รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของโฮยา
Study on factor for plant regeneration of Hoya

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบเงินรายได้ ประจำปี 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
งมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของโฮยา
Study on factor for plant regeneration of Hoya

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบเงินรายได้ ประจำปี 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของโฮยา

(ภาษาอังกฤษ) Study on factor for plant regeneration of Hoya

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงิน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 100 %
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบของ *Hoya spp* บนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าที่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของ *Hoya kerrii* ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 184.27 ตารางมิลลิเมตร และพบว่าที่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของ *Hoya densifolia* ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 215.33 ตารางมิลลิเมตร

การชักนำแคลลัสของ *Hoya densifolia* ให้เป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดได้มากที่สุด 3.72 ยอด ในระยะเวลา 10 สัปดาห์ การเกิดเป็นยอดใหม่จากส่วนของข้อสามารถเกิดได้ดีที่สุดในอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ย้ายต้นอ่อนของ *Hoya densifolia* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS พบว่าสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเจริญต้นและของรากมากที่สุด และย้ายต้นที่สมบูรณ์นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้สำเร็จ

คำสำคัญ ของโครงการวิจัย

โฮย่า, แคลลัส การเจริญเป็นต้นใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Tissue culture of *Hoya* spp. leaves cultured on MS medium supplemented with different concentration of 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2, 4-D and 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel, in the dark conditions for 6 weeks was investigated. Results show the calli of *Hoya Kerrii*, with the mean value of the largest size at 184.27 mm^2 were induced by 5 mg/l 2,4-D. and the calli of *Hoya densifolia* with the mean value of the largest size at 215.33 mm^2 were induced by 1 mg/l 2,4-D.

Callus of *Hoya densifolia* were transferred to shoot regeneration MS medium supplemented with concentrations of 0.5 mg/l BA. The regenerated number of shoots per callus piece was 3.72 shoots for 10 weeks. Multiple shoot of *Hoya densifolia* from node were the best at 1 BA mg/l for 8 weeks. For the best shoot and roots generation in combination with kinetin 0.5 mg/l and 1 IBA mg/l. and transferred plantlet in the pot.

keywords Hoya spp., callus, regeneration

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบคุณ คุณทัศนารถ กระจ่างวุฒิ ที่ได้อนุเคราะห์ สายพันธุ์ *Hoya* จากแปลงทดลองส่วนพระองค์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ น้องๆ รวมทั้งลูกศิษย์ทุกคนที่มีร่วมในการวิจัย ครอบครัวที่กำลังใจ และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ความเป็นมาและข้อมูลทั่วไปของโฮย่า	4
2.1.1 ความเป็นมาของโฮย่า	4
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.3 การปลูกและการดูแลรักษา	7
2.1.4 โรคแมลงที่มักพบ	8
2.1.5 ตัวอย่างสายพันธุ์ของโฮย่า	8
2.1.5.1 โฮย่าเคอร์ริอาย	8
2.1.5.2 โฮย่าโคโรนาเรีย	9
2.1.5.3 โฮย่าเอ็กคาวาตา	9
2.1.5.4 โฮย่ากลาวิโอเลน	10
2.1.5.5 โฮย่าโอโบวาตา	11
2.1.5.6 โฮย่าโกลัมโคอาน่า	11
2.1.5.7 โฮย่าโกบูลิเฟอร่า	12
2.1.5.8 โฮย่าสายพันธุ์เดนสิโฟเลีย	13
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)	13
2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง	13
2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	14
2.2.2.1 การขยายพันธุ์พืช (plant propagation)	14
2.2.2.2 การปรับปรุงพันธุ์ (plant improvement)	15
2.2.2.3 การผลิตพืชปราศจากโรค (disease-free plants)	16
2.2.2.4 การเก็บรักษาพันธุ์พืช (plant conservation)	16
2.2.2.5 การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)	17
2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ) **หน้า**

2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส 17
2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture) 18
2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 18
2.2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ 18
2.2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ 19
2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช 23
2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้ 24
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 28
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 28
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง 29
3.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ 29
3.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด 29
3.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 30
3.2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก 30
3.2.5 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ 30
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง 31
4.1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ 31
4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด 34
4.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 36
4.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก 37
4.5 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ 39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 40
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย 41
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย 42
ภาคผนวก ก 44
ข้อมูลประวัติผู้วิจัย 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา 23
4.1 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นใน *H. kerrii* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบใน อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ 32
4.2 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นใน *H. densifolia* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของ ใบในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ 33
4.3 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำแคลลัส *H. densifolia* บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 6 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ 35
ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962) 42

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงลักษณะส่วนต่างๆของต้นโฮย่า 5
2.2 แสดงลักษณะส่วนต่างๆ ของดอกโฮย่า 6
2.3 แสดงลักษณะต่างๆของใบโฮย่า 7
2.4 ลักษณะของโฮย่าเคอร์ริอาย 8
2.5 ลักษณะของโฮย่าโคโรนาเรีย 9
2.6 ลักษณะของโฮย่าเอ็กคาวาตา 10
2.7 ลักษณะดอกของโฮย่ากลาวิโอเลน 10
2.8 ลักษณะของโฮย่าโอโบวาตา 11
2.9 ลักษณะของโฮย่าโกลัมโคอาน่า 12
2.10 ดอกของโฮย่าโกบูลิเฟอร่า 12
2.11 แสดงลักษณะดอกของ *Hoya densifolia* Turcz. 13
4.1 กราฟแสดงพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยของแคลลัสสายพันธุ์ *H. kerrii* จากการเพาะเลี้ยงชิ้น ส่วนของใบบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรใน แต่ละสัปดาห์ 32
4.2 แสดงลักษณะการเจริญเป็นแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *H. kerrii* และ *H. densifolia* บนอาหาร แข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความ เข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัม ต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 0 (ก) 2 (ข) 4 (ค) และ 6 (ง) สัปดาห์ ตามลำดับ 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.3	กราฟแสดงพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยของแคลลัส *H. densifolia* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรใน ในระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ	34
4.4	กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 6 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ	35
4.5	แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการชักนำแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 8 สัปดาห์	36
4.6	การเพาะเลี้ยงส่วนข้อในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 (ก) 1(ข) 3 (ค) และ 5 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัม ต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์	37
4.7	การเพาะเลี้ยงส่วนข้อในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัม ต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ	37
4.8	การเจริญเป็นรากในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 (ก) 4 (ข) 6 (ค) สัปดาห์ ตามลำดับ	38
4.9	การเจริญเป็นต้น และรากในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น เข้มข้น 0.3 (ก) 0.5 (ข) 1(ค) และ 3 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตามลำดับ	38
4.10	การเจริญเป็นต้น และรากในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 (ก) 0.5 (ข) 1 (ค) และ 3 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตามลำดับ	39
4.11	ขั้นตอนการย้ายปลูก นำต้นที่สมบูรณ์ (ก) เปิดขวดออก (ข) แช่ในน้ายาฆ่าเชื้อ (ค) ปลูกในดิน (ง) ใช้ถุงพลาสติกคุมเพื่อรักษาความชื้น (จ)	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย

ปัจจุบันโฮย่าเป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยงเป็นไม้ประดับเป็นอย่างมากในประเทศไทย โดยมีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาค ส่วนใหญ่เป็นไม้เลื้อยอิงอาศัยเกาะกับต้นไม้ใหญ่ ได้อาหารและน้ำจากลมและฝน ทุกส่วนของต้นมีน้ำยางสีขาว ยกเว้นเพียงไม่กี่ชนิด มีน้ำยางใส มีใบหนาคล้ายพืชอวบน้ำ จึงสามารถทนแล้งได้ดี มีรากที่ทำหน้าที่คล้ายรากอากาศ การขยายพันธุ์โฮย่านิยมใช้การตัดชำ โดยเลือกกิ่งที่แข็งแรงไม่แก่หรืออ่อนเกินไป โฮย่าบางชนิด เช่น ชนิดที่มีใบด่าง หรือมาจากเขตหนาว เมื่อนำมาปักชำมักออกรากยาก และอ่อนแอต่อสภาพอากาศในไทยจึงต้องขยายพันธุ์ด้วยการทาบกิ่ง จึงให้ผลดี [http://www.ptcn.ac.th/student/Sand12.html]

โฮย่า เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ในวงศ์ Asclepiadaceae กระจายพันธุ์ครอบคลุมบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และตอนบนของทวีปออสเตรเลีย เจริญอยู่ในสภาพธรรมชาติต่าง ๆ กัน พบมากที่สุดในแนวเส้นศูนย์สูตร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเกาะอยู่ในทะเลจีนใต้ ที่มีสภาพเป็นป่าฝนเขตร้อนเหมือนป่าดงดิบ มีแสงส่องถึง นอกจากนี้ยังพบในป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งในแถบอินโดจีน รวมทั้งบนหุบเขาสูงซึ่งเป็นป่าดิบเขาในเขตกึ่งร้อน ปัจจุบันพบโฮย่ากว่า 400 ชนิดทั่วโลก รูปร่างและขนาดของใบแตกต่างกันในแต่ละชนิด เช่น รูปกลม รูปรี รูปหัวใจ บางชนิดมีผิวใบหยาบเหมือนแผ่นหนัง หรือมีขนคล้ายกำมะหยี่ปกคลุม ดอกออกเป็นช่อแบบซี่ร่ม เกิดที่ข้อใบและมักห้อยลง ก้านช่อดอกมีอายุนานหลายปีและเกิดดอกซ้ำได้หลายครั้ง ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 5 อัน ลักษณะเด่นของดอกคือมีกลีบดอกเป็นมันคล้ายทำด้วยขี้ผึ้ง สีสันสดใส จึงมีชื่อเรียกว่า Wax Plant หรือบางชนิดกลีบดอกมีขนฟูคล้ายกำมะหยี่ปกคลุม นอกจากนี้ ยังมีส่วนที่คล้ายมงกุฎ 5 แฉกครอบอยู่ตรงกลางเหนือกลีบดอกเกสรเพศผู้ 5 อัน มีลักษณะคล้ายก้อนขี้ผึ้งอยู่ระหว่างแฉกของมงกุฎ ส่วนเกสรเพศเมีย 1 อัน อยู่กึ่งกลางมงกุฎ ดอกมักจะมีกลิ่นหอมโดยเฉพาะเวลากลางคืน ออกดอกในช่วงปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว ส่วนชนิดที่มีถิ่นกำเนิดในเขตหนาวจะออกดอกในฤดูหนาวผลเป็นฝักรูปร่างยาว เมื่อแก่จะแห้งและแตกออกเพียงด้านเดียว ภายในมีเมล็ดเล็ก ๆ จำนวนมาก เมล็ดมีขนพิเศษช่วยในการกระจายพันธุ์ไปตามลม เมล็ดที่ตกในที่เหมาะสมก็จะเจริญเติบโตต่อไป

ปัจจุบันโฮย่าเป็นไม้ประดับที่ปลูกกันแพร่หลายทั่วโลก ซึ่งค้นพบแล้วกล่าว 400 ชนิด (ไม่รวมต้นที่มีการกลายพันธุ์และลูกผสมซึ่งเกิดจากผู้ปลูกเลี้ยงได้ผสมสายพันธุ์) กระจายพันธุ์ครอบคลุมบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และตอนบนของทวีปออสเตรเลีย เจริญอยู่ในสภาพธรรมชาติที่แตกต่างกัน พบมากที่สุดในแนวเส้นศูนย์สูตรซึ่งส่วนใหญ่เป็นเกาะทางทะเลจีนใต้ที่มีสภาพเป็นป่าฝนเขตร้อนเหมือนป่าดงดิบ นอกจากนี้ยังพบในป่าเบญจพรรณ บนหุบเขาสูงและป่าดิบแล้งในแถบอินโดจีน ในประเทศไทยถูกค้นพบประมาณ 40 ชนิด (เศรษฐมันตร์, 2553)

รายงานจากกรมวิชาการเกษตร 2554 การค้นพบใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2551 คือ *Hoya imperialis* Lindi เป็นไม้เถา ลำต้นขนาดใหญ่และแข็งแรง กล่าวได้ว่าเป็นโฮย่าที่มีดอกใหญ่ที่สุดในสกุลนี้ พบระหว่างการสำรวจพรรณไม้บริเวณเทือกเขาชายแดนไทยมาเลเซีย โดยนายเจริญ แซ่ไว พิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นพืชที่มีดอกขนาดใหญ่มากเมื่อเทียบกับชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกัน และเป็นที่รู้จักกันดีในวงการไม้ดอกไม้ประดับในชื่อ “โฮย่าจักรพรรดิ”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโฮย่ามีอยู่ไม่มากและเป็นไปอย่างจำกัด Maraffa และคณะ (1981) ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงให้เกิดเอ็มบริโอโดยใช้ส่วนของชิ้นใบของ *Hoya carnosa* Lakshmi และคณะ (2009) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของโฮย่าสายพันธุ์ *Hoya wightii* ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นและสามารถขยายพันธุ์ได้น้อย ในตะวันตกของรัฐทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย โดยศึกษาการงอกของยอดและรากศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดยอดเป็นจำนวนมากของชิ้นพืช ซึ่งเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทั้งกลุ่มไซโทไคนิน คือ KN BA 2-iP TDZ และกลุ่มออกซิน คือ IBA IAA และ NAA ในความความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ต่างกัน จากการที่ในปัจจุบันประเทศไทยพบโฮย่าประมาณ 40 ชนิดและมีแนวโน้มที่จะพบสายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และการขยายพันธุ์ต้นโฮย่าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในประเทศไทยยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก มีการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับพืชชนิดนี้อยู่น้อย โดย สมัชชา (2001) มีการเพาะเลี้ยงข้อปล้อง ชักนำให้เกิดแคลลัส ชักนำให้เกิดยอด และนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย และปรับปรุงพันธุ์โดยการปลูกถ่ายยีน จากความสำคัญดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้มีการศึกษาการเกิดเป็นแคลลัส การเกิดเป็นยอดใหม่ การเพาะเลี้ยงข้อให้เป็นต้นใหม่ การเจริญเป็นรากและการย้ายออกปลูก โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ขั้นสูงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบให้เกิดแคลลัส
1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและพัฒนาเป็นต้นใหม่
1.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักข้อให้เกิดเป็นยอดหลายยอด
1.2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้มีรากที่สมบูรณ์
1.2.5 นำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงงานนี้ดำเนินการขึ้นเพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ต้นของโฮยาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำจากส่วนของใบให้เกิดแคลลัส ชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ ชักนำส่วนข้อให้เป็นต้นใหม่และพัฒนาให้เกิดเป็นรากที่สมบูรณ์ แล้วย้ายออกปลูก

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Hoya* และอยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae เพื่อการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการชักนำให้เกิดแคลลัส พัฒนาให้เกิดยอด และราก จากนั้นจึงนำมาปลูกในสภาวะธรรมชาติ โดยต้องผ่านการปรับสภาพสภาวะให้เหมาะสม โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อการขยายพันธุ์ได้รวดเร็วขึ้น เป็นการอนุรักษ์พันธุกรรม โฮย่าเพื่อสานต่อโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

โฮย่า (Hoya spp.) , แคลลัส (callus), เซลล์แขวนลอย (suspension), การเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ความเป็นมาและข้อมูลทั่วไปของโฮย่า

2.1.1 ความเป็นมาของโฮย่า

โฮย่า หรือ นมตำเลีย อยู่ในสกุล *Hoya* มีชื่อสามัญว่า Wax Flower, Wax Plant, Wax Vine นมพิจิตร นมหนูเนื้อมะต่อม และลิ้นเหี้ย เป็นพืชใบเลี้ยงคู่อยู่ในวงศ์ Apocynaceae (เดิมอยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae) โดย ดร.โรเบิร์ต บราวน์ (Dr. Robert Brown) นายแพทย์ชาวอังกฤษ เป็นผู้ตั้งชื่อสกุลขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2353 เพื่อเป็นเกียรติแด่ Tomas Hoy ผู้ดูแลสวนของดยุคแห่งนอร์ธัม-เบอร์แลนด์ (Duke of Northumberland in England) ซึ่งเป็นผู้ค้นพบและเพาะเลี้ยง โดย Thomas Hoy ได้เดินทางมาสำรวจป่าในแถบเอเชียเพื่อเก็บตัวอย่างพืชและได้พบพันธุ์ไม้ต่างๆรวมถึงไม้เลื้อยชนิดหนึ่งที่มีดอกรูปร่างแปลกตา จึงลองเก็บตัวอย่างพืชชนิดนี้มาปลูกที่ประเทศอังกฤษ ไม้นี้มีการเจริญเติบโตแข็งแรง ออกดอกได้ดีและมีความสวยงามแปลกตา จึงเป็นที่นิยมของคนอังกฤษสมัยนั้น พันธุ์ไม้ชนิดนี้ปลูกเลี้ยงได้ง่าย เมื่อเจริญอยู่ตัวแล้วแทบจะไม่ต้องการการบำรุงรักษาเลย ใบมีอายุหลายปีถ้าได้รับแสงมากใบจะหนาแน่นกว่าปลูกในที่ร่ม การขยายพันธุ์โดยตัดกิ่งชำ นิยมปลูกในกระเช้าหรือปลูกให้เลื้อยตามเสาหรือต้นไม้ใหญ่เป็นไม้ประดับที่นิยมปลูกเลี้ยง โดยโฮย่าต้นแรกที่ถูกตั้งชื่อและถือเป็นต้นแบบของพืชสกุลนี้คือ *H. carnosa* มีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ของประเทศจีนและฮ่องกง

สำหรับสายพันธุ์ที่ค้นพบในประเทศไทยกว่า 40 สายพันธุ์ ส่วนมากจะเป็นสายพันธุ์ป่าโดยมักพบบริเวณป่าดิบชื้นทางภาคใต้ เช่น *H. balaensis* *H. flagellate* และ *H. ellptica* หรือ ป่าดิบเขาทางภาคเหนือ เช่น *H. chinghungensis* *H. engleriana* และ *H. pottsii* เป็นต้น และที่ทั่วโลกให้ความสนใจ คือ การค้นพบโฮย่าชนิดใหม่ *H. litophytica* หรือที่รู้จักกันดีในชื่อโฮย่า อุ้มผาง ที่ป่าอุ้มผาง จ.ตาก โดยโฮย่าชนิดนี้มีจุดเด่น คือ เป็นพืชที่พบเฉพาะในประเทศไทยเพียงแห่งเดียวในโลกและถือว่าเป็นพืชหายาก ใกล้สูญพันธุ์ เพราะตอนที่ไปสำรวจพบโฮย่าชนิดนี้มีจำนวนน้อยเพียง 2 ถึง 3 กอ ขึ้นอยู่ตรงหน้าผาหินที่การพังทลายของหินลงมาตลอด อาศัยตามซอกหิน การค้นพบชนิดใหม่นี้ บ่งชี้ถึงความหลากหลายทางชีวภาพและความสมบูรณ์ของทรัพยากรป่าไม้ในประเทศไทย ซึ่งในอนาคตอาจมีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่ของโฮย่าในประเทศไทยอีกก็เป็นได้

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

โฮย่าเป็นไม้เถาหรือไม้เลื้อยอิงอาศัย ลำต้นยาวทอดเลื้อยพันต้นไม้อื่น ทุกส่วนของต้น มีน้ำยางสีขาวแต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีน้ำยางใสๆเช่น *H. carnosa* ในธรรมชาติโฮย่าเกาะอาศัยกับ กิ่งก้านของไม้ใหญ่ รากชอนไชตามเปลือกไม้เพื่อพยุงต้นไว้และคอยดูดซับความชื้นทำให้พืชชนิดนี้ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดีต่อสภาพขาดน้ำ รากที่ทำหน้าที่คล้ายรากอากาศเกาะยึดกับคบไม้ อิงอาศัยเพื่อพยุงตัวเองและให้ลำต้นได้ทอดเลื้อย ผลเป็นฝักกลมรูปร่างยาวขนาด 8 ถึง 10 เซนติเมตร แต่ละดอกติดผลเป็น 2 ฝัก เมื่อแก่จะแห้งและแตกออกเพียงด้านเดียว ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กเป็นจำนวนมากที่ปลายเมล็ดมีขุยพิเศษหรือที่เรียกว่า coma เป็นพู่ละเอียดสีขาว (รูปที่ 2.1) ช่วยในการขยายพันธุ์ซึ่งเมื่อฝักแตกออกเมล็ดจะลอยไปตามลมตกลงในที่ต่างๆถ้าบริเวณนั้นเหมาะสมมีธาตุอาหารเพียงพอก็จะเจริญเติบโตต่อไป

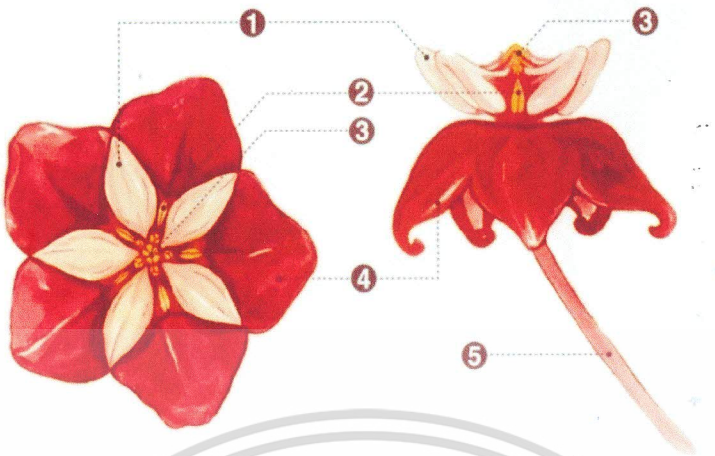
โฮย่าจะมีลักษณะของดอกและใบที่แตกต่างกันมีความสวยงามและลักษณะเฉพาะในแต่ละสายพันธุ์โดยลักษณะของช่อดอกจะเกิดตรงซอกใบ ก้านช่อกลมและแข็ง ออกในแนวระนาบหรือเกือบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนานกับแนวระนาบก้านดอกยาว ดอกออกจากปลายก้านช่อ ออกเป็นช่อแบบซี่ร่มออกมาจากจุดเดียวกันตามข้อใบ ห้อยลง เป็นกลุ่มครึ่งหรือค่อนทรงกลม ขนาดของช่อดอกแตกต่างกันตาม สายพันธุ์มีตั้งแต่ขนาดใหญ่จนถึงขนาดเล็กมาก แต่ละช่อมีดอกย่อยตั้งแต่ 10 ถึง 30 ดอก ดอกมีหลายสีขึ้นกับสายพันธุ์ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 5 กลีบ ตรงกลางของแต่ละดอกมีมงกุฎ 5 อัน หรือที่เรียกว่า corona กลีบหนาคล้ายขี้ผึ้งเป็นมันเงา (Wax plant) หรือบางชนิดมีขนคล้ายกำมะหยี่ปกคลุมหนาแน่น มียอดเกสรเพศเมียอยู่กึ่งกลางล้อมรอบด้วยเกสรเพศผู้ที่มีลักษณะเป็นก้อนเรียกว่า pollinia (รูปที่ 2.2) ออกดอกดกในช่วงปลายฤดูฝนและต้นฤดูร้อน ดอกมีกลิ่นหอมมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ส่วนมากโฮย่าจะหอมมากในเวลากลางคืน ดอกจะบานเพียง 2 วันก็จะร่วงไปแต่ช่อดอกเดิมจะสร้างดอกชุดใหม่ได้หลายครั้ง

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะส่วนต่างๆของต้นโฮย่า 1) ลำต้น 2) ก้านช่อดอก 3) ราก 4) ดอก 5) ใบ 6) ฝัก 7) เมล็ด 8) ขน (coma)
ที่มา : อุไร (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะส่วนต่างๆ ของดอกโฮย่า 1) มงกุฎ 2) เกสรเพศผู้ 3) ยอดเกสรเพศเมีย 4) กลีบดอก 5) ก้านดอก

ที่มา : อุไร (2551)

รูปร่างและขนาดของใบมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในแต่ละท้องถิ่นหรือแต่ละสภาพแวดล้อม เช่น ในที่ร่มใบสีเขียว ถ้าอยู่ในที่สูงหรือได้รับแดดจัดมักจะมีสีม่วงแดงหรือม่วงคล้ำและด้วยใบที่อวบหนามีคิวติน (cutin) เคลือบที่ผิวใบซึ่งช่วยลดการสูญเสียน้ำจากต้นได้ดีจึงสามารถเจริญได้ในสภาพแล้ง แสงแดด นอกจากนี้ยังมีลักษณะแตกต่างกันออกไป (รูปที่ 2.3) ตามสายพันธุ์ซึ่งมีลักษณะดังนี้

2.1.2.1 รูปแถบ (linear) แผ่นใบยาวและแคบ จะยาวมากกว่า 4 เท่าของความกว้างใบ ขอบใบค่อนข้างขนานกันตลอดความยาวของใบ

2.1.2.2 รูปขอบขนาน (oblong) รูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้า ความยาวประมาณ 2 ถึง 3 เท่า ของด้านกว้าง ขอบในขนานกัน ปลายใบและฐานใบมนกลม

2.1.2.3 รูปรี (elliptic) แผ่นใบรูปวงรี อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างเป็น 3 ต่อ 2 ตรงกลางกว้างที่สุดและค่อยๆเรียวลงไปหาฐานใบและปลายใบ

2.1.2.4 รูปใบหอก (lanceolate) ฐานใบกว้างแล้วค่อยๆสอบแคบเข้าไปหาปลายใบ

2.1.2.5 รูปหอกกลับ (oblanceolate) คล้ายกับรูปหอกแต่กลับด้านกันปลายใบกว้าง ฐานใบสอบแคบ

2.1.2.6 รูปไข่ (ovate) ส่วนฐานใบจนเกือบถึงกลางใบแผ่กว้าง หรือความยาว 3 ส่วน ความกว้าง 2 ส่วน

2.1.2.7 รูปไข่กลับ (obvate) คล้ายกับรูปไข่แต่กลับด้านกันปลายใบกว้าง ฐานใบแคบ

2.1.2.8 รูปหัวใจกลับ (obcordate) ปลายใบแผ่กว้างและหยักเว้าเป็น 2 พู แล้วค่อยๆ เรียวแหลมลงไปหาฐานใบ

2.1.2.9 รูปวงกลมหรือเกือบกลม (orbicular) ใบคล้ายวงกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การปลูกและการดูแลรักษา

วัสดุปลูก โฮย่าต้องการความชื้นแต่ไม่แฉะ ควรใช้วัสดุปลูกที่โปร่ง ระบายน้ำดีและสามารถเก็บความชื้นได้ดี ที่นิยมใช้ในเมืองไทยคือ กาบมะพร้าวสับ และรากเฟินชายผ้าสีดำทั้งสองชนิดนี้สามารถดูดซับน้ำและเก็บความชื้นได้ดี ไม่แฉะเกินไป

ภาชนะปลูก ควรปลูกในกระถางแขวน อาจเป็นกระถางดินเผา หรือกระถางพลาสติกก็ได้ เพื่อให้ต้นเลื้อยพัน อาจปลูกเกาะไปกับกิ่งไม้ใหญ่ หรือซุ้มไม้เลื้อยแล้วปล่อยให้เติบโตตามธรรมชาติ

แสงแดด โฮย่าต้องการแสงแดดครึ่งวันในช่วงเช้า ใบจะมีสีเขียวสดไม่หยาบกร้าน หากพื้นที่เพาะปลูกได้รับแสงช่วงบ่ายและได้รับน้ำสม่ำเสมอก็สามารถเติบโตได้ แต่ใบจะมีสีซีดกว่า และถ้าได้รับแสงแดดน้อย กิ่งจะยืดยาวไม่ออกดอก

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะต่างๆของใบโฮย่า
ที่มา : อุไร (2551)

น้ำ ควรรดน้ำวันละครั้งในช่วงเช้า ถ้าวัสดุปลูกแห้งควรรดอีกครั้งในช่วงบ่ายโดยเฉพาะ ฤดูร้อนและฤดูหนาว

ปุ๋ย อาจฉีดปุ๋ยเกล็ดละลายน้ำให้บ้างทุกสองสัปดาห์ หรือปุ๋ยเม็ดละลายช้าทุก 3 เดือน หรือ 6 เดือน ไม่ควรให้ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนสูง เพราะทำให้ต้นผลิใบมาก อวบน้ำ เปราะหักง่าย ไม่จำเป็นต้องให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสสูงเพื่อเร่งดอก เพราะโฮย่าออกดอกเป็นฤดูกาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 โรคแมลงที่มักพบ

2.1.4.1 เชื้อรา เกิดจากความชื้นของเครื่องปลูกมีมากเกินไป ส่วนใหญ่แล้วจะพบในช่วงฤ 0ดูฝนหรือรดน้ำมากเกินไป สังเกตอาการว่าโคนต้นและใบเริ่มเหลือง ใบหลุดร่วง ให้รีบตัดกิ่งที่อยู่เหนือส่วนที่เน่า นำมาปักชำใหม่ ไม่เช่นนั้นทำให้รากเน่าและลุกลามขึ้นไปถึงยอดแต่หากเป็นระยะแรกเริ่มแก้ไขได้โดยการใช้ยากำจัดเชื้อราฉีดพ่น

2.1.4.2 โรคใบจุด เกิดจากเชื้อราชนิด *Phyllosticta Zingiberi* เข้าไปทำลายตั้งแต่ต้นและใบ สามารถป้องกันโดยการฉีดพ่นยาฆ่าเชื้อรา

2.1.4.3 เพลี้ยอ่อน เป็นแมลงปากดูดขนาดเล็กชนิดหนึ่ง โดยจะดูดกินน้ำเลี้ยงตามลำต้น ใบ และดอก ทำให้หงิกงอ ดอกเหี่ยว กำจัดได้โดยการฉีดพ่นด้วยอะบาแมคติน ในอัตราส่วนที่ฉลากระบุ

2.1.5 ตัวอย่างสายพันธุ์ของโฮย่า

2.1.5.1 โฮย่าเคอร์ริอาย (ด่างนอก)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hoya Kerrii Albomarginata*

ชื่อสามัญ Sweetheart Hoya, valentine Hoya

ถิ่นกำเนิด ประเทศในแถบอินโดจีน ในไทยพบตามป่าดิบแล้งทั่วทุกภาค ยกเว้นภาคใต้

ลักษณะ โฮย่าขนาดกลาง ใบรูปหัวใจ ขนาด 5 - 7 เซนติเมตร ปลายใบหยักเว้า ลึก มน โคนใบสอบ แผ่นใบหนาแข็ง ช่อดอกห้อยลง แต่ละช่อมี 10 - 20 ดอก เมื่อบานเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ดอกหันเข้าหากึ่งกลางช่อ กลีบดอกสี เหลืองนวลมีขนนุ่มปกคลุม มงกุฎสีแดงสด เส้าเกสรสีแดงเรื่อ มักปรากฏน้ำหวานอยู่ตามเส้าเกสร มีกลิ่นหอมตอนกลางคืน ออกดอกช่วงปลายฤดูหนาวเข้าฤดูร้อน (รูปที่ 2.4)

สภาพปลูก ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนแล้ง

รูปที่ 2.4 ลักษณะของโฮย่าเคอร์ริอาย

ที่มา : http://www.apodagis.com/asclepiadaceae/hoyas/hoya_species/kerrii_albo-marginata.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

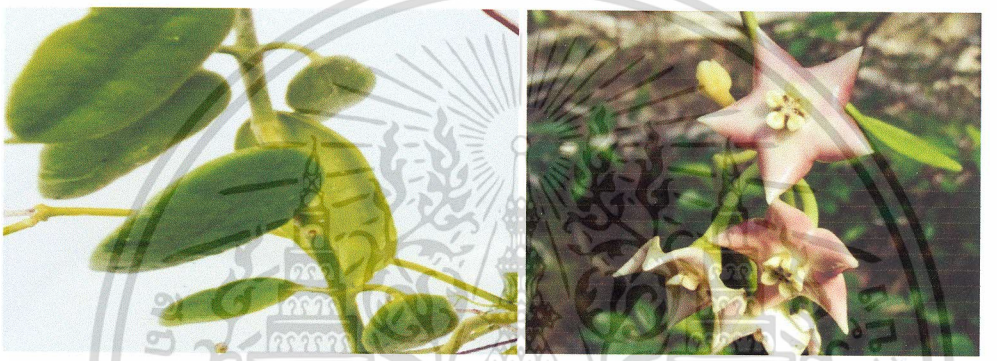
2.1.5.2 โฮย่าโคโรนาเรีย

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hoya coronaria Blume cv. Pink*

ถิ่นกำเนิด ภาคใต้ของไทย มาเลเซีย เกาะชวา บอร์เนียว สุมาตรา และซูลาเวซี

ลักษณะ โฮย่าขนาดกลาง ใบรูปรีแกมรูปขอบขนาน กว้าง 3 - 4 เซนติเมตร ยาว 8 - 12 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม โคนใบสอบ แผ่นใบหนามีขนนุ่มปกคลุมโดยเฉพาะด้านท้องใบ แต่ละช่อให้ดอก 2 - 4 ดอก กลีบดอกแผ่ออกเป็นรูปดาวหนา เมื่อบานเต็มที่เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 - 3 เซนติเมตร สีชมพูอมแดงหรือสีเหลืองอ่อนเป็นมัน มงกุฎสีครีมอมแดง ดอกบานทน มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ออกดอกช่วงปลายฤดูหนาวเข้าฤดูร้อน (รูปที่ 2.5)

สภาพการปลูก ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี



รูปที่ 2.5 ลักษณะของโฮย่าโคโรนาเรีย
ที่มา : http://www.thailandhoyaclub.com/webboard/index.php?topic=446.msg0#new

2.1.5.3 โฮย่าเอ็กคาวาตา

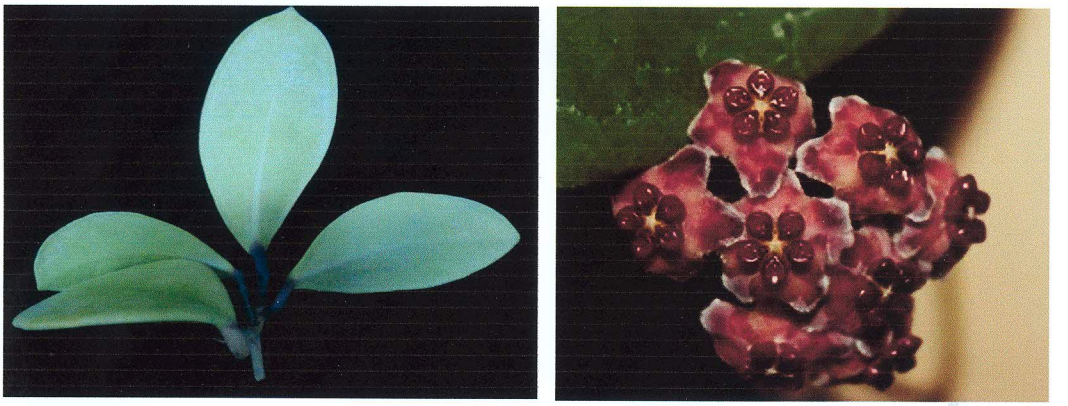
ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hoya excavata*

ถิ่นกำเนิด เกาะบอร์เนียว

ลักษณะ โฮย่าขนาดกลาง ใบรูปไข่ หนา สีเขียวเข้ม กว้าง 6 - 10 เซนติเมตร ยาว 10 - 20 เซนติเมตร ไม่เห็นเส้นใบอย่างชัดเจนและไม่มีเกล็ดใบ กลีบดอกมี 2 ส่วนคือส่วนกลีบดอกสีแดงและกลีบดอกสีชมพู ทั้งสองส่วนมีสีเหลืองแซมเล็กน้อย ลักษณะดอกในช่วงแรกจะค่อนข้างแบน เมื่อบานเต็มที่บริเวณขอบของกลีบดอกจะโค้งงอไปด้านหลังเล็กน้อย มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 - 2 เซนติเมตร มีช่อละ 10 - 25 ดอก ดอกสามารถอยู่ได้ถึง 2 สัปดาห์ สามารถผลิตน้ำหวานได้ค่อนข้างมากแต่ไม่เป็นหยด และมีกลิ่นหอมแรงคล้ายวนิลา (รูปที่ 2.6)

สภาพการปลูก ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



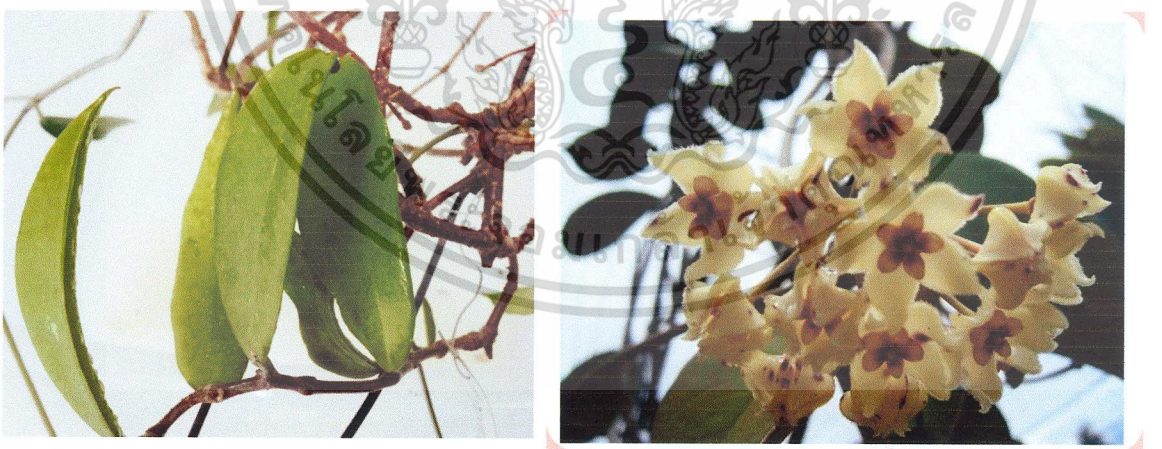
รูปที่ 2.6 ลักษณะของโฮย่าเอ็กคาวาตา
ที่มา : http://www.bloggang.com/mainblog.php?id=darlingtalang&month=04-04-2011&group=20&gblog=16

2.1.5.4 โฮย่ากลาวิโอเลน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hoya Graveolens*

ถิ่นกำเนิด ประเทศไทยตามบริเวณเทือกเขาแถบ ปราจีนบุรี ศรีราชา

ลักษณะ ความแตกต่างของดอก สีของกลีบดอกมีให้ชื่นชมทั้งในแบบสวยปนลายกระและลายจุดสีเข้มแต่งแต้มลงบนกลีบขาวนวล ตอนกลางคืนจะส่งกลิ่นหอมออกคาวเพื่อล่อแมลงให้มาผสมเกสร (รูปที่ 2.7) **สภาพการปลูก** ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี



รูปที่ 2.7 ลักษณะดอกของโฮย่ากลาวิโอเลน
ที่มา : http://www.thailandhoyaclub.com/File/ThailandHoyaClub_V1_2.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.5 โฮย่าโอโบวาตา

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hoya Obovata*

ถิ่นกำเนิด ประเทศอินโดนีเซีย

ลักษณะ เป็นโฮย่าที่เจริญเติบโตได้ง่ายและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ใบมีรูปร่างร่างเกลือบกลม และมีสีเขียวเข้ม ขนาดของใบประมาณ 6 – 10 เซนติเมตรจากเส้นผ่าศูนย์กลาง ดอกมีสีชมพูอ่อน ที่มีโคโรนาสีชมพูเข้ม ผลิตน้ำหวานและมีกลิ่นหอมคล้ายกุหลาบ ดอกเป็นช่อซี่ร่มมีประมาณ 20 – 25 ดอก (รูปที่ 2.8)

สภาพการปลูก ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี

รูปที่ 2.8 ลักษณะของโฮย่าโอโบวาตา

ที่มา : http://www.bloggang.com/mainblog.php?id=darlingtalang&month=04-04-2011&group=20&gblog=16

2.1.5.6 โฮย่าโกลัมโคอาน่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hoya golamcoana*

ถิ่นกำเนิด ฟิลิปปินส์

ลักษณะ โฮย่าไม้เลื้อยทรงพุ่ม ขนาดกลาง ใบสีเขียวเข้ม เห็นเส้นใบอย่างชัดเจน ใบมีขนาดกว้าง 2.5 - 3 เซนติเมตร ยาว 3 - 5 เซนติเมตร ช่อดอกห้อยลง แต่ละช่อมี 10 - 15 ดอก กลีบดอกสีขาว และมีมงกุฎสีแดงแซมขาว มีกลิ่นหอม ดอกบานทนประมาณ 1 สัปดาห์ (รูปที่ 2.9)

สภาพการปลูก ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.9 ลักษณะของโฮย่าโกลัมโคอาน่า
ที่มา : http://www.kasetporpeang.com/forums/index.php?topic=6414.2992

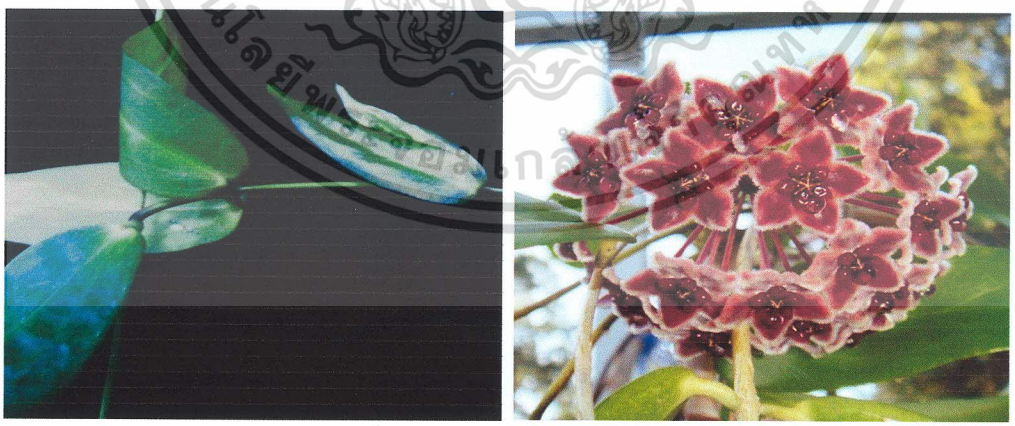
2.1.5.7 โฮย่าโกบูลิเฟอร่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hoya globulifera*

ถิ่นกำเนิด ปาปัวนิวกินี (ค้นพบใน ค.ศ.1850)

ลักษณะ โฮย่าไม้เลื้อยพันธุ์หายาก ใบรูปรี ขนาดกว้างประมาณ 2.5 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 8 เซนติเมตร บริเวณโคนใบมีสีเหลือง ใบมีลักษณะหนา เห็นเส้นใบได้อย่างชัดเจน ดอกสีดำแดง บางครั้งมีสีเทาแดง มีลักษณะค่อนข้างหนา มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร ช่อดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ดอกมีขนสั้นปกคลุมคล้ายกำมะหยี่ มีกลิ่นดอกเล็กน้อย หอมคล้ายวนิลา ดอกบานทน มียางค่อนข้างมาก (รูปที่ 2.10)

สภาพการปลูก ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ชอบความชื้น

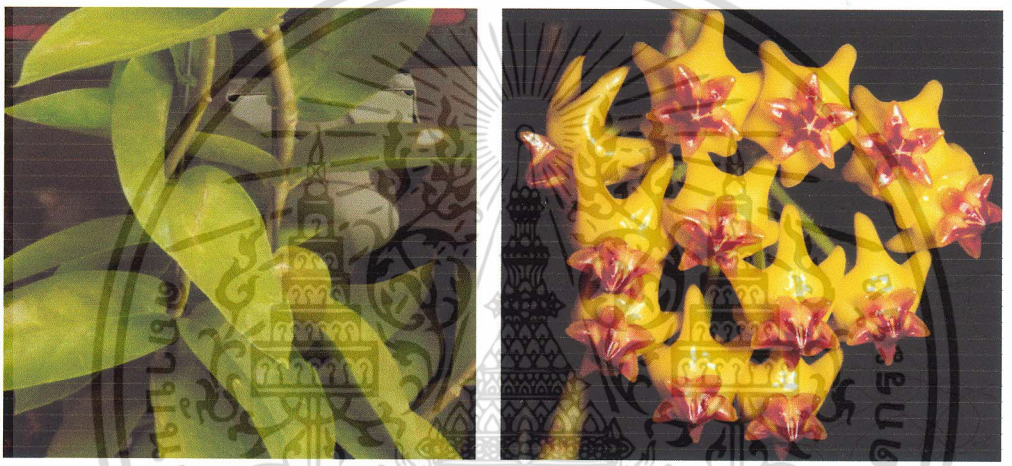


รูปที่ 2.10 ดอกของโฮย่าโกบูลิเฟอร่า
ที่มา : http://srqhoyas.com/CUTTINGS/GM/HoyaGlobuliferaCuttingBrIML1063

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.8 โฮย่าสายพันธุ์เดนสิโฟเลีย

โฮย่า เดนสิโฟเลีย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Hoya densifolia* Turcz. ชื่อสามัญคือ Wax plant, Rope wax flower มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศฟิลิปปินส์ มีลักษณะทั่วไปคือ เป็นไม้เลื้อยขนาดกลาง ลำต้นเป็นเถาเลื้อย กิ่งก้านยาวเก้งก้าง มีน้ำยางสีขาวตามลำต้น ใบเดี่ยว รูปกลมแกมรูปรี ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ แผ่นใบสีเขียว เห็นเส้นกลางใบชัดเจน โคนใบนม ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ขนาดใบกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 3-5 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบ ดอกย่อยมีลักษณะโคนกลีบเชื่อมติดกัน ส่วนปลายแยกออกเป็น 5 กลีบ กลีบดอกงอไปทางก้านดอกด้านหลัง มงกุฎมีสีแดง 5 อัน ดอกสีเขียวแกมเหลือง สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ปลูกเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว ต้องการแสงแดดครึ่งวัน รูปที่ **2.11** (เศรษฐมันตร์, 2553)



รูปที่ 2.11 แสดงลักษณะดอกของ *Hoya densifolia* Turcz.
(http://www.bloggang.com/data/a/alleni/picture/1261588364.jpg)

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

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

2.2.1.1 เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่มีเซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

2.2.1.4 เนื้อเยื่อเจริญอยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

2.2.1.5 เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ได้แก่

2.2.1.5.1 ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อท่ออาหารและ cortex

2.2.1.5.2 ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

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

2.2.1.5.4 ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.5 ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

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

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

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

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

ในปัจจุบันสามารถขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เป็นจำนวนมาก ดังตัวอย่างต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

การปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถสร้างพืชพันธุ์ต่างๆ ได้ตามความต้องการ เช่น การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของพืชให้รอดชีวิตได้ ซึ่งถ้าปล่อยให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตอยู่ในสภาพตามธรรมชาติอาจจะตายได้ เนื่องจากอาหารที่สะสมในเมล็ดมีอยู่ในปริมาณที่จำกัด เช่น เมล็ดกล้วยไม้และ เมล็ดข้าวที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ในปัจจุบันสามารถผลิตลูกผสมระหว่าง apple กับ pear ได้ลูกผสมเป็น appear ลูกผสมระหว่างผักกาดขาว (chinese cabbage) กับ กะหล่ำปลี (cabbage) ได้ลูกผสมเป็นผักกาดกระหล่ำ (hakuran) และลูกผสมไม้ดอกต่างๆ เช่น สร้อยทอง (sodidago) กับ แอสเตอร์ (aster) ได้เป็น sodidester แล้วใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนในอาหารสังเคราะห์เพื่อให้ได้ลูกผสมที่สามารถเจริญเติบโตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในธรรมชาติพืชต่างสายพันธุ์ (species) และต่างสกุล (genus) ไม่สามารถจะผสมพันธุ์กันได้ หรือถ้าผสมข้ามกันได้ก็เกิดขึ้นน้อย แต่การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสามารถรวมลักษณะของพืชที่แตกต่างกัน 2 สายพันธุ์ไว้ในต้นเดียวกันได้ โดยการรวมโพรโทพลาสต์ของพืช (protoplast fusion) ซึ่งอาจใช้สารเคมี PEG หรือการใช้กระแสไฟฟ้าโดยเครื่อง somatic hybridizer หลังจากนั้นนำโพรโทพลาสต์ที่รวมกันแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อให้มีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ก็จะได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะรวมของพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่การทดลองส่วนใหญ่ไม่ค่อยประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากต้องใช้วิธีการ หรือการใช้เทคนิคขั้นสูงที่ซับซ้อนในการพัฒนาโพรโทพลาสต์ และต้องใช้ระยะเวลานานหลายเดือนในการพัฒนาให้กลายเป็นต้นใหม่ ปัจจุบันมีการใช้เครื่องยิงยีนหรืออนุภาคดีเอ็นเอ (particle gun หรือ microprojectile bombardment) ซึ่งสามารถยิงอนุภาคดีเอ็นเอเข้าไปในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อเจริญของพืช รวมทั้งแคลลัส และเซลล์แขวนลอยได้โดยตรง และมีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมาช่วยในการย้ายยีนให้กับส่วนที่เป็นเนื้อเจริญของพืช แคลลัส และเซลล์แขวนลอย ได้เป็นผลสำเร็จโดยไม่จำเป็นต้องใช้โพรโทพลาสต์

2.2.2.3 การผลิตพืชปราศจากโรค (disease-free plants) โดยทั่วไปพืชที่ถูกเชื้อจุลินทรีย์เข้าทำลาย เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย เชื้อไวรัสนี้จะติดไปกับส่วนของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชตลอดเวลาทำให้ไม่สามารถผลิตพืชที่ปราศจากโรคได้ ซึ่งมีผลต่อพืชโดยตรง คือ พืชต้นนั้นจะมีความอ่อนแอ อัตราการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ ผลผลิตต่ำหรืออาจทำให้พืชนั้นตายได้ การผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยการตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด ให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.01-0.05 มิลลิเมตร เพราะบริเวณปลายยอดมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว และต่อเนื่อง การตัดปลายยอดต้องตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไวรัสเคลื่อนตัวตามท่อน้ำ และท่ออาหารไปไม่ถึง เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ก็สามารถที่จะพัฒนาให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และปราศจากเชื้อไวรัส เช่น มะเขือเทศ ยาสูบ เผือก มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นต้น

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยวิธีการที่ถูกต้อง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้ตามชนิดอาหารของพืชชนิดนั้นๆได้

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

2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรงไคมา (parenchyma) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆแคลลัสมีขนาดต่างๆกันหลายรูปแบบมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคคิวโอสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆฉ่ำน้ำ คล้ายกับฟองน้ำ เรียกว่า friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน เนื้อเยื่อพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิต สามารถที่จะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ ยกตัวอย่างเช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ลำต้น ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เมล็ด เรณู แคมเบียม คอร์เทกซ์ และท่อลำเลียงอาหาร เป็นต้น

2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

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

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

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

2.2.4.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะต้องใช้แสงที่มีความเข้มข้นต่ำ หรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.5 สถานะของอาหารที่เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งจะช่วยให้แคลลัสมีพื้นที่สัมผัสอาหารน้อยกว่า

2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตรอาหาร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื้อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆจากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆสามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้ว หรือ ช้อนตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้นควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารต่างๆ แต่ละสูตรจะมีชื่อเรียกต่างๆ กัน ตามชื่อผู้คิดค้น เช่น

White (1943) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ

Vacin และ Went (1949) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

Murashige และ Skoog (1962) ค้นพบสูตร MS เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ

Linsmaier และ Skoog (1965) ค้นพบอาหารสูตร LS

Nitch และ Nitch (1969) ค้นพบสูตรอาหาร NN

Gamborg และคณะ (1968) ค้นพบสูตรอาหาร B_5

Chu (1975) ค้นพบสูตร N_6 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด

Lloyd และ McCown (1980) ค้นพบสูตร WPM เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้เนื้อแข็ง

Driver และ Kuniyuki (1984) ค้นพบสูตร DKW เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวอลนัส

2.2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์

2.2.6.2.1 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีสำคัญมาก มีผลทำให้พืชมีการพัฒนา และเจริญเติบโต มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

2.2.6.2.2.5 กรด2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4,5Trichlorophenoxy acetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2,4,5-T สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_5Cl_3O_3$($Cl_3C_6H_2OCH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 255.48 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

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

2.2.6.2.2.7 กรดพารา-คลอโรฟีนอกซีอะซิติก (p-chlorophenoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อๆ ว่า 4-CPA หรือ PCPA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_7ClO_3$($ClC_6H_4OCH_2COCl$) น้ำหนักโมเลกุล 186.59

2.2.6.2.2.8 กรด 2-แนพทอกซีอะซิติก (2-naphthoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อๆ ว่า NOA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{10}O_3$($C_{10}H_7OCH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 202.21 เป็นผลึกสีเทา สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และกรดอะซิติก

2.2.6.2.2.9 กรด 3,6-ไดคลอโร-ออโท-อะนิสิก (3,6-dichloro-o-anisic acid) หรือ 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid หรือ 3,6-dichloroanisic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า dicamba สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_6Cl_2O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ และอะซิโตน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.2.11 กรดฟีนีลอะซิติก (phenylacetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า PAA สูตรทางเคมี $C_8H_8O_2$ $C_6H_5CH_2CO_2H$ น้ำหนักโมเลกุล 136.15 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ และอีเทอร์

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

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

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

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

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

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

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

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายและเก็บรักษาไว้ในสภาพที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.3.3 กาแลกโทส (galactose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16
2.2.6.2.3.4 ซอบิทอล (sobitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17
2.2.6.2.3.5 แมนนิทอล (mannitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17
2.2.6.2.3.6 ซูโครส (sucrose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30
2.2.6.2.3.7 มอลโทส (maltose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30
2.2.6.2.3.8 ซูคราโลส (sucralose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 397.64

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ตัวทำละลาย	การเก็บ
ออกซิน	Indole-3-acetic acid (IAA)	1N NaOH	0°C
(auxins)	Indole butyric acid (IBA)	1N NaOH	0-5°C
	Naphthaleneacetic (NAA)	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
ไซโตไคนิน	N_6-Benzyladenine (BA)	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
(cytokinins)	Kinetin	1N NaOH	0°C
	Zeatin	1N NaOH	0°C
	N_6-isopentenyl adenine (2iP)	1N NaOH	0°C
สารควบคุมการ	Abscissic acid (ABA)	1N NaOH	0°C
เจริญเติบโตอื่นๆ	Gibeberellic acid (GA)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	Picloram	0.2M KOH	0°C

หมายเหตุ EtOH = Ethanol alcohol
NaOH = Sodium hydroxide
KOH = Potassium hydroxide
N = Normality
M = Molarity

2.2.6.2.5.1 ชนิดและสายพันธุ์ พืชต่างชนิดและสายพันธุ์ ส่วนใหญ่ต่างต้องการธาตุอาหารไม่เหมือนกัน

2.2.6.2.5.2. อายุและระยะการพัฒนา แม้เป็นพืชชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน ถ้าอายุและระยะการพัฒนาต่างกัน ก็อาจต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน

2.2.6.2.5.3. ชนิดของชิ้นส่วนพืช พืชชนิดเดียว หรือแม้กระทั่งต้นเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนของพืชส่วนต่างๆ เช่นใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงจะต้องใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างออกไปจากสูตรที่ใช้เลี้ยงใบหรือราก

2.2.6.2.5.4. เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่มีเป้าหมายของการเลี้ยงต่างกัน จำเป็นต้องใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันด้วย ตัวอย่าง ต้องการเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดก็ใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่ง ที่แตกต่างไปจากสูตรที่ต้องการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือราก

2.2.6.2.5.5. สถานะของอาหาร ชิ้นส่วนพืชเดียวกันที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็ง (solid medium) อาจได้ผลแตกต่างไปจากการเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid medium) หรืออาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium)

2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับขั้นตอนนี้ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอกเป็นต้น โดยจะต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพราะว่าในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ จะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัสแพร่กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และจะตายในที่สุดซึ่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ประสบความสำเร็จ

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โดยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไป พร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆภายในก็จะสูญเสียไปด้วย สารเคมีสามารถทำปฏิกิริยากับสารในไซโตพลาสซึม จะมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ หรือสารเคมีสามารถจับกับโปรตีนในเอนไซม์ และโปรตีนเสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจะต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

2.2.7.1 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีเปอร์เซ็นต์ความปลอดจุลินทรีย์สูง

2.2.7.2 สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว

2.2.7.3 สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว ไม่ควรมีสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์

2.2.7.4 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

2.2.7.5 ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้

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

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

2.2.8.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3-12 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-15 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

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

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

2.2.8.6 ซิวเวอร์ไนเทรต ($Ag(NO_3)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8.7 สารละลายไอโอดีน (Iodine solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

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

2.3.8.9 เมอคิวริไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.10 เมอคิวริโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

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

2.2.8.12 กรดกัมมะถันหรือกรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 20-70 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.13 เบนโซโคเมียมคลอไรด์ (benzalkonium chloride) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

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

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

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Hoya* และในวงศ์ Asclepiadaceae เพื่อขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการชักนำให้เกิดแคลลัส พัฒนาให้เกิดยอด และราก จากนั้นจึงนำมาปลูกในสภาวะธรรมชาติ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพอสรุปได้ดังนี้

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

สมัชชา และ สมปอง (2544) ศึกษาการแยกโพรโทพลาสต์ จากชิ้นส่วนต่างๆ ของนมตำเลีย (*Hoya* spp.) ด้วยสารละลายเอนไซม์ชนิดต่างๆ และความเข้มข้นต่าง ๆ และทำการแยกบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน สามารถแยกโพรโทพลาสต์ ได้ จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าเอนไซม์ cellulase R-10 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ macerozyme R-10 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโพรโทพลาสต์ ได้ 2.22 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีการรอดชีวิตสูงสุด 93.72 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถแยกโพรโทพลาสต์ ได้ 1.64 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตสูงสุด 91.91 เปอร์เซ็นต์ แหล่งของชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม คือ ใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถแยกโพรโทพลาสต์ ได้สูงสุด 1.79 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีการรอดชีวิตสูงสุด 92.22 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงแบบผังในอาหารกึ่งแข็งโดยใช้ไฟตาเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้โพรโทพลาสต์แบ่งเซลล์สูงสุด 8.19 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1.0 โพรโทพลาสต์ ต่อมิลลิลิตร สามารถแบ่งเซลล์ได้สูงสุด 11.83 เปอร์เซ็นต์ โพรโทพลาสต์แบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-5 วัน สามารถพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (4-10 เซลล์) หลังการเพาะเลี้ยง 10-14 วัน และพัฒนาเป็นแคลลัสขนาดเล็กที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน การย้ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการเลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนใบของต้นโฮย่า แล้วตรวจสอบกิจกรรมของ GUS พบว่า อะโกรแบคทีเรียม เชื้อสายพันธุ์ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTOK233 เป็นองค์ประกอบ มีประสิทธิภาพการปลูกย้ายยีนสูงสุดที่ 94.4 เปอร์เซ็นต์ โดยพบกิจกรรมของ GUS 6.8 จุดต่อตัวอย่าง รองลงมาคือเชื้อสายพันธุ์ EHA101 ซึ่งมี พลาสมิด pIG121 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงที่สุด 77.8 เปอร์เซ็นต์ โดยพบกิจกรรมของ GUS 5.2 จุดต่อตัวอย่าง และเชื้อสาย พันธุ์ LBA4404 ซึ่งมี พลาสมิด pBI121 มีประสิทธิภาพการย้ายยีน 9.1 เปอร์เซ็นต์ โดยพบกิจกรรมของ GUS 1 จุดต่อตัวอย่าง

Khan และคณะ (2002) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดของ *Bixa orellana* L. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่สูงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5.0 มิลลิโมลาร์ และ BA 2.5 มิลลิโมลาร์ ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ในที่มืดตลอดเวลา สามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่าในที่สว่างสลับกับที่มืด หรือที่สว่างตลอดเวลา และการพัฒนาแคลลัสไปเป็นยอดที่ดีที่สุดในอาหารที่เติม BA 10.0 มิลลิโมลาร์ และ NAA 5.0 มิลลิโมลาร์ และวัดความยาวยอดได้ 4 เซนติเมตร ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

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

Alina และคณะ (2008) ศึกษาการขยายพันธุ์ของ *Carlina acaulis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ คือ BA Kinetin และ Zeatin ร่วมกับ NAA พบว่าในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ สามารถเกิดยอดมากที่สุด แต่มีความยาวยอดต่ำกว่าในอาหารที่เติม Kinetin และ Zeatin และสามารถพัฒนาการเกิดรากในอาหารสูตร MS ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และเกิดรากในอาหารแข็งสูตร MS ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง55.3 เปอร์เซ็นต์

Ahmad และคณะ (2009) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนของใบของ *Ruta graveolens* L. เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4,5-T ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ การชักนำให้เกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 70.6±2.33 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปชักนำให้เกิดยอด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 92.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 7.5 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ และสามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุดในการเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

Lakshmi และคณะ (2009) ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ของ *Hoya wightii* ssp. *palniensis* ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae และเป็นพืชประจำถิ่นของรัฐทมิฬนาฑูของประเทศอินเดียที่มีความอ่อนแอสูง จึงต้องมีการศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยสังเกตการเพาะเลี้ยงปลายยอดของชิ้นพืชลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินคือ Kinetin BA 2-iP และ TDZ ในความเข้มข้นต่างๆ และทดสอบในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินคือ IBA IAA และ NAA ในความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินที่เหมาะสมที่สุด จากการทดลองก่อนหน้า พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอดในกลุ่มไซโตไคนินคือ Kinetin 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA 1.47 ไมโครโมลาร์ และกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณที่เหมาะสมที่สุดคือการเติม และชักนำให้เกิดรากในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA 0.98 ไมโครโมลาร์ จากนั้นย้ายลงไปปลูกในสภาวะควบคุม พบว่ามีโอกาสรอด 56 เปอร์เซ็นต์

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

1) *Hoya kerrii*

2) *Hoya densifolia*

สายพันธุ์ Hoya จากแปลงทดลองส่วนพระองค์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)

3.1.2.2 อาหารผงสำเร็จสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1962)

3.1.2.3 ผงวุ้นเจลแลนกัม

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

3.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.1.3.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)

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

3.1.3.1.2 Indole-3-butyric acid (IBA)

3.1.3.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)

3.1.3.2.1 N6-benzylaminopurine (BA)

3.1.3.2.2 kinetin

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)

3.1.4.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)

3.1.4.3 ตู้อบความร้อน (hot air oven)

3.1.4.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และหยาบ (balance)

3.1.4.5 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.1.4.6 เครื่องเขย่า (shaker)

3.1.4.7 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)

3.1.4.8 ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.1.4.9 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beaker)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.12 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรีย และกระดาษกรองแบคทีเรียขนาด 0.2 ไมครอน

3.1.4.13 มีดผ่าตัดขนาดต่างๆ (knives)

3.1.4.14 ช้อนตักสาร (spectula)

3.1.4.15 ปากคีบขนาดต่างๆ (forcept)

3.1.4.16 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4.17 เวอร์เนียร์ (Vernier caliper)

3.1.4.18 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.1.4.19 ทิปขนาดต่าง ๆ (tip

3.1.4.20 กระดาษฟรอยด์ (aluminium foil)

3.1.4.21 กล้องถ่ายภาพดิจิตอล กล้องสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.4.22 กระถาง ดิน ปุ๋ย และ ยาฆ่าแมลง

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

นำชิ้นส่วนใบของต้นโฮย่าสายพันธุ์ *kerrii* และ *densifolia* มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวใบโดยล้างด้วยน้ำเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้น จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนของใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแข็งสูตร MS ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 20-30 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มืด ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตโดยวัดขนาดความกว้างและยาวเพื่อนำมาหาพื้นที่หน้าตัดของแคลลัส ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

นำแคลลัสของโฮย่าสายพันธุ์ *densifolia* ที่ได้จาก 3.2.1 มาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.8 เซนติเมตรโดยเฉลี่ย เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งหมด 4 สูตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH 5.6-5.8 (ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก) นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแข็งสูตร MS ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตโดยนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 6 8 และ10 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

นำชิ้นส่วนข้อของต้นโฮย่าสายพันธุ์ *densifolia* มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ข้อโดยล้างด้วยน้ำเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้น จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนของข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดแล้ว นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแข็งสูตร MS ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตเป็นจำนวนยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ8 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ

3.2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก

นำชิ้นส่วนต้นอ่อนโฮย่าสายพันธุ์ *densifolia* มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแข็งสูตร MS ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตเป็นจำนวนราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์

3.2.5 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

คัดเลือกต้นที่สมบูรณ์คือมีต้นที่สมบูรณ์มียอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำต้นพืชออกจากขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็นดินที่ใช้สำหรับการเพาะปลูก รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 3-7 วัน เพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

จากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ของโฮย่า 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *kerrii* และ *densifolia* พบว่า สูตรอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D แต่ละความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตกลายเป็นแคลลัสได้ ซึ่งแคลลัสจะเริ่มเจริญจากส่วนขอบใบ และจะเจริญเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง

การชักนำให้เกิดแคลลัสของ *H. Kerrii* โดยทำการวัดขนาดของแคลลัสในลักษณะ กว้าง × ยาว ผลที่ได้ แคลลัสจะมีขนาดใหญ่มากขึ้น ในแต่ละสัปดาห์ตามลำดับ ในระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 4.1) และนำค่าขนาดของแคลลัส มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด แคลลัสมีขนาดพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 147.65 ตารางมิลลิเมตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ และแคลลัสมีขนาดพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 184.27 ตารางมิลลิเมตร ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ รูปที่ 4.1 และ รูปที่ 4.2 ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Romana (2013) สามารถชักนำแคลลัสจากส่วนของใบของ *H. kerrii* ได้จำนวนมาก ที่ 2,4-D ความเข้มข้นของ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปในสัปดาห์ที่ 10 อัตราการเพิ่มขนาดของแคลลัส เริ่มมีแนวโน้มลดลง เพราะแคลลัสของใบบางส่วนกลายเป็นสีน้ำตาล

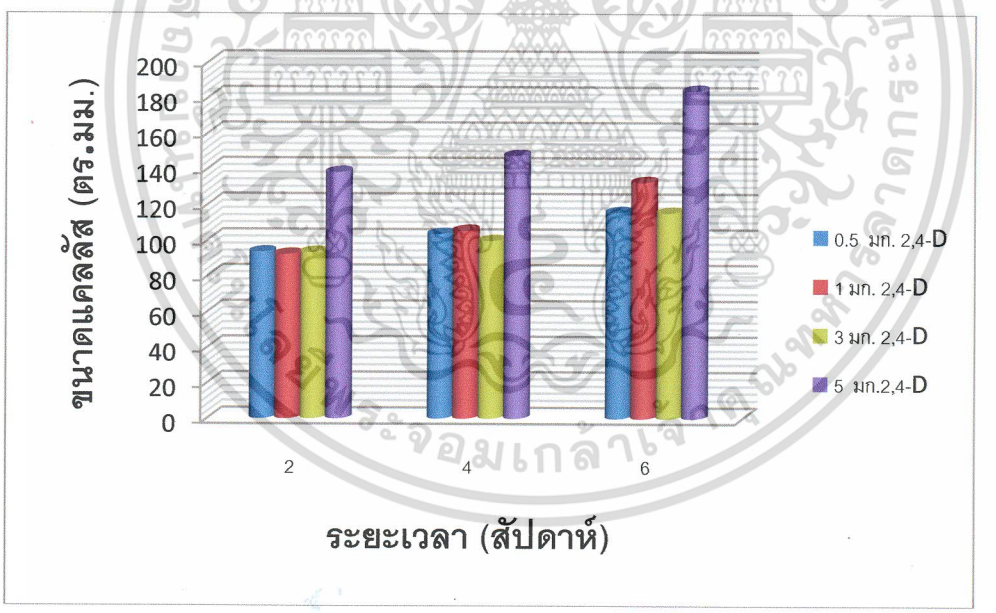
การชักนำให้เกิดแคลลัสของ *H. densifolia* พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของใบเกิดแคลลัสมีขนาดพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.47.32 ตารางมิลลิเมตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ และแคลลัสมีขนาดพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 215.33 ตารางมิลลิเมตร ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ตารางที่ 4.2 รูปที่ 4.2 และ รูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นใน *H. kerrii* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบใน อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์

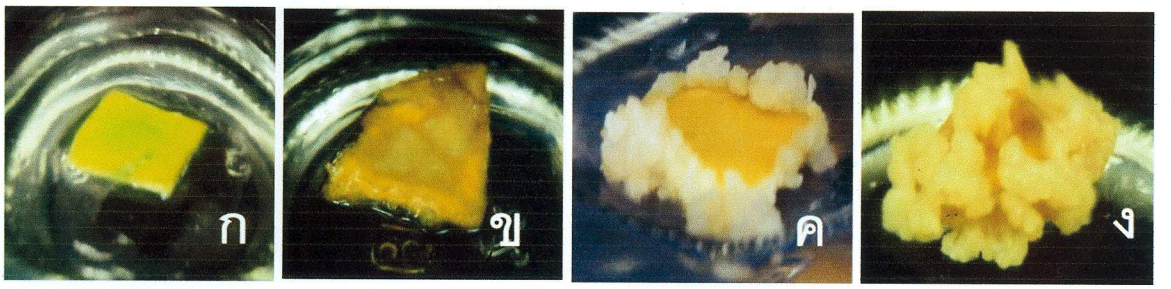
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มก./ลิตร)	จำนวนชิ้นใบทั้งหมด (ชิ้น)	ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัส (ตร.มม.) ระยะเวลา (สัปดาห์)		
		2 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์
0.5	20	93.56[b]	103.70[ab]	115.90[ab]
1	20	92.22[b]	105.45[ab]	132.70[ab]
3	20	93.37[b]	99.80[b]	115.54[b]
5	20	138.24[a]	147.65[a]	184.27[a]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยของแคลลัสสายพันธุ์ *H. kerrii* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบบน อาหารแข็ง สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรใน แต่ละสัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



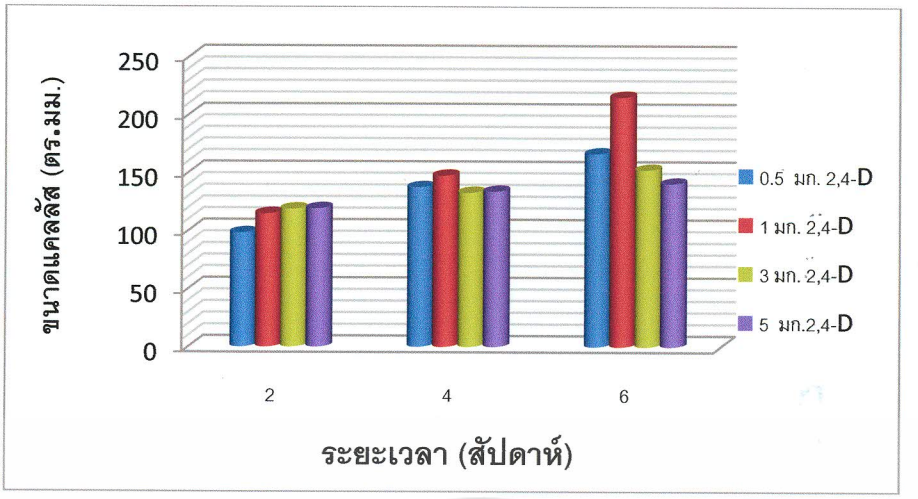
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะการเจริญเป็นแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *H. kerrii* และ *H. densifolia* บนอาหาร แข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัม ต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 0 (ก) 2 (ข) 4 (ค) และ 6 (ง) สัปดาห์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นใน *H. densifolia* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มก./ลิตร)	จำนวนชิ้นใบทั้งหมด (ชิ้น)	ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัส (ตร.มม.) ระยะเวลา (สัปดาห์)		
		2 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์
0.5	30	98.39[b]	137.54[a]	166.49[b]
1	30	114.75[a]	147.32[a]	215.33[a]
3	30	118.74[a]	132.70[a]	152.42[b]
5	30	119.19[a]	133.80[a]	140.68[b]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยของแคลลัส *H. densifolia* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรใน ในระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ

4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดจากแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร โดยทำการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นแล้วนำมาหาจำนวนยอดเฉลี่ย เป็นระยะเวลา 4 6 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ

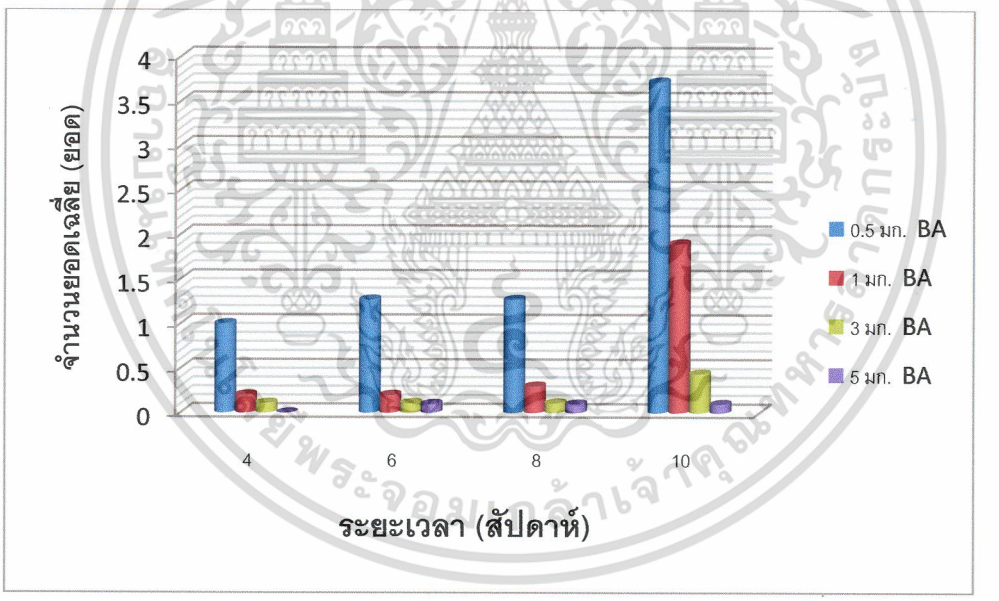
จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของโฮย่า สายพันธุ์เดนซิโฟเลีย ในระยะเวลา 2 สัปดาห์แรกจะไม่พบการพัฒนาเป็นยอดเกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงต่อมาจะพบการพัฒนาเป็นจุดเขียวมากขึ้นที่เพิ่มขึ้นมาตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 10 พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของจุดเขียวที่จะพัฒนาเป็นยอดจากแคลลัสได้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.72 ยอด (ตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.4 รูปที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำแคลลัส *H. densifolia* บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 6 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ

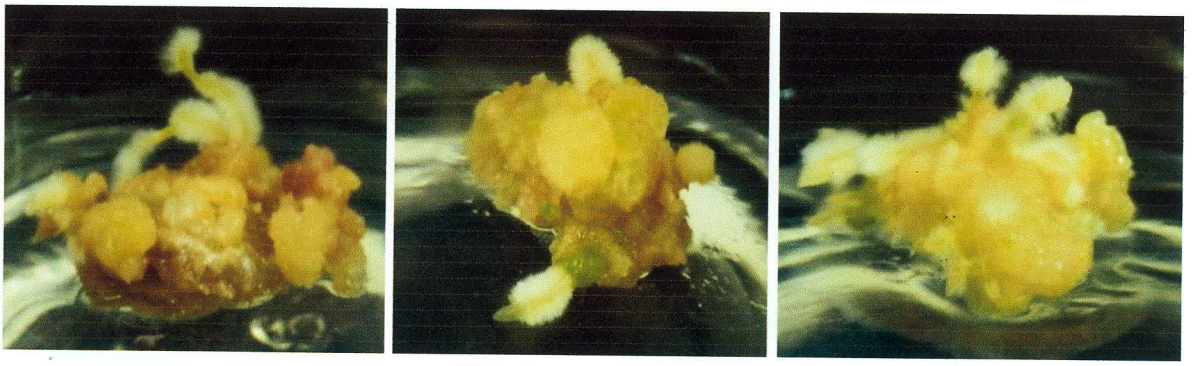
BA ความเข้มข้น (มก./ลิตร)	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	จำนวนยอดเฉลี่ย (สัปดาห์)			
		4	6	8	10
0.5	10	1^{a}	1.27^{a}	1.27^{ab}	3.72^{a}
1	10	0.2^{a}	0.2^{a}	0.3^{b}	1.9^{ab}
3	10	0.11^{a}	0.11^{a}	0.11^{b}	0.44^{b}
5	10	0^{a}	0.1^{a}	0.1^{b}	0.1^{b}

หมายเหตุ $^{a-b}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 6 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



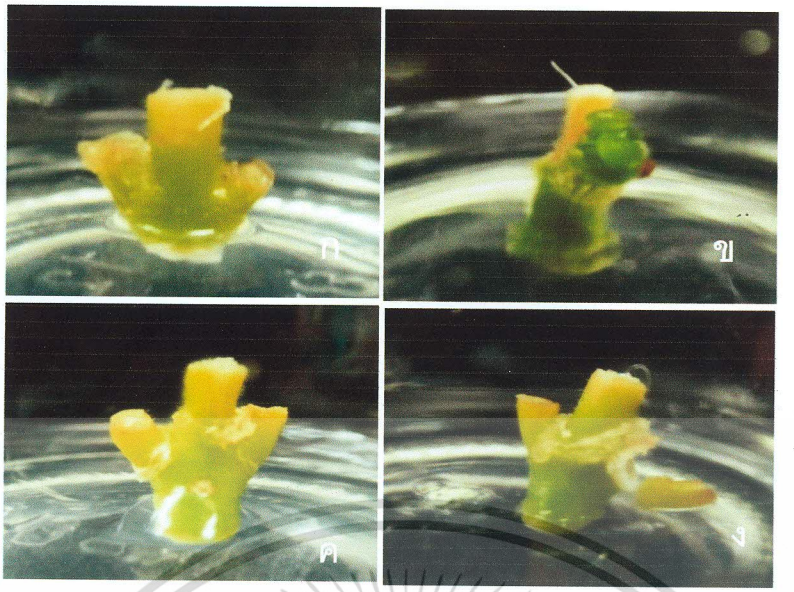
รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะการเกิดยอดจากการชักนำแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

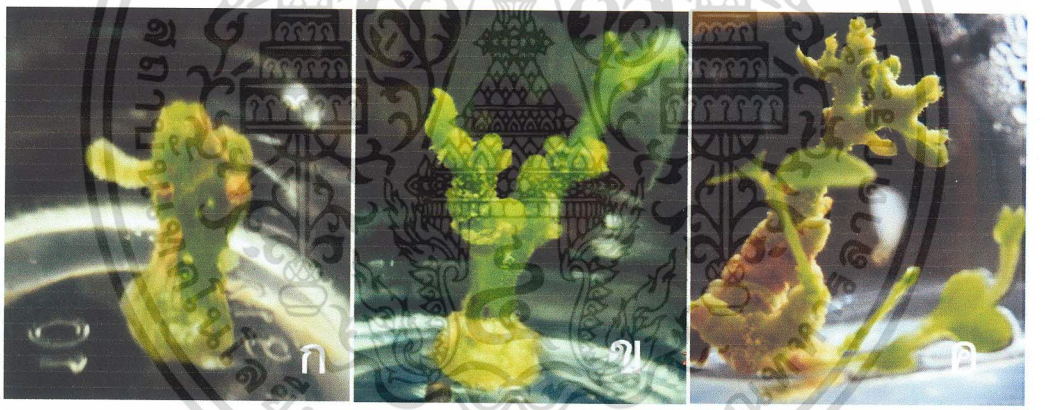
นำชิ้นส่วนข้อของต้นโฮย่าสายพันธุ์ *densifolia* มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ข้อโดยล้างด้วยน้ำเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้น จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนของข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดแล้ว นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแข็งสูตร MS ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตเป็นจำนวนยอดภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ8 สัปดาห์

จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อพบว่าในระยะเวลา 2 สัปดาห์ แคลลัสเริ่มมีการพัฒนาเป็นจุดเขียวตามบริเวณข้อ รูปที่ 4.6 และมีการพัฒนาเจริญเติบโตมากขึ้นตามลำดับ โดยในทุกสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนากลายเป็นต้นใหม่ได้ทุกความเข้มข้นของอาหาร และในอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนากลายเป็นต้นใหม่ได้มากที่สุดในระยะเวลา 8 สัปดาห์ รูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเพาะเลี้ยงส่วนข้อในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 (ก) 1(ข) 3 (ค) และ 5 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์



รูปที่ 4.7 การเพาะเลี้ยงส่วนข้อในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

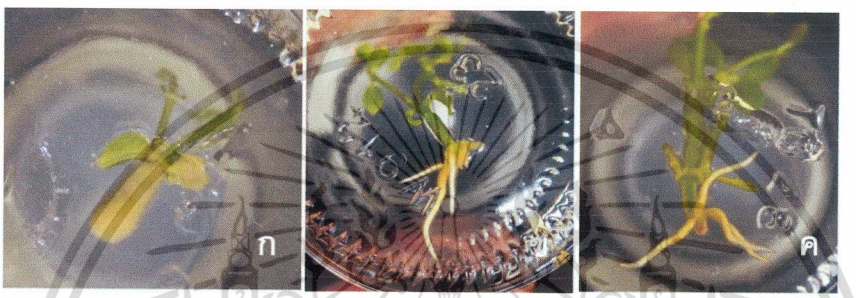
4.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเร่งการชักนำต้นให้เจริญเป็นราก

ตัดส่วนยอดอ่อนที่ได้มาจาก 4.3 นำต้นโฮย่าสายพันธุ์ *densifolia* มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.3 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแข็งสูตร MS ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตเป็นจำนวนราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์

จากการทดลองพบว่า ต้นสามารถเจริญเติบโตได้ โดยมีการยืดยาวมากขึ้น และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยหลังจาก 2 สัปดาห์ รากเริ่มงอกออกจากบริเวณส่วนโคนของต้น และการเจริญของต้นและรากมีการเจริญมากขึ้นตามช่วงระยะเวลา ในทุกสูตรอาหาร รูปที่ 4.8 และรูปที่ 4.9 และพบว่าสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.3 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเป็นต้น และเจริญเป็นราก ทุกสูตรอาหาร และสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญต้น และของรากมากที่สุด รูปที่ 4.10



รูปที่ 4.8 การเจริญเป็นรากในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 (ก) 4 (ข) 6 (ค) สัปดาห์ ตามลำดับ

รูปที่ 4.9 การเจริญเป็นต้น และรากในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น เข้มข้น 0.3 (ก) 0.5 (ข) 1 (ค) และ 3 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.10 การเจริญเป็นต้น และรากในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 (ก) 0.5 (ข) 1 (ค) และ 3 (ง) มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

4.5 การย้ายออกปลูกการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

หลังจากชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ รูปที่ 4.11 ก แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงรูปที่ 4.11 ข ล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรารูปที่ 4.11 ค จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็นดินที่ใช้สำหรับการเพาะปลูกรูปที่ 4.11 ง รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 10 วัน รูปที่ 4.12 จ เพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ

รูปที่ 4.11 ขั้นตอนการย้ายปลูก นำต้นที่สมบูรณ์จากขวดเพาะเลี้ยง (ก) เปิดขวดออก (ข) นำต้นมาแช่ในน้ายาฆ่าเชื้อ (ค) ปลูกต้นลงในดิน (ง) ใช้ถุงพลาสติกคุมเพื่อรักษาความชื้น (จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การชักนำให้เกิดแคลลัสของ *H. Kerrii* โดยทำการวัดขนาดของแคลลัสในลักษณะ กว้าง × ยาว พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด แคลลัสมีขนาดพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 184.27 ตารางมิลลิเมตร

ในแคลลัสของ *H. densifolia* ในการเพาะเลี้ยงสัปดาห์ที่ 6 พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของใบเกิดแคลลัสมีขนาดพื้นที่หน้าตัดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 215.33 ตารางมิลลิเมตร

พบว่าการเกิดยอดของ *H. densifolia* อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของจุดเขียวที่จะพัฒนาเป็นยอดจากแคลลัสได้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.72 ยอด

การเกิดเป็นยอดใหม่จากส่วนของข้อสามารถเกิดได้มากที่สุดในอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

การเจริญของต้นและรากของ *H. densifolia* พบว่าสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญต้น และของรากมากที่สุด

ต้นที่สมบูรณ์ของ *H. densifolia* สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้สำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม นิลาวรรณ ทรงครุฑ พรรณิภา เรืองเชื้อเหมือน พัชรา เพ็ญไพจิตร์ และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. 2557. การเจริญเป็นแคลลัสและการเจริญของเซลล์แขวนลอยของ *Hoya kerrii* ว. วิทย์. กษ. 45(2)(พิเศษ): 181-184.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วารสาร ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 45 ฉบับที่ 2 (พิเศษ) พฤษภาคม-สิงหาคม 2557 Vol.45 No.2 (Suppl.) May-August 2014

การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 8

1 การสกัดเส้นใยอาหารจากเปลือกข้าว
กุลนิภา ธนรุ่งรังสี ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และ อรพิน เกิดชูชื่น

5 ผลของเชื้อเห็ดตับเต่าต่อการเติบโตทางกิ่งใบของพริกขี้หนู 'เทวี 60'
สุกัญญา บุญทา ประภาพร ตั้งกิจโชติ และ กวิศร์ วานิชกุล

9 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไนเตรทของผักกาดฮ่องเต้ที่ปลูกในระบบ Nutrient Film Technique (NFT)
ศักดิ์สิทธิ์ บุญดำ และ ปริยานุช จุลกะ

13 การต้านโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากผักใบเปรี้ยวพื้นบ้านของไทย
อุทัยวรรณ สุทธิศันสนีย์ พุทธชา สอนจันทร์ และ กัลยารัตน์ เครือวัลย์

17 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสจากสารสกัดใบแปะตำปึง โดยวิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว
ไตรวุฒิ พันธุ์โยธา วรางคณา ศรีจำนงค์ ชลัท ศานติวรางคณา นัฐพล ตั้งสุภูมิ และ อุทัยวรรณ สุทธิศันสนีย์

21 การลดความเปรี้ยวของไวน์สับปะรดด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์การค้า และออโตโคนัสไอโซเลท
กนกวรรณ ทองแม้น ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และ ภาวินี ดีแท้

25 ผลของการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดแกลลิก
อัญชนา อินสวาสดิ์ เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และ ธนจันทร์ มหาวนิช

29 การเปลี่ยนแปลงสีและเนื้อสัมผัสระหว่างการเก็บของกล้วยตากที่บรรจุในซองเมทัลไลซ์
อรสา สุริยาพันธ์ และ ธัญญาภรณ์ บอนแดง

33 คุณภาพทางเคมีและประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มชาพร้อมบริโภคจากเปลือกส้มโอ
นันท์ชนก นันทะไชย กมลวรรณ จ้างมีศิลป์ พิมพ์ชนก สุขสมบุญ และ พัตราภรณ์ แก้วศรี

37 ผลของอุณหภูมิอบแห้งต่อคุณภาพของส้มแขกแห้ง
สุธีรา เสาวภาคย์ ธรรมรัตน์ สัมมะวัฒนา และ ศิริพร อาจณรงค์

41 การศึกษาส่วนผสมที่เหมาะสมสำหรับเครื่องดื่มชาเปลือกส้มโอพร้อมบริโภค
นันท์ชนก นันทะไชย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

153 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบต้ากลูแคนจากข้าวเหนียวดำ
พัตราพร จอมเมืองบุตร

157 การสกัดและลักษณะน้ำมันจากเมล็ดองุ่นไทยที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือสภาวะวิกฤต
จิระวัฒน์ เอี่ยมวัฒน์ ปารมี เพ็งปรีชา ภัทรนันทร์ กมลนัทธ์ และ กนกวรรณ ไพรพนาพงศ์

161 สมบัติทางกายภาพเคมีและการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสของใบกะเพราผสมในขนมปัง
เสาวนีย์ เอี้ยวสกุลรัตน์

165 การใช้สตาร์ชเมล็ดขนุนดัดแปรในการผลิตแผ่นแป้งฮะเก๋า
จิรนาถ บุญคง

169 สมบัติของฟลาวร์มันมือเสือและการใช้ทดแทนแป้งสาลีในโดนัทยีสต์
สุมลรัตน์ อัมพวัน จันทร์สมร สายศรี และ อโนชา สุขสมบูรณ์

173 อิทธิพลของระยะปลูกต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของต้นเฉาก๊วย
กฤษณา บุญศิริ ลักษณาพร มีสำราญ และ สุเมธ อินเฉลิม

177 อุปกรณ์ปรับแรงดันสำหรับระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลงสำหรับ ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้แบบ Temporary Immersion Bioreactor
ปรีดาวรรณ ไชยศรีชลธาร ชูศักดิ์ ชวประดิษฐ์ อนุชิต ฉ่ำสิงห์ สุภัทร หนูสวัสดิ์ และ ประภาพร ฉันทานุมัติ

181 การเจริญเป็นแคลลัสและการเจริญของเซลล์แขวนลอยของ *Hoya kerrii*
อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม นิลาวรรณ ทรงครุฑ พรรณิภา เรืองเชื้อเหมือน พัชรา เพ็ญไพจิตร์ และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ

185 ผลของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิดต่อการงอกและการแบ่งเซลล์ของข้าววัชพืช
จุฑามาศ ศุภพันธ์ และ วีระเกียรติ ทรัพย์มี

189 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้ตัวเร่งออกไซด์ผสมแคลเซียมซิงค์ออกไซด์, ตัวเร่งปฏิกิริยาแคลเซียมออกไซด์และซิงค์ออกไซด์
ยุทธการ บุญยืน รัตนชัย ไพรินทร์ และ เก้ากันยา สุดประเสริฐ

193 การเพิ่มสารแอนโทไซยานินในผลตะขบด้วยการออสโมซิสในน้ำกระเจี๊ยบ
อรสา สุริยาพันธ์ รุ่งทิพย์ อินทสังข์ และ กนกพร รังสรรค์

197 ความคิดเห็นของเกษตรกรที่มีต่อการผลิตข้าวตามระบบการจัดการคุณภาพ การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (จี เอ พี) อำเภอบ้านแพรก จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
พัชระ อุ่นทรัพย์ และ สุพัตรา ศรีสุวรรณ

201 ผลของเชื้อเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ต่อการเจริญเติบโตของข้าวอินทรีย์
อรรจนา ด้วงแพง วิทวัส อ่อนบำรุง และ ชรินทร์ ธวันธา

205 ผลของการใช้ถั่วแลบแลบ 4 ชนิดเพื่อปรับปรุงสมบัติบางประการของดินลูกรัง
วิมลนันทน์ กันเกตุ ชื่นจิต แก้วกัญญา และ ชื่นนภา หนันแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเป็นแคลลัสและการเจริญของเซลล์แขวนลอยของ *Hoya kerrii*

Callus Induction and Growth Curve of Cell Suspension Culture of *Hoya kerrii*

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] นิลาวรรณ ทรงครุฑ[1] พรรณิภา เรืองเชื้อเหมือน[1] พัชรา เพ็ญไพจิตร์[1] และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ[2]

Poeaim, A.[1], Songkrut, N.[1], Rueangchueamuean, P.[1], Penpaijit, P.[1] and Krajangvuthi, T.[2]

Abstract

Tissue culture of *Hoya kerrii* leaves cultured on solid MS medium supplemented with different concentration of 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2, 4-D and 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel, in the dark conditions for 6 weeks was investigated. Results show the calli, with the mean value of the largest size at184.27 mm^2were induced by 5 mg/l 2,4-D. For the growth curve of cell suspension, we studied on *H. kerrii* was cultured into liquid MS medium containing with 3 mg/l 2,4-D and 30 g/l sucrose for one month. The results showed that, the best cell suspension growth at 12-21 days which fresh weight and dry weight 0.3487 and 0.0149 g/10 ml respectively. Viability of suspension cells was determined by the method of fluorescein diacetate for 30 days. Suspension cells were life of cells green fluorescence for living cells.

Keywords: *Hoya kerrii*, callus induction, growth curve, cell suspension

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบของ *Hoya kerrii* บนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นระยะเวลาเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าที่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 184.27 ตารางมิลลิเมตร การศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย *H. kerrii* ในสูตรอาหารเหลว MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วงวันที่ 12-21 สามารถชั่งน้ำหนักเซลล์สดและน้ำหนักเซลล์แห้งได้เท่ากับ 0.3487 และ 0.0149 กรัม ต่ออาหารเหลว 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำเซลล์แขวนลอยอายุ 30 วัน ศึกษาการมีชีวิตของเซลล์โดยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต พบว่าจะมีการเรืองแสงสีเขียวสำหรับเซลล์ที่มีชีวิต

คำสำคัญ: การชักนำแคลลัส กราฟการเจริญเติบโต เซลล์แขวนลอย

คำนำ

โฮย่า หรือ นมตำเลีย จัดอยู่ในสกุล *Hoya* มีชื่อสามัญว่า Wax Flower, Wax Plant, Wax Vine มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น นมพิจิตร นมหนูเนื้อมะต่อม และลิ้นเหี้ย เป็นพืชใบเลี้ยงคู่อยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae พันธุ์ไม้นี้นิยมใช้เป็นไม้ประดับ สามารถปลูกเลี้ยงได้ง่าย ขยายพันธุ์โดยตัดกิ่งชำ นิยมปลูกในกระเช้าหรือปลูกให้เลื้อยตามเสาหรือต้นไม้ใหญ่ สำหรับสายพันธุ์ที่ค้นพบในประเทศไทยมีมากกว่า 40 สายพันธุ์ ส่วนมากจะเป็นสายพันธุ์ที่มักพบบริเวณป่าดิบชื้นทางภาคใต้ เช่น *H. balaensis*, *H. flagellate* และ *H. ellptica* หรือ ป่าดิบเขาทางภาคเหนือ เช่น *H. chinghungensis H. engleriana* และ *H. pottsii* เป็นต้น ส่วน *Hoya Kerrii* ชื่อสามัญ sweetheart hoya, valentine hoya ถิ่นกำเนิดในประเทศแถบอินโดจีน ในประเทศไทยพบตามป่าดิบแล้งทั่วทุกภาค โดยใบมีรูปหัวใจ ปลายใบหยักเว้า ลึก มน โคน ใบสอบ แผ่นใบหนาแข็ง ช่อดอกห้อยลง เมื่อบานเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ดอกหันเข้าหากึ่งกลางช่อ กลีบดอกสีเหลืองนวลมีขนนุ่มปกคลุม มงกุฎสีแดงสด มีกลิ่นหอมตอนกลางคืน ออกดอกช่วงปลายฤดูหนาวเข้าฤดูร้อน Lakshmi (2010) กล่าวว่า การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของโฮย่ามีจำนวนน้อยมาก การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการ

[1] สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520.

[1] Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520.

[2] พระตำหนักสวนปทุม ปทุมธานี 12000

[2] Phra Tamnak Suan Pathum, Pathumthani 12000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ และศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

ตัดชิ้นส่วนใบของ *H. kerrii* มาล้างด้วยน้ำเพื่อทำความสะอาด และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอคิวริก(II) คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตัดใบให้ได้ขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ไม่มีแสง ทำการทดลอง 20 ซ้ำ บันทึกผลของการเกิดแคลลัสทุก 2 สัปดาห์ วัดความกว้าง ยาว ของแคลลัส และบันทึกภาพและนำข้อมูลขนาดแคลลัสที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 20

ศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

นำแคลลัส *H. kerrii* มา 0.15 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ได้รับแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บันทึกผลเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุกๆ 3 วัน ตั้งแต่วันที่ 0 จนถึง 30 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด เมื่อครบเวลาทำการกรองเซลล์แขวนลอยเพื่อหาน้ำหนักเซลล์สดและน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีของ อนุรักษ์ (2550) นำค่าเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยมาเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และศึกษาการมีชีวิตของเซลล์โดยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งแคลลัสจะครอบคลุมทั่วทั้งใบ (Figure 1) และนำค่าขนาดของแคลลัส มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ขนาดใหญ่สุด (Table 1) ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ สอดคล้องกับการทดลองของ Romana (2013) สามารถชักนำแคลลัสจากส่วนของใบของ *H. kerrii* ได้จำนวนมาก ที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Table 1 Size of callus (mm^2) which were cultured on solid MS media supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel, in the dark condition for 2 4 and 6 weeks

Concentration of 2,4-D (mg/l)	Number of leave inoculation	Size of callus (mm^2)		
		2	4	6
0.5	20	93.56^{b}	103.70^{ab}	115.90^{ab}
1	20	92.22^{b}	105.45^{ab}	132.70^{ab}
3	20	93.37^{b}	99.80^{b}	115.54^{b}
5	20	138.24^{a}	147.65^{a}	184.27^{a}

Means indicated by the same letter (a and b) within a column are not significantly different at ($P<0.05$) level by DNRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

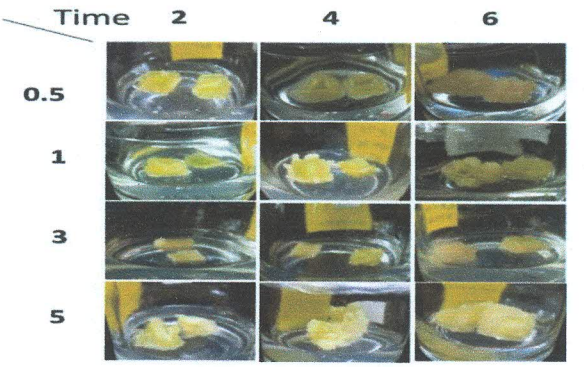


Figure 1 Callus from leave were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel for 2 4 and 6 weeks

การศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

การศึกษาเซลล์แขวนลอยของ *H. kerrii* พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์สด และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 0.3487 และ 0.0149 กรัม ต่อ อาหารเหลว 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2) ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง วันที่ 21 อัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยจะเพิ่มขึ้น โดยวันที่ 12 จะเริ่มมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์จนถึงวันที่ 21 เซลล์แขวนลอยจะมีปริมาณสูงสุด ในระยะ log phase (Figure 2) หลังจากวันที่ 21 อัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยจะลดลง และเกิดการตายของเซลล์ ในระยะ death phase เนื่องจากสารอาหารไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตต่อไปของเซลล์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Khiet และคณะ (2006) ที่พบเซลล์แขวนลอยมีการเจริญสูงสุดในช่วงวันที่ 15 และลดต่ำลงในวันที่ 20 ก่อนที่จะเข้าสู่สภาวะคงที่ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และศึกษาการมีชีวิตของเซลล์โดยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตจะมีการเรืองแสงสีเขียวสำหรับเซลล์มีชีวิต

Table 2 The measurement of fresh and dry weight for suspension culture of *H. kerrii* in liquid MS medium supplemented with 3 mg/l 2,4-D for 30 days.

Days	Fresh weight (mg/10ml)	Dry weight (mg/10ml)
0	0.2434	0.0043
3	0.2412	0.0062
6	0.2694	0.0067
9	0.2923	0.0069
12	0.2753	0.0070
15	0.3037	0.0124
18	0.3228	0.0136
21	0.3487	0.0149
24	0.3396	0.0141
27	0.2960	0.0132
30	0.3016	0.0131

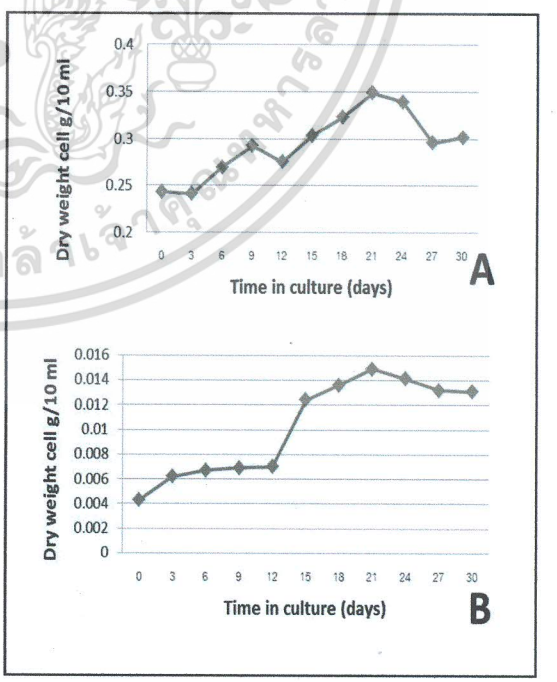


Figure 2. Growth rate of suspension culture cells of *H. kerrii*, (A) Fresh weight cells, (B) Dry weight cells.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผล

ในการชักนำให้เกิดแคลลัส *H. kerrii* จากชิ้นส่วนของใบ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสใหญ่ที่สุด 184.27 ตารางมิลลิเมตร ในสัปดาห์ที่ 6

กราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยสูงสุดในวันที่ 21โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์สด และเซลล์แห้งสูงสุดคือ 0.3487 และ 0.0149 กรัม ตามลำดับ โดยวันที่ 12 จะเริ่มมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ จนถึงวันที่ 21 เซลล์แขวนลอยจะมีปริมาณสูงสุด ในระยะ log phase

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี 2556 จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณการอนุเคราะห์ สายพันธุ์ *H. kerrii* จากแปลงทดลองส่วนพระองค์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี

เอกสารอ้างอิง

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, 2550, เทคโนโลยีชีวภาพของพืช, โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 159 น.

Khiet, B.L.T., Thi, N.N., Huyen, P.X. and Nhut D.T., 2006, Primary Study of Cell Suspension Culture Of Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*), Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture, 113-114.

Lakshmi, S.R., Franklin Benjamin, J.H., Senthil Kumar, T., Murthy, G.V.S. and Rao. M.V., 2010, *In Vitro* Propagation of *Hoya wightii* ssp. palniensis K.T. Mathew, a Highly Vulnerable and Endemic Species of Western Ghats of Tamil Nadu, India. African Journal of Biotechnology, 9(5): 620-627.

Romana, S., 2013, Micropropagation of *Hoya Kerrii* (Valentine Hoya) through Callus Induction for Long Term Conservation and Dissemination, International Journal of Science and Research, 2(8): 162-164.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

กรมวิชาการเกษตร.2554. ๘๔ วงศ์พรรณไม้ เทิดไท้องค์ราชัน: กลุ่มวิจัยพฤษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พันธุ์พืช, สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช. กรมวิชาการเกษตร.กรุงเทพฯ 280 น.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล. 2553. ร้อยพรรณพฤกษา โฮย่า. เศรษฐศิลป์, กรุงเทพฯ, 93 น.

อุไร จิรมงคลการ. 2551. โฮย่า คู่มือคนรักต้นไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. บ้านและสวน, กรุงเทพฯ, 105.

สมพร ประเสิรฐส่งสกุล. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. โฟร์เพซ, กรุงเทพฯ, 129 น.

สมัชชา นาคสมบัติ และสมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย (*Hoya* spp.) และการปลูกถ่ายยีน. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23, 2, 193-201.

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

อุไร จิรมงคลการ. 2551. โฮย่า คู่มือคนรักต้นไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. บ้านและสวน, กรุงเทพฯ, 105.

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

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

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

Jeong Eun Lee, S.G., Seo, B.K., Kim, S.M., Woo, B.C., Koo, T.H., Park, Y.P., Lim and S,H., Kim. 2012. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the reed grass (*Phragmites communis* Trin.). A.J. Biotechnology, Vol. 11(8), 1904-1911.

Khan, P.S., S., Valli, E., Prakash, and K.R., Rao. 2002. Callus induction and plantlet regeneration in Bixaorellana L., an annatto-yielding tree. Biol. 38, 186-190.

Khiet, B.L.T., Thi, N.N., Huyen, P.X. and Nhut D.T. 2006. Primary study of cell suspension culture of yellow passion Fruit (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*). Proceedings of international workshop on biotechnology in agriculture. 113-114.

Maraffa, S.B., W.R., Sharp, H.K., Tayama and T.A., Fretz. 1981. Apparent Asexual Embryogenesis in Cultured Leaf Sections of *Hoya*. Z.F. Pflanzenphysiologie, Vol. 102(1), 45-55.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Naseem, A. and Mohammad, A. 2005. In Vitro Mass Propagation of Cucumis sativus L. from Nodal Segments. Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Botany, Aligarh Muslim University.

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

Revathi Lakshmi, J.H.F., Benjamin, T.S., Kumar, G.V.S. Murthy and M.V., Rao. 2010 . Efficient rhizogenesis of *in vitro* raised microshoots of *Hoya wightii* Hook. f. ssp. *palniensis* K.T. Mathew-a vulnerable species endemic to Western Ghats. J. Biosci. Res., Vol. 1(3), 137-145.

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

[Online].Available : http://www.ptcn.ac.th/student/Sand12.html

[Online].Available : http://gwen4gardens.blogspot.com/2012/10/hoya-pubicaylx-with-friends.html

[Online].Available : http://hoya-polska.blogspot.com/2011/02/hoya-incurvula-schlechter-1916.html

[Online].Available : http://www.bloggang.com/data/a/alleni/picture/1261588364.jpg

[Online].Available : http://www.kasetporpeang.com/forums/index.php?topic=6414.4768

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

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

4. ประวัติการศึกษา

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

5. ระบุสาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การย้ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม และเครื่องยิงยีน การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

รางวัลและเกียรติประวัติที่เคยได้รับ

1990-1991	Thesis of Master Degree at Kasetsart university	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (NCGEB) Bangkok ,Thailand.
1995-1998	Plant tissue culture of Rice and Corn	National Research Council of Thailand
1995	Visiting at Kyushu Tokai University. Japan.	Visiting scholar under the Acadermic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan
1996-1998	Thai rice genetic transformation by Agrobacterium	The Rockefeller Foundation USA
2001	Visiting at Kyushu Tokai University. Japan.	Visiting scholar under the Acadermic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan
2002-2005	Doctural Degree at Kyushu Tokai University , Japan.	Visiting scholar under the Acadermic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan
2006-2009	Improvement of Nile Grass (*Acrocras macrum* Stapf)	National Research Council of Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	by Tissue Culture.	
2009-2010	Genetics variation of *Ficus* sp.	Faculty of Science KMITL
2010-2011	Genetic diversity in *Passiflora* spp.	Faculty of Science KMITL
2009-2011	Mass Propagation of *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture for Agricultural and Studies on Genetic Diversity	National Research Council of Thailand
2011-2012	Improvement of *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade for virus resistance by tissue culture	National Research Council of Thailand
2013	Study on factor for plant regeneration of Hoya	Faculty of Science KMITL
2013	Study on cost and time to produce of Rhizoma peanut (Arachis glabrata) by tissue culture and to determine the mutation after culturing	Fund of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2535. กราฟการเติบโตของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดลูกผสมSW3 x INV. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 358 น.

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

นิตย์ศรี แสงเดือน อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กมลพรรณ นามวงศ์พรหม เดชา บุญมะลิช้อน ชำนาญฉัตรแก้ว ราเชนทร์ ถิระพร และ Bernd Buter. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพ ของ *Zea may* L.:การประยุกต์ใช้ในโครงการปรับปรุงข้าวโพด การแสดงแบบโปสเตอร์ การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 8. 29 มีนาคมถึง 1 เมษายน 2536 ณ สถาบันพัฒนาวิชาการ สาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดลศาลายา นครปฐม 89 น.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prachuapkhirikhan, Thailand

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม นิตย์ศรี แสงเดือน ชาญวิทย์ ม่วงมิตร และ ชำนาญ ฉัตรแก้ว . 2550. การเจริญเป็นแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเนื้อเยื่อสบู่ดำสายพันธุ์ สมก. ในโครงการสัมมนาวิชาการ เรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1 จัดโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งหมาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. หน้า 119-123.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

Sukhawat, S and A. Poeaim. 2009. Efficiency of gene transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Node tissue of Nilegrass (*Acroceras macrum*). The International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences in Collaboration with Kasetsart University 23-27 Febuary the Emerald hotel, Rachadapisek Road, Bangkok Thailand. 99-106.

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

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

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

รัตนาภรณ์ บุญเรือง และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. การเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของถั่วอาหารสัตว์ *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade

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

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

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

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

Boonruang Ratanaporn. A., Poeaim, A., Jantakarn and P. Pongtongkam. 2012. An efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from callus of *Centrosema pascuorum* cv.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cavalcade. 1st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2011) 26-29 January KMITL Bangkok Thailand. 42-46.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. 2013. Genetic Diversity in *Passiflora* spp. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18. Thai J. Genet. S(1): 214-217.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้