went และ อาหารตัดแปลง OD ต่อจำนวน โปรโตคอร์รมีสีเขียว และจำนวนยอด จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เป็นเวลา 18 สัปดาห์

| อาหาร           | จำนวนโปรโตคอร์รมีสีเขียว $\bar{x}(\pm SE)$ | จำนวนยอด $\bar{x}(\pm SE)$ |
|-----------------|--|----------------------------|
| Vacin and Went  | 9.11 $\pm$ 5.33 a                          | 17.33 $\pm$ 10.14 a        |
| อาหารตัดแปลง OD | 0.00 $\pm$ 0.00 b                          | 0.00 $\pm$ 0.00 b          |
| F-test          | **   | **                         |
| CV              | 23.13 %                                    | 23.44 %                    |

x ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

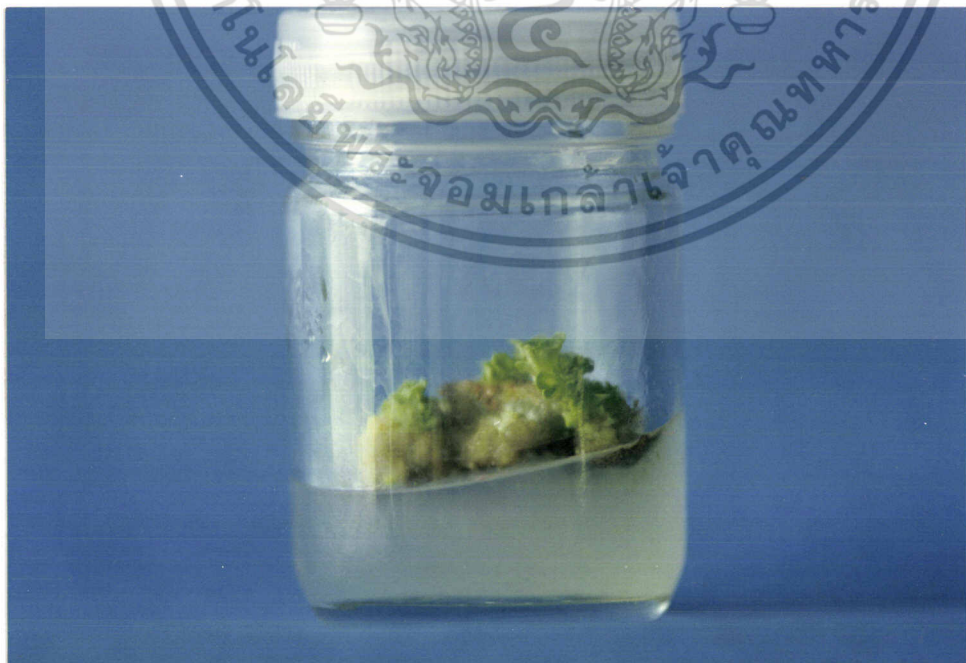
\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P < 0.01$



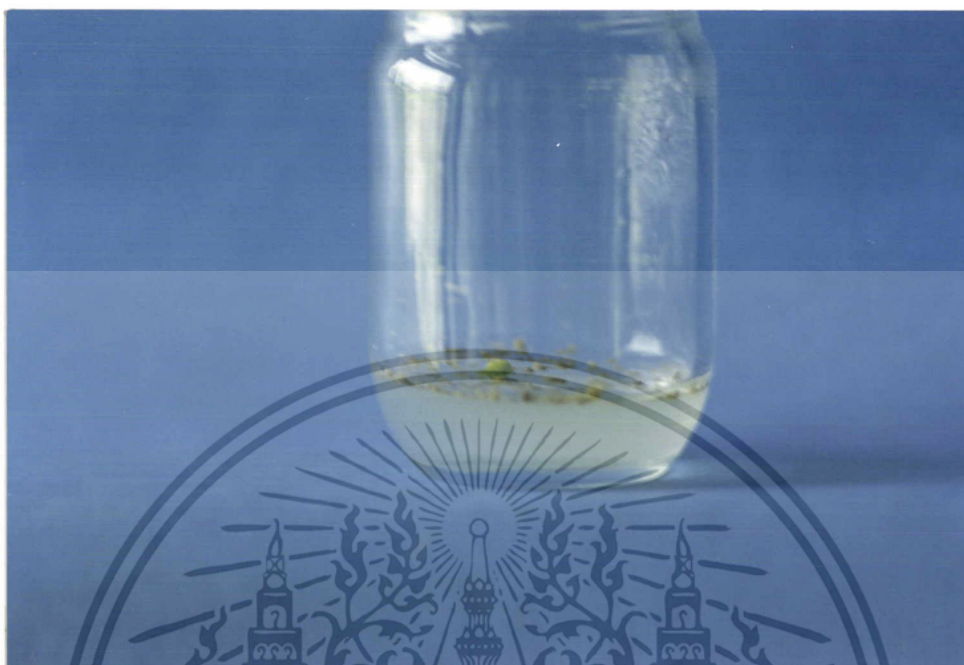
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



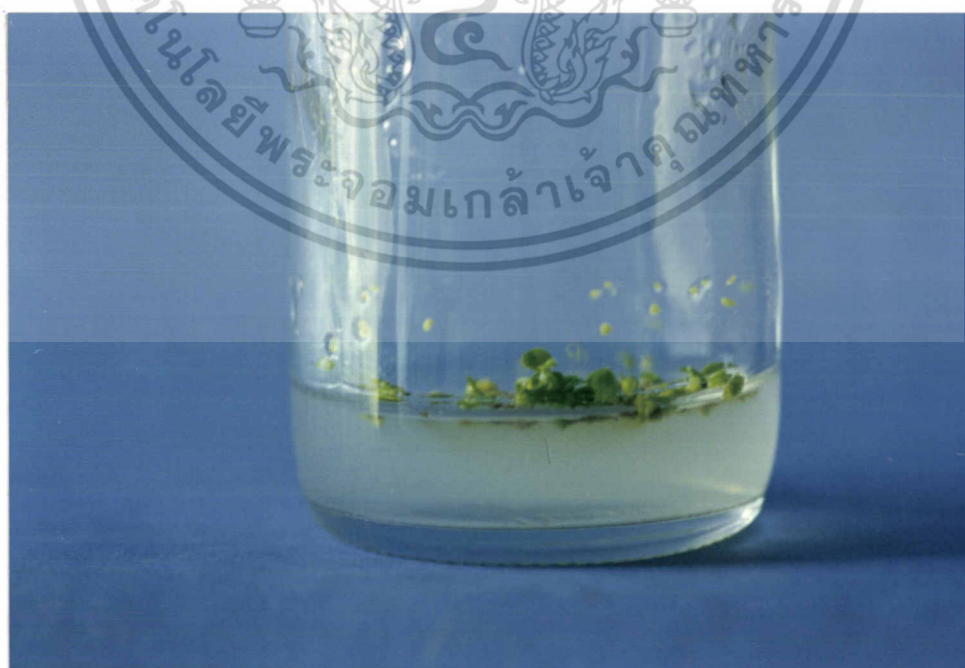
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะชิ้นส่วนตาของแอฟริกันไวโอเลต



เอกสารนี้เป็**ภาพที่ 6** ที่แสดงลักษณะยอดที่เกิดบนชิ้นส่วนแอฟริกันไวโอเลต เมื่ออายุ 9 สัปดาห์ ชนด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะ โปรรี โคคิออร์มที่มีสีเขียว (บริเวณกต.นงหวต) จากการเพาะเลี้ยง  
เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เมื่ออายุ 18 สัปดาห์



เอกสารนี้เป็น **ภาพที่ 8** แสดงลักษณะขดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะเมื่ออายุ 18 สัปดาห์ ค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำตู้เลี้ยงปลาและเครื่องฟอกอากาศมาดัดแปลงเพื่อใช้เป็นตู้ย้ายชิ้นส่วนในสภาพปลอดเชื้อ และนำหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) มาใช้ในการนึ่งฆ่าเชื้อแทนหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รวมทั้งทำการทดสอบอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบต่างๆ ของ Bridgen and Brand ซึ่งได้มีการรายงานว่าสามารถทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแอฟริกันไวโอเลตได้ (Kyte, 1987) โดยทำการเปรียบเทียบกับอาหาร MS+NAA 5.4  $\mu\text{M}$ +BA 4.4  $\mu\text{M}$  (Start and Cumming, 1976) และ อาหารที่มีส่วนประกอบต่างๆ สูตร OD (1987) ซึ่งมีการรายงานว่าสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ได้ (อรดี, 2538) โดยทำการเปรียบเทียบกับอาหาร Vacin and Went (Goh, 1990) เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้อุปกรณ์ที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง มาใช้งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับผู้สนใจ หรือ นักเรียน นักศึกษา ภายหลังจากทำการทดลอง พบว่า

การนำตู้เลี้ยงปลาและเครื่องฟอกอากาศมาดัดแปลง ใช้เป็นตู้ย้ายชิ้นส่วนในสภาพปลอดเชื้อ นั้น สามารถนำมาใช้ทำงานแทนตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) ที่มีราคาสูงได้ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Taji (1996) รายงานไว้ โดยลักษณะของตู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลงนี้ จะใช้ลักษณะการไหลของอากาศ จากด้านหลังผ่านแผ่นกรองประสิทธิภาพสูง (HEPA filter) แล้วไหลเข้าภายในตู้ ผ่านพื้นที่ทำงาน และออกสู่ด้านหน้าของตัวตู้ ลักษณะที่อากาศมีการไหลต่อเนื่องตลอดเวลาจะช่วยป้องกันไม่ให้อากาศที่ไม่ผ่านการกรองภายนอกตู้เข้าสู่ภายในได้ (Dodds and Roberts, 1995) ถึงแม้ว่าในการทดสอบตู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลงจะพบว่า การทดสอบครั้งที่ 3 มีแนวโน้มการปนเปื้อนสูงขึ้นมากกว่าผลการทดสอบ ในครั้งที่ 2 จึงจำเป็นต้องทำการผ่านแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบครั้งที่ 4 ซึ่งผลของการทดสอบในครั้งที่ 4 และ 5 ไม่พบการปนเปื้อน ซึ่งสอดคล้องกับที่ Dodds and Roberts(1995) รายงานไว้ว่า ในการใช้งานตู้ย้ายชิ้นส่วนดัดแปลงจำเป็นต้องทำการฆ่าเชื้อและทำความสะอาดภายในเสียก่อน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อโรคในชิ้นส่วนพืชได้ การผ่านแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อโรคเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดในห้องปฏิบัติการ (Dodds and Roberts, 1995)

ในส่วนของการนำหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) มาใช้นึ่งฆ่าเชื้อแทนการใช้หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) พบว่า สามารถนำมาใช้ทำงานแทนกันได้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Taji (1996), Hartmann *et al.* (1959), Dodds and Roberts (1995) และ Kyte (1987) พบว่าหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) มีการทำงานเช่นเดียวกับหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) การใช้หม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) ในการนึ่งฆ่าเชื้อมีข้อจำกัดในเรื่องของ จำนวนขวด อาหาร ขนาดขวดอาหาร ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อในแต่ละครั้ง ในกรณีที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อขวด

อาหารครั้งละมากๆ โดยใช้หม้อตุ๋นอาหารความดันจำกัดทำการหนึ่งหลายๆ ครั้ง แต่ถึงอย่างไรก็ตามการนึ่งมาเรื่อยๆ สำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบประหยัด สามารถนำหม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) มาใช้แทนหม้อหนึ่งความดันได้

ในส่วนของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของแอฟริกันไวโอเลต พบว่า อาหารตัดแปลง Bridgen and Brand มีการตายของชิ้นส่วนเกิดขึ้นถึง 100 % ในขณะที่อาหาร MS+NAA 5.4 $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M พบการตายของชิ้นส่วน เพียง 6.67 % อีกทั้งพบว่า อาหาร MS+NAA 5.4 $\mu$ M+BA 4.4  $\mu$ M ทำให้เกิดจำนวนยอด 52.61 ในขณะที่ อาหารตัดแปลง Bridgen and Brand ไม่พบการเกิดยอดเลย แสดงว่า อาหารตัดแปลง Bridgen and Brand ไม่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลตได้ ซึ่งขัดกับผลการทดลองของ Bridgen (1986) ที่สามารถใช้อาหารตัดแปลง Bridgen and Brand เพาะเลี้ยงส่วนใบและก้านใบของแอฟริกันไวโอเลตได้สำเร็จ ซึ่งสาเหตุสำคัญที่ไม่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลต โดยใช้อาหารตัดแปลง Bridgen and Brand อาจเนื่องมาจาก ส่วนผสมบางตัวในอาหารตัดแปลง Bridgen and Brand นั้นใช้ยาเม็ด Inositol ขนาด 250 mg 1/2 เม็ดเป็นส่วนผสม ตามรายงานของ Kyte (1987) แต่ในประเทศไทยไม่มียาเม็ดชนิดนี้จำหน่าย เท่าที่หามาใช้แทนได้จะเป็นยาเม็ด Lipochol ที่ใน 1 เม็ด มีส่วนประกอบของ Inositol 30 mg ซึ่งจะมีส่วนประกอบสารอื่นๆ อีกหลายตัว ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการเจริญของชิ้นส่วนแอฟริกันไวโอเลต และทำให้เกิดการตายขึ้น อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าอาหารตัดแปลง Bridgen and Brand ที่ใช้ในการทดลองนี้ ไม่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลตได้

ในส่วนของอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ ซึ่งประกอบด้วย อาหาร Vacin and Went และอาหารตัดแปลง OD (1987) ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ซึ่งกระเป็นเวลา 10 สัปดาห์พบว่า อาหารตัดแปลง Vacin and Went ทำให้เกิดจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียว 72.06 ในขณะที่ อาหารตัดแปลง OD (1987) เกิดจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียวเพียง 8.55 ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ อร์ดี (2538) ที่ว่าอาหารตัดแปลง OD (1987) สามารถใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ได้ ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาเกาะเป็นเวลา 18 สัปดาห์ ผลที่ได้ก็เป็นไปในทำนองเดียวกัน นั่นคือ ขัดแย้งกับรายงานของ อร์ดี (2538) ที่ว่าอาหารตัดแปลง OD (1987) สามารถใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ได้ โดยพบว่า อาหาร Vacin and Went สามารถทำให้เกิดจำนวนโปรโตคอร์มสีเขียวเป็นจำนวน 9.11 และเกิดเป็นยอดจำนวน 17.33 ในขณะที่อาหารตัดแปลง OD (1987) ไม่พบการเกิดโปรโตคอร์มสีเขียว และยอดเลย จากผลที่ว่า อาหารตัดแปลง OD(1987) ไม่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ได้นั้น อาจมีสาเหตุอันเนื่องมาจาก สูตรอาหารตัดแปลงที่ อร์ดี (2538) ได้รายงานไว้ ใช้ปุ๋ยทวินเฟอร์ดี สูตร 12-23-27 เป็นส่วนผสม แต่เนื่องจากไม่มี ปุ๋ยทวินเฟอร์ดี สูตร 12-23-27 จำหน่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในท้องตลาด จึงได้เลือกสูตรที่ใกล้เคียงมาใช้แทน คือ ปุ๋ยพวีนเฟอร์ตี สูตร 13-27-27 และจากการทดลองพบว่า อาหารแบบง่าย OD (1987) มีลักษณะการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้เช่นเดียวกับการใช้อาหาร Vacin and Went แต่มีแนวโน้มการพัฒนาที่ช้ากว่ามาก และจากผลการทดลองพบว่าในสัปดาห์สุดท้ายเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแบบง่าย OD (1987) มีขนาดเล็กจนไม่สามารถสังเกตลักษณะของส่ได้ชัดเจน ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ว่าเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแบบง่าย OD (1987) กำลังมีการพัฒนาในระดับเริ่มต้น และมีการพัฒนาที่ช้า ซึ่งจำเป็นต้องใช้เวลาในการทดสอบให้มากขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบประหยัด สามารถใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วนที่คัดแปลงขึ้นโดยใช้ตู้เลี้ยง-ปลาและเครื่องฟอกอากาศ และใช้หม้อตุ๋นอาหารความดัน (Pressure cooker) ในการนึ่งฆ่าเชื้อ แทนการใช้ตู้ย้ายชิ้นส่วน (Laminar-air flow cabinet) และหม้อนึ่งความดัน(Autoclave)ได้ ตามลำดับ ในส่วนของอาหารคัดแปลง Bridgen and Brand พบว่าไม่สามารถใช้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลตแบบประหยัดได้ การใช้อาหารคัดแปลง OD(1987) เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้แบบประหยัด เมล็ดกล้วยไม้สามารถเจริญและพัฒนาได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองกับการใช้อาหาร Vacin and Went (1949) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง.

- ครรชิต ธรรมศิริ. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. อัดสำเนา จากเอกสารเผยแพร่ สถาบันวิจัยพืชสวนบางกอกน้อย. 11 น.
- จิตรภาพรณ พิสิท. 2536. การเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 82 น.
- ธรรมรัตน์ ยางสูง. 2539. การประดิษฐ์ตู้ปลอดเชื้อในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ. แบบสำรวจข้อมูล , โครงการนำเสนอในงานนิทรรศการ "พระจอมเกล้าลาดกระบังเฉลิมพระเกียรติ: เทคโนโลยีเพื่อ ปวงชน" สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 12 น.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 158 น.
- ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2521. ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. พิมพ์ครั้งที่1: ห้างหุ้นส่วนสามัญ นิติบุคคลอาหารการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 432 น.
- สนั่น จำเลิศ. 2522. หลักการขยายพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 374 น.
- อรดี สหวัชรินทร์. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 49 น.
- Bridgen, M.P. 1986. Do-it-yourself Cloning. Greenhouse Grower, May, 1986: 43-47 Cited by L. Kyte. Plant from Test Tubes: An introduction to Micropropagation. Portland, OR; Timber Press. 160 p.
- Bridgen, M.P. and J.J.W. Bartok. 1996. <http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/microprop/facilities/microlab.html>.
- Bridgen and Brand. University of Connecticut. Cited by L. Kyte. 1987. Plant from Test Tubes: An introduction to Micropropagation. Portland, OR; Timber Press. 160 p.
- Conger, B.V. 1981. Cloning Agricultural Plants via *In Vitro* Techniques. CRC Press. 273 p.
- Cooke, R.C. 1977. Tissue Culture Propagation of African Violet. HortScience. 12(6): 549.
- Dixon, R.A. 1985. Plant Cell Culture: a Practical Approach. Oxford, England : IRL Press. 236 P.
- Dixon, R.A. and R.A. Gonzales. 1994. Plant Cell Culture: A Practical Approach. Oxford University Press. 230 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1995. Experiments in Plant Tissue Culture. New York : Cambridge University Press. 160 p.
- Goh, C.J. 1990. Orchids, Monopodials. *In* P.V Amirati., D.R. Evans., W.R. Sharp. and P.S. Yashpal (eds.) Handbook of Plant Cell Culture Volume 5. McGraw Hill, Inc. USA. 833 p.
- Grout, B.B.W. 1990. African Violet. pp.181-205. *In* P.V Amirati., D.R. Evans., W.R. Sharp. and P.S. Yashpal (eds.) Handbook of Plant Cell Culture Volume 5. McGraw Hill, Inc. USA. 833 p.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester and F. T. Davies.Jr. 1959. Plant Propagation: Principle and Practices. 647 p.
- Knudson, C. 1846. A New Nutrient for the Germination of Orchid Seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 36: 125-126.
- Kyte, L. 1987. Plant from Test Tubes: An introduction to Micropropagation. Portland, OR; Timber Press. 160 p.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Culture. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Smith, R.H. 1992. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. San Diego: Academic Press. Inc. 171 p.
- Start, N.D. and B.G. Cumming. 1976. *In Vitro* Propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *HortScienc.* 11(3): 204-206.
- Street, H.E. 1973. Plant Tissue and Cell Culture. Berkly: University of California Press. 614 P.
- Taji, A. 1996. <http://www.une.edu.au/~agronomy/AgSSrHortTCinfo.html>.
- Trigino, R.N. and D.J. Gray. 1996. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press, Inc. USA. 374 p.
- Vacin, E. and F. Went. 1949. Some pH Change in Nutrient Solution. *Botan. Gaz.* 110: 605-613.



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)**  
**(สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอฟริกันไวโอเลต)**

| สารเคมี   | ปริมาณ (mg/l) |
|---|---------------|
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$                            | 1650          |
| $\text{KNO}_3$                                      | 1900          |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 440           |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | 370           |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 170           |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | 6.2           |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | 22.3          |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 8.6           |
| KI  | 0.83          |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25          |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$           | 0.025         |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 0.025         |
| $\text{Na}_2\text{-EDTA}$                           | 37.25         |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 27.858        |
| Glycine   | 2.0           |
| Nicotinic acid                                      | 0.5           |
| Pyridoxine-HCl                                      | 0.5           |
| Thiamine-HCl  | 0.1           |
| Sucrose   | 30000         |
| NAA   | 1.005         |
| BA  | 0.991         |
| Agar  | 8000          |
| pH  | 5.8           |

ที่มา : ประสาทร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สูตรอาหาร Vacin and Went (1949)**  
**(สำหรับเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้)**

| สารเคมี                                   | ปริมาณ (mg/l) |
|---|---------------|
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$              | 200           |
| $\text{KNO}_3$                            | 525           |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 250           |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 500           |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 250           |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.85         |
| $\text{Na}_2\text{-EDTA}$                 | 37.25         |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 7.5           |
| Sucrose                                   | 20000         |
| น้ำมะพร้าว                                | 150 ml.       |
| Agar                                      | 6200          |
| pH  | 5.5           |

ที่มา : ศรราชิต ชรรณศิริ. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อ.  
ยัดสำเนาจากเอกสารเผยแพร่ สถาบันวิจัยพืชสวนบางกอกน้อย. 11 น.

**สูตรอาหารดัดแปลงของ Bridgen and Brand**  
(สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แอฟริกันไวโอเล็ต)

| สารเคมี  | ปริมาณ        |
|--|---------------|
| Table sugar  | 1/8 cup       |
| Tab water  | 1 cup         |
| Stock : 1/4 tsp. all purpose<br>10-10-10 fertilizer in<br>1 gal. water | 1/2 cup stock |
| Inositol tablet (250 mg.)  | 1/2 tablet    |
| Vitamin tablet with<br>Thiamine  | 1/2 tablet    |
| Agar flakes  | 2 tablespoons |

ที่มา : Kite,L. 1987. Plant From Test Tubes. Timber Press,Inc. Hong kong. P.47

**สูตรอาหารดัดแปลง OD(1987)**  
(สำหรับเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้)

| สารเคมี                  | ปริมาณ   |
|--------------------------|----------|
| ปุ๋ยทวินเฟอร์ตี 13-27-27 | 2 g/l    |
| น้ำตาลทราย               | 30 g/l   |
| น้ำมะพร้าว               | 150 ml/l |
| ไขมัน                    | 6.2 g/l  |
| ความเป็นกรด-ด่าง         | 5.6      |

ที่มา : อรดี สหวัชรินทร์. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 22.

### ส่วนประกอบของสารเคมีในยา Lipochol 1 เม็ด

| สารเคมี   | ส่วนประกอบ |
|---|------------|
| Tioctic acid                                      | 3.5 mg     |
| Orotic acid                                       | 30 mg      |
| Inositol  | 30 mg      |
| Methionine  | 50 mg      |
| Vitamin B <sub>1</sub> (Thiamine mononitrate)     | 2 mg       |
| Vitamin B <sub>2</sub> (Riboflavin)               | 1 mg       |
| Vitamin B <sub>6</sub> (Pyridoxine hydrochloride) | 1 mg       |
| Vitamin B <sub>12</sub> (Cyanocobalamin)          | 1 µg       |
| Vitamin C   | 30 mg      |
| Nicotinamide                                      | 10 mg      |
| Calcium pantothenatr                              | 5 mg       |

ที่มา : เอกสารกำกับยา Lipochol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 6** การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอุปกรณ์และอาหาร ต่อการเกิดขอดของ แอฟริกันไวโอเลต เมื่อมีอายุ 9 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูลแบบ  $\log x+1$

| SOV   | df | SS      | MS     | F-value              | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|---------|--------|----------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 0.1014  | 0.0507 | 0.7226 <sup>NS</sup> | 5.14   | 10.92  |
| Tr    | 3  | 8.0732  | 2.6911 | 38.3462**            | 4.76   | 9.78   |
| A     | 1  | 0.0002  | 0.0002 | 0.0023 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| B     | 1  | 8.0729  | 8.0729 | 115.0341**           | 5.99   | 13.75  |
| AB    | 1  | 0.00002 | 0.0002 | 0.0022 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| ERROR | 6  | 0.4211  | 0.0702 |                      |        |        |
| TOTAL | 11 | 8.5957  | 0.7814 |                      |        |        |

Grand Mean = 0.82      CV = 32.30 %      SE = 0.11

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

**ตารางภาคผนวกที่ 7** การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอุปกรณ์และอาหารต่อการเกิดโปรโตคอร์ม สีเขียวของเมล็ดกล้วยไม้ข้างกระ เมื่อมีอายุ 10 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูลแบบ  $\log x$

| SOV   | df | SS     | MS     | F-value              | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|--------|--------|----------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 0.1179 | 0.0589 | 0.3353 <sup>NS</sup> | 5.14   | 10.92  |
| Tr    | 3  | 2.3039 | 0.7680 | 4.3682 <sup>NS</sup> | 4.76   | 9.78   |
| A     | 1  | 0.2272 | 0.2272 | 1.2925 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| B     | 1  | 1.9169 | 1.9169 | 10.9039*             | 5.99   | 13.75  |
| AB    | 1  | 0.1597 | 0.1597 | 0.9083 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| ERROR | 6  | 1.0548 | 0.1758 |                      |        |        |
| TOTAL | 11 | 3.4766 | 0.3161 |                      |        |        |

Grand Mean = 1.31      CV = 32.07 %      SE = 0.17

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 8** การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอาหารต่อการเกิดโปรโตซอร์รมลีเขียวของ  
เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ เมื่อมีอายุ 18 สัปดาห์

| SOV   | df | SS       | MS       | F-value              | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|----------|----------|----------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 2.2203   | 1.1101   | 1.0000 <sup>NS</sup> | 19.00  | 99.00  |
| Tr    | 1  | 124.4881 | 124.4881 | 112.1364**           | 18.51  | 98.49  |
| ERROR | 2  | 2.2203   | 1.1101   |                      |        |        |
| TOTAL | 5  | 128.9287 | 25.7857  |                      |        |        |

Grand Mean = 4.55

CV = 23.13 %

SE = 0.61

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

**ตารางภาคผนวกที่ 9** การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอาหาร ต่อการเกิดขอดของเมล็ดกล้วยไม้  
เขาแกะ เมื่อมีอายุ 18 สัปดาห์

| SOV   | df | SS       | MS       | F-value              | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|----------|----------|----------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 8.2537   | 4.1269   | 1.0000 <sup>NS</sup> | 19.00  | 99.00  |
| Tr    | 1  | 450.4933 | 450.4933 | 109.16108**          | 18.51  | 98.49  |
| ERROR | 2  | 8.2538   | 4.1269   |                      |        |        |
| TOTAL | 5  | 467.0008 | 93.4002  |                      |        |        |

Grand Mean = 8.66

CV = 23.44 %

SE = 1.17

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

**ตารางภาคผนวกที่ 10** การวิเคราะห์ทางสถิติผลของอุปกรณ์ และอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน  
ในชิ้นส่วนของ แอฟริกันไวโอเล็ต ภายใน 6 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูล

แบบ arcsine

| SOV   | df | SS        | MS       | F-value              | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|-----------|----------|----------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 381.8711  | 190.9355 | 1.5860 <sup>NS</sup> | 5.14   | 10.92  |
| Tr    | 3  | 955.4316  | 318.4772 | 2.6455 <sup>NS</sup> | 4.76   | 9.78   |
| A     | 1  | 253.0143  | 253.0143 | 2.1017 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| B     | 1  | 698.6797  | 698.6797 | 5.8037 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| AB    | 1  | 3.7376    | 3.7376   | 0.0310 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| ERROR | 6  | 722.3135  | 120.3856 |                      |        |        |
| TOTAL | 11 | 2059.6162 | 187.2378 |                      |        |        |

Grand Mean = 27.19      CV = 40.35 %      SE = 4.48

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

**ตารางภาคผนวกที่ 11** การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของอุปกรณ์และอาหาร ต่อเปอร์เซ็นต์การตาย  
ในชิ้นส่วนของ แอฟริกันไวโอเล็ต ภายใน 6 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูล

แบบ arcsine

| SOV   | df | SS        | MS        | F-value             | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|-----------|-----------|---------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 221.678   | 110.839   | 3.000 <sup>NS</sup> | 5.14   | 10.92  |
| Tr    | 3  | 17142.293 | 5714.098  | 154.659**           | 4.76   | 9.78   |
| A     | 1  | 0.000     | 0.000     | 0.000 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| B     | 1  | 17142.293 | 17142.293 | 463.978**           | 5.99   | 13.75  |
| AB    | 1  | 0.000     | 0.000     | 0.000 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| ERROR | 6  | 221.678   | 36.946    |                     |        |        |
| TOTAL | 11 | 17585.649 | 1598.695  |                     |        |        |

Grand Mean = 52.20      CV = 11.64 %      SE = 2.48

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 12** การวิเคราะห์ทางสถิติผลของอุปกรณ์และอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน  
ในชิ้นส่วนของเมล็ดกล้วยไม้ ช้างกระ ภายใน 6 สัปดาห์ โดยการแปลง  
ข้อมูลแบบ arcsine

| SOV   | df | SS       | MS       | F-value             | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|----------|----------|---------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 358.626  | 179.313  | 0.838 <sup>NS</sup> | 5.14   | 10.92  |
| Tr    | 3  | 1012.003 | 337.334  | 1.577 <sup>NS</sup> | 4.76   | 9.78   |
| A     | 1  | 0.000    | 0.000    | 0.000 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| B     | 1  | 1012.003 | 1012.003 | 4.730 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| AB    | 1  | 0.000    | 0.000    | 0.000 <sup>NS</sup> | 5.99   | 13.75  |
| ERROR | 6  | 1283.773 | 213.962  |                     |        |        |
| TOTAL | 11 | 2654.402 | 241.309  |                     |        |        |

Grand Mean = 29.67      CV = 49.29 %      SE = 5.97

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

**ตารางภาคผนวกที่ 13** การวิเคราะห์ทางสถิติผลของอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในชิ้นส่วน  
ของเมล็ดกล้วยไม้เขามะ ภายใน 6 สัปดาห์ โดยการแปลงข้อมูลแบบ  
arcsine

| SOV   | df | SS        | MS        | F-value              | F 0.05 | F 0.01 |
|-------|----|-----------|-----------|----------------------|--------|--------|
| Bk    | 2  | 833.0034  | 416.5017  | 9.1992 <sup>NS</sup> | 19.00  | 99.00  |
| Tr    | 1  | 1232.8530 | 1232.8530 | 27.2298*             | 18.51  | 98.49  |
| ERROR | 2  | 90.5518   | 45.2759   |                      |        |        |
| TOTAL | 5  | 2156.4082 | 431.2816  |                      |        |        |

Grand Mean = 28.74      CV = 23.41 %      SE = 3.88

<sup>NS</sup> ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้