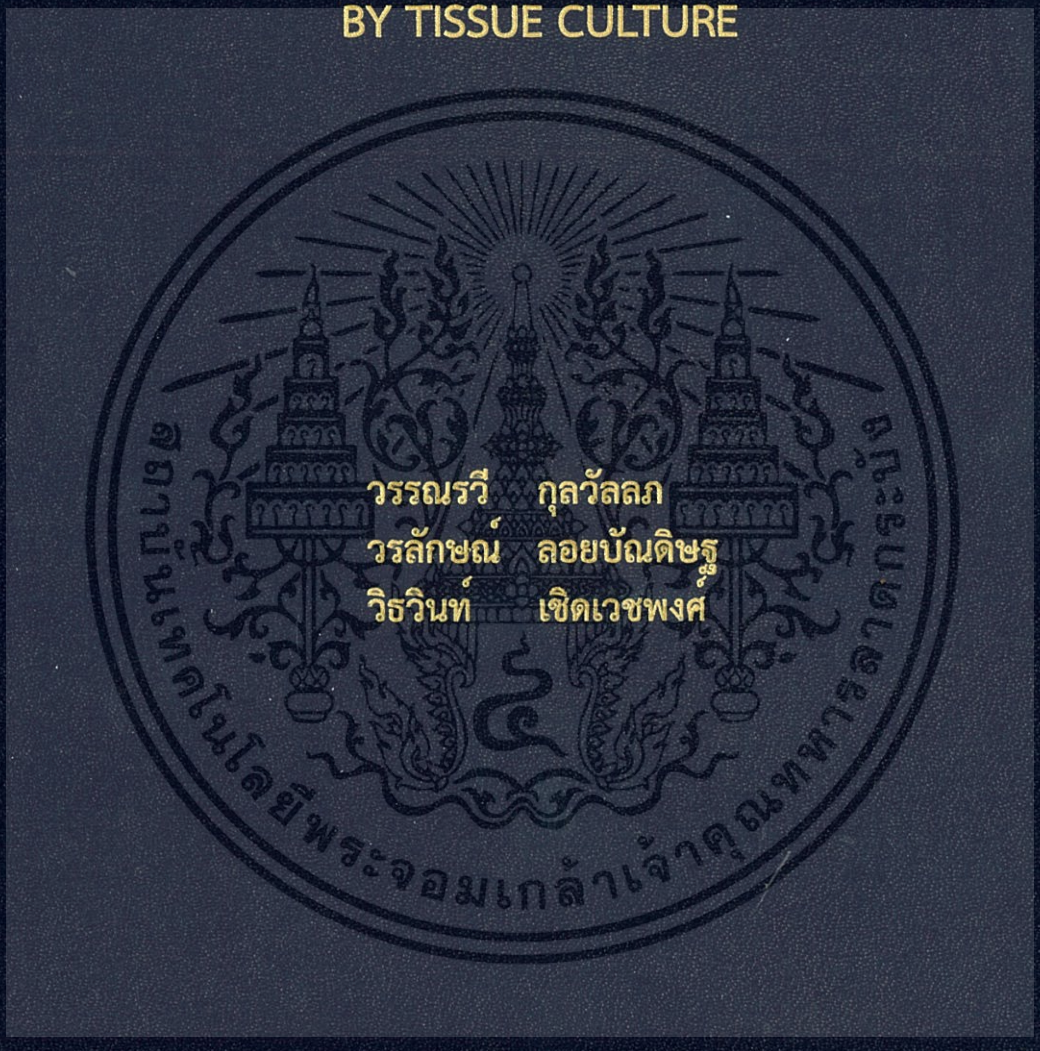
อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.)

EFFECT OF PLANT GROWTH REGLURATORS FOR LAUREL CLOCK VINE (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) BY TISSUE CULTURE



วรรณรวี กุลวัลลภ
วรลักษณ์ ลอยบัณดิษฐ
วิธวินท์ เชิดเวชพงศ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.)

EFFECT OF PLANT GROWTH REGLURATORS FOR LAUREL CLOCK VINE (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) BY TISSUE CULTURE

วรรณรวี กุลวัลลภ
วรลักษณ์ ลอยบัณดิษฐ
วิธวินท์ เชิดเวชพงศ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF PLANT GROWTH REGLURATORS FOR LAUREL CLOCK VINE (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) BY TISSUE CULTURE

WANRAWEE KUNWALOP
WORALAK LOYBANDIT
WITTAWIN CHERDVECHAPONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Effect of Plant Growth Reglurators for Laurel Clock Vine (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) by Tissue Culture
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรรณรวี กุลวัลลภ รหัสนักศึกษา 56050900 นางสาววรลักษณ์ ลอยบัณดิษฐ รหัสนักศึกษา 56050905 นายวิธวินท์ เชิดเวชพงศ์ รหัสนักศึกษา 56050910
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2559

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสาตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.)
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรรณรวี กุลวัลลภ รหัสนักศึกษา 56050900
	นางสาววรลักษณ์ ลอยบัณดิษฐ รหัสนักศึกษา 56050905
	นายวิธวินท์ เชิดเวชพงศ์ รหัสนักศึกษา 56050910
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ต่อการถอนพิษ โดยใช้ชิ้นส่วนของใบ และข้อของต้นรางจืด นำไปฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 80 มิลลิลิตร ประกอบด้วย mercuric (II) chloride ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการชักนำใบให้เกิดเป็นแคลลัส ที่สารควบคุมการเจริญ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำใบให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 39.58 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดคือ 906.82 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ส่วนการชักนำข้อให้เกิดยอดที่อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดมากที่สุดคิดเป็น 30.91 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 50.91 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำข้อให้เกิดยอดมากที่สุด 25.71 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 65.71 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำข้อให้เกิดยอดมากที่สุด 38.10 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 60.32 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

คำสำคัญ : รางจืด, แคลลัส, การชักนำให้เกิดแคลลัส, การชักนำให้เกิดยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of Plant Growth Reglurators for Laurel Clock Vine (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) by Tissue Culture
Students	Miss Wanrawee Kunwalop Student ID 56050900
	Miss Woralak Loybandit Student ID 56050905
	Mr. Wittawin Cherdvechapong Student ID 56050910
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biotechnology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim
Co-advisor	Dr. Wimonmat Boonmee

Abstract

Study the influence of growth regulators on tissue culture of Laurel clock vine (*Thunbergia laurifolia* Lindl.). A useful herbal for detoxification. In this study use leaves and shoots explants from Laurel clock vine. The explants were disinfected with 80 ml sterile distilled water containing 0.2% mercuric (II) chloride and then explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing with 2,4-D BA, mT and TDZ concentrations 0, 0.5, 1, 2, 3 and 5 mg/l. The highest callus number (39.58%) was obtained on medium containing 2 mg/l 2,4-D. The highest average callus size (906.82 mm^3) was obtained on medium containing 5 mg/l 2,4-D.

For the shoot induction (BA), The highest percentage of node develop to shoot (30.91%) was obtained on medium containing 2 mg/l BA. The highest shoot number (50.91%) was obtained on medium containing 5 mg/l BA. For the shoot induction (*m*T), The highest percentage of node develop to shoot (25.71%) and The highest shoot number (65.71%) was obtained on medium containing 5 mg/l *m*T. For the shoot induction (TDZ), The highest percentage of node develop to shoot (38.10%) and The highest shoot number (60.32%) was obtained on medium containing 1 mg/l TDZ. All results were obtained after 8 week of culture.

Keywords : Laurel clock vine, callus, callus induction, regeneration

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่านดังนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ให้คำปรึกษา เสนอแนวทางแก้ไขปัญหา และคอยช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการโครงงานพิเศษที่ให้คำแนะนำ รวมทั้งช่วยตรวจสอบ และแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้เพื่อให้เกิดความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี ที่ร่วมเป็นกรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมสอบโครงงานพิเศษครั้งนี้ และเสียสละเวลาในการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้อง และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่ดูแลเอาใจใส่ เข้าใจ และให้กำลังใจตลอดการจัดทำโครงงานพิเศษ

วรรณรวี กุลวัลลภ
วรลักษณ์ ลอยบัณดิษฐ
วิธวินท์ เชิดเวชพงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 2
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) 3
2.1.1 ถิ่นกำเนิดของรางจืด และลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของรางจืด 3
2.1.2 ประโยชน์ของรางจืด 4
2.1.3 การปลูกและการดูแลรักษา 5
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 5
2.2.1 ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง 5
2.2.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 6
2.2.3 การฟอกฆ่าเชื้อ 7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 10
3.1 รางจืดที่ใช้ในการศึกษา 10
3.2 สารเคมี 10
3.3 อุปกรณ์ 10
3.4 วิธีการทดลอง 11
3.4.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส 11
3.4.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 13
4.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส 13
4.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 16
4.2.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 16
4.2.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 20
4.2.3 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 28
เอกสารอ้างอิง 29
ภาคผนวก 31
ภาคผนวก ก 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงจำนวนชิ้นใบที่เพาะเลี้ยง จำนวนใบที่เกิดแคลลัส และปริมาตรเฉลี่ยแคลลัสในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 14

4.2 แสดงจำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง จำนวนข้อที่เกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอดเฉลี่ย และการเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 17

4.3 แสดงจำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง จำนวนข้อที่เกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอดเฉลี่ย และการเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 21

4.4 แสดงจำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง จำนวนข้อที่เกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอดเฉลี่ย และการเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 (ก) ลักษณะของต้นรางจืด (ข) ใบของต้นรางจืด (ค) ดอกของต้นรางจืด.....	4
4.1 แสดงอัตราการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	14
4.2 แสดงลักษณะการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ....	15
4.3 แสดงอัตราการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	18
4.4 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3และ 5มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ.....	19
4.5 แสดงอัตราการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	22
4.6 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ.....	23
4.7 แสดงอัตราการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	26
4.8 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ.....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
2,4-D	2,4-Dicholophenoxy acetic acid
2iP	2-isopentenyladenine
BA	6-Benzylaminopurine
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
Kin	Kinetin
Mem*T*R	*meta*-Methoxy topolin riboside
MS	Murashige and Skooge, 1962
*m*T	*meta*-Topolin
*m*TR	*meta*-Topolin riboside
NAA	Naphthalene
TDZ	Thidiazuron

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พืชสมุนไพรเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่ามหาศาลอยู่ในประเทศ ถึงแม้ว่าจะมีสมุนไพรเป็นจำนวนมาก แต่ประเทศไทยยังขาดการพัฒนาด้านการดูแลรักษา และการนำสมุนไพรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่า ซึ่งรางจืดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีคุณประโยชน์ต่อการถอนพิษต่างๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายทั้งภายในและภายนอก ผู้คนเริ่มปลูกรางจืดเพิ่มมากขึ้น และต่อไปอาจใช้รางจืดในชีวิตประจำวัน เพราะรางจืดเป็นสมุนไพรที่ใช้ขับล้างพิษได้ดีกว่าสมุนไพรชนิดอื่น (รมย์วินทร์, 2553) ซึ่งในการเพาะปลูกต้นรางจืดด้วยวิธีทางธรรมชาติคือ การใช้เถาปักชำจะปลูกในช่วงฤดูฝน ประมาณเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม และการเพาะเมล็ดจะใช้เมล็ดรางจืดแก่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม โดยการเพาะปลูกรางจืดจะนิยมใช้เถามากกว่าการใช้เมล็ด เนื่องจากเมล็ดใช้เวลานานกว่า และมีจำนวนน้อย (กรวีร์ และคณะ, 2553) จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ทราบได้ว่าการเพาะปลูกด้วยวิธีทางธรรมชาติจะก่อให้เกิดปัญหา เช่น สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปตามฤดู การปลูกรางจืดจะปลูกในช่วงฤดูฝน และการดูแลรางจืดต้องให้น้ำในช่วงเริ่มปลูกมากกว่าช่วงอื่นๆ ซึ่งฤดูกาลจะก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะปลูกต้นรางจืด จึงทำให้เกิดการศึกษาการเพาะปลูก และขยายพันธุ์ต้นรางจืดด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเทคนิคนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยา เกษตรกรรม อุตสาหกรรม เภสัชวิทยา และการแพทย์ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีประโยชน์ เช่น สามารถเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์พืชที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันสั้น สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ เช่น การสร้างพันธุ์พืชต้านทานต่อแมลง หรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เป็นต้น และยังสามารถผลิตพืชที่ปลอดเชื้อไวรัสที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2554)

รางจืด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Thunbergia laurifolia* Lindl. เป็นพืชสมุนไพรประเภทไม้เลื้อยหรือไม้เถา สามารถเลื้อยไปตามพื้นดิน หรือพาดพันขึ้นไปบนต้นไม้ใหญ่ เถาแข็งแรงแตกแขนงได้ดี รางจืดจัดเป็นพืชเถาที่มีอายุนานหลายปี เป็นสมุนไพรไทยที่ได้รับการยืนยันทางวิทยาศาสตร์จากหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าเถารางจืดมีสรรพคุณเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะส่วนของใบที่สกัดจากน้ำ รางจืดมีความเป็นพิษต่ำมาก มีรายงานทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านพิษยาฆ่าแมลง และสารเคมีว่าการใช้รางจืดรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพาราควอทจากยาฆ่าวัชพืช โรงพยาบาลเจ้าพระยายมราช จังหวัดสุพรรณบุรี พบว่าการรักษาโดยการให้น้ำต้มรางจืดร่วมกับการรักษาตามหลักแพทย์แผนปัจจุบัน ทำให้ผู้ป่วยที่รับสารพาราควอท รอดชีวิต 51.56 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณที่กินมีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (กรวีร์ และคณะ, 2553) โดยรางจืดเป็นที่รู้จักในชื่อของ “ราชาแห่งการถอนพิษ” เนื่องจากสามารถแก้พิษ และกำจัดสารพิษในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ราก และเถาสามารถนำมากินแก้ร้อนใน กระหายน้ำ ใบ และราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ปรุงยาถอนพิษไข้ เป็นยาพอกบาดแผล น้ำร้อนลวก ไฟไหม้ ผด ผื่น คัน เริม อีสุกอีใส ทำลายพิษยาฆ่าแมลงหรือยาเบื่อ พิษจากการดื่มสุรามากเกินไป (สุภาภรณ์, 2554; กรวีร์ และคณะ, 2553)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส
2. ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบ และการเกิดของยอดจากชิ้นส่วนข้อ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส
2. ทราบชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการชักนำข้อให้เกิดเป็นยอด

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รางจืด (Thunbergia laurifolia)

อนุกรมวิธานของรางจืด (National Plant Data Center USA, 2010)

Kingdom Plantae

Phylum Magnoliophyta

Class Magnoliopsida

Subclass Asteridae

Order Scrophulariales

Family Acanthaceae

Genus Thunbergia

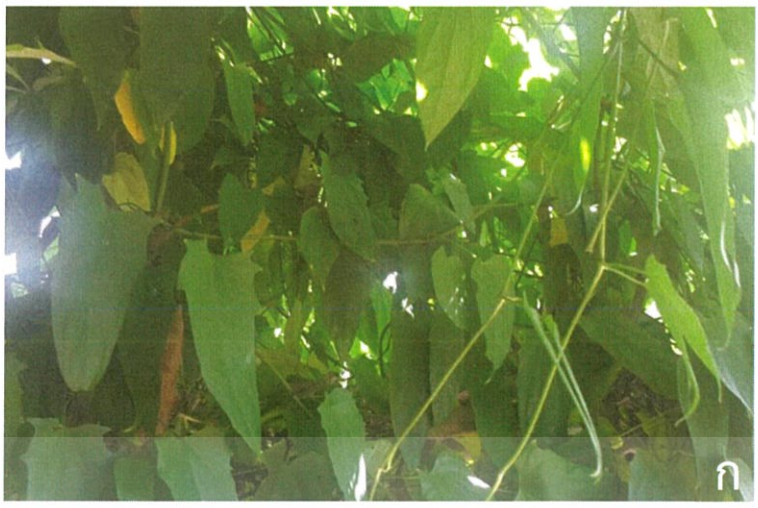
Species *Thunbergia laurifolia* Lindl

2.1.1 ถิ่นกำเนิดของรางจืด และลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของรางจืด (ดวงจันทร์, 2547)

รางจืดเป็นไม้เถาที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อาทิ ไทย มาเลเซีย และพม่า เป็นต้น ในประเทศไทยพบมากตามป่าดงดิบหรือป่าดิบชื้นทั่วไป เป็นที่ทราบกันดีว่ามีสรรพคุณเด่นในการขจัดพิษต่างๆ ทั้งพิษจากพืช พิษจากสัตว์ และพิษจากสารเคมี จึงนิยมนำมาปลูกตามบ้านเรือนทั่วไป รางจืดมีชื่อพื้นเมืองอื่นๆ ได้แก่ กำลังช้างเผือก เครือเขาเขียว ขอบชะนาง ยาเขียว (ภาคกลาง) คาย รางเย็น (ยะลา) จอลอดิเออ ซั้งกะ ปั้งกะล่ะ พอหน่อเตอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ดุเหว่า (ปัตตานี) ทิดพุด (นครศรีธรรมราช) น้ำนอง (สระบุรี) ยำแย้ แอดแอ (เพชรบูรณ์)

ลำต้นรางจืดจัดเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง เถามีสีเขียวสดหรือสีเขียวเข้ม เลื้อยพาดไปตามกำแพงรั้ว ทิ้งตัวห้อยเป็นระย้าลงสู่เบื้องล่าง (รูปที่ 2.1ก) ลักษณะของใบเป็นใบเดี่ยว รูปขอบขนาน ความกว้างใบประมาณ 4-7 เซนติเมตร ความยาวใบ 8-14 เซนติเมตร ขอบใบเว้าเล็กน้อย ปลายใบเรียวแหลมเป็นติ่ง โคนใบเป็นรูปหัวใจ ใบเกลี้ยงไม่มีขน และใบที่อยู่ด้านล่าง จะใหญ่กว่าใบที่อยู่ถัดขึ้นไป (รูปที่ 2.1ข) ลักษณะของดอกรางจืดออกดอกเป็นช่อห้อยลงมาตามซอกใบ หรือตามข้อของลำต้น ช่อดอกหนึ่ง จะมีดอกประมาณ 3-4 ดอก กลีบดอกมีสีม่วงแกมน้ำเงิน มีใบประดับสีเขียวหรือสีขาวประสีน้ำตาลแดงหรือสีแดงหุ้มดอกอยู่ ที่ฐานดอกมีลักษณะเป็นกรวยตื้นๆ หลอดกรวยยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ภายในดอกมีเกสรตัวผู้อยู่ 4 อัน (รูปที่ 2.1ค) ผลของรางจืดจะมีลักษณะเป็นฝัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 (ก) ลักษณะของต้นรางจืด (ข) ใบของต้นรางจืด (ค) ดอกของต้นรางจืด
ที่มา : ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

2.1.2 ประโยชน์ของรางจืด (สุภาภรณ์, 2554)

ราก และเถาของรางจืดสามารถใช้รับประทานเป็นยาแก้ร้อนใน มีสรรพคุณช่วยแก้อาการกระหายน้ำ รางจืดช่วยรักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก และมีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการผื่นแพ้ต่างๆ นอกจากนี้สมุนไพรรางจืดเป็นสมุนไพรที่เราสามารถกินยอดอ่อน และดอกอ่อนเป็นผักได้ โดยจะใช้ลวกกิน แกงกิน เหมือนกับผักพื้นบ้านทั่วๆไป นอกจากนี้ยังนิยมกินน้ำหวานจากดอกรางจืด โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ และต้นรางจืดสามารถนำมาทำเป็นชารางจืด โดยนำมาหั่นเป็นฝอย ตากลมให้แห้งแล้วนำมาชงกับน้ำร้อนดื่มแทนชาได้ และยังช่วยล้างพิษในร่างกายได้อีกด้วย

ในปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรรางจืดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แคปซูลรางจืด เพื่อความสะดวก และง่ายต่อการใช้ประโยชน์ การปลูกรางจืดนอกจากจะใช้ประโยชน์ในด้านสมุนไพรแล้วยังนิยมปลูกไว้เพื่อชมดอก และยังสามารถช่วยบังแสงแดดทำให้เกิดร่มเงาได้อีกด้วย เนื่องจากรางจืดเป็นไม้เลื้อยแบบไร้การควบคุม และไม่มีทิศทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การปลูกและการดูแลรักษา (กรวีร์, 2553)

รางจืดนิยมปลูกในช่วงฤดูฝน ประมาณเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคมเป็นช่วงที่มีสภาพอากาศที่เหมาะสม เนื่องจากมีความชื้นในปริมาณปานกลางถึงสูง สามารถปลูก และขยายพันธุ์ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่

1. การเพาะเมล็ดหรือปักชำ สำหรับการปักชำจะใช้กิ่งพันธุ์ที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปี หรือกิ่งพันธุ์แก่ที่สีน้ำตาลอมเขียว โดยการตัดกิ่งยาว 20-30 เซนติเมตร โดยให้มีตากิ่งหรือข้อกิ่งติดมาอย่างน้อย 1-2 ตา แล้วจึงนำไปปักชำในกระถาง หรือปักชำลงดินบริเวณที่ต้องการปลูก และรดน้ำสม่ำเสมอ 1-2 ครั้งต่อวัน จนกิ่งเริ่มแทงยอดอ่อน

2. การปลูกจากการเพาะเมล็ด ถือเป็นวิธีที่สามารถได้ต้นที่สมบูรณ์ที่สุด เพราะจะได้ต้นที่สามารถแตกกิ่งแขนงได้มาก และลำต้นที่เจริญเติบโตขึ้นมายังมีอายุนานกว่าต้นที่ได้จากการเพาะชำ

3. การตอน ทำการตัดปลายเถาส่วนยาวออก ให้เหลือโคนเถาหรือโคนกิ่งที่มีสีน้ำตาลอมเขียว โดยให้มีระยะจากจุดตอนไปถึงส่วนปลายประมาณ 20-30 เซนติเมตร หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ 10-20 วัน จึงทำการตอนกิ่ง

สำหรับพื้นที่ปลูกรางจืด นิยมปลูกตามริมรั้วหรือใกล้กับต้นไม้อื่น เพราะช่วยให้เถารางจืดเลื้อยเกาะได้ง่าย หากปลูกในพื้นที่โล่งก็ต้องทำหลักให้เลื้อยโดยเฉพาะ รางจืดสามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 1 ปีขึ้นไป ถ้าเก็บเกี่ยวรางจืดที่มีอายุน้อยกว่า 1 ปี จะได้ใบที่มีขนาดเล็ก เถาหรือลำต้นมีขนาดเล็ก เมื่อนำมาตากแห้งจะมีน้ำหนักน้อย สารสำคัญ และสรรพคุณทางยาจะน้อยกว่ารางจืดที่มีอายุมาก สำหรับรางจืดอายุมากกว่า 1 ปี สามารถเก็บเกี่ยวได้ปีละ 1 ครั้ง แล้วรอให้แตกกิ่งก้านใหม่แล้วเก็บในปีต่อไป รางจืดต้องการการดูแลรักษาและให้น้ำในช่วงเริ่มปลูกมากกว่าช่วงอื่นๆ หลังจากนั้นมีการให้น้ำบ้างในช่วงฤดูแล้งกำจัดวัชพืชบ้างเป็นครั้งคราว ให้ปุ๋ยอินทรีย์

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์, 2540)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนิยมอย่างมากทั้งในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์และอุตสาหกรรม โดยนำชิ้นส่วนของพืช เช่น ลำต้น ใบ ดอก ตา เป็นต้น มาทำให้สะอาดปราศจากเชื้อโรค แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นการรวบรวมเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ มาใช้ในการดูแลรักษา นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักใช้เพิ่มจำนวนพืชให้มีลักษณะเหมือนกันทางพันธุกรรมให้ได้จำนวนมาก ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีหลายอย่าง เช่น สามารถขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิด สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตพืชที่ปราศจากโรค สามารถปรับปรุงพันธุ์พืชได้

2.2.1 ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง (คำนูณ, 2542)

ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการเจริญได้เป็น 3 แบบใหญ่ๆ คือ

1. การเกิดแคลลัส (callogenesis) แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์พาเรงไคมาที่ยังไม่พัฒนาไปเป็นรากหรือลำต้น อาจจะอยู่กันอย่างหลวมๆ สามารถหลุดได้ง่าย เรียกว่า friable callus หรือเกาะกันแน่น หลุดได้ยาก เรียกว่า compact callus สามารถเจริญเป็นต้นได้โดยการเปลี่ยนสัดส่วนความเข้มข้นของออกซิน และไซโทไคนินให้เหมาะสม ต้นที่เจริญมาจากแคลลัสมีจุดกำเนิดได้ 2 แบบ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยเซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือเจริญมาจากกลุ่มเซลล์ข้างเคียงกัน โดยที่กลุ่มเซลล์เหล่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่างๆ แล้วเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

2. การเกิดออร์แกโนเจนเนซีส (organogenesis) คือ การเกิดยอด และรากที่เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่โดยสมบูรณ์

3. การเกิดเอ็มบริโอเจนเนซีส (embryogenesis) คือ การพัฒนาเป็นต้นอ่อน เอ็มบริโอเจเนซิสกลายเป็นเอ็มบริออยด์ มีพัฒนาการเหมือนเอ็มบริโอแต่ต่างกันตรงจุดกำเนิด กล่าวคือ เอ็มบริโอได้จากการที่ละอองเรณู เข้าผสมกับโอวูล ได้เป็นไซโกต แล้วเจริญเป็นเอ็มบริโอ หลังจากนั้นเอ็มบริโอจะมีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ คือ จากเอ็มบริโอก็เป็นรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และต้นกล้าตามลำดับ แต่เอ็มบริออยด์นั้นมีจุดกำเนิดจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร

2.2.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์, 2540)

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ขึ้นกับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช และชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง โดยอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด คือ อาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส โดยอาหารจะประกอบด้วยธาตุอาหาร คือ สารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง

1. ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (inorganic substances) ประกอบด้วย

1.1 ธาตุอาหารหลัก (macro-elements/nutrients) ได้แก่ C, H, O, N, P, K, Ca, Mg และ S

1.2 ธาตุอาหารรอง (micro-elements/nutrients) ได้แก่ Fe, Mn, Cu, Zn, B, Cl, และ Mo

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (organic substansces) ประกอบด้วย

2.1 วิตามิน (vitamins) ที่ใช้กันมาก ได้แก่ thamine, nicotinic acid, pyridoxine, inositol, biotin, folic acid, riboflavin และ ascorbic acid

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ได้แก่

2.2.1 สารในกลุ่ม auxin ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส เช่น Indole-3-acetic acid, Indole-3-butyric acid, Naphthalene acetic acid, 2,4-diclorophenoxyacetic acid

2.2.2 สารในกลุ่ม cytokinin ช่วยชักนำให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว กระตุ้นการเจริญของตาข้าง ชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดหลายๆยอด เช่น 6-Benzylaminopurine, 2-isopentenyladenine, kinetin, zeatin

2.3 แหล่งคาร์บอน (carbon sources) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อการเจริญเติบโต น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กรดอะมิโน (amino acids) ได้แก่ glutamine, asparagine, adenine, glycine และ casein hydrolysate

2.5 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น coconut milk, yeast extract, tomato juice และ malt extract

2.2.3 การฟอกฆ่าเชื้อ (อนุรักษ์, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจมีติดอยู่ที่บริเวณผิวของเนื้อเยื่อออกเสียก่อนด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (sterilizing agent) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด การเลือกชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย คือ เมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric (II) choloride) ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช นอกจากนี้ควรมีการเติมสารลดแรงตึงผิว เช่น Tween-20 เพื่อให้สารละลายเข้าไปฆ่าเชื้อได้อย่างทั่วถึง และในขณะทำการฆ่าเชื้อควรมีการเขย่าน้ำยาฆ่าเชื้อตลอดเวลา เพื่อให้ชิ้นเนื้อเยื่อจมอยู่ใต้น้ำยาฆ่าเชื้อ ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อ ความสกปรก ชนิดของพืช และส่วนของพืชที่ต้องการฟอกหรือความแข็งแรงของชิ้นส่วนพืช เช่น บริเวณตาข้าง ตายอด ใบ ราก เป็นต้น โดยความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อสูงนิยมใช้เวลาน้อยกว่าความเข้มข้นต่ำ

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Koilpillai และคณะ (2010) ทำการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นใบเงินใบทอง (*Graptophyllum pictum*) โดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอด และตาข้าง โดยจะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกันโดยผลการทดลองพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 8.8 ไมโครโมลาร์ จะเกิดยอดได้ปริมาณมากที่สุดคือ 3.1±0.8 ยอด และสำหรับในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 9.28 ไมโครโมลาร์ พบว่ายอดที่เกิดมีความสูง 4.1 เซนติเมตร ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงแบบ ½ MS ที่เติมกรดจิบเบอเรลลิก ความเข้มข้น 5.6 ไมโครโมลาร์ พบว่ายอดที่เกิดขึ้นจะมีความสูงมากที่สุดคือ 6.8±0.7 เซนติเมตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่าความยาวของยอดที่เกิดขึ้นจะมีความสูงอยู่ในช่วง 4.6±1.4 ถึง 6.8±0.7 เซนติเมตร ถ้าใช้อาหาร ½ MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ พบว่าพืชจะเกิดกระบวนการสร้างรากได้มากที่สุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาจะเป็น IBA ความเข้มข้น 9.48 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้สำหรับ IAA ที่ความเข้มข้นเดียวกันจะเกิดรากปริมาณมากที่สุด 6.2±1.3 รากต่อชิ้นส่วนพืช โดยมีความยาว 4.2±1.3 เซนติเมตร เมื่อพืชมีโครงสร้างที่ครบถ้วน และสมบูรณ์ก็จะสามารถนำไปปลูกลงดินด้วยวิธีทางธรรมชาติได้ และเจริญเติบโตเป็นต้นที่แข็งแรง

Amoo และคณะ (2011) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสกุลอังกาบ (*Barleria greenii*) หาคุณสมบัติที่แตกต่างกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ BA Kin *m*T *m*TR และ Me*m*TR ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากหากทราบถึงคุณสมบัติ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดจะส่งผลให้พืชที่ปลูกเจริญเติบโตได้รวดเร็วเกิดแคลลัส และยอดปริมาณมากตามที่ต้องการได้ โดยจากการทดลองพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต Me*m*TR ความเข้มข้น 7 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตกลายเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยอดได้ดีที่สุด คือ 5.88±0.73 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วนพืช และพบว่าถ้าใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ชนิดนี้เพียงอย่างเดียวจะส่งผลให้พืชเกิดการสร้างยอดได้ดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA แต่สารควบคุมการเจริญเติบโต BA มีผลเสียคือพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตนี้จะเกิดการเจริญเติบโตจนมีรูปร่างที่ผิดปกติได้มาก เมื่อเทียบกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 4 ชนิดที่เหลือ นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*TR และ Mem*TR* เมื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงพืช พบว่าพืชเกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติน้อยกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ

Sayeed และคณะ (2011) ทำการศึกษาพืชสกุลฮ่อมช้าง *Phlogacanthus thyrsiflorus* Nees. วงศ์เหงือกปลาหมอ (Acanthaceae) โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะในขั้นตอนการขยายปริมาณยอด และการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ ซึ่งต้นฮ่อมช้างเป็นพืชหายากที่มีสรรพคุณทางยาของประเทศบังคลาเทศ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้ชิ้นส่วนปลายยอด และตาข้าง จากผลการทดลองพบว่าเมื่อนำมาเลี้ยงด้วยอาหาร MS ที่ทำการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างออกมาได้ดีที่สุดคือ 84.2 เปอร์เซ็นต์ เทียบได้เป็นปริมาณของยอดเท่ากับ 12.4±0.66 ต่อชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้น และสำหรับการชักนำให้เกิดรากในพืชจะต้องนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร ½ MS ที่เติม IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขั้นตอนการย้ายปลูกลงดิน ต้องเลี้ยงต้นพืชที่มีสภาพสมบูรณ์ในห้องที่มีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปย้ายลงในอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเปอร์เซ็นต์การรอดของพืชที่นำไปปลูกลงดินคือ 85 เปอร์เซ็นต์

Puripunyavanicha และคณะ (2015) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นรางจืดหรือ *Thunbergia laurifolia* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการถอนพิษได้หลากหลายชนิด โดยในงานวิจัยนี้จะใช้ชิ้นส่วนของรางจืดในส่วนของใบอ่อนมาชักนำให้เกิดแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีซูโครสปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate ปริมาตร 0.1 เปอร์เซ็นต์ L-proline ปริมาตร 0.25 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองทำให้ทราบได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D มีผลอย่างมากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และการเพาะเลี้ยงต้นรางจืดในอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจะไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยถ้าเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุดคือ 97.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามหากเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้นที่มากเกินไปจะทำให้การชักนำแคลลัสลดน้อยลง

Mohammed และคณะ (2016) ทำการศึกษาต้นฟ้าทะลายโจร (*Andrographis lineata*) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้างของต้นฟ้าทะลายโจรที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ซึ่งเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการเจริญของต้นใหม่ 91 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ BA และ NAA ทำให้พืชเกิดดอก และเกิดผลได้โดยไม่ต้องรอฤดูกาล ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมเหมือนกับการปลูกด้วยวิธีทางธรรมชาติ ต้นฟ้าทะลายโจรที่เพาะเลี้ยงหลังจากผ่านไป 2 เดือน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากระยะที่เจริญเติบโตในส่วนของลำต้น และใบ ไปสู่ระยะที่มีการเจริญเติบโตด้านการสืบพันธุ์ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของซูโครส และไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย หากต้องการให้ฟ้าทะลายโจรเกิดรากได้ดีจะต้องนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร ½ MS เมื่อพืชมีโครงสร้างครบถ้วนสมบูรณ์จะสามารถนำมาย้ายลงในดิน และปลูกด้วยวิธีทางธรรมชาติได้

Srikun (2017) ทำการศึกษาการขยายพันธุ์ต้นฮ่อม (*Strobilanthes tonkinensis* Lindau) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในวงศ์ Acanthaceae ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสารที่สกัดออกจากพืชชนิดนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญของสาร Squalene ซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่ให้ความชุ่มชื้นกับร่างกายได้เป็นอย่างดี การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มจากนำชิ้นส่วนยอดของพืชที่ทำการเพาะปลูกในเรือนกระจกเป็นระยะเวลา 1 เดือน มาฟอกฆ่าเชื้อโดยเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถทำให้ชิ้นส่วนพืชที่นำไปเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อ และเจริญเติบโตได้อย่างดี ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ BA การเพิ่มความเข้มข้นของสาร 2 ชนิดนี้ จะไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดของพืช โดยถ้านำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครโมลาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พืชจะมีปริมาณยอดสูงที่สุดคือ 12 ยอดต่อ 1 ชิ้นพืช ส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ พบว่าหากใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 4-6 ไมโครโมลาร์ จะสามารถชักนำให้เกิดยอดประมาณ 4-6 ยอดต่อ 1 ชิ้นพืช เมื่อเทียบกับพืชที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA พบว่าต้องใช้สารนี้ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 32-128 ไมโครโมลาร์ ถึงจะให้ปริมาณยอดที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายไปลงอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ยอดที่ได้จะมีความยาวมากที่สุด และสำหรับการชักนำให้เกิดราก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 7.5 ไมโครโมลาร์ จะเกิดรากปริมาณมากที่สุด คือ 21 รากต่อ 1 ยอด จากนั้นนำมาย้ายใส่กระถางเพาะปลูก และเพาะเลี้ยงภายในเรือนกระจกเป็นเวลา 5 สัปดาห์ จะได้พืชที่สมบูรณ์พร้อมสำหรับการเพาะปลูกลงดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 รางจืดที่ใช้ในการศึกษา

ได้รับต้นรางจืดจากความอนุเคราะห์ของ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

3.2 สารเคมี

- อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skooge, 1962 (MS)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-Dicholophenoxy acetic acid (2,4-D)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต 6-Benzylaminopurine (BA)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต *meta*-Topolin (*m*T)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ)
- เมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric (II) chloride)
- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)
- น้ำตาลซูโครส (sucrose)
- ไฟทาเจล (phytagel)
- เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- สารลดแรงตึงผิว (Tween-20)
- น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (distilled water)

3.3 อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง (balance)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้ความดัน (autoclave)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven)
- ตะเกียง (alcohol burner)
- ไฟแช็ค (lighter)
- มีดผ่าตัด (scalpel)
- กรรไกร (scissors)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปากคีบ (forceps)
- ช้อนตักสารเคมี (spatula)
- ที่ดูดปล่อยสาร (auto pipette)
- ทิปขนาดต่างๆ (tip)
- พาราฟิล์ม (parafilm)
- แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์ (aluminium foil)
- ถ้วยชั่งสาร (weighing boat)
- กระดาษทิชชู (tissue paper)
- ถุงมือ (gloves)
- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวง (cylinder)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- จานแก้ว (petri dish)
- ขวดแก้วขนาดต่างๆ (bottle)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส

ตัดชิ้นส่วนใบของต้นรางจืด มาล้างด้วยน้ำสะอาด และนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5-6 วินาที นำไปฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 80 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย mercuric (II) chloride ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ Tween-20 ความเร็วรอบ 220 rpm เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางบนเพลทหรือจานกระดาษให้แห้ง โดยส่วนของใบจะตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ย้ายลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ปราศจากแสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลจำนวนใบที่เกิดแคลลัส เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ใบที่เกิดแคลลัส จากนั้นวัดความกว้าง ความยาว ความสูงของแคลลัส เพื่อคำนวณหาปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัส นำค่าที่คำนวณได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Versions 23 ด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยสามารถคำนวณได้ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ใบที่เกิดแคลลัส คำนวณได้จาก : $\frac{\text{จำนวนใบที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนใบที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$

ปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัส (ลูกบาศก์มิลลิเมตร) คำนวณได้จาก : $\frac{\text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{สูง ของแคลลัสที่เกิด}}{\text{จำนวนใบที่เกิดแคลลัส}}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การศึกษาของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

ตัดชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืด มาล้างด้วยน้ำสะอาด และนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5-6 วินาที นำไปฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 80 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย mercuric (II) chloride ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ Tween-20 ความเร็วรอบ 220 rpm เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางบนเพลทหรือจานกระดาษให้แห้ง โดยส่วนของข้อตัดให้มีขนาดประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร ย้ายลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ปราศจากแสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลจำนวนข้อที่เกิดยอด จำนวนยอด เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ข้อที่เกิดยอด และเปอร์เซ็นต์ที่เกิดยอด จากนั้นวัดความยาวของยอด เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยของความยาวยอด นำค่าที่คำนวณได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Versions 23 ด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยสามารถคำนวณได้ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ข้อที่เกิดยอด คำนวณได้จาก : $\frac{\text{จำนวนข้อที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$

เปอร์เซ็นต์ที่เกิดยอด คำนวณได้จาก : $\frac{\text{จำนวนยอดที่เกิด}}{\text{จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$

ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร) คำนวณได้จาก : $\frac{\text{ความยาวของยอดที่เกิด}}{\text{จำนวนข้อที่เกิดยอด}}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ปราศจากแสง 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซ็นต์จำนวนใบที่เกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัสที่เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นของแต่ละความเข้มข้นของอาหารแข็งสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

หลังจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของรางจืด พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ทุกความเข้มข้นจะมีผลต่อการชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสได้ และจากผลการทดลองพบว่าแคลลัสจะเจริญจากบริเวณกลางใบ และขอบใบ โดยสัปดาห์แรกจะยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ บนชิ้นใบที่ทำการเพาะเลี้ยง ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 จะเกิดแคลลัสสีขาวขึ้นมาจากบริเวณขอบใบ และกลางใบเล็กน้อยที่ทุกความเข้มข้นของ 2,4-D โดยที่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัสมากที่สุด รองลงมาคือ ความเข้มข้นที่ 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 3 แคลลัสจะเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีจำนวนชิ้นที่มากขึ้น ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ หลังจากนั้นลักษณะของแคลลัสที่เกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เกาะตัวอย่างหนาแน่นมีสีขาว ในรูปแบบ compact callus ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ 2,4-D ทั้ง 6 ความเข้มข้น พบว่าแต่ละความเข้มข้นมีปริมาณของแคลลัสที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน (รูปที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Puripunyavanicha (2015) ซึ่งได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงใบของต้นรางจืดในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุดคือ 97.5 เปอร์เซ็นต์

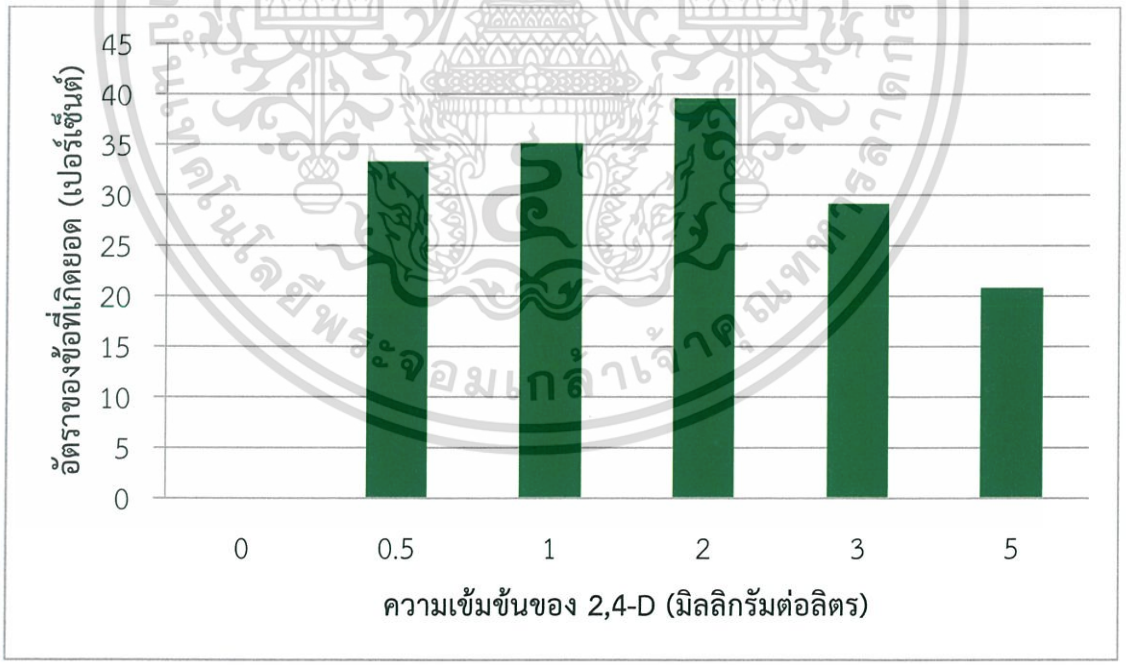
โดยจากผลการทดลองอาหารแข็งสูตร MS ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ใบเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด คือ 19 ใบจากทั้งหมด 48 ใบหรือเท่ากับ 39.58 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดคือ 906.82 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้ใบเกิดแคลลัสได้ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนชิ้นใบที่เพาะเลี้ยง จำนวนใบที่เกิดแคลลัส และปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

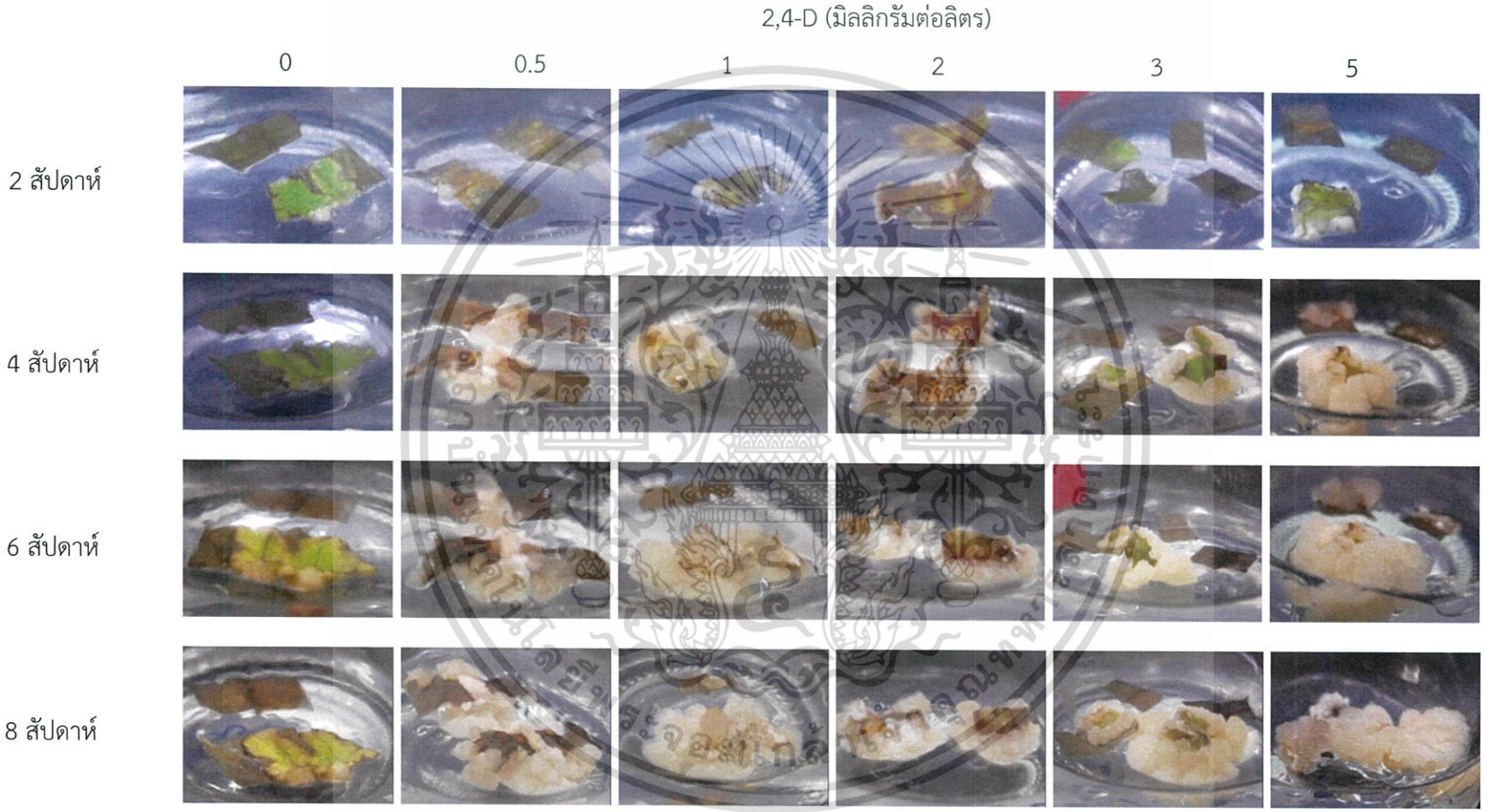
สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	**จำนวนชิ้นใบที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)**	**จำนวนใบที่เกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)**	**ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ย (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)**
0	48	0 (0)	0^{c}
0.5	48	15 (31.25)	528.55^{ab}
1	48	17 (35.12)	445.22^{ab}
2	48	19 (39.58)	472.32^{ab}
3	48	14 (29.17)	459.09^{ab}
5	48	10 (20.83)	906.82^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.1 แสดงอัตราการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ

4.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

4.2.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืด ในอาหารแข็งสูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA มีส่วนช่วยในการชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดเกิดการเจริญเติบโตกลายเป็นยอดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยยอดจะเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงจะเกิดเป็นลักษณะตุ่มขนาดเล็กงอกออกมาจากข้อร่วมกับการเกิดแคลลัสที่ BA ความเข้มข้น 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่ BA ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัส จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปตุ่มที่เกิดจะเจริญเป็นยอด โดยข้อของต้นรางจืดที่เพาะเลี้ยงที่ BA ทุกความเข้มข้นจะเกิดยอดในสัปดาห์ที่ 2 จากนั้นความยาวของยอดจะเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ถัดไป ส่วนที่ BA ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดจำนวนน้อย และที่ BA ความเข้มข้น 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดจำนวนมาก (รูปที่ 4.4) และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดดีที่สุดคือ 17 ข้อจากทั้งหมด 55 ข้อ คิดเป็น 30.91 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 10.15 มิลลิเมตร ที่ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดมากที่สุด คือ 50.91 เปอร์เซ็นต์ และ BA ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดน้อยที่สุด คือ 7 ข้อจากทั้งหมด 55 ข้อ เท่ากับ 12.73 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดยอดน้อยที่สุด คือ 23.64 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 2.56 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Koilpillai และคณะ (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นใบเงินใบทอง โดยใช้อาหารแข็งสูตร MS พบว่าความเข้มข้นเดียวกัน คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด คือ 3.1±0.8 ยอด

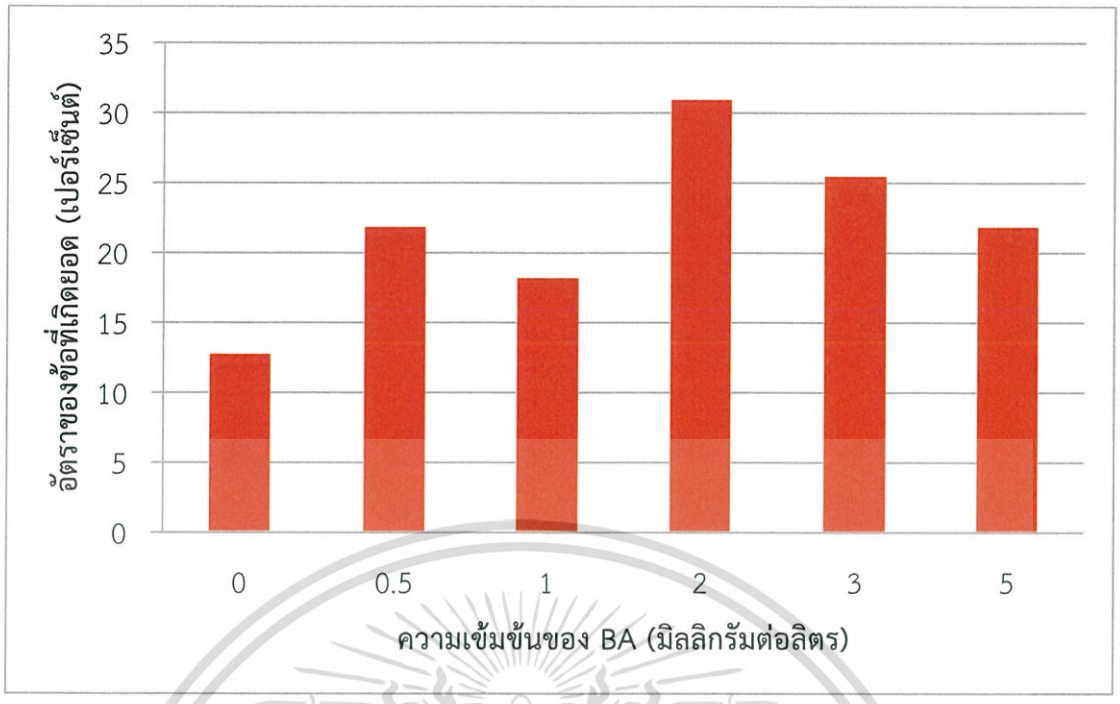
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง จำนวนข้อที่เกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอดเฉลี่ย และการเกิดแคลลัส ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	แคลลัส	
					เกิด	ไม่เกิด
0	55	7 ^{b} (12.73)	13 (23.64)	2.56^{d}	/	
0.5	55	12^{ab} (21.82)	22 (40.00)	6.82^{bc}	/	
1	55	10^{ab} (18.18)	13 (23.64)	6.96^{cd}	/	
2	55	17^{a} (30.91)	28 (50.91)	10.15^{a}	/	
3	55	14^{ab} (25.45)	25 (44.45)	4.61^{cd}	/	
5	55	12^{ab} (21.82)	28 (50.91)	8.74^{ab}	/	

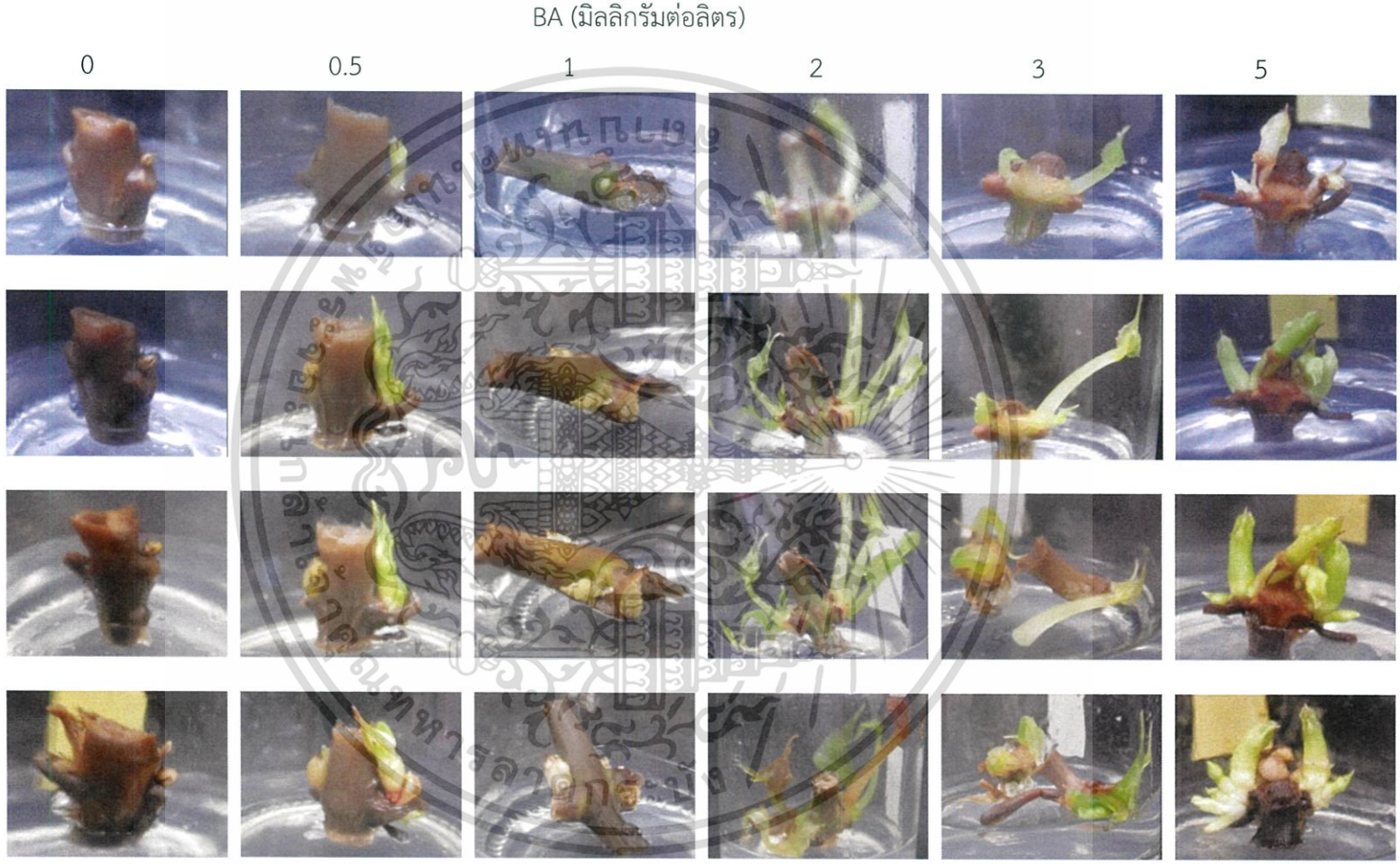
หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รูปที่ 4.3 แสดงอัตราการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ

4.2.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

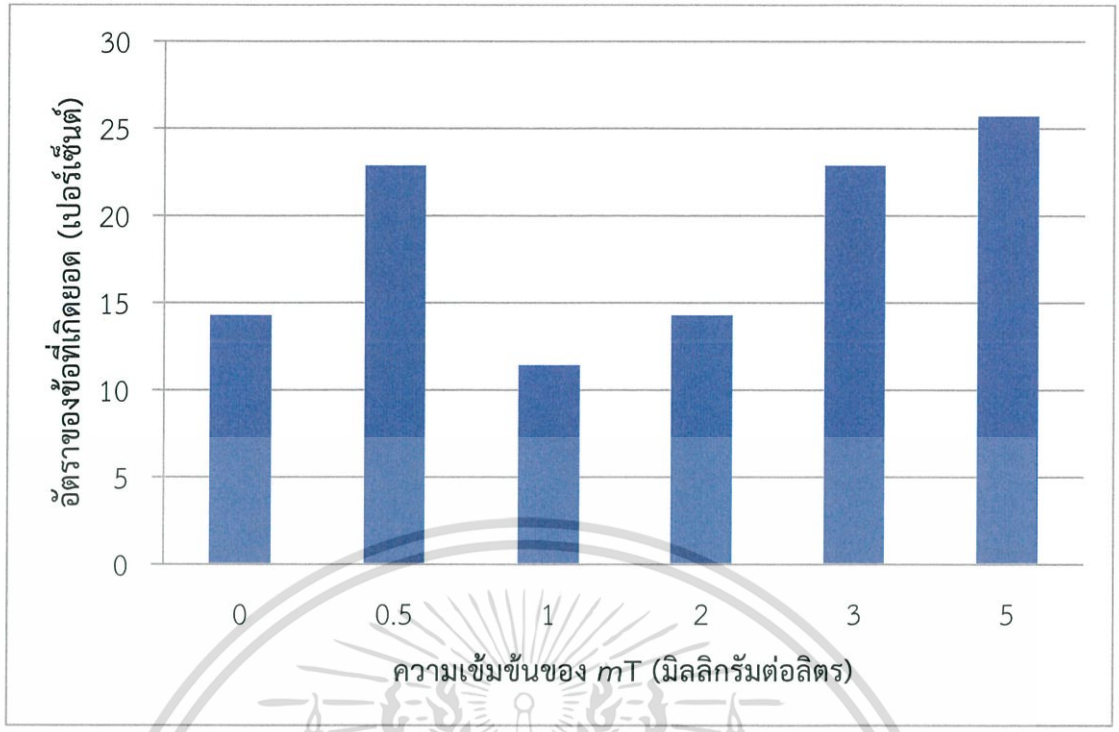
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืด ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 พบว่าทุกความเข้มข้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ต่อมาในสัปดาห์ที่ 3 ข้อที่เพาะเลี้ยงจะเกิดยอด แต่ทุกความเข้มข้นจะเกิดยอดจำนวนน้อย ซึ่งในสัปดาห์นี้จะเกิดยอดร่วมกับการเกิดแคลลัส โดยแคลลัสที่เกิดจะมีสีขาว ต่อมาในสัปดาห์ที่ 4 ยอดที่เกิดจะมีความยาวเพิ่มขึ้น และมีจำนวนยอดมากขึ้น (รูปที่ 4.6) และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดดีที่สุดคือ 9 ข้อจากทั้งหมด 35 ข้อ เท่ากับ 25.71 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราการเกิดยอดมากที่สุดคือ 65.71 เปอร์เซ็นต์ และความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 9.24 มิลลิเมตร ที่ *m*T ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดน้อยที่สุดคือ 4 ข้อจากทั้งหมด 35 ข้อ เท่ากับ 11.43 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดยอดน้อยที่สุดคือ 20.00 เปอร์เซ็นต์ และที่ *m*T ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 3.95 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง จำนวนข้อที่เกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอดเฉลี่ย และการเกิดแคลลัส ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

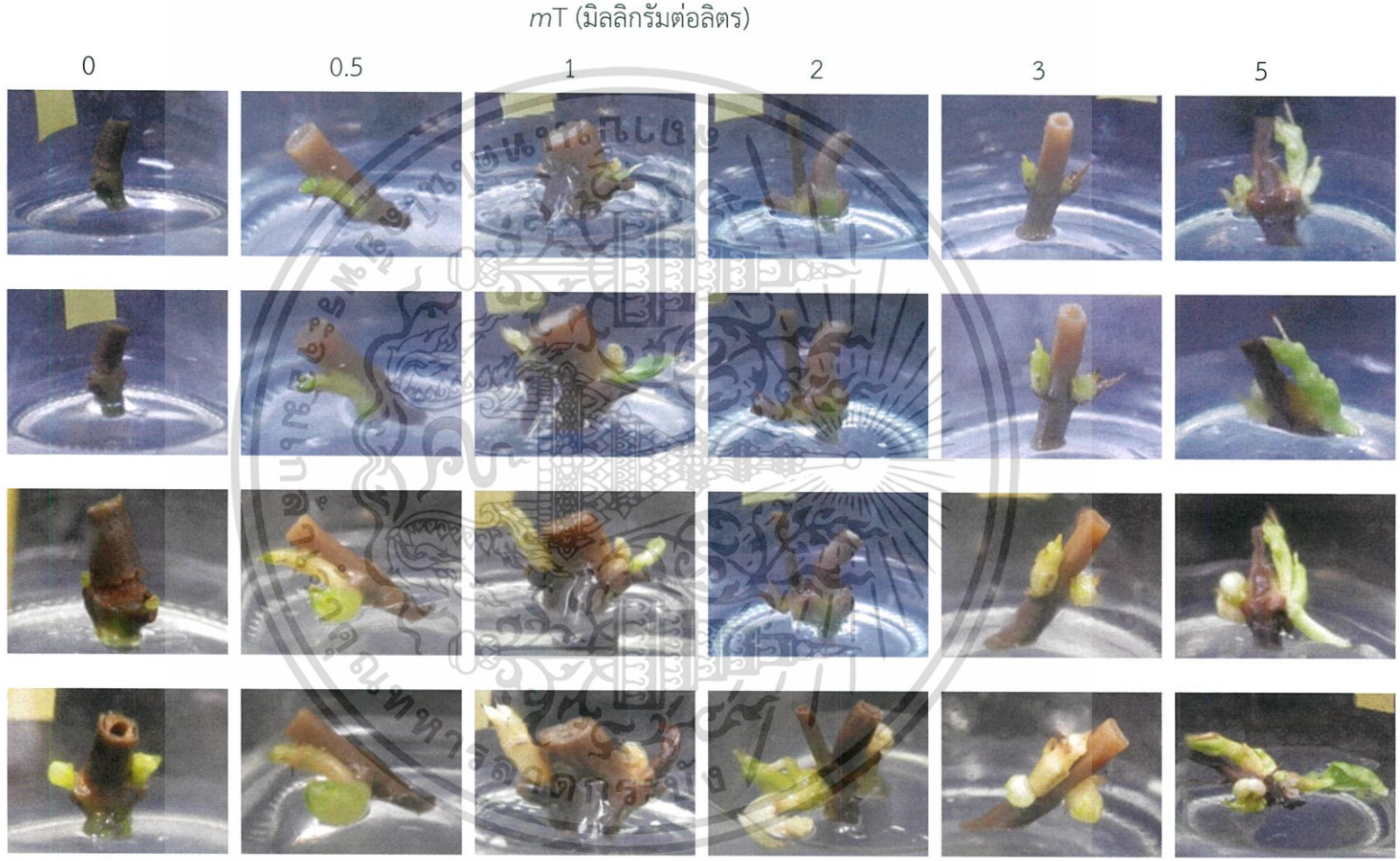
สารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	แคลลัส	
					เกิด	ไม่เกิด
0	35	5[a] (14.29)	8 (22.86)	3.95[b]		/
0.5	35	8[a] (22.86)	13 (37.14)	8.55[b]	/	
1	35	4[a] (11.43)	7 (20.00)	5.61[b]	/	
2	35	5[a] (14.29)	8 (22.86)	7.98[b]	/	
3	35	8[a] (22.86)	14 (40.00)	5.47[b]	/	
5	35	9[a] (25.71)	23 (65.71)	9.24[a]	/	

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.5 แสดงอัตราการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ

4.2.3 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

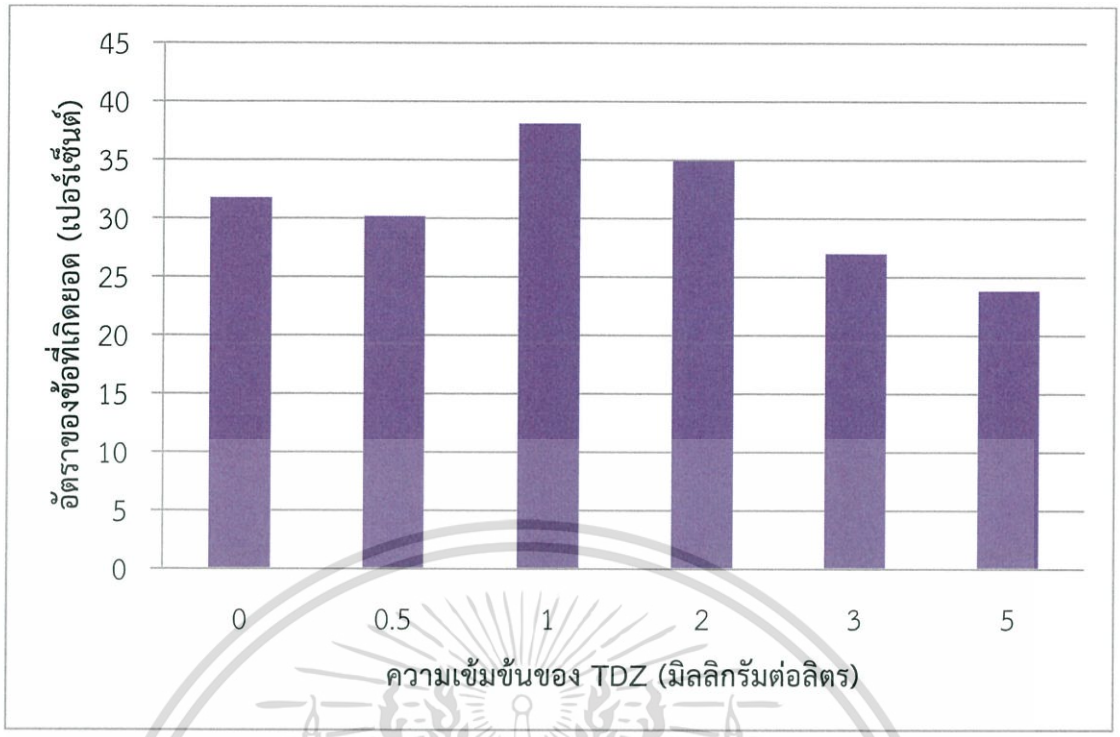
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืด ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัสร่วมกับการเกิดยอด (รูปที่ 4.8) หลังจากนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าในสัปดาห์ที่ 8 ที่ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดดีที่สุดคือ 24 ข้อจากทั้งหมด 63 ข้อ เท่ากับ 38.10 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นมากที่สุดคือ 38 ยอด หรือเท่ากับ 60.32 เปอร์เซ็นต์ ที่ TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดน้อยที่สุดคือ 15 ข้อจากทั้งหมด 63 ข้อ เท่ากับ 23.81 เปอร์เซ็นต์ และที่ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 13.98 มิลลิเมตร แต่มีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นน้อยที่สุดคือ 26 ยอด หรือเท่ากับ 41.27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ TDZ ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 3.67 มิลลิเมตร นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจะน้อยลงตามความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.4) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Srikun (2017) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นฮ่อม และมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นอัตราการเกิดยอดจะน้อยลงเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง จำนวนข้อที่เกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอดเฉลี่ย และการเกิดแคลลัส ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

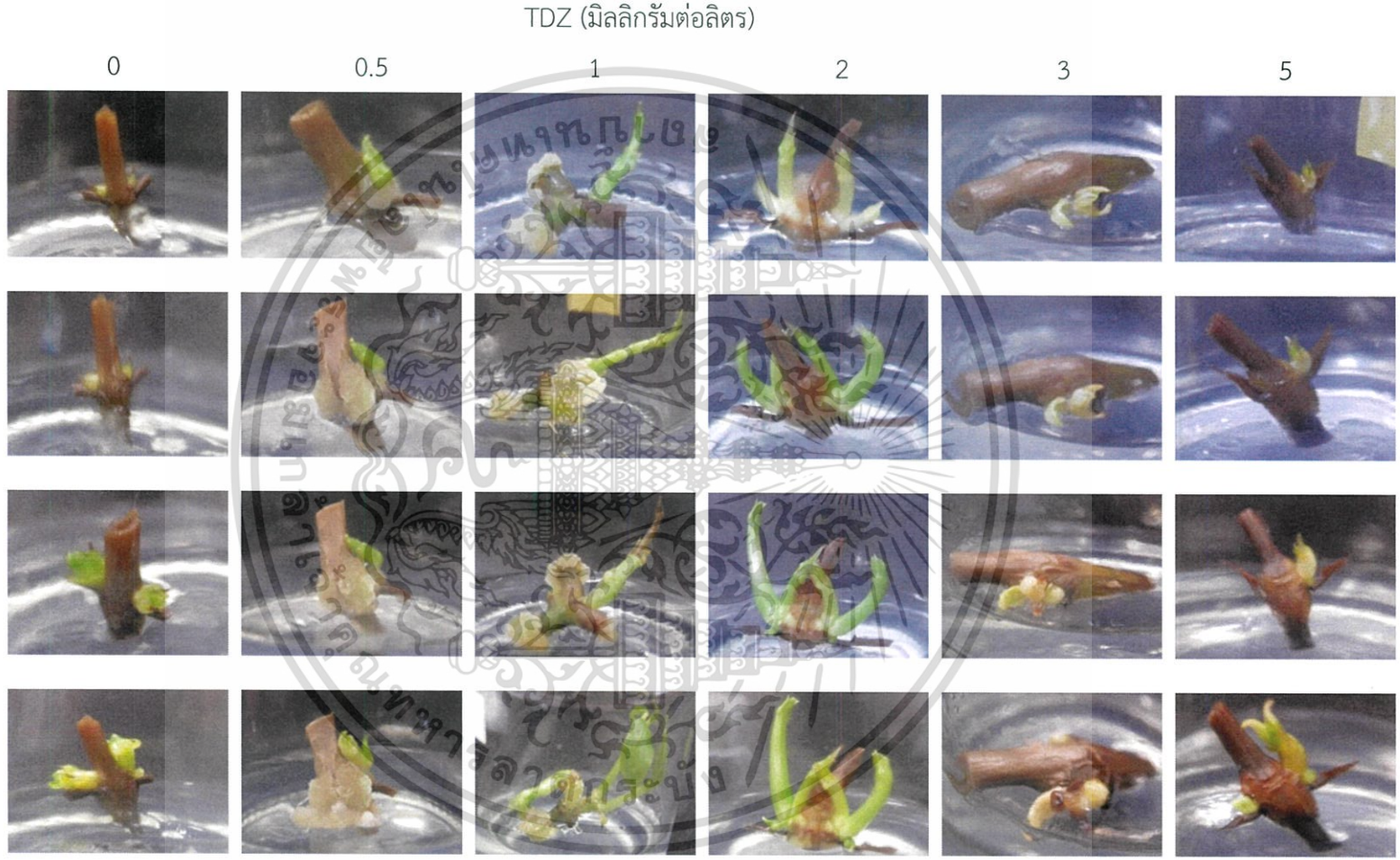
สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	แคลลัส	
					เกิด	ไม่เกิด
0	63	20[a] (31.75)	30 (47.62)	3.67[a]		/
0.5	63	19[a] (30.16)	36 (57.14)	6.34[a]	/	
1	63	24[a] (38.10)	38 (60.32)	7.47[a]	/	
2	63	22[a] (34.92)	36 (57.14)	7.96[a]	/	
3	63	17[a] (26.98)	26 (41.27)	13.98[a]	/	
5	63	15[a] (23.81)	25 (39.68)	7.56[a]	/	

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.7 แสดงอัตราการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นรางจืดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของรางจืดในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 19 ใบจากทั้งหมด 48 ใบ คิดเป็น 39.58 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดคือ 906.82 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ในการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของรางจืดในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ที่สารควบคุมการเจริญเติบโต BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ที่ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ 17 ข้อจากทั้งหมด 55 ข้อ คิดเป็น 30.91 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 10.15 มิลลิเมตร และ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดมากที่สุดคือ 50.91 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของรางจืดโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T มีการเจริญเติบโตได้ช้ากว่าเมื่อเทียบกับรางจืดที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ BA ส่วน *m*T ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดดีที่สุดคือ 9 ข้อจากทั้งหมด 35 ข้อ เท่ากับ 25.71 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเกิดยอดมากที่สุดคือ 65.71 เปอร์เซ็นต์ ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 9.24 มิลลิเมตร และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของรางจืดโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดยอดดีที่สุดคือ 24 ข้อจากทั้งหมด 63 ข้อ เท่ากับ 38.10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเกิดยอดมากที่สุดคือ 60.32 เปอร์เซ็นต์ และที่ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 13.98 มิลลิเมตร

เมื่อพิจารณาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อดีที่สุด คิดเป็น 38.10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่ำสุด และชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในส่วนของการชักนำข้อให้เกิดยอด ผู้ที่สนใจสามารถศึกษา และพัฒนาต่อยอดเพื่อให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เพื่อชักนำให้เกิดรากก่อนนำออกปลูกในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรวีร์ ชูธรรมธัช. 2553. **ว่านรางจืด พืชมหัศจรรย์.** กรุงเทพฯ : ปัญญาชน

เกษตรมือใหม่. 2547. **พืชผักผลไม้ไทยมีคุณค่าเป็นทั้งอาหารและยาตอน"รางจืด".** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio47-48/47-480013.htm

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2547. **บทความวิทยุรายการสาระความรู้ทางการเกษตร.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio47-48/47-480013.htm

เมดไทย. 2556. **รางจืด สรรพคุณและประโยชน์ของว่านรางจืด 20 ข้อ.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://medthai.com/รางจืด/

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำนักงานคณะกรรมาการวิจัยแห่งชาติ. 2554. **โครงการวิจัยและพัฒนาสมุนไพร.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สุภาภรณ์ ปิติพร. 2554. **รางจืด ราชายาแก้พิษ.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : หมอชาวบ้าน

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Amoo, S. O., Finnie, J. F., and Van Staden, J. 2011. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant growth regulation*, 63(2), 197-206.

Koilpillai, Y. J., and S. Wilson. 2010. " *In vitro* Propagation of *Graptophyllum pictum* L. (Acanthaceae) - a Medicinal Plant." [In English]. *Journal of Pharmacy Research* 3, no. 9 : 2201-2202.

Mohammed, A., Chiruvella, K. K., and Ghanta, R. G. 2016. In vitro plant regeneration, flowering and fruiting from nodal explants of *Andrographis lineata* nees (Acanthaceae). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, *19*(3), 195-202.

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

National Plant Data Center USA. 2010. Laurel clock vine. [Online]. Available : https://www.eddmaps.org/species/subject.cfm?sub=14028

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Puripunyavanicha, V. and Khamvarna V. 2015. "Callus induction in young leaf of *Thunbergia Laurifolia* Lindl." 774-779. Thailand Institute of Nuclear Technology, NakhonNayok, 26120, Thailand: Moving Forward to a Prosperous and Sustainable Community

Sayeed, A. K. M. 2012."In vitro shoot proliferation and plant regeneration of *Phlogacanthus thyrsiflorus* Nees. a Rare Medicinal Shrub of Bangladesh."

Srikun, N. (2017). In vitro propagation of the aromatic herb *Strobilanthes tonkinensis Lindau. Agriculture and Natural Resources*, 51(1), 15-19.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตาราง สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	6.9
$ZnSO_4 \cdot 2H_2O$	6.14
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
Na_2-EDTA	37.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้