รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นแคลลัสและต้นใหม่ของไก่ฟ้าพญาลอ
Study on factor for callus induction and plant regeneration of *Aristolochia ringens* Vahl

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นแคลลัสและต้นใหม่ของไก่ฟ้าพญาลอ

Study on factor for callus induction and plant regeneration of *Aristolochia ringens* Vahl

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2558
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.0026663
i.
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
สพม.
เลขทะเบียน 147856
วัน เดือน ปี 15 ก.ค. 2560

1. **ชื่อโครงการวิจัย** (ภาษาไทย) การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นแคลลัสและต้นใหม่ของไก่ฟ้าพญาลอ

(ภาษาอังกฤษ) Study on factor for callus induction and plant regeneration of *Aristolochia ringens* Vahl

แหล่งเงิน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป (เงินรายได้) ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงิน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 100 %

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบของไก่ฟ้าพญาลอ (*Aristolochia ringens* Vahl) บนสูตรอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าที่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของไก่ฟ้าพญาลอได้ การชักนำแคลลัสของไก่ฟ้าพญาลอให้เป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ทุกความเข้มข้นสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ในระยะเวลา 90 วัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนข้อของไก่ฟ้าพญาลอ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ในการชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด จากนั้นนำต้นมาชักนำให้เกิดราก ในอาหารแข็ง สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (Indole-3-butyric acid) ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ในการชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด และย้ายต้นที่สมบูรณ์นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้สำเร็จ

คำสำคัญ: *Aristolochia* การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส การเจริญเป็นต้นใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Tissue culture of *Aristolochia ringens* Vahl. leaves cultured on MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with different concentration of 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2, 4-D and 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel, in the dark conditions for 6 weeks was investigated. Results show the calli were growth in all media. Calli were regenerated in all media of BA concentration for 90 days.

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

Keywords: *Aristolochia*, tissue culture. callus, regeneration

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2558 ประเภท ส่งเสริมนักวิจัย และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบคุณ คุณทัศนารถ กระจ่างวุฒิ ที่ได้อนุเคราะห์สายพันธุ์ไก่ฟ้าพญาลอ (*Aristolochia* sp.) จากแปลงทดลองส่วนพระองค์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ น้องๆ รวมทั้งลูกศิษย์ทุกคนที่มีร่วมในการวิจัย ครอบครัวที่กำลังใจ และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ลักษณะทั่วไปของ *Aristolochia*	4
2.1.1 *Aristolochia*	4
2.1.2 *Aristolochia ringens* Vahl	5
2.1.3 *Aristolochia fimbriata*	5
2.1.4 *Aristolochia indica*	6
2.1.5 *Aristolochia* ชนิดต่างๆ	7
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)	8
2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง	8
2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	9
2.2.2.1 การขยายพันธุ์พืช	9
2.2.2.2 การปรับปรุงพันธุ์ (plant improvement)	10
2.2.2.3 การผลิตพืชปราศจากโรค (disease-free plants)	10
2.2.2.4 การเก็บรักษาพันธุ์พืช (plant conservation)	11
2.2.2.5 การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)	11
2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)	11
2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส	12
2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	13
2.2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์	13
2.2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์	14
2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช	17
2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้	18
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	23
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	23
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง	24
3.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ	24
3.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด	24
3.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด	25
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	26
4.1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ	26
4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด	27
4.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด	28
4.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก	30
4.5 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	33
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	34
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	35
ภาคผนวก ก	39
ข้อมูลประวัติผู้วิจัย	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1. การเจริญของยอดจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน	28
4.2 การเจริญของรากจากส่วนต้นต้นไก่ฟ้าพญาลอ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน	31
ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962)	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะส่วนต่างๆของต้นไก่ฟ้าพญาลอ	4
2.2 ลักษณะส่วนต่างๆของต้นไก่ฟ้าพญาลอ *Aristolochia ringens* Vahl	5
2.3 ลักษณะส่วนต่างๆของต้นไก่ฟ้าพญาลอ *ristolochia fimbriata*	6
2.4 ลักษณะส่วนต่างๆของต้นไก่ฟ้าพญาลอ *Aristolochia indica*	7
2.5 ลักษณะส่วนต่างๆของต้นไก่ฟ้าพญาลอ *Aristolochia sp*	8
4.1 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของต้นไก่ฟ้าพญาลอ	26
4.2 การเจริญของใบในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4- D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	26
4.3 การเจริญขอข้อในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นต่างๆ	27
4.4 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นไก่ฟ้าพญาลอ	28
4.5 การเจริญของยอดจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน	29
4.6 การเจริญขอข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30	29
4.7 การเจริญของยอดจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน 30 วัน (ก, ข) และ 60 วัน (ค, ง)	30
4.8 การเจริญของยอดจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน	31
4.9 สามารถชักนำให้เกิดราก (ก-จ) และสามารถชักนำให้เป็นต้นที่ที่มีรากที่สมบูรณ์ (ฉ-ช)	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย

ประเทศไทยมีพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่เป็นไม้ดอก ซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่มพืชที่มีวิวัฒนาการสูงสุดในอาณาจักรพืช พืชมีดอกทั้งหมดแบ่งออกเป็น 2 Subclass คือ Subclass Monocotyledonae ได้แก่ พืชใบเลี้ยงเดี่ยว และ Subclass Dicotyledonae ได้แก่ พืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งพืชทั้งสองกลุ่มนี้ต่างก็มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในส่วนต่าง ๆ คือ ระบบราก ลำต้น และใบ ดังนั้นในการพัฒนาพืชเหล่านี้โดยใช้ความรู้ทางสรีรวิทยา และการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ผล จำเป็นต้องมีความเข้าใจถึงลักษณะการเจริญเติบโตและรายละเอียดของพืชเหล่านี้ โดยพืชที่นำมาศึกษา คือ ไก่ฟ้าพญาลอ ไก่ฟ้าพญาลอ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Aristolochia ringens* Vahl อยู่ในวงศ์ Aristolochiaceae ชื่อทั่วไปเรียกว่า เถากระเช้าสีดา ไก่ฟ้า มีลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อย นำมาปลูกเป็นไม้ประดับในประเทศเขตร้อน สามารถขึ้นได้ดีทุกพื้นที่ ออกดอกตลอดปี นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ และปลูกเป็นอาหารสำหรับตัวอ่อนของผีเสื้อ (วีระชัย, 2538) ส่วนรากของ *Aristolochia* แต่ละสายพันธุ์ มักนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร (Reddy และคณะ, 1995) Gadhi และคณะ, (1999) กล่าวว่าสารสกัด methanol จากเหง้าหรือใบของ *Aristolochia paucinervis* Pomel หลายส่วนได้รับการคัดเลือกเพื่อหาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยใช้วิธีการเจือจางของวุ้นกับเชื้อแบคทีเรีย ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสนใจที่เป็นไปได้ที่จะสนับสนุนการใช้ *A. paucinervis* Pomel ในยาแผนโบราณแบบโมร็อกโกเพื่อรักษาผิวหนังและการติดเชื้อที่เนื้อเยื่ออ่อน และโรคลำไส้

และมีการศึกษาในระดับโมเลกุลถึงผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ (Hwang และคณะ, 2006) ความรุนแรงของสารพิษที่สร้างขึ้นจากสายพันธุ์นี้ นำมาประยุกต์ใช้อย่างจำเพาะ เช่น เป็นเซรุ่มแก้พิษงู (Abubakar และคณะ, 2006) ต้านการปฏิสนธิ (Gupta และคณะ, 1996) เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวและมะเร็งผิวหนัง ของร่างกาย (Hinou และคณะ, 1990) ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ หรือโปรโตซัว (Kumar และคณะ, 2006) และเป็นสารฆ่าหนอน (Nascimento และคณะ, 2004)

จากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความจำเป็นต้องมีการขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นจำนวนมาก และเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรม เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบต้นไก่ฟ้าพญาลอ ให้เกิดแคลลัส

1.2.2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและพัฒนาเป็นต้นใหม่

1.2.3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักข้อให้เกิดเป็นยอดหลายยอด

1.2.4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้มีรากที่สมบูรณ์

1.2.5. นำต้นไก่ฟ้าพญาลอ ออกปลูกสู่ธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงงานนี้ดำเนินการขึ้นเพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ต้นของไก่ฟ้าพญาลอ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยชักนำจากส่วนของใบให้เกิดแคลลัส ชักนำส่วนข้อให้เป็นต้นใหม่ และชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ และพัฒนาให้เกิดเป็นรากที่สมบูรณ์ แล้วย้ายออกปลูกในธรรมชาติ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไก่ฟ้าพญาลอ สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบการวิจัยอย่างแพร่หลาย การศึกษาวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไก่ฟ้าพญาลอ พบว่ามีการวิจัยดังนี้

Soniya และคณะ (2006) ขยายพันธุ์ *Aristolochia indica* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเพิ่มจำนวนการเกิดใหม่อย่างรวดเร็ว การเพิ่มจำนวนยอดจากการชักนำชิ้นส่วนปลายยอด และข้อปล้อง บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2-isopentenyladenine (2-iP) ความเข้มข้น 1-6 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจำนวนยอดสูงสุดที่ชักนำด้วยอาหารที่ประกอบด้วย 2-iP ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความแตกต่างของยอดที่เกิดขึ้นโดยตรงจากใบ และปล้อง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย BA 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.8-2 มิลลิกรัมต่อลิตร การเกิดใหม่จากแคลลัสเมื่อชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA 0.6-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8-3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเปลี่ยนถ่ายใส่อาหารที่มี BA อย่างเดียว 1-6 มิลลิกรัมต่อลิตร แยกยอดที่ยืดยาวออกจากกัน และทำให้เกิดรากด้วยอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถย้ายออกปลูกลงดินได้สำเร็จ

Joseph และ Inayath Sidique (2011) การเพาะเลี้ยงปลายยอด และตาข้างของ ไก่ฟ้าพญาลอ *Aristolochia bracteolata* ในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่ประกอบด้วย 6-benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพิ่มจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปลายยอด และตาข้าง พบว่าปลายยอดสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ 6.5 ยอด และพบว่า BAP ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนยอด ได้ 8.9 ยอด และนำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย Indole-3-butyric acid (IBA) 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถสร้างรากได้ จากนั้นนำต้นที่มียอดและรากที่สมบูรณ์ย้ายออกปลูกในกระถางได้สำเร็จ

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการที่จะขยายพันธุ์ การเพิ่มปริมาณ โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นไก่ฟ้าพญาลอ ให้มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

ไก่ฟ้าพญาลอ (*Aristolochia ringens* Vahl), แคลลัส (callus), การเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำใบให้เกิดแคลลัส
2. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการชักนำข้อให้เกิดยอด
3. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำแคลลัสกลายเป็นต้น
4. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการชักนำต้นให้มีการที่สมบูรณ์
5. ย้ายออกปลูกในธรรมชาติเพื่อได้ต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะทั่วไปของ *Aristolochia*

2.1.1 ***Aristolochia*** สกุลนี้ มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า "sensu lato" อยู่ในวงศ์ Aristolochiaceae ประกอบด้วยสายพันธุ์ประมาณ 500 สายพันธุ์ สามารถพบในทางเขตร้อน และบางสายพันธุ์จะอยู่ในบริเวณใกล้เขตร้อน หรือบริเวณที่มีอากาศค่อนข้างร้อน (Kelly และ Gonzalez, 2003) และพบประมาณ 90 สายพันธุ์ในเขตอุณหภูมิปกติของประเทศบราซิล (Leitao และ Kaplan, 1992) ในแต่ละสายพันธุ์จะมีการเปลี่ยนแปลงจากไม้กึ่งพุ่มมาเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง ภาพที่ 2.1 และส่วนใหญ่ผีเสื้อจะเป็นตัวชักนำการถ่ายละอองของเกสรตัวเมีย พืชในกลุ่มนี้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Brantjes, 1980; Costa และ Hime, 1981, 1983; Wolda และ Sabrosky, 1986; Hall และ Brown,1993; Burgess และคณะ, 2004) เนื่องจากเป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยา การต้านทานแมลง การฆ่าแมลง การต้านทานแบคทีเรีย และการต้านทานไวรัส (Garavito, 1990; Wu และคณะ, 2004) สารทุติยภูมิในพืชกลุ่มนี้ได้แก่ aristolochic acid, aristolactams, benzylisoquinoline, alkaloids, monoterpene, diterpene และ triterpene รวมทั้งที่ได้รับมาจาก diterpene labdanoic acid (LAs) sesquiterpene และ diterpene เป็นส่วนประกอบทางเคมีที่มีมากที่สุด (Leitao และ Kaplan, 1992; Kumar และคณะ, 2006) สารในกลุ่ม sesquiterpene ประมาณ 24 ชนิด ได้มีการศึกษา และอธิบายเอาไว้อย่างมาก โดยหลักแล้วจะประกอบไปด้วย cadinanes aristolanes germacrenes และ bicyclogermacrenes (Wu และคณะ, 2004)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะส่วนต่างๆของต้นไก่ฟ้าพญาลอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 *Aristolochia ringens* Vahl ไก่ฟ้าพญาลอ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Aristolochia ringens* Vahl อยู่ในวงศ์ Aristolochiaceae ชื่อทั่วไปเรียกว่า เถากระเช้าสีดา ไก่ฟ้าพญาลอ มีลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อย ลำต้นเกลี้ยง ใบเดี่ยว ผิวเกลี้ยง ใบเรียงสลับ รูปแผ่ค่อนข้างกลมคล้ายไต ความกว้าง 7.5-15.5 เซนติเมตร ความยาว 5-10 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ ปลายกลม โคนเว้าลึกรูปหัวใจ เส้นใบออกจากจุดโคนเชื่อมกันที่ขอบใบ ก้านใบยาว 3.5-8 เซนติเมตร มีหูใบเทียมลักษณะคล้ายใบขนาดเล็ก ดอกเป็นดอกเดี่ยว ออกตามซอกใบ รูปคล้ายนก พื้นสีเขียวอ่อน มีลายเป็นเส้นตาข่ายสีแดงหรือม่วงเข้ม ก้านดอกยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ส่วนโคนดอกเชื่อมกันเป็นกระเปาะ กว้าง 3-4 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ส่วนปลายโค้งพับขึ้น และแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนบนรูปคล้ายช้อนแบน ยาว 4-5.5 เซนติเมตร ส่วนล่างรูปขอบขนานโค้ง ยาวประมาณ 6-15 เซนติเมตร ภาพที่ 2.2 เกสรตัวผู้ 6 อัน อยู่ในกระเปาะ ผลรูปทรงกระบอก กว้าง 3-3.5 เซนติเมตร ยาว 7-7.5 เซนติเมตร มี 6 สัน เมื่อแก่จะแตกเป็นรูปคล้ายกระเช้าเมล็ดรูปหัวใจกลับ มีปีก ขนาด 2-3.5 มิลลิเมตร การกระจายพันธุ์มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ นำมาปลูกเป็นไม้ประดับในประเทศเขตร้อน สามารถขึ้นได้ดีทุกพื้นที่ ออกดอกตลอดปี นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ และปลูกเป็นอาหารสำหรับตัวอ่อนของผีเสื้อ (วีระชัย, 2538)

ภาพที่ 2.2 ลักษณะส่วนต่างๆ ของต้นไก่ฟ้าพญาลอ *Aristolochia ringens* Vahl

2.1.3 *Aristolochia fimbriata* ลักษณะเป็นพุ่ม และลำต้นมีขนาดเล็ก ความยาวสูงสุดประมาณ 18 นิ้ว ทำให้เหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้แขวนมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ แต่ละใบมีลักษณะกลม และมีขนาดกลาง ออกเป็นดอกเดี่ยวๆตามซอกใบ และบานตลอดฤดูร้อน เป็นพืชพื้นเมืองของอาร์เจนตินาปารากวัย และทางใต้ของบราซิล เจริญเติบโตในที่มีแสง และอากาศถ่ายเทสะดวก จะไม่ชอบแดดโดยตรง ให้อุณหภูมิในฤดูร้อน 68-78 องศาฟาเรนไฮต์ ส่วนฤดูหนาว 50 องศาฟาเรนไฮต์ รดน้ำเป็นประจำ ครั้งหรือสองครั้งต่อสัปดาห์ เจริญได้ดีที่สุดในดินที่อุดมสมบูรณ์ ขยายพันธุ์ด้วยการปักชำ และเพาะเมล็ด โดยจะตัดส่วนลำต้นของไม้เนื้ออ่อนนี้ ในช่วงฤดูใบไม้ร่วงหลังจากออกดอกแล้ว ขนาดยาว 4-5 นิ้ว ปักชำด้วยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเร่งราก ที่มีการระบายน้ำออก และเก็บรักษาความชื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการเริ่มเพาะเมล็ด ต้องแช่น้ำเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และให้แสงเพื่อการงอก (www.plantoftheweek.org/week076.shtml) ซึ่งสายพันธุ์นี้เป็นไม้ยืนต้น มีดอกที่น่าสนใจ ดึงดูดผีเสื้อ และมีคุณสมบัติทางยา ดอกของสปีชีส์นี้ มีลักษณะที่โดดเด่นไม่เหมือนดอกไม้อื่นๆ ภาพที่2.3 รูปร่างดอกสมมาตรด้านข้าง กลีบดอกเชื่อมติดกัน เพื่อล่อแมลงเข้าไปผสมเกสร ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ ในวงศ์ Aristolochiaceae ดอกจะมีรัศมีสมมาตรกัน เช่น *Saruma*, *Asarum* (Gonzalez และ Stevenson, 2000) อีกทั้งสปีชีส์นี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการผสมเกสรโดยใช้กลิ่น และกลีบดอกเป็นกับดักล่อแมลง ซึ่งแมลงต้องเป็นสปีชีส์ ที่มีความจำเพาะกับพืชเจ้าบ้าน ซึ่งสารทุติยภูมิประกอบด้วย aristolochia acid และ aristolactam ที่ได้จากวิถีชีวสังเคราะห์อัลคาลอยด์ (Kumar, 2006)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะส่วนต่างๆ ของต้นไก่ฟ้าพญาลอ ***ristolochia fimbriata***

2.1.4 *Aristolochia indica* จัดอยู่ในวงศ์ Aristolochiaceae มีกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศบังกลาเทศ มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศอินเดีย และศรีลังกา ในประเทศไทยยังไม่พบขึ้นตามธรรมชาติ เป็นพืชที่มีความพิเศษ และใกล้จะสูญพันธุ์ (Rahman, 2001) *Aristolochia indica* เป็นไม้เลื้อย ลำต้นยาวและบาง ผิวราบเรียบ ออกดอกน้อย ดอกจะออกมาระหว่างก้านกับกิ่ง ดอกมีลักษณะกลีบเลี้ยงเล็ก กลมรี แหลม สมมาตรด้านข้าง กลีบรวมเชื่อมติดกัน ที่โคนเป็นกระเปาะมีรูปร่างแตกต่างกัน รูปร่างคล้ายไก่ฟ้า ภาพที่2.4 มีกลิ่นเหม็น สีสะดุดตา ก้านเกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้มักเชื่อมกันเป็นเส้าเกสร รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มี 6 ช่อง บางชนิดจะบิดเป็นเกลียวขณะที่เจริญขึ้นเมล็ดเป็นรูปไข่ แหลม แบน มีปีก ผล เป็นแบบผลแห้งแตก แตกตามรอยตะเข็บ มีรูปร่างคล้ายกระเช้า Shafi และคณะ (2002) พบว่า น้ำมันหอมระเหยของ *Aristolochia indica* ประกอบด้วย β-caryophyllene และ α-humulene เป็นส่วนประกอบสำคัญ พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้

พืชในวงศ์ Aristolochiaceae จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งโดยใช้ส่วนของราก หัวใต้ดิน และลำต้น เป็นพืชที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวช่วยบรรเทาอาการปวดข้อ ลดการอักเสบ กระเพาะอาหารอักเสบ ไอแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาการอาหารไม่ย่อยในเด็ก และเป็นพืชที่ดีสำหรับแก้พิษสัตว์มีพิษขนาดเล็ก น้ำสกัดจากกลีบดอก หรือน้ำสกัดจากรากมีคุณสมบัติแก้พิษงูเห่า เนื่องจากมีสารที่ชื่อว่า Aristolochic acid ในแต่ละสายพันธุ์ มีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้

สาร Aristolochic acid (AA) (3,4-methylenedioxy-8-methoxy-10-nitrophenanthrene-1-carboxylic acid) คือ สารประกอบหลักที่พบในพืชชนิดนี้ AA ที่ได้จาก *Aristolochia indica* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก Kupchan and Doskotch (1962). และสารจำพวก sesquiterpene ที่ได้จากส่วนรากของ *Aristolochia indica* มีฤทธิ์ในการต้านการทำงานของฮอร์โมนเพศในหนูเพศเมีย และต้านการฝังตัวของไข่ที่ได้รับการผสมแล้วในผนังมดลูก Pakrashi และ คณะ 1977

สารสกัดจากพืช *Aristolochia indica* นำมาทดสอบศักยภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา สารใน ใบและลำต้นพบว่ามีการใช้ในการรักษาโรคพิษสุนัขบ้า และ ในแมลงที่สามารถกัดได้ (Vaghasiya and Chanda, 2007) และ Heinrich และคณะ (2009) ได้ศึกษาการประเมินความเสี่ยงต่อการใช้ *A. indica* ร่วมกับสายพันธุ์ Aristolochia อื่น ๆ และ Gomes และคณะ (2010) ศึกษาการใช้สาร AA ในการต่อต้านของพิษงูได้

ภาพที่ 2.4 ลักษณะส่วนต่างๆของต้นไก่ฟ้าพญาลอ *Aristolochia indica*

2.1.5 ***Aristolochia*** ชนิดต่างๆ ดังเช่น ภาพที่5

Aristolochia sp. Cerrado

Aristolochia labiata (*brasiliensis*)

Aristolochia pohliana

Aristolochia maxima

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aristolochia ridicula

Aristolochia cymbifera Domingos Martins

Aristolochia gibertii

Aristolochia esperenzae

Aristolochia arenicola Hance

Aristolochia galeata Brasilia

ภาพที่ 2.5 ลักษณะส่วนต่างๆ ของต้นไก่ฟ้าพญาลอ *Aristolochia* sp

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

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆ ส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

2.2.1.1 เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่มีเซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.2.1.4 เนื้อเยื่อเจริญอยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

2.2.1.5 เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ได้แก่

2.2.1.5.1 ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อท่ออาหารและ cortex

2.2.1.5.2 ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

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

2.2.1.5.4 ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.5 ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

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

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

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

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

ในปัจจุบันสามารถขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เป็นจำนวนมาก ดังตัวอย่างต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

2.2.2.2 การปรับปรุงพันธุ์ (plant improvement) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เช่น การช่วยย่นระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ โดยการเพาะเลี้ยงอับเรณู ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมหนึ่งชุดให้พัฒนาเป็นแคลลัสหรือต้นอ่อน จากนั้นเติมสารโคลชิซีนลงไปในอาหารที่เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นมาอีกเท่าหนึ่งกลายเป็นสองชุดและเป็นสายพันธุ์แท้ หรือเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็นโดสเปิร์มซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุดก็จะได้พืชที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุด ซึ่งต้นพืชดังกล่าวเมื่อนำไปปลูกในสภาพธรรมชาติจะให้ผลที่ไม่มีเมล็ด นอกจากนี้ยังสามารถชักนำเกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี เช่น แกมมา อัลตราไวโอเลต และเอ็กซ์ เป็นต้น หรือใช้สารเคมี เช่น โคลชิซีน (colchicine) เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) และโซเดียมเอไซด์ (sodiumazide) เป็นต้น เพื่อให้เกิดสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะที่พึงประสงค์ เช่น สายพันธุ์กลายที่ทนทานต่อโรคแมลง ทนทานต่อสภาพดินกรด ดินเค็ม ทนต่อสภาพความแห้งแล้ง ทนทานต่อสารปราบวัชพืชบางชนิด หรือสายพันธุ์กลายที่มีสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่สูงขึ้นกว่าเดิม เป็นต้น

2.2.2.3 การผลิตพืชปราศจากโรค (disease-free plants) โดยทั่วไปพืชที่ถูกเชื้อจุลินทรีย์เข้าทำลาย เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย เชื้อไวรัสนี้จะติดไปกับส่วนของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชตลอดเวลาทำให้ไม่สามารถผลิตพืชที่ปราศจากโรคได้ ซึ่งมีผลต่อพืชโดยตรง คือ พืชต้นนั้นจะมีความอ่อนแอ อัตราการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ ผลผลิตต่ำหรืออาจทำให้พืชนั้นตายได้ การผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยการตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด ให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดเล็กประมาณ 0.01-0.05 มิลลิเมตร เพราะบริเวณปลายยอดมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว และต่อเนื่อง การตัดปลายยอดต้องตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไวรัสเคลื่อนตัวตามท่อน้ำ และท่ออาหารไปไม่ถึง เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ก็สามารถที่จะพัฒนาให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และปราศจากเชื้อไวรัส เช่น มะเขือเทศ ยาสูบ เผือก มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นต้น

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

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

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

2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรงไคมา (parenchyma) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆแคลลัสมีขนาดต่างๆกันหลายรูปแบบมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคคิวโอสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆฉ่ำน้ำ คล้ายกับฟองน้ำ เรียกว่า friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน เนื้อเยื่อพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิต สามารถที่จะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ ยกตัวอย่างเช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ลำต้น ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เมล็ด เรณู แคมเบียม คอร์เทกซ์ และท่อลำเลียงอาหาร เป็นต้น

2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

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

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

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

2.2.4.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะต้องใช้แสงที่มีความเข้มข้นต่ำ หรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

2.2.4.5 สถานะของอาหารที่เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งจะช่วยให้แคลลัสมีพื้นที่สัมผัสอาหารน้อยกว่า

2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตรอาหาร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื้อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆจากนั้นนำแคลลัสมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆสามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้ว หรือ ช้อนตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้นควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารต่างๆ แต่ละสูตรจะมีชื่อเรียกต่างๆ กัน ตามชื่อผู้คิดค้น เช่น

White (1943) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ

Vacin และ Went (1949) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

Murashige และ Skoog (1962) ค้นพบสูตร MS เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ

Linsmaier และ Skoog (1965) ค้นพบอาหารสูตร LS

Nitch และ Nitch (1969) ค้นพบสูตรอาหาร NN

Gamborg และคณะ (1968) ค้นพบสูตรอาหาร B_5

Chu (1975) ค้นพบสูตร N_6 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด

Lloyd และ McCown (1980) ค้นพบสูตร WPM เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้เนื้อแข็ง

Driver และ Kuniyuki (1984) ค้นพบสูตร DKW เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวอลนัส

2.2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์

2.2.6.2.1 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีสำคัญมาก มีผลทำให้พืชมีการพัฒนา และเจริญเติบโต มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

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

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

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

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

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

2.2.6.2.1.6 อะดีนีน (adenine) หรือวิตามิน B_4 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_5H_5N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 135.13

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

2.2.6.2.2.6 กรด 4-อะมิโน-3,5,6-ไตรคลอโรพิโคลินิก (4-amino-3,5,6-trichloro picolinic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า picloram สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_3Cl_3N_2O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 241.46 สามารถละลายในน้ำ และอะซิโตน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

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

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

2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับขั้นตอนนี้ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอกเป็นต้น โดยจะต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพราะว่าในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ จะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัสแพร่กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โดยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไป พร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆภายในก็จะสูญเสียไปด้วย สารเคมีสามารถทำปฏิกิริยากับสารในไซโตพลาสซึม จะมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจะต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

2.2.7.1 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีเปอร์เซ็นต์ความปลอดจุลินทรีย์สูง

2.2.7.2 สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

147856

2.2.7.3 สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว ไม่ควรมีสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์

2.2.7.4 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

2.2.7.5 ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช *Aristolochia ringens* Vahl เพื่อขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการชักนำให้เกิดแคลลัส พัฒนาให้เกิดยอด และราก จากนั้นจึงนำมาปลูกในสภาวะธรรมชาติ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพอสรุปได้ดังนี้

Manjula และคณะ (1977) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดและตาข้างของ *Aristolochia indica* L. (Aristolochiaceae) ในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เสริมด้วย α-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.51 ไมโครโมลล่าร์ และ benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลล่าร์ สามารถทำให้เกิดจำนวนยอด 45-50 ยอด จากส่วนของปลายยอดและตาข้าง การสะสมฟีนอลิกในแคลสัสในอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหาร MS ที่เติม NAA หรือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid และ BA หรือ kinetin ถูกควบคุมโดยการเติม phloroglucinol (PG) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารสูตร MS ที่ชักนำแคลลัส อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลล่าร์ BA ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลล่าร์ และ PG ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดผลดีที่สุดในแง่ของการงอกของต้นใหม่ที่เกิดจากแคลลัส การพัฒนาใบหน่อจากส่วนใบทำได้โดยตรงโดยใช้ BA ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลล่าร์ พร้อมด้วยถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดขนาดเล็ก ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร White ที่เติมกรด indolebutyric ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลล่าร์ พบว่าต้นที่มีรากสมบูรณ์ สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ในดิน มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์

Maraffa และคณะ (1981) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของโฮย่าสายพันธุ์ *carnosa* สามารถตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0 ถึง 57.0 ไมโครโมลาร์ ต่อ kinetin ความเข้มข้น 0 ถึง 46.0 ไมโครโมลาร์ NAA ความเข้มข้น 0 ถึง 54.0 ไมโครโมลาร์ ต่อ kinetin ความเข้มข้น 0 ถึง 46.0 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D ความเข้มข้น 0 ถึง 40.0 ไมโครโมลาร์ ต่อ kinetin ความเข้มข้น 0 ถึง150.0 ไมโครโมลาร์ พบว่าแคลลัสที่เจริญดีที่สุดพบในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ต่อ kinetin เมื่อย้ายอาหารครั้งที่ 2 จะเห็นได้ว่าแคลลัสที่เจริญในอาหารที่เติม 2,4-D ต่อ kinetin สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ สัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อ kinetin ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 2.3 ถึง 5.0 ไมโครโมลาร์ และ kinetin ความเข้มข้น 2.5 ถึง 20.0 ไมโครโมลาร์

Soniya และคณะ (2006) ศึกษาการขยายพันธุ์ *Aristolochia indica* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเพิ่มจำนวนการเกิดใหม่อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ การเพิ่มจำนวนยอดจากการชักนำชิ้นส่วนปลายยอด และข้อปล้อง บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2-isopentenyladenine (2-iP) ความเข้มข้น 1-6 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจำนวนยอดสูงสุดที่ชักนำด้วยอาหารที่ประกอบด้วย 2-iP ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความแตกต่างของยอดที่เกิดขึ้นโดยตรงจากใบ และปล้อง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย BA 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.8-2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดใหม่จากแคลลัส เมื่อชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA 0.6-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8-3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเปลี่ยนถ่ายใส่อาหารที่มี BA อย่างเดียว 1-6 มิลลิกรัมต่อลิตร แยกยอดที่ยืดยาวออกจากกัน และทำให้เกิดรากด้วยอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถปลูกลงดินได้

Siddique และคณะ (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้น *Aristolochia indica* ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญ (BAP, IBA, NAA, 2,4-D, Kn และ NAA) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด ในสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำแคลลัสให้เป็นต้น ในกาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้มากที่สุด 85 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 5.77 ยอดต่อแคลลัส และในการศึกษาการเกิดรากอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย Kn ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 80 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำออกปลูกได้สำเร็จ

Alina และคณะ (2008) ศึกษาการขยายพันธุ์ของ *Carlina acaulis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ คือ BA Kinetin และ Zeatin ร่วมกับ NAA พบว่าในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ สามารถเกิดยอดมากที่สุด แต่มีความยาวยอดต่ำกว่าในอาหารที่เติม Kinetin และ Zeatin และสามารถพัฒนาการเกิดรากในอาหารสูตร MS ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และเกิดรากในอาหารแข็งสูตร MS ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง ได้ 55.3 เปอร์เซ็นต์

Selvakumar (2008) ศึกษาการเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร *Aristolochia indica* L. (Aristolochiaceae) โดยใช้ข้อ ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย KN สารควบคุมการเจริญเติบ gibberellic (GA3), benzyl adenine (BA) และ adenine sulphate (AdS) รวมทั้ง KN + GA3, KN + BA และ KN + AdS ด้วย 2.46 ไมโครโมลาร์ indolo-3- บิวทิลแอซิค (IBA) รวมอยู่ในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) การเจริญเติบโตของข้อเป็นยอด ในอาหารสูตร ที่ประกอบด้วย การส่งเสริมโดย AdS ความเข้มข้น 27.1 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียวและยังใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอื่น ๆ (PGRs) เมื่อเทียบกับชุดค่าผสมอื่น KN (23.25 ไมโครโมลาร์ และ AdS ความเข้มข้น 13.5 ไมโครโมลาร์ มีการแตกยอดจำนวนมาก ส่วนใน IBA ทำให้เกิดรากที่เพิ่มขึ้นในขณะที่การฝังรากของ IAA เกิดขึ้นในหน่อที่มีการสร้างแคลลัสแทรกแซงที่ปลายฐาน การใช้โปรโตคอลของเราจากก้านใบของ *A. indica* ภายในระยะเวลา 3 เดือน 10-12 ต้น สามารถย้ายปลูกและรอดได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Roy และคณะ (2008) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของพืช *Gymnema sylvestris* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Asclepiadaceae พืชชนิดนี้พบในประเทศอินเดียวที่มีสรรพคุณเป็นยาที่ใช้การรักษาโรคเบาหวาน โดยการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 2,4-D kinetin IAA และ BAP โดยการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าประสิทธิภาพสูงสุดของการสร้างแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ 2,4-D และ Kinetin

Ahmad และคณะ (2009) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนของใบของ *Ruta graveolens* L. เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4,5-T ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ การชักนำให้เกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 70.6±2.33 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปชักนำให้เกิดยอด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 92.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 7.5 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ และสามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุดในการเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

Bliss และคณะ (2009) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนก้านใบ และลำต้นของ *Aristolochia fimbriata* ให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มี α-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดเป็นต้นใหม่ที่ดี การเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่เกิดขึ้นภายในระยะเวลา 1 เดือน ต้นใหม่สามารถพัฒนาเป็นรากที่สมบูรณ์และย้ายออกปลูกในเรือนกระจกและสามารถออกดอกได้ภายใน 4 สัปดาห์หลังปลูก

Lakshmi และคณะ (2010) ศึกษาการ เพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดของโฮย่าสายพันธุ์ *wightii* ssp. *palniensis* ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงที่สุดคือ 90 เปอร์เซ็นต์ และนำต้นที่มีความสมบูรณ์ของรากและยอดมาทำการ ปรับสภาพให้เหมาะสมก่อนปลูกเป็นเวลา 2 เดือน สามารถมีชีวิตรอดถึง 80 เปอร์เซ็นต์.

Raad และคณะ (2012) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Anthurium andreanum* โดยชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตรในที่มืด พบว่าเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และภายใต้สภาวะที่มืดเกิดแคลลัสได้ดีกว่าที่สว่าง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดยอด โดยเกิดยอดที่สูงที่สุดในอาหารที่เติม NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Pramod และคณะ (2012) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนใบและตาข้าง *Aristolochia indica* L. โดยเริ่มจากการนำใบและตาข้างขนาด (0.5-1.0 ซม.) มาล้างให้สะอาด และนำไปล้างในน้ำประปาประมาณ 15 - 20 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำยาล้างด้วยน้ำเปล่า 5% (v / v) Tween-20 5-10 นาที ต่อมาล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้งเป็นเวลา 5 นาที ต่อจากนั้นแช่อยู่ในเอทานอล 70% (v / v) 2 - 3 นาทีและล้างด้วยแก้วน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ย้ายใบและตาข้าง แช่ในสารละลาย 0.1% (w / v) $HgCl_2$ เป็นเวลา 1 - 2 นาที และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ล้างออกเป็น 2-3 ครั้ง ในน้ำปราศจากฆ่าเชื้อ นำใบและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog ที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันของ BAP และ NAA ผลการศึกษาพบว่าทั้งใบและตาข้างเพาะเลี้ยงใน BAP ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พัฒนาเป็นแคลลัส และแคลลัสถูกพัฒนาเป็นยอด และรากในอาหารสูตร MS ที่เติม 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP + 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA และรากถูกกระตุ้นจากในอาหาร MS ที่เสริมด้วย NAA ขนาด 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในส่วนของข้อได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับส่วนใบ 85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้รับการปรับสภาพให้เหมาะสมและย้ายปลูกในธรรมชาติ และต้นพืชถูกนำไปใช้ได้ตลอดทั้งปีสำหรับหมอแผนโบราณ ผลิตเป็นยา การอนุรักษ์พันธุกรรม การเพาะปลูกเชิงพาณิชย์ และการผลิตสารทุติยภูมิ

Romana (2013) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนใบ ก้านใบ ราก และ ข้อ ของข้อ Hoya สายพันธุ์ kerrii ในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีส่วนประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 6.9 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าส่วนใบสามารถเกิดแคลลัสได้ก่อนส่วนของ ข้อ ก้านใบ และราก ในอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ไก่ฟ้าพญาลอ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Aristolochia ringens* Vahl

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)

3.1.2.2 อาหารผงสำเร็จสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1962)

3.1.2.3 วุ้นไฟตาเจล

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

3.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.1.3.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)

3.1.3.1.1 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

3.1.3.1.2 Indole-3-butyric acid (IBA)

3.1.3.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)

3.1.3.2.1 N6-benzylaminopurine (BA)

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)

3.1.4.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)

3.1.4.3 ตู้อบความร้อน (hot air oven)

3.1.4.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และหยาบ (balance)

3.1.4.5 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.1.4.6 เครื่องเขย่า (shaker)

3.1.4.7 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)

3.1.4.8 ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.1.4.9 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beaker)

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

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

3.1.4.12 ปากคีบขนาดต่างๆ (forcept)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.13 มีดผ่าตัดขนาดต่างๆ (knives)

3.1.4.14 ช้อนตักสาร (spectula)

3.1.4.15 เวอร์เนียร์ (Vernier caliper)

3.1.4.16 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner Stainless)

3.1.4.17 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.1.4.18 ทิปขนาดต่าง ๆ (tip

3.1.4.19 กล้องถ่ายภาพดิจิตอล กล้องสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.4.20 กระถาง ดิน ปุ๋ย และ ยาฆ่าแมลง

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

นำชิ้นส่วนใบของต้นไก่ฟ้าพญาลอ มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวใบโดยล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 จำนวน 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนของใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 30 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มืด ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโต

3.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

นำแคลลัสของต้นไก่ฟ้าพญาลอที่ได้จาก 3.2.1 มาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.8 เซนติเมตรโดยเฉลี่ย เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยทำการทดลอง 30 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

นำชิ้นส่วนข้อของต้นไก่ฟ้าพญาลอ มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ข้อโดยล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 จำนวน 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนของข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตเป็นจำนวนยอดภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 และ 60 วัน แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก

นำชิ้นส่วนต้นอ่อนของต้นไก่ฟ้าพญาลอ ที่ได้มาจาก 3.2.2 และ 3.2.3 นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตเป็นจำนวนราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 และ 60 วัน แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.2.5 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

หลังจากชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วนำต้นไก่ฟ้าพญาลอ ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 3-7 วันเพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ

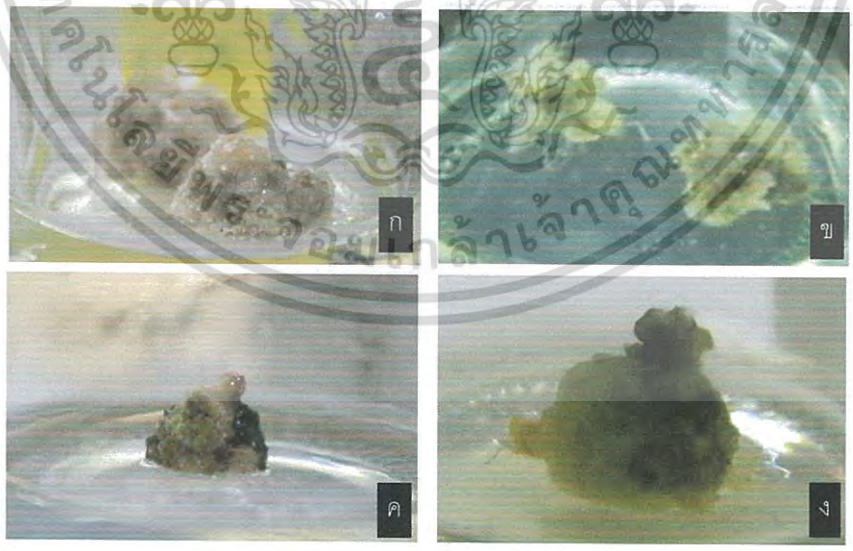
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

นำชิ้นส่วนใบของต้นไก่ฟ้าพญาลอที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ ภาพที่4.1 มาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่า ในแต่ละสูตรสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ลักษณะของแคลลัสมีทั้งชนิดเกาะกลุ่มแน่น และเกาะกันหลวมๆ ดังภาพที่ 4.2

ภาพที่ 4.1 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของต้นไก่ฟ้าพญาลอ

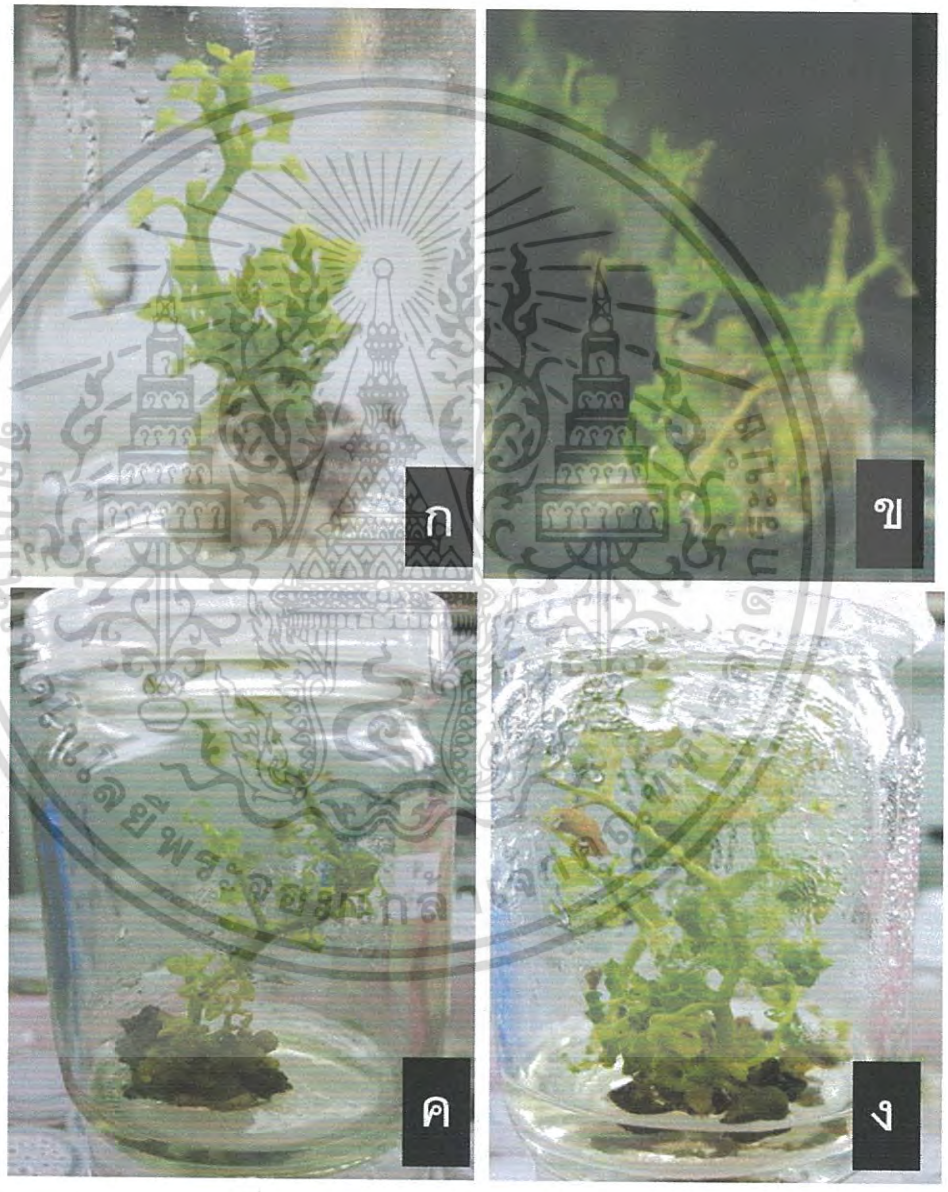


ภาพที่ 4.2 การเจริญของใบในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

นำแคลลัสของต้นไก่ฟ้าพญาลอมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่าทุกสูตรสามารถเจริญเป็นตุ่มสีเขียว และมีการพัฒนายืดยาวในระยะเวลา 30-60 เดือน ภาพที่ 4.3 ก และ ข และมีการยืดยาว และมีการแตกยอดเพิ่มขึ้น และยืดยาวมากขึ้น ในระยะเวลา 90 วัน ภาพที่ 4.3 ค และ ง



ภาพที่ 4.3 การเจริญขอข้อในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นต่างๆ
ก และ ข สามารถเจริญเป็นตุ่มสีเขียว และมีการพัฒนายืดยาวในระยะเวลา 30-60 เดือน
ค และ ง การแตกยอดเพิ่ม และยาวขึ้นในระยะเวลา 90 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

ตัดส่วนของต้นไก่ฟ้าพญาลอ นำมาตัดแยกเป็นชิ้นส่วนข้อ จากนั้นล้างด้วยน้ำไหลผ่าน นำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอร็อกซ์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 เขย่าเป็นเวลา 20 นาที ล้างชิ้นส่วนข้อด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ภาพที่ 4.4 จากนั้น นำส่วนข้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดต่อต้นได้สูงที่สุด 1.8 ยอดต่อต้น และ 3.73 ยอดต่อต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน และ 60 วันตามลำดับ (ตารางที่ 4.1, ภาพที่ 4.5 ภาพที่ 4.6 และ ภาพที่ 4.7) ขณะที่เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอด มักเกิดแคลลัสขึ้นรอบโคนต้น โดยแคลลัสมีลักษณะเป็นทั้งแบบ compact และ friable จากนั้นเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนยอดต่อไป เพื่อนำไปชักนำให้เกิดราก

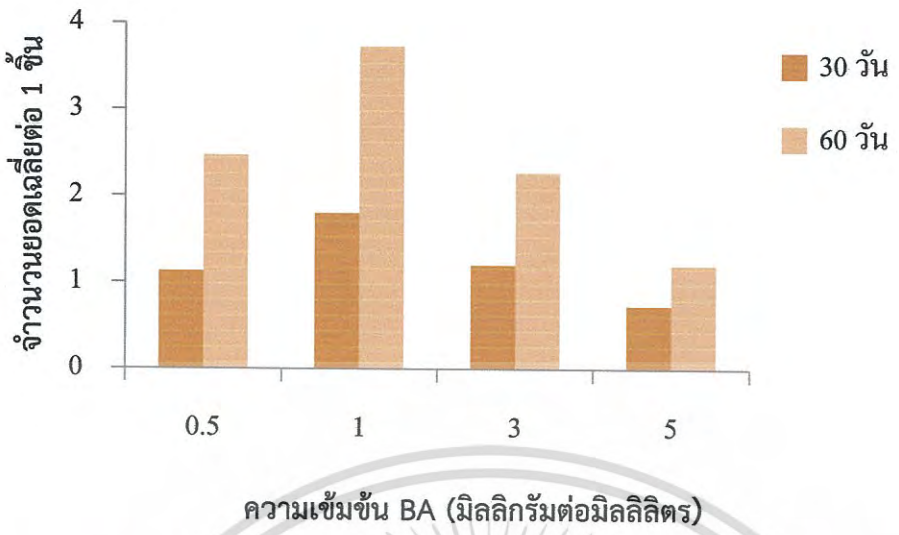
ภาพที่ 4.4 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นไก่ฟ้าพญาลอ

ตารางที่ 4.1. การเจริญของยอดเฉลี่ยจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน

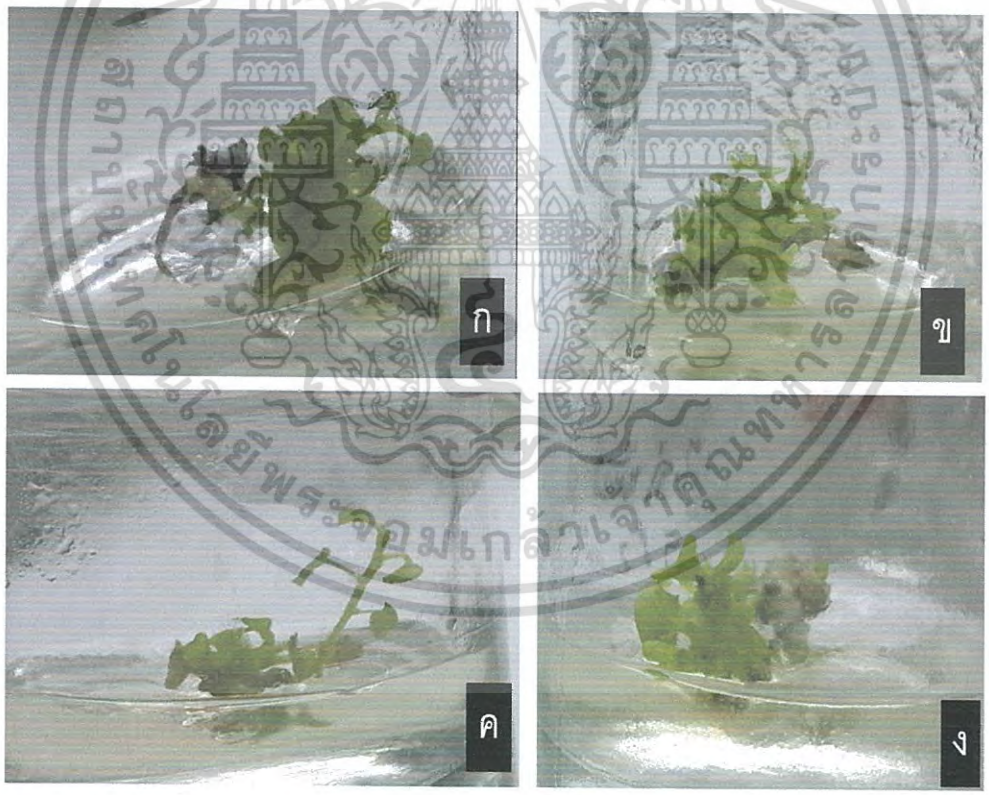
ความเข้มข้นของ BA มก/ล	จำนวนข้อเริ่มต้น	จำนวนข้อที่เกิดยอด	% จำนวนข้อที่เกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อในระยะเวลา	
				30 วัน	60 วัน
0.5	15	14	93.33	1.13^{b}	2.47^{b}
1	15	15	100.00	1.8^{a}	3.73^{a}
3	15	13	86.67	1.2^{ab}	2.27^{bc}
5	15	10	66.67	0.73^{b}	1.20^{c}

Means ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Ducan's *New* Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเจริญของยอดจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน



ภาพที่ 4.6 การเจริญขอข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.7 การเจริญของยอดจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน 30 วัน (ก, ข) และ 60 วัน (ค, ง)

4.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก

การชักนำให้เกิดรากจากส่วนของต้นที่สมบูรณ์ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.4 รากต่อต้น ในระยะเวลา 60 วัน (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.8 และ ภาพที่ 4.9 ก-จ) และสามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 4.9 ฉ-ช)

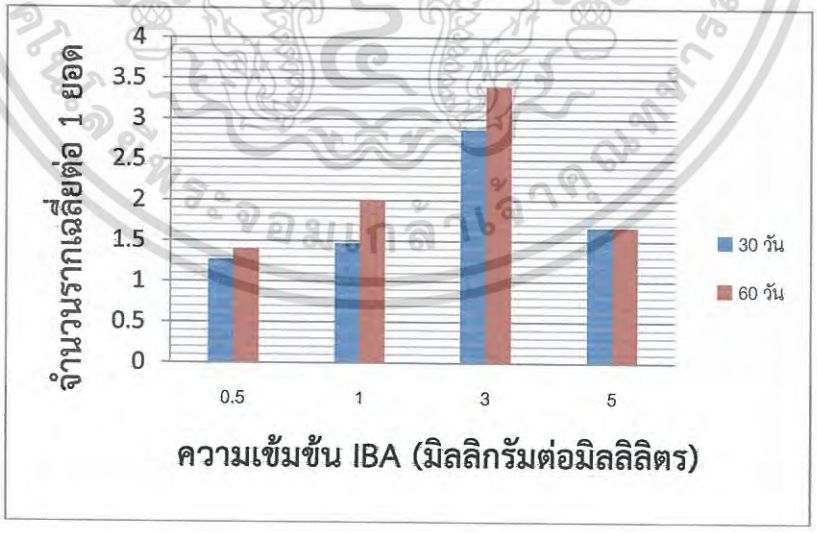
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

การชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วนำต้นไก่ฟ้าพญาลอ ออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 3-7 วัน เพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ และสามารถย้ายปลูกในดินได้สำเร็จ สามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 4.9 ซ)

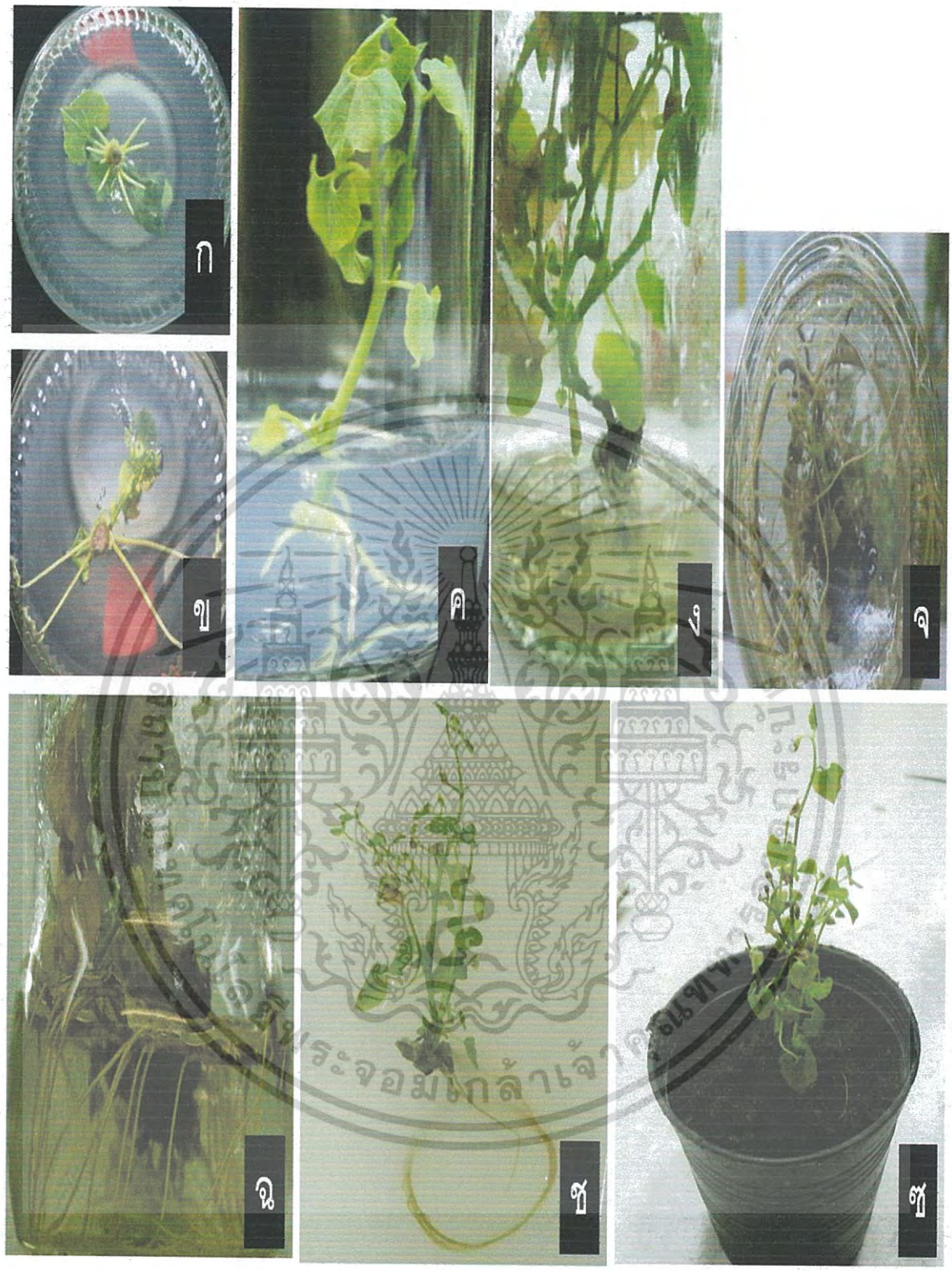
ตารางที่ 4.2 การเจริญของรากจากส่วนต้นต้นไก่ฟ้าพญาลอ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน

ความเข้มข้นของ IBA มก/ล	จำนวนต้นเริ่มต้น	จำนวนต้นที่เกิดราก	% จำนวนต้นที่เกิดราก	จำนวนรากต่อต้น	
				30 วัน	60 วัน
0.5	15	10	66.67	1.27	1.40
1	15	5	33.33	1.47	2
3	15	10	66.67	2.87	3.4
5	15	3	20	1.67	1.67



ภาพที่ 4.8 การเจริญของยอดจากส่วนข้อต้นไก่ฟ้าพญาลอl ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 30 และ 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 สามารถชักนำให้เกิดราก (ก-จ) และสามารถชักนำให้เป็นต้นที่ที่มีรากที่สมบูรณ์ (ฉ-ช)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อขยายพันธุ์พืชสายพันธุ์ต้นไก่ฟ้าพญาลอ *A. ringens* Vahl ในสภาพปลอดเชื้อ ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบของไก่ฟ้าพญาลอ บนสูตรอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าที่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของไก่ฟ้าพญาลอได้ การชักนำแคลลัสของไก่ฟ้าพญาลอให้เป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ทุกความเข้มข้นสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ในระยะเวลา 90 วัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนข้อของไก่ฟ้าพญาลอ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ในการชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 3.73 ยอด ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.47 2.27 และ 1.20 ยอด ตามลำดับ จากนั้นนำต้นมาชักนำให้เกิดราก ในอาหารแข็ง สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (Indole-3-butyric acid) ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 60 วัน พบว่าในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ในการชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.4 ราก ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 1.40 2 และ 1.67 ราก ตามลำดับ ในระยะเวลาเวลา 60 วัน และย้ายต้นที่สมบูรณ์นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้เป็นผลสำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, ฐิรญากานต์ เดชแทน, ชุติมา แซ่เฮ้ง, บุษราคัม ลิ้มเจริญเงิน และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. 2558. การเจริญเป็นต้นใหม่ ของ *Aristolochia ringens* Vahl โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ว. วิทย์. กษ. 46(3)(พิเศษ): 845-848.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

วีระชัย ณ นคร. 2538. พรรณไม้สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 2. สำนักพิมพ์โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮาส์. กรุงเทพฯ.

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

Abubakar, M.S., Balogun, E., Abdurahman, E.M., Nok, A.J., Shok, M., Mohammed, A. and Garba, M. 2006. Ethnomedical treatment of poisonous snakebites: plant extract neutralized Naja nigricollis venom. Pharm Biol 44: 343-348.

Ahmad, N., M., Faisal, M., Anis and I.M., Aref. 2010. *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. South African Journal of Botany, 76, 597–600.

Alina Trejgell, M., Bednarek and A. Tretyn. 2008. Micropropagation of *Carlina acaulis* L. A.B.C.S Botanica, 51, 97–103.

Amitava Roy, S., Ghosh, M., Chaudhuri and P.K. Saha. 2008. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.Br. (Asclepiadaceae). Afr. J. Biotechnol. Vol. 7(13), 2209-2211.

Bliss, B.J., Landherr, L., de Pamphilis, C.W., Ma, H., Hu, Y. and Maximova, S.N. 2009. Regeneration and plantlet development from somatic tissues of *Aristolochia fimbriata*. Plant Cell Tissue Organ Cult 98: 105-114.

Brantjes, N.B.M. 1980. Flower morphology of *Aristolochia* species and the consequences for pollination. Acta Bot. Neerl. 29: 212-213.

Burgess, K.S., Singfield, J., Melendez, V. and Kevan, P.G. 2004. Pollination biology of *Aristolochia grandiflora* (Aristolochiaceae) in Veracruz, Mexico. Ann. Mo. Bot. Gard. 91: 346-356.

Gadhi, C.A., Weber, M., Mory, F., Benharref, A., Lion, C., Jana, M. and Lozniewski, A. 1999. Antibacterial activity of Aristolochia paucinervis Pomel. J Ethnopharmacol 67: 87-92.

George, E.F. and Sherrington, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegeticst Ltd., England.

Garavito, F.A.G. 1990. Aristolochiaceae. In: Colombia, U.N. (Ed.), Flora de Colombia. Bogota, pp. 9-182.

Gomes, A., R. Das, S. Sarkhel, R. Mishra, S. Mukherjee, S. Bhattacharya and A.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gomes. 2010. Herbs and herbal constituents active against snakebite. Indian J. Exp. Biol., 48: 865-878.

Gonzalez, F. and Stevenson, D.W. 2000. Perianth development and systematics of *Aristolochia*. Flora 195: 370-391.

Gupta, R.S., Dobhal, M.P. and Dixit, V.P. 1996. Morphometric and biochemical changes in testes of Presbytis entellus entellus Dufresne (Langur monkey) following aristolochic acid administration. Ann Biol Ludhiana 12: 328-334.

Hall, D.W. and Brown, B.V. 1993. Pollination of Aristolochia littoralis (Aristolochiales, Aristolochiaceae) by males of *Megaselia* spp. (Diptera, Phoridae). Ann. Entomol. Soc. Am. 86: 609-613.

Heinrich, M., J. Chan, S. Wanke, C. Neinhuis and M.S.J. Simmonds. 2009. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid1 and 2- a global assessment based on bibliographic sources. J. Ethnopharmacol., 125: 108-144.

Hinou, J., Demetzos, C., Harvala, C. and Roussakis, C. 1990. Cytotoxic and antimicrobial principles from the roots of *Aristolochia longa*. Int J Crude Drug Res 28: 149-151.

Joseph S. and K.M. Inayath Sidique. 2011. In vitro Rapid Clonal Propagation of *Aristolochia bracteolata* Lam. (Aristolochiaceae)-A Valuable Medicinal Plant World Journal of Agricultural Sciences 7 (6): 653-658.

Pakrashi, A., B. Chakrabarty and A Dasgupta, 1976. Effect of the extracts from *Aristolochia indica* Linn. on interception in female mice Experientia, 32: 394-395.

Kelly, L.M. and Gonza´lez, F. 2003. Phylogenetic relationships in Aristolochiaceae. Syst. Bot. 28, 236-249.

Kumar, V.P., Chauhan, N.S., Padh, H. and Rajani, M. 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. J Ethnopharmacol 107: 182-188.

Kupchan, S.M. and R.W. Doskotch, 1962. Tumor inhibitors. I. Aristolochic acid, the active principle of *Aristolochia indica*. J. Med. Pharm. Chem., 5: 657-659.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lakshmi, S.R, Franklin, J.H., Senthil Kumar, T., Murthy, G.V.S. and Rao, M.V. 2010. *In vitro* propagation of *Hoya wightii* ssp. *palniensis* K.T. Mathew-a highly vulnerable and endemic species of Western Ghats of Tamil Nadu. Afr. J. Biotechnol. 9(5), 620-627.

Leitao, G.G. and M.A.C. Kaplan. 1992. Quı´mica do geˆnero *Aristolochia*. Rev. Bras. Farm. 73: 65-75.

Manjula.,S, Thomas, A, Daniel,B and G.M. Nai. 1977. In vitro plant regeneration of Aristolochia indica through axillary shoot multiplication and organogenesis.Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 51, Issue 2, 145–148.

Maraffa, S.B., W.R., Sharp, H.K., Tayama and T.A., Fretz. 1981. Apparent asexual embryogenesis in cultured leaf sections of *Hoya*. Z.F. Pflanzenphysiologie, Vol. 102(1), 45-55.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Nascimento, I.R., Murata, A.T., Bortoli, S.A. and L.M. Lopes. 2004. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. Pest Manag Sci 60: 413-416.

Pramod, V. P. and M. Jayaraj. 2012. In vitro Regeneration of Plantlets from Leaf and Nodal explants of *Aristolochia indica* L.– An Important Threatened Medicinal Plant. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine . 488-493

Raad., M. K, S.B., Zanjani, M., Shoor, Y., Hamidoghli, A.R., Sayyad, A.K., Masouleh and B., Kaviani. 2012. Callus induction and organogenesis capacity from lamina and petiole explants of *Anthurium andreanum* Linden (Casino and Antadra). AJCS. 6(5), 928-937.

Rahman, M. 2001. Red data Book of Vascular plants. Bangladesh National herbarium. Dhaka, Bangladesh.

Reddy, R.V., Reddy, M.H. and Raju, R.R.V. 1995. Ethnobotany of *Aristolochia* L. Acta Bot Indica 23: 291-292.

Romana Siddique. 2013. Micropropagation of *Hoya Kerrii* (Valentine Hoya) Through Callus Induction for long term conservation and dissemination. International Journal of Science and Research (IJSR), India Online ISSN: 2319-7064. Volume 2 Issue 8, August 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Roy., Amitava, S., Ghosh, M., Chaudhuri and P.K. Saha. 2008. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.Br. (Asclepiadaceae). Afr. J. Biotechnol. Vol. 7(13), 2209-2211.

Selvakumar, V and P. R. Anbudurai. 2008. Stimulation of Micropropagation of the Medicinal Plant *Aristolochia indica* L. throughNodal Explants by Adenine Sulphate. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. 39-41.

Siddique, N.A., M.H. Kabir and M.A. Bari, 2006. Comparative *in vitro* study of plant regeneration from nodal segments derived callus in *Aristolochia indica* Linn. and *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. Endangered medicinal plants in Bangladesh. J. Plant Sci., 1: 106-118.

Soniya, E.V. and M. Sujitha, 2006. An efficient in vitro propagation of *Aristolochia indica*. Biol Plant 50: 272-274.

Shafi, P.M, M.K, Rosamma, K, Jamil, and P.S Reddy. 2002. Antibacterial activity of the essential oil from *Aristolochia indica*. Fitoterapia. Volume 73, Issue 5, 439-441.

Vaghasiya, Y. and S.V. Chanda. 2007. Screening of methanol and acetone extracts of fourteen Indian medicinal plants for antimicrobial activity. Turk. J. Biol., 31: 243-248.

Wolda, H. and C.W. Sabrosky, 1986. Insect visitors to two forms of *Aristolochia pilosa* in Las Cumbres, Panama. Biotropica 18: 295-299.

Wu, T.S., Damu, A.G., Su, C.R. and P.C. Kuo. 2004. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. Nat. Prod. Rep. 21: 594-624.

[Online] Available : http://www.plantoftheweek.org/week076.shtml(30/12/2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม/ลิตร)
$NH_4 NO_3$	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

<u>ส่วน ค</u> ประวัติ

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

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

4. ประวัติการศึกษา

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

6. ระบุสาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยการใช้รังสี และสารเคมี การย้ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม และเครื่องยิงยีน การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

รางวัลและเกียรติประวัติที่เคยได้รับ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2535. กราฟการเติบโตของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด ลูกผสมSW3 x INV. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 358 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2535. การแยกโพรโทพลาสต์จากส่วนของใบอ่อนของข้าวโพด 5 สายพันธุ์. ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 18. 704 น.

นิตย์ศรี แสงเดือน อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กมลพรรณ นามวงศ์พรหม เดชา บุญมะลิซ้อน ชำนาญฉัตรแก้ว ราเชนทร์ ถิระพร และ Bernd Buter. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพ ของ *Zea may* L:การประยุกต์ใช้ในโครงการปรับปรุงข้าวโพด การแสดงแบบโปสเตอร์ การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้งที่ 8. 29 มีนาคมถึง 1 เมษายน 2536 ณ สถาบันพัฒนาวิชาการ สาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดลศาลายา นครปฐม 89 น.

นิตย์ศรี แสงเดือน อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กมลพรรณ นามวงศ์พรหม ประศาสตร์ เกื้อมณี และ ชำนาญ ฉัตรแก้ว. การชักนำให้เกิดเป็นต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเอมบริโออ่อนของข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์ การเกษตรฉบับที่ 26 (4-6) 67 - 79 น.

Poeaim, A., N. Sangduen., S. Pongchareankit, W, Boonmee and W. Kaewbunsong. 1995. Growth Curve of KAO-DAWK-MALI 105 rice (Oryza Sativa L .) Suspension Culture. p 204. In International conference on Biotechnology Research and Application for Sustainable in Development. Chulabhorn Research Institute, (BRASD) August 7-10, Bangkok. (poster)

Poeaim, A and N. Sangduen. 1995. Protoplast Isolation and Culture from Cell Suspension Culture by using KAO-DAWK-MALI 105 Rice Callus (*Oryza sativa* L.). p 115. abstracts of the Third Asia -Pacific Conference on Agricutural Biotechnology : Issues and Choices. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and National Science and Technology Development Agency (NSTDA). November 10-15. Prachuapkhirikhan, Thailand

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2539. การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370. วารสารวิทยาศาสตร์ ลาดกระบัง ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 70-79 น.

Klamsomboon, P, A, Poeaim and N. Sangduen. 1997. Enhancement of Embryogenic Callus Production and an Established Cell Suspension Culture of Indica Rice. Abstracts of General Meeting of The International Program on Rice Biotechnology.15-19 September. Malacca, Malaysia.

Poeaim A. 1998. Gene Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Khao Ta Hang 17 rice (*Oryza sativa* L.). Abstract of The 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology A nd The 1998 Annual Meeting of the Nation Center for Genetic Engineering and Biotechnology on Biotechnology for a Self-Sufficient Economy. 25-27 November. Bangkok, Thailand. 79 .

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2542. การแสดงออกของยีนในแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 โดยอโกรแบคทีเรียม. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์. 224-229 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2542. การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์. 230-236 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2542. การแสดงออกของยีนในแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยอโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์. ในเอกสารประกอบ การประชุมทางวิชาการ 30 ปี เกษตรเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. ระหว่าง วันที่ 24-25 มิถุนายน. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 343-349 น.

Poeaim, A and C, Sallaud. 1999. Thai rice Genetic Transformation by *Agrobacterium*. Abstracts of General Meeting of The International Program on Rice Biotechnology. Phuket. Thailand.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2543. การเจริญของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. ระหว่าง วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์. 472-479 น.

Poeaim, A and N. Sangduen. 2000. *Agrobacterium*-mediated Transformation using Embryogenic Rice Suspension Culture. Abstract for *The International Conference* Tropical Agriculture Technology for Better Health and Environment. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom Thailand.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน 2544 . การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60. ในรายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 39. ระหว่าง วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 174-180 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2544. การย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60. ในสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2544. 150-154

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2545. การแสดงออกของยีนในแคลลัสและไมโครแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ชัยนาทโดยอโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40. ระหว่างวันที่ 4-7 กุมภาพันธ์. 256-262 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2545. การถ่ายยีนในแคลลัสข้าวโพดหวานพันธุ์ อินทรีย 2 โดยเชื้ออโกรแบคทีเรียม 2 สายพันธุ์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 19 ฉบับ ที่ 2 60-66 น.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Poeaim, A, Y, Matsuda and T. Murata. 2004. Optimization of callus induction and plant regeneration from seed explants of Zoysia species. J Jpn Soc Turfgrass Sci 31: 3-10.

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Poeaim, S., A. Poeaim and K. Soytong. 2007. Determination of the genetic relationship of Vanilloideae (Orchidaceae) based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. Proceedings of the International Conference on Science and Technology for Sustainable Development. Bangkok, Thailand. 26-27 April. 514-517.

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

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

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

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

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

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

Sukhawat, S and A. Poeaim. 2009. Efficiency of gene transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Node tissue of Nilegrass (*Acroceras macrum*). The International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences in Collaboration with Kasetsart

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

University 23-27 Febuary the Emerald hotel, Rachadapisek Road, Bangkok Thailand. 99-106.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม รัญญิการ์ โปราหา รารี ช้อนทอง อรสา จันทิมา และแสงทอง พงษ์เจริญกิต. 2555. การชักนำแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร. การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้ งที่ 9. 2182-2188.

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T147856

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้