การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นไส้กรอกแอฟริกา (*Kigelia africana*) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

STUDY ON OPTIMAL MEDIA OF SAUSAGE TREE (*Kigelia africana*) BY TISSUE CULTURE

ชุติมณฑน์ แสงคำสุข
พรภัสสร วศิษฏ์นิฏิวัฒน์
รุจิรา รักราวี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ ต้นไส้กรอกแอฟริกา (*Kigelia africana*) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

STUDY ON OPTIMAL MEDIA OF SAUSAGE TREE (*Kigelia africana*) BY TISSUE CULTURE

T149028

ชุติมณฑน์ แสงคำสุข
พรภัสสร วศิษฎ์นิฏิวัฒน์
รุจิรา รักราวี

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 149028
วัน,เดือน,ปี 27 S.A. 2560
b.12879678
i..........

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

STUDY ON OPTIMAL MEDIA OF SAUSAGE TREE (*Kigelia africana*) BY TISSUE CULTURE

CHUTTIMON SAENGKHAMSUK
PORNPATSORN WASITNITIWAT
RUJIRA RAKRAWEE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นไส้กรอกแอฟริกา (*Kigelia africana*) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Study on Optimal Media of Sausage Tree (*Kigelia africana*) by Tissue Culture
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชุติมณฑน์ แสงคำสุข รหัสนักศึกษา 55051077 นางสาวพรภัสสร วศิษฎ์นิฎิวัฒน์ รหัสนักศึกษา 55051132 นางสาวรุจิรา รักราวี รหัสนักศึกษา 55051155
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	พนา โลหะทรัพย์ทวี
ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นไส้กรอกแอฟริกา (*Kigelia africana*) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชุติมณฑน์	แสงคำสุข	รหัสนักศึกษา 55051077
	นางสาวพรภัสสร	วศิษฏ์นิฏิวัฒน์	รหัสนักศึกษา 55051132
	นางสาวรุจิรา	รักราวี	รหัสนักศึกษา 55051155
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม		

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ต้นใหม่จากเมล็ด และการชักนำรากจากยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกา การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดแคลลัสได้มากที่สุด (80 เปอร์เซ็นต์) และมีขนาดเฉลี่ยของแคลลัสใหญ่ที่สุด (5214.17 ลูกบาศก์มิลลิเมตร) การชักนำต้นใหม่จากเมล็ดต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดต้นใหม่ได้มากที่สุด (86.54 เปอร์เซ็นต์) และการชักนำรากจากชิ้นส่วนยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดรากมากที่สุด (70.83 เปอร์เซ็นต์) ทั้ง NAA และ IBA สามารถชักนำแคลลัสได้

คำสำคัญ : การเกิดแคลลัส การเกิดต้นใหม่ การเกิดราก ต้นไส้กรอกแอฟริกา

Title	Study on Optimal Media of Sausage Tree (*Kigelia africana*) by Tissue Culture
Students	Miss Chuttimon Saengkhamsuk Student ID 55051077
	Miss Pornpatsorn Wasitnitiwat Student ID 55051132
	Miss Rujira Rakrawee Student ID 55051155
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

Study on optimal media for callus induction, plant regeneration from mature seed and root induction from shoot explant of Sausage tree (*Kigelia africana*). Callus induced from mature seed were culture on solid MS medium supplemented with different concentrations of BA and 2,4-D. The maximum callus induction (80%) and the highest size callus (5214.17 mm^3) on solid MS medium supplemented with 5 mg/L BA. Plant regeneration from mature seed were culture on solid MS medium supplemented with different concentrations of BA. The best plant regeneration on solid MS medium supplemented with 1mg/L BA (86.54%). Root induced from shoot explant were culture on solid MS medium supplemented with different concentrations of IAA, IBA and NAA. The maximum root induction on solid MS medium supplemented with 2 mg/L NAA (70.83%). Both NAA and IBA could induced root and callus proliferation.

Keywords : callus induction, plant regeneration, root induction, sausage tree

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการศึกษาโครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ได้แนะนำ และให้ความรู้ต่างๆ ในการทำโครงงานวิจัยนี้ อีกทั้งข้อเสนอแนะ การตอบคำถามเกี่ยวกับปัญหาที่เกิดขึ้นในงานวิจัยที่ผู้จัดทำได้มีความสงสัย และช่วยปรับปรุงและตรวจสอบข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในขณะทำการทดลอง ตลอดจนการสนับสนุนในการทำงานวิจัยในด้านต่างๆ ด้วย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานสอบโครงงานพิเศษ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ที่ได้เสียสละเวลาในการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากขึ้น อีกทั้งข้อเสนอแนะต่างๆ ที่ทำให้โครงงานพิเศษนี้ผ่านลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำเป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และสารเคมีต่างๆ ในการทดลองโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อน พี่ และน้องของผู้จัดทำที่ได้เป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยฉบับนี้ และส่งเสริมการศึกษาของผู้จัดทำมาโดยตลอด

คณะผู้จัดทำหวังว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในการศึกษาเกี่ยวกับงานวิจัยทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขออภัย ณ ที่นี้ด้วย

ชุติมณฑน์ แสงคำสุข

พรภัสสร วศิษฏ์นิฏิวัฒน์

รุจิรา รักราวี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ต้นไส้กรอกแอฟริกา (*Kigelia africana*)	3
2.1.1 ต้นไส้กรอกแอฟริกา	3
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นไส้กรอกแอฟริกา	4
2.1.3 องค์ประกอบทางเคมี	4
2.1.4 การนำไปใช้เป็นยา	4
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)	5
2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	6
2.2.2 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช	8
2.2.3 สารฆ่าเชื้อ	9
2.2.4 วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	10
2.2.4.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ดพืช	10
2.2.4.2 การเพาะเลี้ยงราก	10
2.2.4.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส	11
2.2.5 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	11
2.2.5.1 ปัจจัยภายใน	11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.5.2 ปัจจัยภายนอก........ 11

2.2.5.3 ปัจจัยอื่นๆ........ 12

2.2.6 ประโยชน์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช........ 12

2.2.6.1 การขยายพันธุ์พืช........ 12

2.2.6.2 การปรับปรุงพันธุ์........ 13

2.2.6.3 การผลิตสารทุติยภูมิ........ 13

2.2.6.4 การผลิตพืชปราศจากโรค........ 13

2.2.6.5 การเก็บรักษาพันธุ์พืช........ 13

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง........ 14

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย........ 18

3.1 พืชและการเก็บตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา........ 18

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี........ 18

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ........ 18

3.2.2 อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช........ 18

3.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช........ 18

3.2.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ........ 18

3.3 วิธีการดำเนินงาน........ 19

3.3.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดไส้กรอกแอฟริกา........ 19

3.3.2 การชักนำแคลลัสจากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา........ 19

3.3.3 การชักนำต้นใหม่จากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา........ 20

3.3.3.1 การชักนำต้นใหม่ของไส้กรอกแอฟริกาจากเมล็ด........ 20

3.3.3.2 การชักนำรากของต้นไส้กรอกแอฟริกา........ 20

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล........ 21

4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสจากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา........ 21

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของไส้กรอกแอฟริกา........ 25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกาจากเมล็ด 25
4.2.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากของต้นไส้กรอกแอฟริกา 33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 39
5.1 สรุปผลวิจัย 39
5.2 ข้อเสนอแนะ 40
เอกสารอ้างอิง 41
ภาคผนวก 45
ภาคผนวก ก 46
ภาคผนวก ข 47

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงจำนวนเมล็ด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เป็นเวลา 12 สัปดาห์.. 22

4.2 แสดงจำนวนเมล็ด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เป็นเวลา 12 สัปดาห์.. 23

4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ จำนวนยอด ความยาวต้นเฉลี่ย จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย) และจำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย) ของต้นไส้กรอกแอฟริกา ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ในระยะเวลา 4 และ 6 สัปดาห์......... 27

4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ จำนวนยอด ความยาวต้นเฉลี่ย จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย) และจำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย) ของต้นไส้กรอกแอฟริกา ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ในระยะเวลา 8 และ 10 สัปดาห์.......... 28

4.5 แสดงจำนวนยอด จำนวนราก เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ความยาวรากเฉลี่ย และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์........... 35

4.6 แสดงจำนวนยอด จำนวนราก เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ความยาวรากเฉลี่ย และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์......... 36

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	(ก) ดอกไส้กรอกแอฟริกา (ข) ลักษณะภายนอกผลไส้กรอกแอฟริกา (ค) ลักษณะภายในผลไส้กรอกแอฟริกา (ง) ใบของไส้กรอกแอฟริกา (จ) ต้นไส้กรอกแอฟริกา......	3
4.1	แสดงการเจริญของแคลลัสของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์................	22
4.2	แสดงการเจริญของแคลลัสของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์.........	23
4.3	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์..	24
4.4	แสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์..	24
4.5	แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์............................	29
4.6	แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์............................	29
4.7	แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์............................	30
4.8	แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์.........................	30

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.9	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ	31
4.10	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ	31
4.11	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนใบของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ	32
4.12	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนรากของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ	33
4.13	แสดงการเจริญของรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น (ก) 0.25, (ข) 0.5, (ค) 1, (ง) 2 และ (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	35
4.14	แสดงการเจริญของรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	36
4.15	แสดงการเจริญของรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น (ก) 0.25, (ข) 0.5, (ค) 1, (ง) 2 และ (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	37
4.16	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ NAA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	37
4.17	แสดงการเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	38

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
BA	6-benzyladenine
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
IBA	Indole-3-Butyric Acid
NAA	Napthalene acetic acid
IAA	Indole-3-acetic acid
MS	อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)
Kn	Kinetin
TDZ	Thidazuron

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ต้นไส้กรอกแอฟริกา (*Kigelia africana*) มีชื่อสามัญคือ African sausage tree หรือ Sausage tree มีลักษณะคล้ายกับไส้กรอก ผลยาวได้มากถึง 1.2 เมตร และมีน้ำหนักหลายกิโลกรัม ลำต้นสีเทาและผิวเรียบ เมื่อต้นแก่จะเกิดสะเก็ดที่ผิวของลำต้น ช่อดอกเป็นสีแดงส้ม ต้องพึ่งพาให้นก และค้างคาวช่วยในการผสมเกสร ต้นไส้กรอกแอฟริกาต้นไม้พบได้ในป่า และในเผ่าต่างๆ ของประเทศแอฟริกาใต้ ต้นไส้กรอกแอฟริกามีประโยชน์หลากหลายด้าน เช่น ผลสุกของไส้กรอกแอฟริกานำมาใช้เป็นยารักษาแผลฝี ผลดิบนำมาใช้เป็นยารักษาโรคซิฟิลิส โรคไขข้อ และมีฤทธิ์เป็นยาระบายอย่างรุนแรง ใบนำมาใช้เป็นยารักษาอาการปวดหลัง โรคปอดบวม เปลือกไม้รักษาโรคกระเพาะอาหารภายในเด็ก และการปวดฟัน ในประเทศซิมบับเวนำเปลือกไม้ และใบมาทำเป็นยาทำแท้ง ประเทศเคนย่านำมาทำเป็นยาโป๊ว และในประเทศแอฟริกาใต้นำมาสกัดเป็นยารักษามะเร็งผิวหนังในระยะเบื้องต้น (Simon and Katie, 2012) ผลสามารถนำใช้เป็นยารักษาโรครูมาติก (Watkins, 1975) ใช้ในการทำเบียร์ ส่วนลำต้นนำไปทำเป็นไม้พาย และเครื่องใช้ต่างๆ (Joffe, 2003 ; McBurney, 2004) ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น สามารถนำไปทำเยื่อกระดาษ อาหารเลี้ยงสัตว์ และไม้สวนไม้ประดับ

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการเพาะปลูกต้นไส้กรอกแอฟริกาค่อนข้างน้อย เป็นที่รู้จักกันไม่มาก และพบว่ามีการเพาะปลูกเป็นไม้ประดับที่สวนนงนุช จังหวัดชลบุรี (ปัทมา, 2557) การเพาะปลูกต้นไส้กรอกแอฟริกาทำได้ยาก เนื่องจากผลสุกของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่ร่วงจากต้นมีระยะพักตัวของเมล็ด 1 ปี และผลสุกโดยส่วนใหญ่ถูกแมลงเข้าไปกินเนื้อผลภายในจึงทำให้ไม่สามารถงอกได้ สามารถเร่งการเจริญของต้นไส้กรอกแอฟริกาโดยการนำไปแช่น้ำร้อนเป็นเวลา 1 นาที หรือทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Simon and Katie, 2012)

จากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้น ต้นไส้กรอกแอฟริกาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลากหลายด้าน จึงได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นไส้กรอกแอฟริกาเพื่อเพิ่มโอกาสการเจริญของเมล็ด และเพิ่มปริมาณของต้นไส้กรอกแอฟริกาให้ได้จำนวนมากโดยใช้ระยะเวลาไม่นาน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังเป็นการสนับสนุนเศรษฐกิจทางการเกษตรในประเทศได้เพิ่มมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulator) ชนิด 6-benzyladenine (BA) และ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของไส้กรอกแอฟริกา

2) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช BA ในการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากเมล็ดไส้กรอกแอฟริกา

3) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช Indole-3-Butyric Acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Napthalene acetic acid (NAA) ในการชักนำให้เกิดรากจากยอดของไส้กรอกแอฟริกา

4) เพื่อขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนของต้นไส้กรอกแอฟริกา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาการชักนำการเกิดแคลลัสจากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเฉพาะ BA และ 2,4-D

2) ศึกษาการชักนำการเกิดต้นไม้จากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเฉพาะ BA

3) ศึกษาการชักนำการเกิดรากจากชิ้นส่วนยอดของไส้กรอกแอฟริกา โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเฉพาะ IBA, IAA และ NAA

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต้นไส้กรอกแอฟริกา

2) สามารถขยายพันธุ์ต้นไส้กรอกแอฟริกาได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

3) สามารถเก็บรักษาพันธุ์พืชได้เป็นระยะเวลานาน

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นไส้กรอกแอฟริกา (*Kigelia africana*)

2.1.1 ต้นไส้กรอกแอฟริกา

ต้นไส้กรอกแอฟริกามีชื่อวิทยาศาสตร์ *Kigelia Africana* (Lam.) Benth. ชื่อสามัญ African sausage tree, Liver sausage tree, Sausage tree มีลักษณะคล้ายกับ *Kigelia abyssinica, K. acutifolia, K. aethiopum, K. ellioti, K. elliptica, K. spragueana* และ *K. Africana* (Simon and Katie, 2012)

มีลำดับอนุวิธาน ดังนี้ (ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Kigelia)

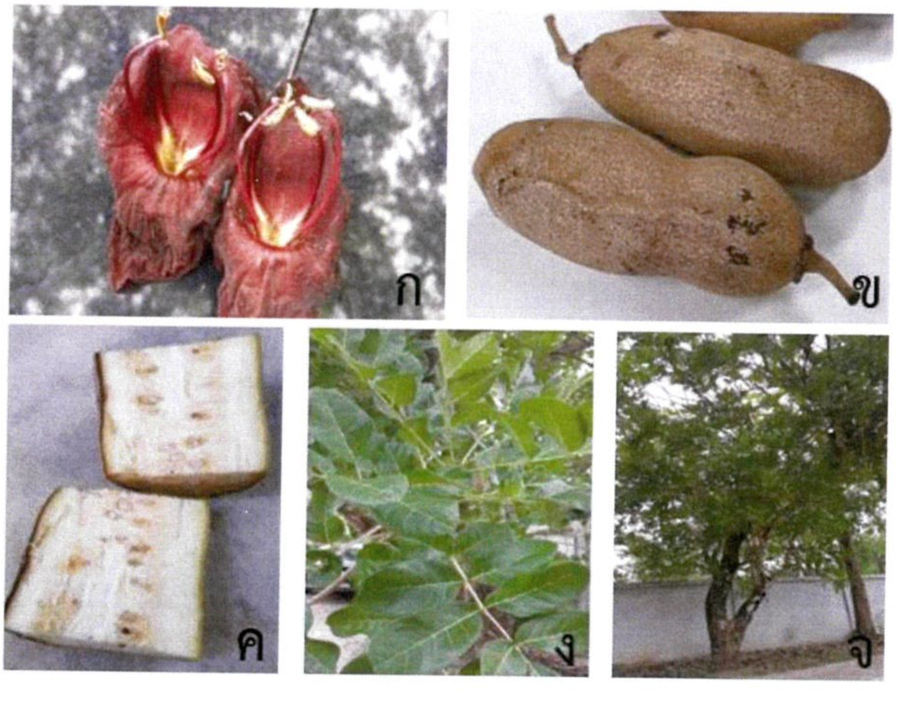
Kingdom : Plantae

Order : Lamiales

Family : Bignoniaceae

Tribe : Coleeae

Genus : Kigelia



รูปที่ 2.1 (ก) ดอกไส้กรอกแอฟริกา (ข) ลักษณะภายนอกผลไส้กรอกแอฟริกา (ค) ลักษณะภายในผลไส้กรอกแอฟริกา (ง) ใบของไส้กรอกแอฟริกา (จ) ต้นไส้กรอกแอฟริกา (ถ่ายโดย : ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นไส้กรอกแอฟริกา

ไส้กรอกแอฟริกาเป็นต้นไม้ที่มีผล ซึ่งผลมีน้ำหนักหลายกิโลกรัม ลักษณะของผลคล้ายกับไส้กรอก จึงเรียกว่า Sausage tree ในแอฟริการู้จักกันดีในชื่อของ ซูลู (umfongothi) เวนด้า (muvevha) และ มาลาวี (mvunguti) ไส้กรอกแอฟริกาเป็นไม้ไม่ผลัดใบ ต้นเจริญได้สูงสุด 25 เมตร สามารถพบได้ในประเทศที่อยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮารา ตั้งแต่บริเวณทานซาเนีย (Tanzania) ในทางตอนเหนือถึงควาซูลูนาทาล (KwaZulu–Natal) ทางตอนใต้ของแอฟริกา รวมถึงบริเวณลุ่มแม่น้ำต่างๆ (Denis. *et al*, 2011)

ไส้กรอกแอฟริกา ลำต้นสีเทา และเรียบเมื่ออายุมากขึ้นเปลือกลอกเป็นสะเก็ด เนื้อไม้สีน้ำตาลหรือเหลือง ดังรูปที่ 2.1 (จ) ไม่ผลัดใบ ยกเว้นเมื่อเกิดฤดูแล้งที่ยาวนาน ใบประกอบแบบขนนก ดังรูปที่ 2.1 (ง) ดอกช่อ ดอกมีลักษณะรูปคล้ายระฆัง และมีสีส้ม แดง หรือเหลือง ดังรูปที่ 2.1 (ก) มีนกและค้างคาวเข้าไปผสมเกสร ผลมีลักษณะเป็นทรงกระบอก แข็ง และยาว ดังรูปที่ 2.1 (ข) มีเมล็ดมาก ดังรูปที่ 2.1 (ค) และผลมีความยาวได้ถึง 1.20 เมตร ต้นไส้กรอกแอฟริกาสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในช่วง 4-5 ปีแรก ออกดอกในช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม และออกผลในช่วงเดือนธันวาคมถึงมิถุนายน ผลมีน้ำหนักมากถึง 12 กิโลกรัม (Simon and Katie, 2012)

2.1.3 องค์ประกอบทางเคมี

สารทุติยภูมิที่พบในพืชที่คล้ายกับสารประกอบจากสายพันธุ์อื่นๆ ใน Family Bignoniaceae โดยในไส้กรอกแอฟริกามีสารทุติยภูมิ คือ Iridoids, Naphthoquinones, Saponins, Tannin, Flavonoids, Coumarins เป็นต้น ซึ่งเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสารที่สกัดได้จากเปลือก คือ Kigelinone, naphthaquinoids, Pinnatal, Isopinnatal, Sterols stigmasterol และสารที่สกัดได้จากใบและผล คือ β-sitosterol, Flavonoids-6-hydroxyluteolin-7-α-glucoside และ Luteolin และสารที่สกัดได้จากราก คือ Dihydroisocoumarins, Lapachol, Sterols และ Glycosides iridoid (Simon and Katie, 2012)

2.1.4 การนำไปใช้เป็นยา

ผลของไส้กรอกแอฟริกาสามารถรักษาฝี แผลสด ท้องผูก โรคปวดเอวบิด โรคทางนรีเวช โรคริดสีดวงทวาร และเป็นยาระบายที่รุนแรง ในประเทศเคนย่านำผลมาทำเป็นยาแก้พิษงู ผลสีเขียวใช้ทำยาพอกซิฟิลิส และโรคไขข้อ ผลสุกมีพิษสูงอาจทำให้เกิดการพองของลิ้น และผิวหนังได้ ใบใช้พอกรักษาอาการปวดหลัง เปลือกไม้ใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารในเด็ก โรคปอดบวม และใช้รักษาโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ในประเทศซิมบับเวใช้ยาที่ต้มจากเปลือกไม้รักษาอาการปวดฟัน และโรคลมชัก ลำต้นและกิ่งไม้ใช้รักษาโรคไขข้อ และโรคบิด รากใช้รักษาโรคนรีเวช ท้องผูก และโรคพยาธิตัวตืด และเมล็ดของ *K. aethiopum* (คล้ายกับ *K. africana*) ใช้ทำเบียร์เพื่อเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ (Simon and Katie, 2012)

ส่วนประกอบที่ไม่ได้นำมาใช้เป็นยา เช่น ผลสุกนำมาใช้ทำเป็นเยื่อกระดาษ หรือในประเทศแอฟริกานำเมล็ดของผลสุกไปคั่วในเถ้าอุ่น และนำมาบริโภค เมล็ดอุดมไปด้วยพลังงานที่

สำคัญ เช่น ฟอสฟอรัส โปรตีน และไขมัน รวมทั้งน้ำมันที่ได้จากเมล็ดอุดมไปด้วยกรดโอเลอิก และกรดไขมันที่จำเป็นซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้ใบของไส้กรอกแอฟริกามีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญเมื่อเทียบกับผักใบเขียวอื่นๆ เช่น ผักขม ในประเทศที่อยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮาราใช้ไส้กรอกแอฟริกาเพื่อเพิ่มปริมาณ และคุณภาพของนมแม่ ใบแห้งมีกรดอะมิโนจำเป็น และแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสารอาหารต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ หรือการประยุกต์ใช้ในการผลิตสีย้อมจากการนำไปต้ม โดยผลสุกผลิตสีแดง รากผลิตสีเหลือง (Simon and Katie, 2012)

ในประเทศอินเดียมีการศึกษาพบว่า ผลมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งอาการปวด และต้านการอักเสบ สารสกัดของไส้กรอกแอฟริกาที่สกัดได้จากเมทานอลพบว่า สามารถยับยั้งคาราจีแนนที่ทำให้เกิดการตีนบวมน้ำ รักษาอาการอักเสบ และบรรเทาอาการปวดได้ (Simon and Katie, 2012)

สารสกัดจากเปลือกลำต้นออกฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida* และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และสารสกัดจากคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้ง *Shigella boydii* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้สูงสุด ลำต้นและเปลือกของไส้กรอกแอฟริกา สามารถยับยั้ง *Salmonella* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดบิวทานอลจากเปลือกของต้นไส้กรอกแอฟริกา ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Entamoeba histolytica* (Lim. *et al*., 2012)

Lim. *et al*. (2012) กล่าวว่า สาร naphthoquinoids 4 ตัวที่ได้จากรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาสามารถต้านทานต่อสายพันธุ์ของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

Moideen. *et al*. (1999) พบว่า สารสกัดไดคลอโรมีเทนจากส่วนของราก และเปลือกลำต้นของไส้กรอกแอฟริกามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Trypanosoma brucei brucei* และสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Leishmania major* ที่ก่อให้เกิดโรคลิชมาเนียซีสได้

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำเอาชิ้นส่วนพืชที่เป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อเซลล์ และเซลล์ที่ไม่มีผนังเป็นต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาวะปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาจนได้ต้นพืชเป็นจำนวนมาก แม้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดชิ้นส่วน อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง แต่โดยหลักการของวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละชิ้นส่วนก็มีความคล้ายคลึงกันอยู่มาก

2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

บุญยืน (2540) การเจริญของพืชบางชนิดอาจต้องการ undefined compound เช่น น้ำผลไม้ yeast extracts และ casein hydrolysate การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิดอาจจะใช้น้ำมะพร้าวหรือกล้วยบด

ประสาทพร (2541) กล่าวว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอาหารที่คิดค้นเพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของต้นพืชหรือเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ โดยมีการปรับปรุงสูตรอาหารให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด มีองค์ประกอบทั้งธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง แต่แตกต่างจากอาหารในธรรมชาติ คือ ส่วนประกอบของอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช น้ำตาล กรดอะมิโนชนิดต่างๆ โดยอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) (1962)

มาลี และคณะ (2550) ศึกษาการทดลองคือ (1) ชนิดสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยศึกษาเปรียบเทียบอาหาร 2 สูตร คือ สูตร MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงพืชทั่วไป และ Woody Plant Medium (1980) (WPM) ใช้ได้ดีกับไม้เนื้อแข็ง พบว่า พืชบางชนิดตอบสนองต่อ WPM ได้ดีกว่า MS เช่น คำมอกน้อย โมกราชินี แต่บางชนิดตอบสนองต่อ MS ได้ดีกว่า เช่น ติ้วขาว (2) ชนิดชิ้นส่วนพืช เช่น ใบเลี้ยง ข้อใบเลี้ยง ข้อที่อยู่ต่ำจากปลายยอดในลำดับที่แตกต่างกัน หรือปลายยอด พบว่าข้อที่อยู่ห่างจากปลายยอดยิ่งมากมีการเพิ่มปริมาณยอดได้ดีกว่าข้อที่ใกล้ปลายยอด และชิ้นส่วนข้อใบเลี้ยงเป็นชิ้นส่วนที่เพิ่มปริมาณยอดได้ดี (3) ผลของชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโต และระดับความเข้มข้นในการเพิ่มปริมาณยอด เช่น ไซโทไคนิน ชนิด BA หรือ Thidiazuron (TDZ) เมื่อใช้ร่วมกับออกซิน เช่น NAA พบว่า BA สามารถใช้ได้ดีกับชิ้นส่วนพืช ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 5-10 ไมโครโมลาร์ (4) ผลของออกซินในการชักนำให้เกิดราก พบว่า พืชตอบสนองต่อ IBA ในการกระตุ้นให้เกิดราก บางชนิดเกิดรากได้เองในช่วงของการเพิ่มปริมาณยอด เช่นติ้วขน ติ้วขาว เทพธาโร แต่บางชนิดยังมีปัญหาในเรื่องการกระตุ้นให้เกิดราก ได้แก่ กล้วยอ้ายพอน และกล้วยหมูสัง

รังสฤษฏ์ (2540) กล่าวว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช พันธุ์พืช และสภาพของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง โดยในอาหารประกอบด้วยธาตุอาหารที่ต้องการ คือ สารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แม้ต้นพืชนั้นมีความต้องการในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนมาก แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ทำให้พืชมีความต้องการธาตุอาหารและสารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า คือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

จากการความหมายของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่กล่าวมา อาจให้คำจำกัดความว่าอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืช และอาหารเพาะเลี้ยงมีองค์ประกอบที่ใกล้เคียงกับอาหารที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ประกอบด้วย แร่ธาตุต่างๆ ทั้งสารประกอบอนินทรีย์และสารประกอบอินทรีย์ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช กรดอะมิโนชนิดต่างๆ

ส่วนประกอบของอาหาร (อนุรักษ์, 2550)

- สารอนินทรีย์ ได้แก่ แร่ธาตุอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แร่ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และ ซัลเฟอร์ ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมากและขาดไม่ได้ และแร่ธาตุอาหารรอง แร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก แมงกานีส โคบอลต์ สังกะสี ทองแดง โมลิบดีนัม โบรอน โดยทั่วไปพืชต้องการแร่ธาตุอาหารรองไปใช้ในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

- สารอินทรีย์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งของคาร์บอนที่มีส่วนสำคัญในการให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปกติจะใช้น้ำตาลปริมาณ 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์

- วิตามิน (vitamins) พืชสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ทุกชนิด แต่เซลล์พืชที่เลี้ยงในสภาพหลอดแก้วต้องการวิตามินเพิ่ม โดยเฉพาะวิตามิน บี 1 วิตามินที่ใช้ เช่น วิตามินบี 1 (thiamine 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) วิตามินบี 5 (pantothenic acid 0.5-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) วิตามินเอ็ม (folic acid 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) วิตามินบี 2 (riboflavin 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร) วิตามินเอช (biotin 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และวิตามินอี (tocopherol 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร)

- กรดอะมิโน (amino acid) กรดอะมิโนมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก กรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปของ L มากกว่าในรูปของ D

- สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ทำหน้าที่กระตุ้น และมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ เพื่อพัฒนาต้นพืช การเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และสารทุติยภูมิ โดยปกติมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตหรือการกำเนิดอวัยวะ และมีเนื้อเยื่อพืชไม่กี่ชนิดที่สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ออกซิน (auxin) สามารถชักนำการยืดของลำต้นและปล้อง การโค้งงอเข้าสิ่งเร้า (tropism) การยับยั้งการเจริญของตาข้าง (apical domonance) การหลุดร่วงของใบ ดอก และผล การเกิดราก เป็นต้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำเอาออกซินไปใช้ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเกิดราก โดยออกซินในปริมาณเพียงเล็กน้อยจะช่วยในการเจริญเติบโตแต่หากมีความเข้มข้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโต ออกซินที่นิยมใช้ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), Napthalene acetic acid (NAA), Indole-3-Butyric Acid (IBA) และ Indole-3-acetic acid (IAA) โดย IBA และ NAA ช่วยในการชักนำราก และ 2,4-D ช่วยในการชักนำแคลลัส

ไซโตไคนิน (cytokinin) มีผลต่อการแบ่งเซลล์ช่วยในการเจริญของตาข้าง ใช้ชะลอและยืดอายุส่วนต่างๆ ของพืช การเติมไซโตไคนินลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงจะช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์

และการเจริญเป็นหน่อเล็กๆ (adventitious shoots) จากส่วนของแคลลัสหรือชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ไซโตไคนินที่นิยมใช้ คือ zeatin, BAP (benzylaminopurine), 2iP (isopentonyl adenine) และ kinetin

- วุ้น (agar) ช่วยในการยึดเกาะของเนื้อเยื่อพืช โดยปกติใช้ความเข้มข้นประมาณ 1.25-2.6 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช

รังสฤษฎ์ (2540) กล่าวว่าการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชเป็นขั้นตอนที่ช่วยในการขจัดหรือลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง และเพื่อลดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น ความเป็นกรด-ด่าง การเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เป็นสาเหตุในการปนเปื้อนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

คำนูณ (2542) กล่าวว่า การติดเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดจาก 4 สาเหตุ คือ จากชิ้นส่วนพืชทั้งภายนอก และภายใน อาหารเพาะเลี้ยง อากาศ และจากผู้ปฏิบัติการทำให้เกิดการปนเปื้อนของชิ้นส่วนพืช และพืชตายได้

อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่า การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก โดยชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอมบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอก เป็นต้น ต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เนื่องจากในธรรมชาติในดิน น้ำ อากาศมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ แพร่กระจายอยู่ทั่วไปซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้จะทำให้พืชตายในที่สุด ซึ่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ประสบความสำเร็จ

จากความหมายของการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชที่กล่าวมา อาจให้คำจำกัดความ คือ การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชเป็นการลดหรือขจัดเชื้อจุลินทรีย์ในชิ้นส่วนพืชเพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้

อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่าการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โดยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไปพร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆ ภายในจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์หรือสารเคมีสามารถจับกับโปรตีนเอนไซม์ และโปรตีนเสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ สารเคมีที่ใช้สำหรับฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้นต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการโดยมีแนวการเลือกใช้ดังนี้

- มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

- สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว
- สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่ายคงสภาพหลังจากการละลายแล้วไม่ควรมีสีและกลิ่นอันไม่พึ่งประสงค์
- ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย
- ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

สารเคมีที่นิยมใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ คลอรอกซ์ (clorox) แคลเซียมไฮโปรคลอไรท์ ($Ca(OCl_2)$) โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ($Na(OCl_2)$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซิลเวอร์ไนเทรต ($Ag(NO_3)_2$) เมอคิวริคลอไรด์ ($HgCl_2$) แอลทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) และสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ ในการฆ่าเชื้อโดยไม่ต้องใช้สารเคมี เช่น การอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) หรือที่เรียกกันว่าแสง UV การเผาไฟซึ่งใช้กับตัวอย่างที่แข็งๆ เช่น เมล็ด และท่อนไม้ เป็นต้น

2.2.3 สารฆ่าเชื้อ

Plant Preservative Mixture (PPM) เป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา และแบคทีเรีย แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของพืช จัดเป็นสารในกลุ่ม preservation มีประสิทธิภาพในการป้องกันหรือลดการปนเปื้อนเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการงอกของเมล็ด การเกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นของพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสามารถใช้ได้ง่ายเพียงแค่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถเติมได้ทั้งก่อนหรือหลังนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เนื่องจากสามารถทนความร้อนสูงได้สามารถป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากทางอากาศ ทางน้ำ และการสัมผัสได้เป็นอย่างดี กลไกการทำงานของ PPM คือ ส่วนผสมของ PPM แทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา และแบคทีเรีย เข้าไปยับยั้งเอนไซม์ในกลไกการเผาผลาญอาหารหรือเมทาบอลิซึม เช่น การหายใจ การถ่ายทอดอิเล็กตรอน กลไกการดูดซึมของน้ำตาล และกรดอะมิโนจากอาหารของแบคทีเรีย และเชื้อรา ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด (Julie, 2015)

เซฟโฟแทกซิม (cefotaxime) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins ใช้ในการยับยั้งหรือกำจัดแบคทีเรียแกรมลบ มีความคงทนในเอนไซม์ B-lactamase แต่จะถูก hydrolysed ได้ง่ายโดยกลุ่มของ TEM enzyme สารปฏิชีวนะ cefotaxime มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่น้อยมาก และยังพบว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัส การชักนำให้เกิดเอมบริโอ (สิริรักษ์, 2547)

ยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) เป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มยาอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) มีกลไกการออกฤทธิ์ คือ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในตัวแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตไม่สามารถให้เชื้อแพร่พันธุ์ และตายได้ (อภัย, 2559)

เมอคิวริคคลอไรด์ (mercuric chloride, $HgCl_2$) ใช้ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีแต่เป็นสารเคมีที่อันตรายต่อคน สารละลายของเมอคิวริคคลอไรด์เป็นสารละลายที่สามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิห้องจึงต้องระมัดระวังการใช้สารนี้ (บุญยืน, 2540)

2.2.4 วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.4.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ดพืช

ในอาหารสังเคราะห์สามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นต้นง่าย การขยายพันธุ์พืชในปัจจุบันส่วนใหญ่อาศัยการเพาะจากเมล็ด แต่พืชบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือต้องอาศัยระยะเวลาหนึ่งก่อนจึงสามารถเจริญเติบโตได้ การผสมพันธุ์พืชบางชนิดเมื่อเจริญเป็นเอมบริโอแล้วมักตายไปก่อนที่จะเจริญเป็นเอมบริโอที่สมบูรณ์ โดยการเพาะเมล็ดในอาหารสังเคราะห์ช่วยแก้ปัญหาบางอย่างเกี่ยวกับการผสมพันธุ์พืชบางชนิดที่สามารถเจริญเติบโตในธรรมชาติได้ยาก

2.2.4.2 การเพาะเลี้ยงราก

White (1934) ได้ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายรากมะเขือในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส และยีสต์สกัดเทศ พบว่า รากที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเป็นจำนวนมาก

บุญยืน (2540) กล่าวว่าอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงรากต้องใส่น้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 5.0-6.0 ความเข้มของแสงในระดับต่ำๆ สามารถทำให้การเจริญได้ดีในรากของพืชบางชนิด รากของพืชบางชนิดอาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อได้รับแสง อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-27 องศาเซลเซียส

ประสาทพร (2541) กล่าวว่ารากพืชส่วนมากนิยมเลี้ยงในอาหารเหลวโดยเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงหรือในเครื่องปฏิกรชีวภาพ พบว่ารากพืชสามารถเจริญได้จำนวนมากและเจริญได้อย่างต่อเนื่อง

การนำเอารากของพืชที่ปลูกอยู่ในเรือนต้นไม้หรือในแปลงมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อค่อนข้างลำบาก ปัญหาที่สำคัญคือ การทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อรา และแบคทีเรียอาศัยอยู่ตามรอยแตกของราก และบางทีก็อาศัยอยู่ระหว่างเซลล์ของพืช รวมถึงการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์จึงอาจทำอันตรายแก่รากได้ การเพาะเลี้ยงรากจึงควรนำมาจากการเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำไปเพาะในอาหาร ควบคุมสภาวะการเพาะเมล็ดในที่มืดช่วยให้รากเจริญได้ดี (บุญยืน, 2540)

2.2.4.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่าแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์พาเรงไคมาที่มี อยู่รวมกันเป็นกลุ่มยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสมีหลายรูปแบบ และมีรูปร่างไม่แน่นอน สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นมีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ คล้ายฟองน้ำ เรียกว่า

friable callus เนื้อเยื่อพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิต สามารถที่ชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ เช่น ส่วนของเอมบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ราก ใบอ่อน และเมล็ด เป็นต้น

แคลลัสยังไม่มีการรวมตัวกันเป็นอวัยวะ โดยการเกิดแคลลัสบริเวณที่มีรอยแผลเกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยออกซิน และไซโตไคนินที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ (บุญยืน, 2540) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสสามารถกระตุ้นให้แคลลัสเกิดเป็นอวัยวะ และเนื้อเยื่อจำนวนมาก โดยไม่จำเป็นต้องตอบสนองต่อบาดแผลของชิ้นส่วนพืช (street, 1969)

การเจริญของแคลลัสเป็นการเพิ่มขนาดโดยถาวรเกิดจากการแบ่งเซลล์แล้วเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญของแคลลัสในอาหารแข็งเห็นได้จากการที่มีก้อนโตขึ้น วิธีวัดการเจริญของแคลลัสทำได้หลายวิธี เช่น ชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และการนับจำนวนเซลล์ นิยมใช้วิธีชั่งน้ำหนักสด เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อการติดตามน้ำหนักเนื้อเยื่อที่เพิ่มขึ้น ทำให้ไม่ต้องทำลายแคลลัส และสามารถนำแคลลัสกลับมาเลี้ยงในอาหารตามเดิมถ้าชั่งในสภาพปลอดเชื้อ (อนุรักษ์, 2550)

2.2.5 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อนุรักษ์, 2550)

2.2.5.1 ปัจจัยภายใน (endogenous factors)

1. ปัจจัยเนื่องจากพันธุกรรม (genetic factor) ปัจจัยในที่นี้หมายถึงสารพันธุกรรมหรือยีน ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีการควบคุม และการแสดงออกของยีนต่างกัน พืชบางชนิดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แล้วสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และชักนำแคลลัสให้กลายเป็นยอดและรากได้ง่าย แต่ในทางกลับกันพืชบางชนิดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมือนกันอาจไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ หรือถ้าชักนำให้เกิดแคลลัสได้แต่อาจไม่สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นยอดหรือรากได้

2. สารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ภายในพืช (plant growth regulators) สารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และสะสมในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันตามชนิดของพืช ประเภทเนื้อเยื่อพืช และสภาพของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

2.2.5.2 ปัจจัยภายนอก (exogenous factors)

1. คุณภาพของแสง หมายถึง ความยาวของคลื่นแสง แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ คลื่นแสงที่มองไม่เห็น เช่น แสงอัลตราไวโอเลต เป็นตัวการในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช และแสงอินฟาเรด มีส่วนทำให้ปล้องของพืชยืดยาวออก และอีกส่วนคือ คลื่นแสงที่มองเห็น เช่น แสงสีม่วง และสีน้ำเงิน เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของพืชต่อแสงที่เรียกว่า phototropism

2. ความเข้มของแสง ปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระยะแรกจะใช้ความเข้มข้นของแสงต่ำเพื่อชักนำให้เกิดยอด หลังจากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของแสงให้มากขึ้น

เพื่อช่วยให้ตายอดได้มีการพัฒนาเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยให้มีความเข้มข้นของแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ แสงเท่านี้ก็เพียงพอในการให้พืชเจริญอยู่ได้ปกติ

3. ระยะเวลาการให้แสง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทั่วไปใช้ระยะเวลาให้แสงประมาณ 16 ชั่วโมง และมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

4. อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยปกติควบคุมห้องที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้มีอุณหภูมิคงที่ประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส แต่ในพืชบางชนิดอาจต้องการอุณหภูมิในการเจริญเติบโตในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูงหรือต่ำกว่านี้ได้

5. สารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อนำเนื้อเยื่อพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส ยอด และรากได้

2.2.5.3 ปัจจัยอื่นๆ

1. ขนาดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง การนำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่มีขนาดใหญ่มาเพาะเลี้ยงจะมีโอกาสพัฒนาเกิดเป็นยอดและรากได้ดีกว่าชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่มีขนาดเล็ก แต่ชิ้นส่วนพืชขนาดใหญ่มีโอกาสในการปนเปื้อนได้มากกว่า

2. การย้ายเนื้อเยื่อพืชจากอาหารเก่าสู่อาหารใหม่ การย้ายเนื้อเยื่อพืชหรือแคลลัสไปยังอาหารใหม่หลายครั้ง มีผลทำให้ความสามารถในการพัฒนาการเจริญเติบโตเป็นยอดและรากของเนื้อเยื่อพืชลดลง

3. ส่วนประกอบของอาหาร ส่วนประกอบของอาหารบางชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดยอดและราก ในการเตรียมอาหารถ้าใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมอิออนปริมาณมาก จะทำให้เนื้อเยื่อเกิดเอมบริโอเจนเนซีสมากกว่าเกิดออร์แกนโนเจนเนซีส

4. ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร โดยทั่วไปจะปรับ pH 5.6-5.8

5. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เป็นสารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงส่งผลให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก ถ้าออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินส่งผลพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุลมีออกซินเท่ากับไซโตไคนินพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ นั้นพบว่าออกซินอยู่ในช่วง 0.01-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับชนิดพืชชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

2.2.6 ประโยชน์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

ปัจจุบันนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทอย่างมากทั้งในด้านการเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และด้านการแพทย์ ด้วยเหตุนี้จึงขอกล่าวถึงประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชดังนี้

2.2.6.1 การขยายพันธุ์พืช (plant propagation) การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีปกติจะมีหลายวิธี เช่น ตอนกิ่ง ติดตา และทาบกิ่ง จะได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนเดิม ได้ปริมาณมาก

แต่ใช้ระยะเวลานาน สำหรับการเพาะเมล็ดทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะไม่เหมือนเดิม อาจเกิดการแปรผันที่ได้ลักษณะที่ดี หรือไม่ดีไปจากต้นพันธุ์เดิมได้ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถช่วยเพิ่มการขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมาก และในระยะเวลาที่เร็วกว่าการขยายพันธุ์ปกติ

2.2.6.2 การปรับปรุงพันธุ์ (plant improvement) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นอย่างดี สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยการใช้รังสี เช่น แกมมา อัลตราไวโอเลต และเอ็กซ์ เป็นต้น หรือการใช้สารเคมี เช่น โคลชิซีน เป็นต้น เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่พึ่งประสงค์

2.2.6.3 การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยาหรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมากต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ถูกควบคุมในสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้พืชมีการสังเคราะห์สารที่ต้องการเพิ่มมากขึ้นได้

2.2.6.4 การผลิตพืชปราศจากโรค (disease free plant) พืชที่ถูกจุลินทรีย์เข้าทำลาย เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่เข้าที่ไปทำลายเซลล์พืช เชื้อไวรัสจะติดไปกับส่วนของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชตลอดเวลา ทำให้ไม่สามารถผลิตพืชที่ปราศจากโรคได้ มีผลต่อพืชโดยตรง คือ พืชอ่อนแอ อัตราการเจริญไม่สมบูรณ์ ผลผลิตต่ำหรือพืชอาจตายได้ การผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยการตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายยอดให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.01-0.05 มิลลิเมตร เพราะบริเวณปลายยอดมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เป็นบริเวณที่เชื้อไวรัสไม่สามารถเคลื่อนตัวตามท่อน้ำ และท่ออาหารได้ เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถพัฒนาให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

2.2.6.5 การเก็บรักษาพันธุ์พืช (plant conversation) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิดทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อบ่อยๆ จนกว่าเมื่อใดที่ต้องการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อนั้นสามารถย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในสภาพเช่นนี้เซลล์ และเนื้อเยื่อจะคงสภาพ และมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สมปอง และอรุณี (2535) ศึกษาการชักนำรากในยางพารา 3 พันธุ์ คือ พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ GTP1 และพันธุ์ PB5/51 โดยการตัดชิ้นส่วนยอดของต้นยางพาราทั้ง 3 สายพันธุ์ มาจุ่มแช่ลงในสารละลาย NAA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 5 ระดับ ในเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผลถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารละลายที่มี NAA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน แช่เป็นเวลา 5 วัน และย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สามารถชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Gauri. *et al*. (2000) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสของต้น *Pelargonium graveolens* โดยใช้ Kinetin (Kn) หรือ 2,4-D พบว่า Kn ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ 66 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสมีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ และเป็นสีเขียว จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินความเข้มข้นสูง และออกซินความเข้มข้นต่ำ สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดี

Naomita and Ravishankar (2004) ศึกษาการขยายพันธุ์ของต้น *Oroxylum indicum* Vent. โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยเมอร์คิวริคคลอไรด์ 0.07 เปอร์เซ็นต์ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง จากนั้นวางเมล็ดลงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) วุ้นความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ pH ของอาหารเท่ากับ 5.8 การชักนำให้เกิดยอดจากเมล็ดใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า BA ความเข้มข้น 8.87 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดยอดได้ดีที่สุด (95.8 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อใช้ BA ความเข้มข้น 8.87 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดยอดได้เพิ่มมากขึ้น จากนั้นตัดชิ้นส่วนยอดขนาด 3-4 เซนติเมตร เพื่อชักนำให้เกิดราก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ IAA พบว่า NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 5.71 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดรากได้ดีที่สุด (91.6 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อย้ายไปเพาะปลูกลงดินที่ประกอบด้วย ดิน : ทราย : soil rite พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 70-72 เปอร์เซ็นต์

Thomas and Puther (2004) ศึกษาการชักนำรากของ *Kigelia pinnata* โดยการตัดชิ้นส่วนยอดที่ชักนำได้จากแคลัส โดยชิ้นส่วนยอดขนาด 1.5 เซนติเมตร และเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า IBA ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดรากเฉลี่ย 4.4 รากต่อชิ้นส่วนพืช และมีความยาวรากเฉลี่ย 13 เซนติเมตร

Shard. *et al*. (2007) ศึกษาการขยายพันธุ์ของต้น *O. indicum* โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการล้างแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับ tween-20 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ล้างด้วย

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และ pH ของอาหารคือ 5.8 โดยการชักนำต้นใหม่จากเมล็ดจะใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA, NAA และปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำการเกิดต้นได้ดีที่สุด และในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลกิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสจากเมล็ดได้ดีที่สุด (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อตัดชิ้นส่วนยอดไปชักนำราก พบว่า อาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดรากได้ดีที่สุด (68 เปอร์เซ็นต์)

เยาวพา และขวัญจิตต์ (2552) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นสร้อยสายเพชร (*Clerodendrum wallichii*) บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS และ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA, IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่เติม IAA และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ชักนำการเกิดรากได้ 81.3 เปอร์เซ็นต์ และIAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดรากมากที่สุด (8.7 ราก)

Dennis and Surabhi (2009) ศึกษาการเกิดรากของต้น *Sarcostemma brevistigma* โดยตัดชิ้นส่วนยอดขนาด 1.5-2 เซนติเมตร และวางบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และ pH ของอาหารคือ 5.8 การชักนำการเกิดรากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1-7 ไมโครโมลาร์ หรือ IBA ความเข้มข้น 1-7 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่า IBA ความเข้มข้น 3 และ 5 ไมโครโมลลาร์ ชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และ NAA ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดรากได้ 71 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนราก 2.1 รากต่อชิ้นส่วนยอด

Harahap. *et al*. (2009) ศึกษาการชักนำรากของต้นมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยการตัดชิ้นส่วนยอดที่มีความยาว 3 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ MS ใช้สารควบคุมการ คือ IBA และ NAA ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่ารากสามารถเจริญได้ในอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชักนำให้เกิดรากได้หลังจากเริ่มเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ และรากสามารถเจริญได้สูงสุดเฉลี่ย 85 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวราก 1.49 เซนติเมตร

Susmita. *et al*. (2009) ศึกษาการขยายพันธุ์ของต้น *Stereospermum personatum* D.C. โดยนำเมล็ดแช่น้ำอุ่นก่อนทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน ย้ายลงไปวางที่เยื่อกระดาษ 4 วัน และย้ายไปวางบน plastic tray เพื่อเพาะเลี้ยงอีก 21 วัน พบว่ายอดมีการเจริญได้ 2.3 เซนติเมตร และมีข้อ 2-3 เซนติเมตร จากนั้นตัดชิ้นส่วนยอดขนาด 1-1.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสังเคราะห์

สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดรากได้ดีที่สุด (100 เปอร์เซ็นต์) เกิดราก 4.4 รากต่อชิ้นส่วนยอด

Baskaran and Krishnan (2010) ศึกษาการขยายพันธุ์ของ *Garcinia indica* โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที ล้างต่อด้วยเมอร์คิวริคคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนของเมล็ด และวางบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร WPM ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ และ pH ของอาหารคือ 5.7±2.0 โดยการชักนำให้เกิดยอดใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ IAA, NAA หรือ IBA พบว่า อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ชักนำการเกิดรากได้มากที่สุด (86.2 ยอด) และเมื่อนำยอดมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร สามารถชักนำการเกิดรากได้มากที่สุด (100 เปอร์เซ็นต์)

Lin. *et al*. (2010) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในการชักนำแคลลัสจาก *Catalpa bungei* โดยใช้ชิ้นส่วนของ ใบ ก้านดอก และ ก้านใบ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Driver and Kuniyuki (DKW) (1984) ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า คือ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และ NAA ที่ความเข้มข้นสูง มีการเกิดแคลลัสน้อย และแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ก้านใบเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส

อุบล (2556) ศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำรากของต้นส้มซ่า (*Citrus medica* L. var. *linetta Risso*) โดยการตัดชิ้นส่วนยอดต้นส้มซ่าให้มีความยาวประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการเจริญเติบโตของรากมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยง 4 และ 8 สัปดาห์ (73.43 และ 91.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 1.45 ราก และความยาวรากมากที่สุด 3.02 เซนติเมตร

Nissar. *et al*. (2013) การชักนำแคลลัส การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ และการเกิดรากของต้นหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* (Blume)) จากชิ้นส่วนใบของต้นหญ้าหนวดแมว ในการชักนำแคลลัส โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D, IAA หรือ NAA และ 2,4-D, IAA หรือ NAA ร่วมกับ BAP พบว่า แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการชักนำแคลลัสเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่ามีการเกิดยอดเป็นจำนวนมาก เมื่อเพาะเลี้ยงจนได้ยอดที่มีความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ทำการตัดชิ้นส่วนยอดไปชักนำให้เกิดราก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า รากมีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดรากได้ 71 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยของการเกิดราก คือ 7.20 ± 2.14 เซนติเมตร

Rodrigues. *et al*. (2013) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสของต้น *Millingtonia hortensis* โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP หรือ 2,4-D ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (70 เปอร์เซ็นต์) และ BAP ความเข้มข้นสูงเพิ่มมากขึ้น ทำให้การเจริญของแคลลัสลดลง และ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ 80 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4-D ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสเกิดสีดำ โดยส่วนมากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย 2,4-D ทำให้แคลลัสสีน้ำตาล

นิตยา และคณะ (2559) การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตเหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อของต้นหนอนตายหยากที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าที่ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสทั้งในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร ½ MS และอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS คือ มีอัตราการเกิดแคลลัส 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์

149028

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชและการเก็บตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

ผลของไส้กรอกแอฟริกาได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. เผชิญชัยภัทร ไชยสิทธิ์

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- เมอร์คิวลิคคลอไรด์ (Mercuric chloride)
- Tween-20
- Zefozan
- Plant Preservative Mixture (PPM)
- Antibiotic : Steptomycin
- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (distilled water)
- เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- Sodium hydroxide (NaOH) และ Hydrochloric acid (HCl)
- ไฟทาเจล
- น้ำตาลซูโครส

3.2.2 อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- Murashige and Skoog (MS) (1962)

3.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator)

- 6-Benzylaminopurine (BA)
- 2,4-Dicholophenoxy acetic acid (2,4-D)
- Napthalene acetic acid (NAA)
- Indole-3-acetic acid (IAA)
- Indole-3-Butyric Acid (IBA)

3.2.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- ขวดที่ใช้เพาะเลี้ยง (tissue culture bottle)
- หลอดทดลอง (test tube)

- จานแก้ว (petri dish)
- ปากคีบ (forceps)
- มีดผ่าตัด (knife)
- ช้อนตักสาร (spatula)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- ตู้อบความร้อน (hot air oven)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)
- ไมโครปิเปต (micropipettes)
- ทิปขนาดต่างๆ (tip)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (refrigerator)
- ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดไส้กรอกแอฟริกา

นำผลของไส้กรอกแอฟริกามาผ่าเอาเมล็ด นำเมล็ดมาล้างน้ำให้สะอาด และล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ทำการฟอกฆ่าเชื้อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ประกอบด้วย mercuric chloride ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ tween-20 2-3 หยด steptomycin PPM และ zefozan ปริมาตร 80 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้ายเมล็ดไส้กรอกแอฟริกาลงขวดที่มีน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่เติม steptomycin PPM zefozan ปริมาตร 80 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง และย้ายลงในขวดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเขย่า 5 นาที จนครบเวลานำเมล็ดมาวางผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.3.2 การชักนำแคลลัสจากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา

จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดไส้กรอกแอฟริกา ข้อ 3.3.1 นำเมล็ดที่ได้วางลงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH ประมาณ 5.6-5.8 ทำการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 5 ขวด ขวดละ 4 เม็ด รวมเป็นความเข้มข้นละ 20 เมล็ด เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการ

บันทึกผลการทดลองโดย วัดขนาดแคลลัส โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.3 การชักนำต้นใหม่ของไส้กรอกแอฟริกา

3.3.3.1 การชักนำต้นใหม่ของไส้กรอกแอฟริกาจากเมล็ด

จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดไส้กรอกแอฟริกา ข้อ 3.3.1 นำเมล็ดที่ได้วางลงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH ประมาณ 5.6-5.8 ทำการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 13 ขวด ขวดละ 4 เม็ด รวมเป็นความเข้มข้นละ 52 เมล็ด โดยเริ่ม เก็บผลที่สัปดาห์ที่ 4 จากนั้นเก็บผลการเจริญของพืชทุกๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง คือ สัปดาห์ที่ 4, 6, 8 และ 10 รวมใช้ระยะเวลา 10 สัปดาห์ วัดความสูงของต้นจากโคนต้นถึงปลายยอด วัดความยาวของใบจากโคนใบถึงปลายใบ วัดความยาวของรากจากโคนต้นถึงปลายรากโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ นับจำนวนยอด จำนวนใบ และจำนวนรากโดยเริ่มนับจากส่วนที่มีความยาวประมาณ 1 มิลลิเมตรขึ้นไป คำนวณเปอร์เซ็นต์การเจริญของต้นใหม่จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.3.2 การชักนำรากของต้นไส้กรอกแอฟริกา

ตัดส่วนยอดที่เกิดจากต้นใหมในข้อที่ 3.3.3.1 นำมาตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาด 2-3 เซนติเมตร วางลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ประมาณ 5.6-5.8 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังนี้ IAA และ NAA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 วัดความยาวของรากจากปลายที่ถูกตัดจากยอดจนถึงปลายรากโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ นับจำนวนรากที่มีความยาวตั้งแต่ 1 มิลลิเมตรขึ้นไป คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากสูตร

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

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

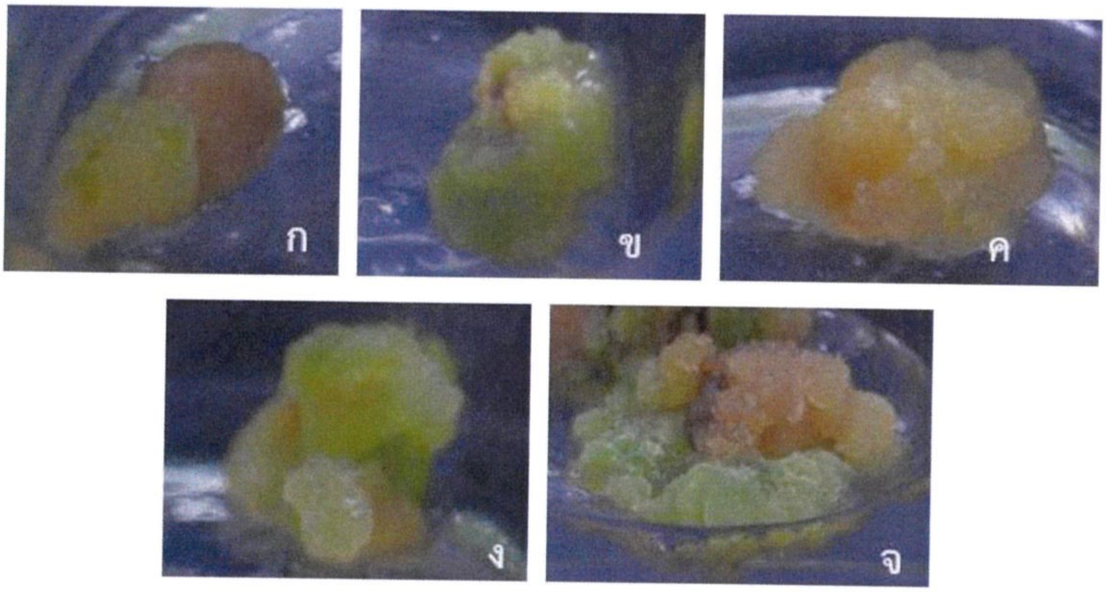
4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสจากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา

การเพาะเลี้ยงเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกาในข้อที่ 3.3.2 พบว่า อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ทุกความเข้มข้น แคลลัสมีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อนดังรูปที่ 4.1 ที่ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเฉลี่ยของแคลลัสใหญ่ที่สุด คือ 5214.17 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rodrigues. *et al*. (2013) ที่ศึกษาการชักนำแคลลัสของ ต้น *Millingtonia hortensis* พบว่า BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 70 เปอร์เซ็นต์ และในการชักนำแคลลัสของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่ BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาด 2371.99, 4984.11, 4482.24 และ 4332.95 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1

การเพาะเลี้ยงเมล็ดไส้กรอกแอฟริกาในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ทุกความเข้มข้นแคลลัสมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล ดังรูปที่ 4.2 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด คือ 65 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเฉลี่ยของแคลลัส 3797.73 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rodrigues. *et al*. (2013) ที่กล่าวว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย 2,4-D จะทำให้แคลลัสมีสีน้ำตาล และที่ 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากัน คือ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดเฉลี่ยของแคลลัส 4392.86 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งใหญ่กว่าขนาดของแคลลัสที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีขนาด 3106.84 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนเมล็ด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เป็นเวลา 12 สัปดาห์

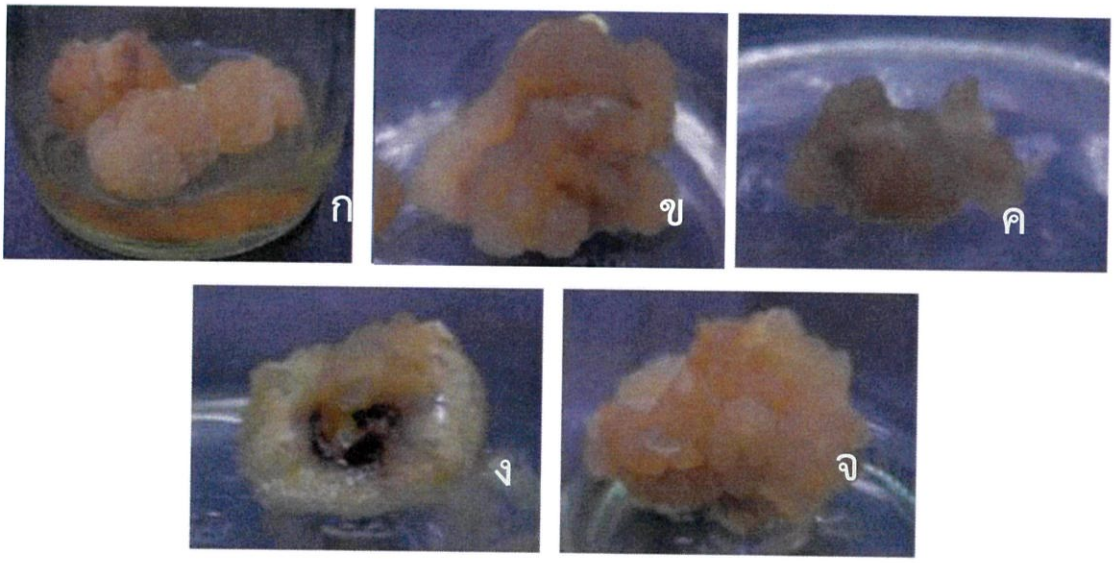
ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ด	จำนวนการเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0.5	20	7 (35)	2371.99
1	20	15 (75)	4984.11
2	20	14 (70)	4482.24
3	20	12 (60)	4332.95
5	20	16 (80)	5214.17



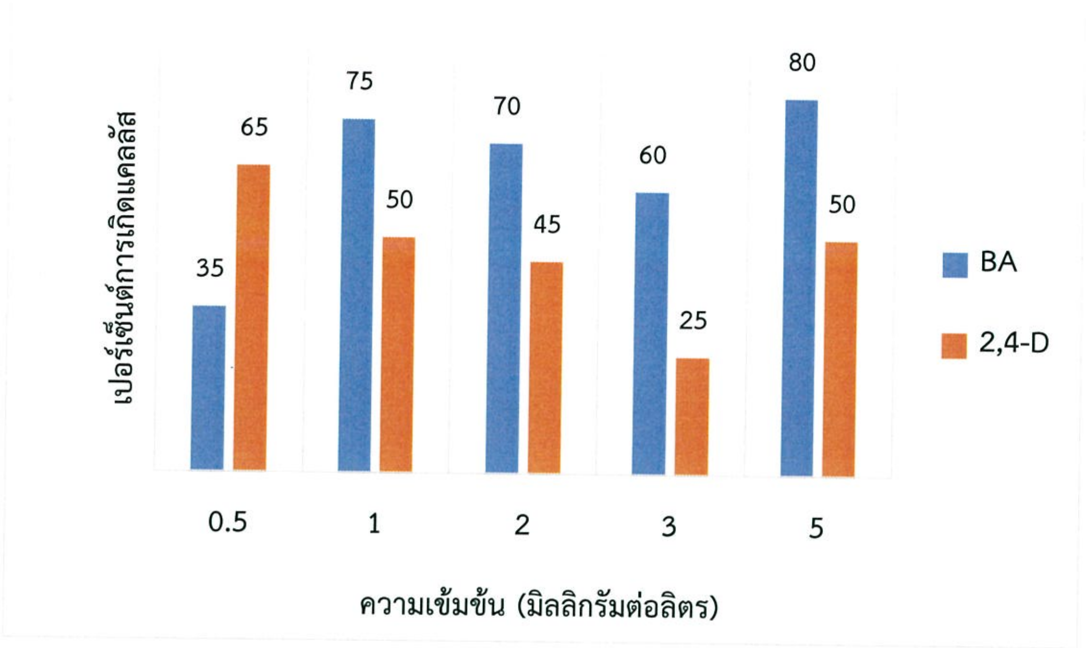
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของแคลลัสของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนเมล็ด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เป็นเวลา 12 สัปดาห์

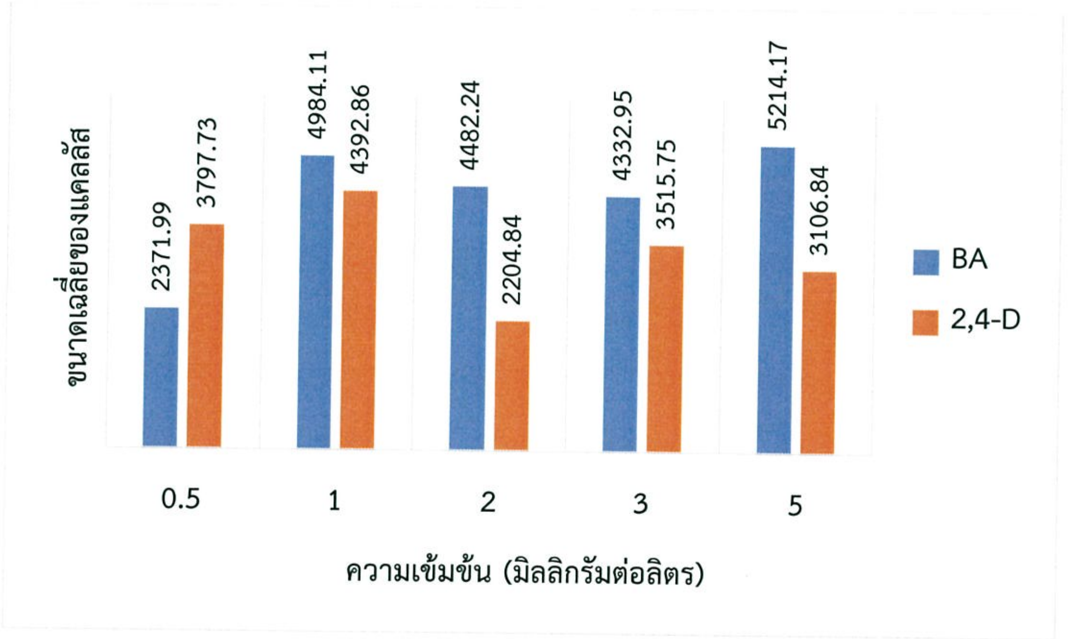
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	**จำนวนเมล็ด**	**จำนวนการเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)**	**ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)**
0.5	20	13 (65)	3797.73
1	20	10 (50)	4392.86
2	20	9 (45)	2204.84
3	20	5 (25)	3515.75
5	20	10 (50)	3106.84



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญของแคลลัสของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

จากการทดลอง เมื่อนำเปอร์เซ็นต์จำนวนการเกิดแคลลัสมาเปรียบเทียบกันใน BA และ 2,4-D แต่ละความเข้มข้น ทำให้ทราบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และ BA ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ นิตยา และคณะ (2559) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดแคลลัสได้ 60 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gauri. *et al*. (2000) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสของต้น *Pelargonium graveolens* พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินความเข้มข้นสูงและออกซินความเข้มข้นต่ำ สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดี โดยในการทดลองใช้ Kn ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการทดลอง BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า 2,4-D สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่า BA ดังรูปที่ 4.3

จากการทดลอง เมื่อนำขนาดเฉลี่ยของแคลลัสมาเปรียบเทียบกันใน BA และ 2,4-D แต่ละความเข้มข้น พบว่า BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำขนาดเฉลี่ยของแคลลัสให้มีขนาดใหญ่ที่สุด และที่ BA ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำขนาดเฉลี่ยของแคลลัสให้มีขนาดใหญ่กว่า 2,4-D ในทุกความเข้มข้น แต่ในการทดลอง BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า 2,4-D ชักนำขนาดเฉลี่ยของแคลลัสได้ใหญ่กว่า BA ดังรูปที่ 4.4

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของไส้กรอกแอฟริกา

4.2.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกาจากเมล็ด

การเพาะเลี้ยงเมล็ดของไส้กรอกแอฟริกา พบว่า อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ พบว่า เกิดต้นใหม่ในทุกความเข้มข้น โดยในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดต้นใหม่มากที่สุด 45 ต้น (86.54 เปอร์เซ็นต์) และมีจำนวนการเกิดใบมากที่สุด คือ 92 ใบ และในสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอดและรากมากที่สุด คือ 116 ยอด และ 29 ราก ตามลำดับ และเมื่อบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นไส้กรอกแอฟริกาในสัปดาห์ที่ 4, 6, 8 และ 10 พบว่า

การเจริญในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเมล็ดไส้กรอกแอฟริกา ทุกความเข้มข้นมีใบเลี้ยงขนาดใหญ่ 2 ใบ ราก และยอดขนาดเล็กงอกออกจากเมล็ด ดังรูปที่ 4.5 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดมากที่สุด คือ 23 ยอด BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวต้นเฉลี่ยสูงสุด คือ 24.46 มิลลิเมตร BA ความ

เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด 24 ใบ และ BA ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด 5 ราก เท่ากัน ดังตารางที่ 4.3

การเจริญในสัปดาห์ที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเมล็ดไส้กรอกแอฟริกา มีใบบริเวณลำต้น และยอด ดังรูปที่ 4.6 (ก และ ค) มีรากงอกออกมาบริเวณต้นที่ติดกับเมล็ด ดังรูปที่ 4.6 (ข) และยอดขนาดเล็กขึ้นเป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 4.6 (ก, ค, ง และ จ) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดมากที่สุด 32 ยอด BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวต้นเฉลี่ย และมีจำนวนรากมากที่สุด คือ 32.27 มิลลิเมตร และ 12 รากตามลำดับ และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด 38 ใบ ดังตารางที่ 4.3

การเจริญในสัปดาห์ที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงเมล็ดไส้กรอกแอฟริกามีใบบริเวณลำต้น ราก และยอดขนาดเล็กขึ้นเป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 4.7 พบว่า ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอด และรากมากที่สุด คือ 76 ยอด และ 23 ราก ตามลำดับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวต้นเฉลี่ย 40.48 มิลลิเมตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด 66 ใบ ดังตารางที่ 4.4

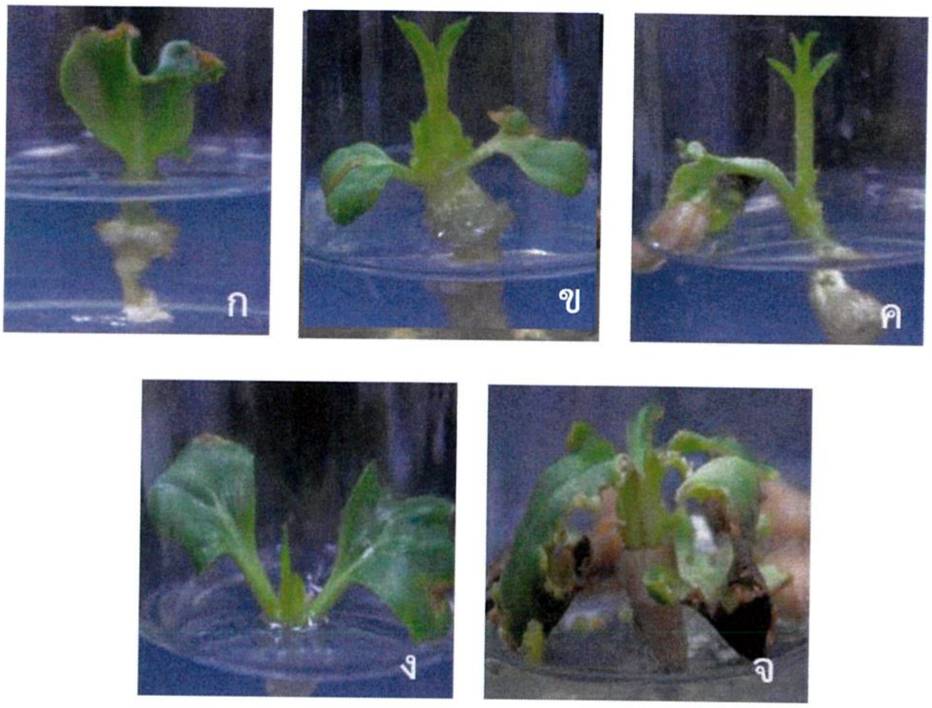
การเจริญในสัปดาห์ที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเมล็ดไส้กรอกแอฟริกามีใบบริเวณลำต้น มีราก และยอดขนาดเล็กขึ้นเป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 4.8 และที่ฐานมีก้อนแคลลัสเกิดขึ้น ใน BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดและรากมากที่สุด คือ 116 ยอด และ 29 ราก BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวต้นเฉลี่ย 56.48 มิลลิเมตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนใบมากที่สุด 92 ใบ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ จำนวนยอด ความยาวต้นเฉลี่ย จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย) และจำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย) ของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ในระยะเวลา 4 และ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ด	จำนวนการเกิดต้น (เปอร์เซ็นต์)	ในระยะ 4 สัปดาห์				ในระยะ 6 สัปดาห์			
			จำนวนยอด	ความยาวต้นเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร))	จำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร))	จำนวนยอด	ความยาวต้นเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร))	จำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร))
0.5	52	29 (55.77)	13	22.23	12 (5.42)	5 (8.64)	23	30.59	26 (13.68)	8 (12.49)
1	52	45 (86.54)	10	17.94	24 (5.09)	5 (7.16)	20	28.13	38 (12.31)	10 (13.35)
2	52	38 (73.80)	23	15.42	18 (4.28)	2 (10.08)	32	24.82	28 (13.83)	7 (15.98)
3	52	42 (80.77)	22	24.46	12 (7.90)	5 (11.59)	31	32.27	32 (14.07)	12 (13.43)
5	52	26 (50.00)	18	14.16	12 (4.20)	2 (7.51)	21	28.35	18 (13.82)	5 (18.35)

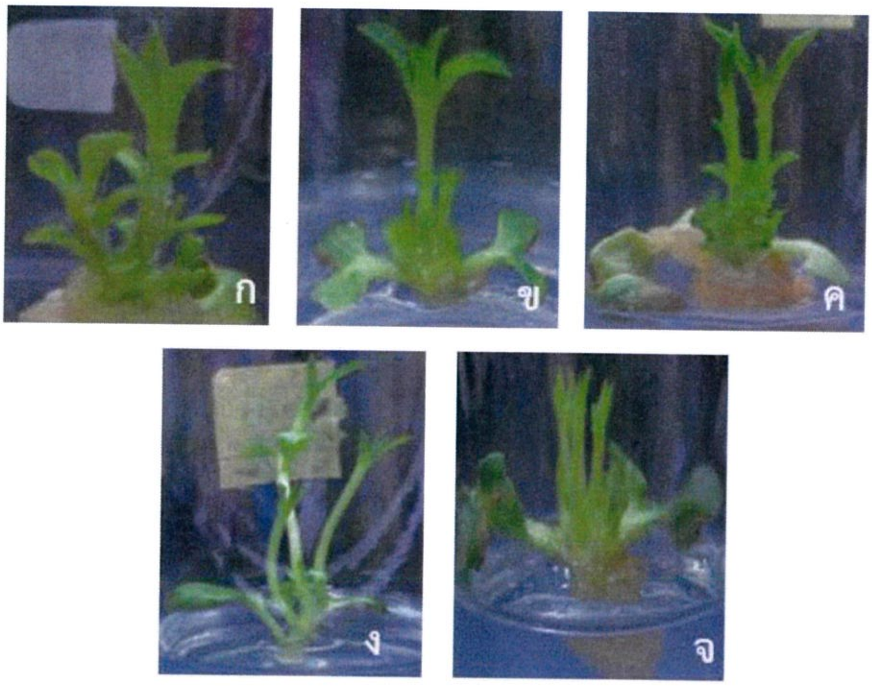
ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ จำนวนยอด ความยาวต้นเฉลี่ย จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย) และจำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย) ของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ในระยะเวลา 8 และ 10 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ด	จำนวนการเกิดต้น (เปอร์เซ็นต์)	ในระยะ 8 สัปดาห์				ในระยะ 10 สัปดาห์			
			จำนวนยอด	ความยาวต้นเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร))	จำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร))	จำนวนยอด	ความยาวต้นเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนใบ (ความยาวใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร))	จำนวนราก (ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร))
0.5	52	29 (55.77)	51	39.90	52 (18.38)	14 (15.72)	84	56.48	76 (20.51)	21 (18.38)
1	52	45 (86.54)	45	36.86	66 (15.48)	19 (17.53)	78	51.22	92 (18.68)	23 (21.71)
2	52	38 (73.80)	64	38.07	40 (15.83)	17 (21.45)	97	49.58	62 (20.54)	20 (29.97)
3	52	42 (80.77)	76	40.39	58 (16.72)	23 (16.93)	116	56.31	78 (20.72)	29 (22.41)
5	52	26 (50.00)	48	40.48	32 (17.51)	12 (22.71)	79	50.08	56 (18.23)	24 (30.68)



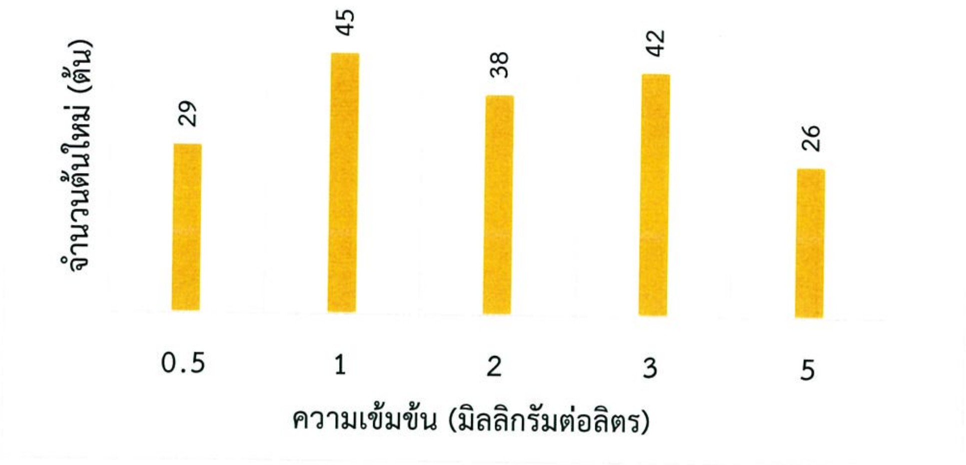
รูปที่ 4.5 แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 4.6 แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์



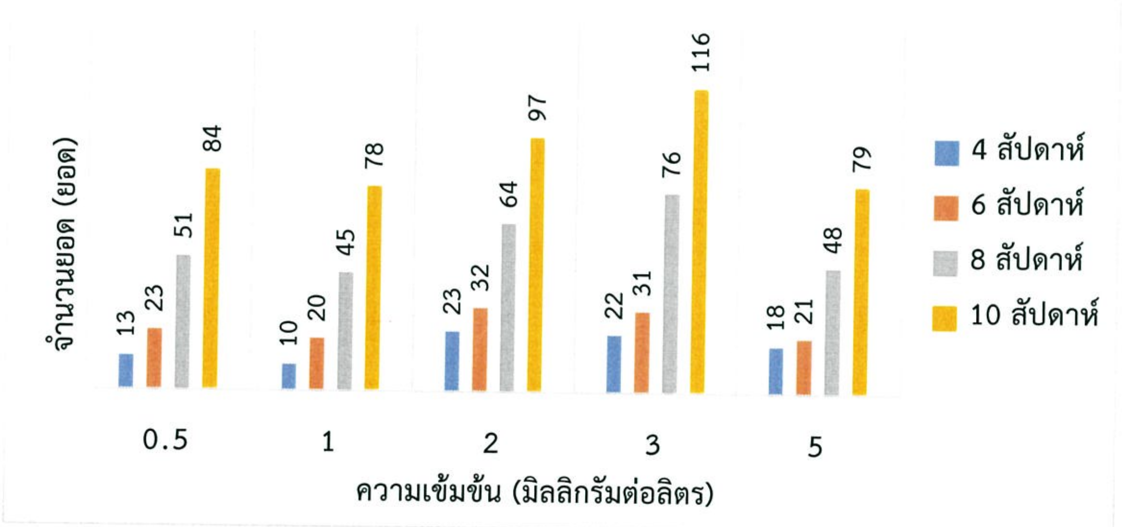
รูปที่ 4.7 แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

รูปที่ 4.8 แสดงการเกิดยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์



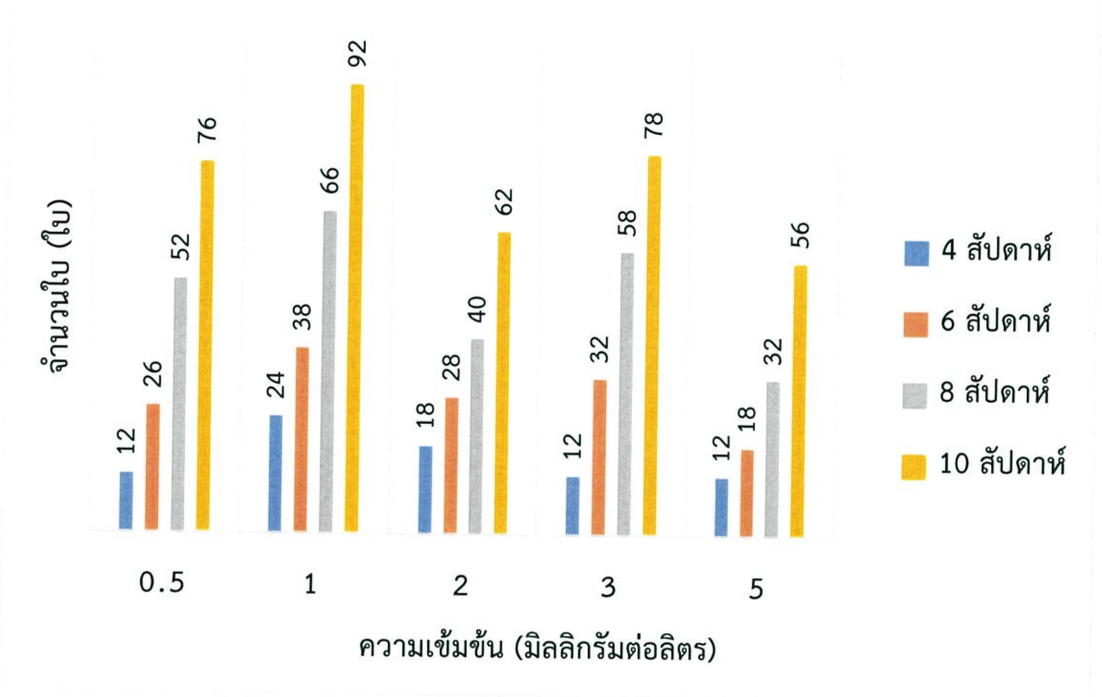
รูปที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนต้นใหม่ของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ ตามลำดับ

จากการทดลอง เมื่อนำจำนวนต้นใหม่ของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เกิดในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์มาเปรียบเทียบกัน พบว่า BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนต้นใหม่มากที่สุด คือ 45 ต้น และ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนต้นใหม่ 42 ต้น รองลงมาตามลำดับ ดังรูปที่ 4.9



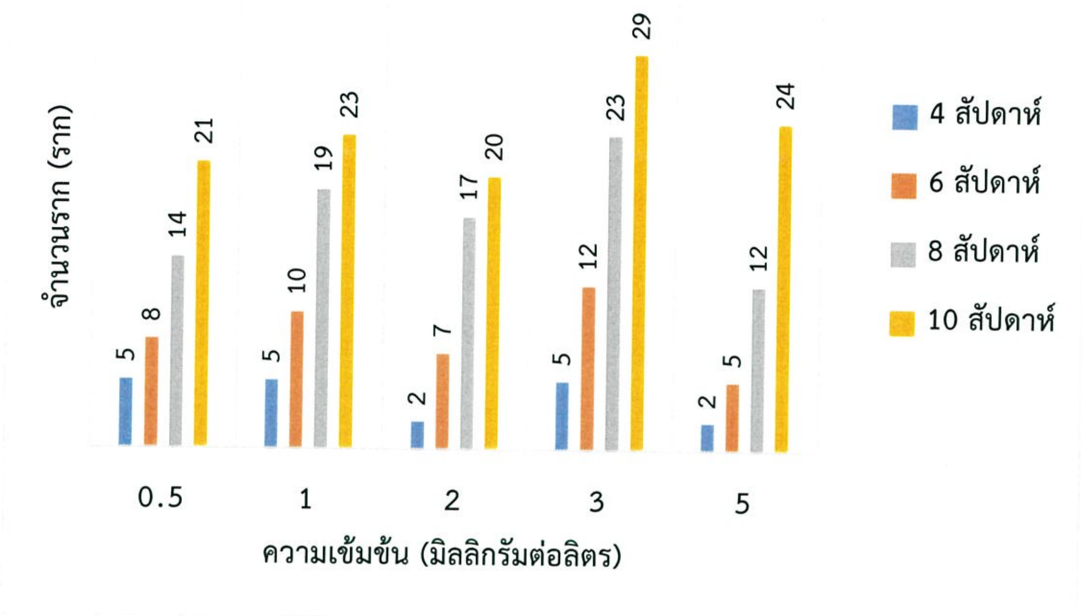
รูปที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ

จากการทดลอง เมื่อนำจำนวนยอดของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เกิดในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแต่ละสัปดาห์มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ในสัปดาห์ที่ 10 ที่ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดมากที่สุด คือ 116 ยอด และ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอด 97 ยอด รองลงมาตามลำดับ ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนใบของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ

จากการทดลอง เมื่อนำจำนวนใบของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เกิดในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแต่ละสัปดาห์มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ในสัปดาห์ที่ 10 ที่ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด คือ 92 ใบ และ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ 78 ใบ รองลงมาตามลำดับ ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนรากของต้นไส้กรอกแอฟริกา บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ

จากการทดลอง เมื่อนำจำนวนรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เกิดในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแต่ละสัปดาห์มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ในสัปดาห์ที่ 10 พบว่า ที่ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด คือ 29 ราก และ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนราก 24 ราก รองลงมาตามลำดับ ดังรูปที่ 4.12

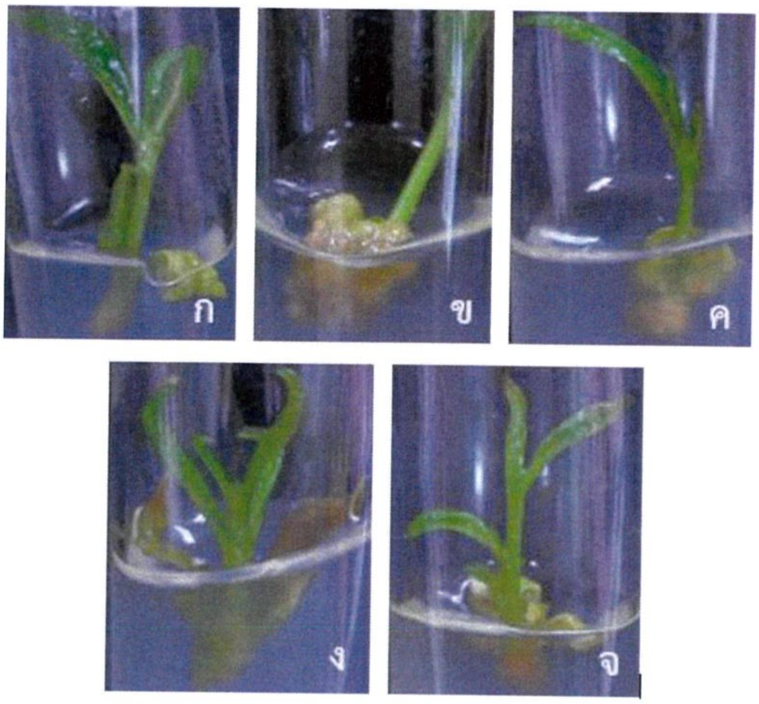
4.2.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากของต้นไส้กรอกแอฟริกา

จากการศึกษาการเจริญของไส้กรอกแอฟริกา เมื่อนำชิ้นส่วนยอดจากข้อที่ 4.2.1 ขนาด 2-3 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดราก ได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวที่รากเจริญออกมาจากชิ้นส่วนยอด และมีความยาวรากเฉลี่ย 6.68 มิลลิเมตร มียอดเล็กๆ ขึ้น 1 ถึง 2 ยอด ดังรูปที่ 4.13 (ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เยาวพา และขวัญจิตต์ (2552) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นสร้อยสายเพชร (*Clerodendrum wallichii*) บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS และ MS พบว่า บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่เติม IAA

ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดรากได้ 81.3 เปอร์เซ็นต์ และ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดรากมากที่สุด (8.7 ราก)

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดราก ได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวที่รากเจริญออกมาจากชิ้นส่วนยอด และมีความยาวรากเฉลี่ย 3.78 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dennis and Thomas (2009) ศึกษาการรากของต้น *Sarcostemma brevistigma* โดยตัดชิ้นส่วนยอด ขนาด 1.5-2.0 เซนติเมตร และวางบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 1-7 ไมโครโมลาร์ พบว่า IBA ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลลาร์ ชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Harahap. *et al*. (2009) ศึกษาการชักนำรากของต้นมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) พบว่า รากสามารถเจริญได้ในอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรรากสามารถเจริญได้สูงสุดเฉลี่ย 85 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวราก 1.49 เซนติเมตร และงานวิจัยของ Nissar. *et al*. (2013) ศึกษาการชักนำรากของต้นหญ้าหนวดแมว พบว่า อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดรากได้ 71 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยของการเกิดรากคือ 7.20±2.14 เซนติเมตร และในการทดลองการเพาะเลี้ยงด้วย IBA จะสามารถชักนำการเกิดแคลลัสกับชิ้นส่วนพืชได้ ลักษณะแคลลัสเป็นสีเขียวอ่อน ดังรูปที่ 4.14 (ก, ข, ค และ ง) โดย ที่ IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดแคลลัสเฉลี่ยใหญ่ที่สุด คือ 3767.05 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.5

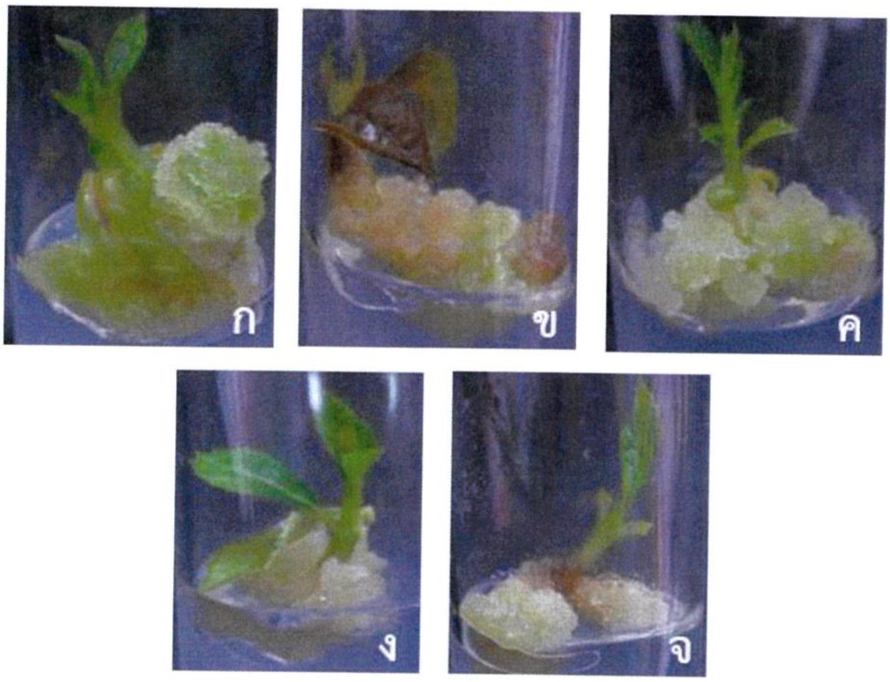
อาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเจริญของรากได้มากที่สุดถึง 70.83 เปอร์เซ็นต์ ความยาวรากเฉลี่ย 3.90 มิลลิเมตร แคลลัสมีขนาด 872.12 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดรากได้ 16.66 เปอร์เซ็นต์ แต่สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 7.00 มิลลิเมตร และมีขนาดแคลลัสมากที่สุดคือ 1867.86 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ส่วนที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยคือ 0.97 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.15 (ก, ค และ ง) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dennis and Thomas (2009) กล่าวว่า NAA ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดรากได้ 71 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนราก 2.1 รากต่อชิ้นส่วนยอด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lin. *et al*. (2010) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในการชักนำแคลลัสจาก *Catalpa bungei* พบว่า NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และ NAA ที่ความเข้มข้นสูง มีการเกิดแคลลัสน้อย และแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล และงานวิจัยของ Naomita and Ravishankar (2004) พบว่า NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 5.71 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดรากได้ดีที่สุด (91.6 เปอร์เซ็นต์)



รูปที่ 4.13 แสดงการเจริญของรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น (ก) 0.25, (ข) 0.5, (ค) 1, (ง) 2 และ (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนยอด จำนวนราก เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ความยาวรากเฉลี่ย และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

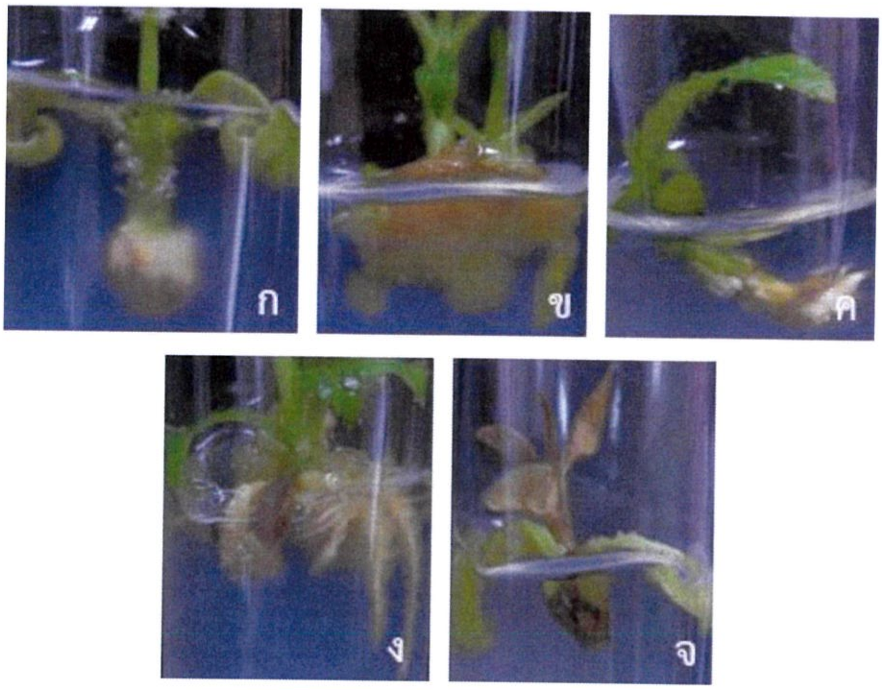
ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอด	จำนวนการเกิดราก (เปอร์เซ็นต์)	ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	
			ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0.5	3	0 (0)	0	3690.66
1	3	0 (0)	0	2577.88
2	3	0 (0)	0	3767.05
3	3	1 (33.33)	3.78	3417.04
5	3	0 (0)	0	1719.47



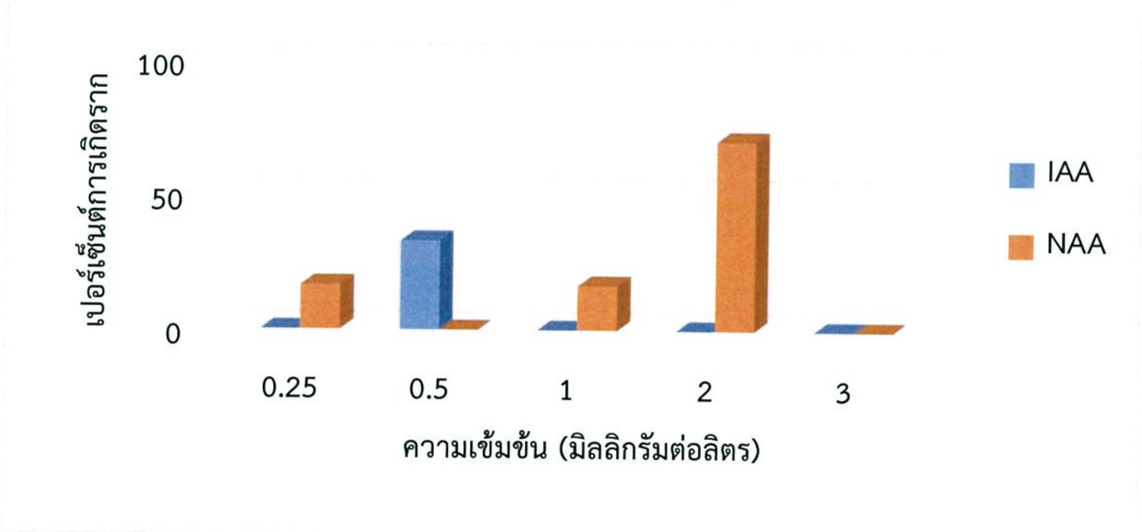
รูปที่ 4.14 แสดงการเจริญของรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น (ก) 0.5, (ข) 1, (ค) 2, (ง) 3 และ (จ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนยอด จำนวนราก เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ความยาวรากเฉลี่ย และขนาดแคลลัสเฉลี่ยของไส้กรอกแอฟริกา เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

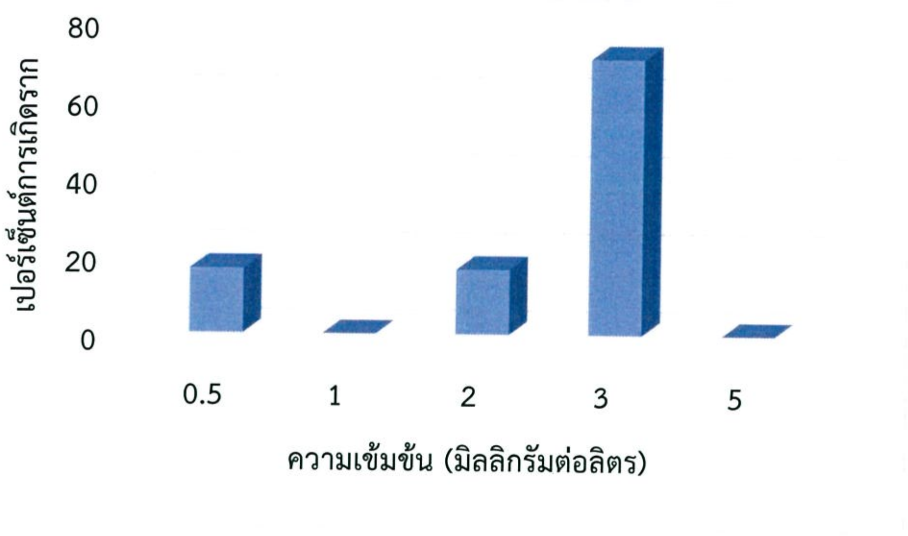
ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	**จำนวนยอด**	**จำนวนการเกิดราก (เปอร์เซ็นต์)**	**ในระยะเวลา 4 สัปดาห์**	
			ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	**ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศมิลลิเมตร)**
0.25	7	1 (16.66)	0.97	1049.68
0.5	7	0 (0)	0	887.93
1	7	1 (16.66)	7.00	1867.86
2	7	5 (70.83)	3.90	872.12
3	7	0	0	585.58



รูปที่ 4.15 แสดงการเจริญของรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น (ก) 0.25, (ข) 0.5, (ค) 1, (ง) 2 และ (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.16 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ NAA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.17 แสดงการเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการชักนำการเกิดรากของต้นไส้กรอกแอฟริกาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญ IAA, IBA และ NAA พบว่า NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการชักนำให้เกิดรากมากที่สุด ดังรูปที่ 4.16 และ 4.17

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของต้นไส้กรอกแอฟริกาในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลาทั้งหมด 12 สัปดาห์ พบว่า มีการเจริญของแคลลัสในทุกสูตรอาหาร โดยสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 16 แคลลัส (80 เปอร์เซ็นต์) และแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด 5214.17 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ที่ BA ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่สารควบคุมการเจริญ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่า คือ 13 แคลลัส (65 เปอร์เซ็นต์) และแคลลัสมีขนาดใหญ่กว่า และจากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากของต้นไส้กรอกแอฟริกา พบว่า IBA และ NAA สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ในทุกความเข้มข้น โดย IBA ชักนำให้เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อนบริเวณรอยตัดของยอดที่สัมผัสกับอาหาร และที่ IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้มีขนาดเฉลี่ยของแคลลัสใหญ่ที่สุด คือ 3767.05 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และที่ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้มีขนาดเฉลี่ยของแคลลัสใหญ่ที่สุด คือ 1867.86 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดต้นใหม่โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดต้นไส้กรอกแอฟริกาในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า มีการงอกของเมล็ดในทุกสูตรอาหาร โดยสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดต้นใหม่มากที่สุด คือ 45 ต้น (86.54 เปอร์เซ็นต์) และมีจำนวนการเกิดใบมากที่สุด คือ 92 ใบ และในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอดและรากมากที่สุด คือ 116 ยอด และ 29 ราก ตามลำดับ

การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA, IBA และ NAA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังนี้ สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ NAA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

NAA มีการชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า IAA และ IBA อาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ 5 ราก (73.83 เปอร์เซ็นต์)

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นไส้กรอกแอฟริกาจากเมล็ดให้เกิดเป็นแคลลัสและต้นใหม่ ควรใช้เมล็ดที่ผ่ากลางเมล็ด เนื่องจากใกล้เคียงบริเวณที่มีเอมบริโออยู่จะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเข้าไปที่เอมบริโอ และเจริญเป็นต้นเกิดได้ง่ายมากขึ้น

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดต้นใหม่ของต้นไส้กรอกแอฟริกา หากต้องการชักนำให้เกิดต้นใหม่มากที่สุดควรใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และถ้าต้องการเพิ่มปริมาณต้นไส้กรอกแอฟริกาให้มีจำนวนมากควรใช้ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถชักนำการเกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด และควรศึกษาสูตรอาหารที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต เนื่องจากต้นพืชอาจเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตได้เช่นกัน

ในการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในชักนำการเกิดแคลลัสต้นไส้กรอกแอฟริกา ควรใช้สารสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ในการศึกษาด้วย เพราะจากการทดลองการชักนำราก สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีเช่นกัน

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ควรเติมเมื่อนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเสร็จแล้ว เนื่องจาก IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเองได้ หากโดนความร้อนเป็นเวลานานอาจทำให้ประสิทธิภาพของสารควบคุมการเจริญเติบโตลดลง และอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดมีสีขุ่นทำให้ยากแก่การตรวจดูลักษณะของพืช เนื่องจากไฟทาเจลละลายไม่หมด จึงควรใช้เวลาในการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที

ในการทดลองนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นจากการนำชิ้นส่วนเมล็ดของต้นไส้กรอกแอฟริกามาชักนำให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่ โดยผ่านกระบวนการออร์แกโนเจเนซิส และโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส โดยอาศัยอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่จะใช้ในการเพิ่มจำนวนของต้นพืชในระยะเวลาสั้น ควรจะมีการทดลองเพิ่มเติม โดยเพิ่มการเพาะเลี้ยงจากส่วนต่างๆ ของต้นไส้กรอกแอฟริกา หรือเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อที่จะให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ และเมื่อต้นพืชเจริญเติบโตเต็มที่ มีรากและลำต้นที่แข็งแรง ควรนำต้นพืชเพาะปลูกลงดินเพื่อเพิ่มผลผลิตของต้นพืชให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังสามารถช่วยกระจายรายได้กับเกษตรกรที่ทำการเพาะปลูกได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : บริษัท ด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด.

เทคโนโลยีชีวภาพและพันธุกรรม. 2558. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. [Online]. เข้าถึงได้จาก . http://vittayasat.blogspot.com/2011/07/blog-post_492.html. [29 ธ.ค. 2013].

นิตยา สุขวรรณา และสุภาพร ภัสสร. 2559. "ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตรMS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 24(1) : 64-75.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2524. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ว. วิทยาศาสต์ มข.9(3) : 140-146. [ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ขอนแก่น.

ปัทมา ขามนนท์. 2557. **ไส้กรอกแอฟริกา สรรพคุณและประโยชน์ต้นไส้กรอกแอฟริกา 9 ข้อ**. [ออนไลน์]. https://patthamatom.wordpress.com. [29 ธ.ค. 2013].

ประสาทพร สมิตะมาน. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : เทคนิคและการประยุกต์ใช้. เชียงใหม่ : นพบุรีการพิมพ์.

มาลี ณ นคร, กมลพรรณ นามวงศ์พรหม, สุรียา ตันติวิวัฒน์, ลิลลี่ กาวีต๊ะ, ศรีสม สุวรรณวงศ์, สรัญญา วัชโรทัย, สุมน มาสุธน และดนัย สรรพศรี. 2554. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ป่า.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/plant/44_plant. [29 ธ.ค. 2013].

เยาวพา จิระเกียรติกุล และขวัญจิตต์ บุญหา. 2552. "การเพิ่มจำนวนต้นและชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อของต้นสร้อยสายเพชร." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 17(3) : 61-65.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 219.

รัตนา ชามฤทธิ์. 2015. "แนวโน้มการทนเค็มของข้าวพันธุ์ชิวเกลี้ยงและพญาลืมแกงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." *วารสารเกษตร*. 31(3) : 259-268.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2559. **ไส้กรอกแอฟริกา**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : en.wikipedia.org/wiki/Kigelia. [29 ธ.ค. 2013].

วีรวรรณ ภมร และพรรณธิภา ณ เชียงใหม่. 2552. "ผลของอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดแคลลัสของสบู่ดำ." *วารสารเกษตร*. 25(2) : 125-133.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สมปอง เตชะโต และอรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา : การพัฒนาเทคนิคการชักนำรากยางพาราในหลอดทดลอง.” *วารสารสงขลานครินทร์.* 14(2) : 133-139.

สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์. 2547. “สูตรอาหารและความเข้มข้นสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกแคลลัส *Stylosanthes hamata* cv. verano เพื่อใช้ในการถ่ายยีน.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช**. กรุงเทพฯ. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อภัย ราษฎรวิจิตร. 2559. **สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)**.

อุบล สมทรง. 2556. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มซ่า” **วารสารเกษตรพระวรุณ**. 10(1) : 29-36.

Baskaran, M. and Krishnan, S. 2010. “High Frequency Plant Regeneration from The Mature Seeds of *Garcinia indica*.” *The Council of Scientific and Industrial Research*. 38(1168) : 1-5.

Dennis, T.T. and Jos T.P. 2004. “Thidiazuron Induced High Frequency Shoot Organogenesis in Callus from *Kigelia pinnata* L.” *Postgraduate and Research Department of Botany*. 45 : 307-313.

Denis, Z. Archile, B.O.K. Mathieu, T.M.N.N. Pierre, T. Vincent, P. and Titanji, K. 2011. “*In Vitro* Antiplasmodial Activity and Cytotoxicity of Crude Extracts and Compounds from The Stem Bark of *Kigelia africana* (Lam.) Benth (Bignoniaceae).” *Parasitol Reseach*. 108 : 1383–1390.

Harahap, F. Poerwanto, R. Suharsono, Souririan, C. and Rahayu, C. 2014. “*In Vitro* Growth and Rooting of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) on Medium with Different Concentrations of Plant Growth Regulator.” *HAYATI Journal of Biosciences*. 21(4) : 151-158.

Gauri, S. Banerjeea, S. Rahmana, L. Mallavarapub, G.R. Sharmac, S. and Sushil Kumara. 2000. “An Efficient In Vitro Procedure for Micropropagation and Generation of Somaclones of Rose Scented *Pelargonium*.” *Plant science*. 155 : 133-140.

Gokhale, M. and Bansal, Y.K. 2009. “Direct *In Vitro* Regeneration of a Aedicinal Tree *Oroxylum indicum* L. Vent. through Tissue Culture.” *African Journal of Biotechnology*. 8 (16) : 3777-3781.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Guohua, M. Jaime, A. Teixeira, D.S. Jinfeng L. Xinhua Z. and Jietang Z. 2011. "Shoot Organogenesis and Plant Regeneration in *Metabriggsia ovalifolia.*" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 105 : 355–361.

Joffe, P. (2003). PlantZAfrica: *Kigelia africana.*

Julie richard. 2015. "Use of PPM in the SASRI Tissue Culture Laboratory." *South African Sugarcane Research Institute.*

Lim, T.K. 2012. "*Kigelia Africana.*" Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. 1. Netherlands. Spinger Netherlands.

Lin, J. Wu, L. Liang, J. and Wang, J. 2010. "Effect of Different Plant Growth Regulators on Callus Induction in *Catalpa bungei.*" *African Journal of Agricultural Research.* 5(19) : 2699-2704.

McBurney, R. (2004). African Wild Harvest. Royal Botanic Gardens, Kew.

Moideen, S.V.K. Houghton, P.J. Rock, P. Croft, S.L. and Aboagye N.F. 1999. " Activity of Extracts and Naphthoquinones from *Kigelia pinnata* Against *Trypanosoma bruceibrucei* and *Trypanosoma brucei rhodiesiense.*" *Plant Medical.* 65 : 493–588.

Naomita, V.D .and Ravishankar, R.V. 2004. "*In Vitro* Propagation of *Oroxylum Indicum* Vent. a Medicinally Important Forest Tree." *Journal of Forest Research.* 9 : 61–65.

Nissar, A.R. Sudarshana, M.S. and Rajashekar, N. 2013. "Callus Induction and Plantlet Regeneration in *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.-A Potent Medicinal Herb." *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 6(3) : 52-55.

Rodrigues, J.L.K. Alva, L.H.S. and Souza, D.L. 2013. "*In Vitro* Studies of Morphogenesis and Epidermal Modification in *Millingtonia hortensis.*" *Research Article, Acta Biologica Indica.* 2(2) : 412-418.

Simon, J. and Katie, B. 2012. "Sausage Tree *Kigelia Pinnata*: An Ethnobotanical and Scientific Review." *HERBALGRAM.* 94 : 50-59.

Sharad, T. Kanchan, S. and Pankaj, S. 2007. "*In Vitro* Propagation of *Oroxylum indicum* – An Endangered Medicinal Tree." *Biotechnology.* 6(2) : 299-301.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Street, H.E. 1969. "Growth and Organized and Unorganized System-Knowledge Gained by Culture of Organs and Tissue Explants Plant Physiology : A Treatise." *Academic Press, New York, NY.* 5B : 3-224.

Susmita, S.K. and Mishra. S.K. 2009. "*In Vitro* Plant Regeneration from Seedling Explants of *Stereospermum personatum* D.C.: a Medicinal Tree." *Trees*. 23 : 409–413.

Sushma, T. Lok, M.S. Palni, V.K. Purohit and Shyamal K.N. 2008. "*In Vitro* Propagation of Brown Oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from Seedling Explants." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 44 : 136–141.

Weiss, C.R. Moideen, S.V.K. Croft, S.L. and Houghton, P.J. 2000. "Activity of Extracts and Isolated Naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Plasmodium falciparum*." *Journal of Natural Products*. 63 : 1306–1309.

White, P.R. 1939. "Controlled Differentiation in a Plant Tissue Culture Bull." *Torrey Botany. Club*, 66 : 507-513.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตาราง สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Murashige and Skoog (MS, 1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_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
Agar	8000
Sucrose	30000
pH 5.7	-

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และนำมาละลายน้ำปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่ต้องการเตรียม
2. ปรับปริมาตรอาหารด้วยกระบอกตวงตามปริมาตรอาหารที่ต้องการ
3. แบ่งอาหารใส่บีกเกอร์ตามจำนวนความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต
4. คำนวณปริมาตรของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต้องการเติมลงในอาหารในแต่ละความเข้มข้น จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

หรือ ปริมาตรที่ใช้ (ml) = $\dfrac{\text{ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม (mg/l) x ปริมาตรอาหารทั้งหมด (ml)}}{\text{ความเข้มข้นจาก stock เริ่มต้น}}$

5. ดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตจาก Stock แล้วเติมลงในบีกเกอร์ แล้วจึงปรับปริมาตรอาหารในแต่ละความเข้มข้น
6. นำอาหารไปปรับ pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8
7. เติมวุ้นลงในอาหารแต่ละความเข้มข้น และละลายวุ้นในอาหารด้วยไมโครเวฟประมาณ 3-5 นาที
8. แบ่งใส่ขวดแก้วที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละประมาณ 10-20 มิลลิลิตร
9. นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15-20 นาที
10. นำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนาน 2-3 วัน เพื่อสังเกตการปนเปื้อนในอาหารก่อนนำไปใช้