



รายงานผลการวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การขยายพันธุ์ฮ่อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze)

ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

MICROPROPAGATION OF HOM (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze).

โดย

กมลพร ปานง่อม วรรณ มังกิตะ และสุคนทิพย์ บุญวงศ์



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การขยายพันธุ์ฮ่อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

MICROPROPAGATION OF HOM (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze).

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551

จำนวน 124,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

กมลพร ปานง่อม

ผู้ร่วมโครงการ

วรรณ มังกิตะ และสุคนทิพย์ บุญวงศ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

15 ตุลาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร ที่ได้จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2551 และขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ขอขอบคุณชาวบ้าน บ้านนาควา บ้านนาตอง บ้านห้วยฮ่อมพัฒนา ที่ให้ความร่วมมือในการสำรวจและเก็บข้อมูลเรื่องฮ่อม อีกทั้งยังให้ความรู้การใช้ประโยชน์จากต้นฮ่อมในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณผู้ใหญ่บ้านนาตอง และชาวบ้านนาตอง ที่ให้ความร่วมมือในการปลูกต้นฮ่อม การดูแล และอนุรักษ์ต้นฮ่อม ขอขอบคุณคณะนักศึกษามหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ความร่วมมือในการปลูกต้นฮ่อม การดูแล และอนุรักษ์ต้นฮ่อม ภายในแปลงสาธิต ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

คณะผู้วิจัย

15 ตุลาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
บทที่ 1 คำนำ	1
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 สื่อม	4
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	25
3.1 ขั้นตอนเตรียมการ	25
3.2 ขั้นตอนการดำเนินการ	26
3.3 สถานที่และระยะเวลาการศึกษา	29
บทที่ 4 ผลการทดลอง	31
4.1 การศึกษาถึงส่วนต่างๆของส้อมที่ใช้เริ่มต้นเลี้ยง	31
4.2 การฟอกเชื้อชิ้นส่วนพืช	32
4.3 การปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรียของชิ้นส่วนพืช	35
4.4 อิทธิพลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนตายอดเมื่อเพาะเลี้ยง	37
ครบ 4 สัปดาห์	
4.5 อิทธิพลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนตายอดเมื่อเพาะเลี้ยง	40
ครบ 8 สัปดาห์	
4.6 การชักนำให้ต้นส้อมยึดยาวก่อนย้ายออกปลูก	43
4.7 การชักนำให้ต้นส้อมเกิดราก	45
4.8 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการย้ายออกปลูก	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจัยรณัผลการทดลอง	51
5.1 วิจัยรณัผลการทดลอง	51
5.2 ข้อเสนอแนะ	54
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	55
6.1 สรุปผลการทดลอง	55
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	64
ภาคผนวก ก	65
ภาคผนวก ข	67



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงระยะเวลาการดำเนินการศึกษา	30
4.1 ผลของไซโตไคน์ไฮโปคลอไรด์ต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของตายอดฮ่อม	33
4.2 ผลการทดลองการเปรียบเทียบจำนวนยอดฮ่อมกับความเข้มข้นของ BAP ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 mg/L ที่ระยะเวลา 1 เดือน	37
4.3 ลักษณะการพัฒนารูปร่างของชิ้นส่วนตายอดในแต่ละสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์	38
4.4 ผลการทดลองการเปรียบเทียบจำนวนยอดฮ่อมกับความเข้มข้นของ BAP ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 mg/L ที่ระยะเวลา 2 เดือน	40
4.5 ลักษณะการพัฒนารูปร่างของชิ้นส่วนตายอดในแต่ละสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์	41
4.6 ความสูงของต้นฮ่อมก่อนย้ายออกปลูก ที่สัปดาห์ที่ 5	43
4.7 ผลการทดลองการเปรียบเทียบความยาวของรากฮ่อมกับความเข้มข้นของ IAA ที่ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 mg/L เป็นเวลา 5 สัปดาห์	45
4.8 ผลการทดลองการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตกับความเข้มข้นของ IAA ที่ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 mg/L หลังการย้ายออกปลูก	47

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 สูตรโครงสร้างของสารออกซินชนิดต่างๆ	12
2.2 สูตรโครงสร้างของสารไซโตไนนชนิดต่างๆ	13
2.3 สูตรโครงสร้างของสารจิบเบอเรลลิน	14
2.4 สูตรโครงสร้างของสารแอบไซสิก	14
2.5 สูตรโครงสร้างของสารเอธิลีน	15
4.1 ต้นหอมที่ใช้เป็นต้นพันธุ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	31
4.2 ลักษณะปลายยอดหอมที่เริ่มเพาะเลี้ยง	34
4.3 ปลายยอดหอมที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	34
4.4 ลักษณะขึ้นส่วนของพืชที่มีการปนเปื้อน	36
4.5 การเจริญเติบโตของยอดหอม เมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์	39
4.6 การเจริญเติบโตของยอดหอม เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์	42
4.7 แสดงความสูงของต้นหอมเมื่อเลี้ยงครบ 5 สัปดาห์	44
4.8 แสดงการพัฒนารากของรากหอม	46
4.9 ความสูงและความยาวของรากต้นหอมก่อนย้ายออกปลูก	46
4.10 การรอดชีวิตของต้นหอมหลังการย้ายออกปลูกในโรงเรือน	48
4.11 ต้นหอมที่นำไปปลูกคืนสู่บ้านนาทอง	48
4.12 นำต้นหอมที่เพาะเลี้ยงได้ปลูกคืนหอมสู่บ้านนาทอง	49
4.13 ต้นหอมที่ปลูกคืนหอมสู่บ้านนาทอง ครบ 6 เดือน	49
4.14 นำต้นหอมที่เพาะเลี้ยงได้ปลูกเป็นแปลงสาธิตภายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้- แพร่ เฉลิมพระเกียรติ	50
4.15 นักศึกษาร่วมกันปลูกต้นหอมเพื่อเป็นแปลงสาธิตภายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้- แพร่ เฉลิมพระเกียรติ	50

สารบัญตารางภาคผนวก

ตาราง

หน้า

1. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Murashige & Skoog (MS)

66



การขยายพันธุ์ห้อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) ด้วยวิธีการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze.

กมลพร ปานง่อม วรณา มังกิตะ และสุคนทิพย์ บุญวงศ์

Kamonporn Panngom, Wanna Mangkita and Sukhonthip Bunwong.

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ต. แม่ทราย อ. ร้องกวาง จ. แพร่ 54140

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์ห้อมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำโดยนำชิ้นส่วนยอดห้อมมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige & Skoog 1962 (MS) ที่มีฮอร์โมน BAP (Benzylaminopurine) ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ได้รับแสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า ยอดห้อมที่เลี้ยงในอาหารที่เติม BAP 2 มก./ล สามารถชักนำให้เพิ่มปริมาณได้มากที่สุด โดยชิ้นส่วนยอดเพียงหนึ่งชิ้นส่วนสามารถเกิดยอดที่มีความยาวมากกว่า 1 ซม. ได้จำนวนยอดเฉลี่ย 10.75 ยอด และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ลักษณะยอดยืดยาว ใบสมบูรณ์มีสีเขียว ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ยืดยาว และชักนำให้เกิดรากเพื่อย้ายออกไปปลูก และจากการศึกษาผลของฮอร์โมน IAA (Indole -3-Acetic Acid) ต่อ การยืดยาวของต้น การเกิดราก และความยาวของรากห้อมพบว่า ห้อมที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA 1, 2, 3 และ 5 มก./ล สามารถชักนำให้ต้นห้อมยืดยาวและเกิดรากได้ 100 % ภายในเวลา 3 สัปดาห์ ต้นห้อมมีลักษณะที่เหมาะสมต่อการนำไปปรับสภาพในโรงเรือนและย้ายไปเพาะปลูก

บทที่ 1 คำนำ

1.1 ที่มาของปัญหา

ฮ่อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดและกระจายพันธุ์ในเขตภาคเหนือ มีความสำคัญกับวิถีชีวิต ความเชื่อ และภูมิปัญญาท้องถิ่นของคนในชุมชน ทั้งด้านการผลิตเครื่องนุ่งห่ม และยารักษาโรค ฮ่อมเป็นยาพื้นบ้านล้านนาใช้ใบต้มน้ำดื่ม แก้ไข้ ยาพื้นบ้านใช้รากและใบ ต้มน้ำดื่ม แก้ไข้ ปวดศีรษะ เนื่องจากหวัด เจ็บคอ หลอดลมอักเสบ ตาอักเสบ สำหรับชาวจังหวัดแพร่ได้จัดให้ฮ่อมเป็นพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบในการย้อมผ้าหม้อฮ่อม ซึ่งเป็นสินค้าที่มีชื่อเสียงและเป็นเอกลักษณ์ของจังหวัดแพร่ แต่ปัจจุบันต้นฮ่อมได้ลดจำนวนลงมาก เนื่องจากความต้องการใช้วัตถุดิบในการผลิตผ้าหม้อฮ่อมมีมากขึ้น หากมีการซื้อขายและใช้ประโยชน์จากต้นฮ่อมมากเกินไปโดยไม่มีการอนุรักษ์และขยายพันธุ์เช่นนี้ ในไม่ช้าฮ่อมจะกลายเป็นพืชที่หายากและสูญพันธุ์ในที่สุด

พื้นที่ในจังหวัดแพร่ที่มีการปลูกต้นฮ่อมมากที่สุด คือ บ้านนาตอง ตั้งอยู่ที่ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ซึ่งนำต้นฮ่อมมาใช้ประโยชน์ในการย้อมผ้าหม้อฮ่อมและเป็นยารักษาโรคซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่น ประสบวิกฤตการณ์ภัยพิบัติน้ำท่วม ดินถล่ม เมื่อปลายเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2549 ทำให้พื้นที่ในการปลูกต้นฮ่อมได้รับความเสียหายจากภัยพิบัติทางธรรมชาติ ทำให้ต้นฮ่อมมีความเสี่ยงต่อการใกล้สูญพันธุ์มากยิ่งขึ้น เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนี้แล้วถ้าไม่มีการอนุรักษ์และขยายพันธุ์ต้นฮ่อม ต้นฮ่อมก็จะกลายเป็นพืชที่หายากและสูญพันธุ์ในที่สุด ลูกหลานคนรุ่นหลังก็จะรู้จักแต่ชื่อ ไม่รู้จักต้นฮ่อมว่าเป็นต้นลักษณะอย่างไร

ปัจจุบันการผลิตผ้าหม้อฮ่อมได้ใช้สารเคมีแทนการย้อมสีจากธรรมชาติ ซึ่งสีธรรมชาติที่ใช้ย้อมผ้าหม้อฮ่อมนั้นได้มาจากต้นฮ่อม การใช้สารเคมีแทนสีฮ่อมนั้นเป็นเพราะว่าการย้อมฮ่อมในอดีตมักใช้วิธีการถ่ายทอดจากย่า ยาย มารดา สู่ลูกหลาน ซึ่งเป็นวิธีการถ่ายทอดโดยตรงตัวต่อตัวอย่างแท้จริง การย้อมฮ่อมนั้นเป็นการย้อมที่มีกระบวนการย้อมที่ยุ่งยาก เสียเวลา และที่สำคัญคือ ปัจจุบันนี้ต้นฮ่อมหาได้ยากและมีจำนวนน้อยลงมากเนื่องจากต้นฮ่อมมีอายุไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับ ดิน ฟ้า อากาศ ในสถานที่นั้นๆ กับการนำใบฮ่อมมาใช้ทำสีน้ำเงินได้ก็ต่อเมื่อใบฮ่อมนั้นมีอายุเข้าปีที่ 2 ระยะของการเก็บไม่จำกัดแล้วแต่จะออกแขนงช้าหรือเร็ว (เทคโนโลยีสร้างสรรค์ผลิตภัณฑ์ OTOP, 2548) ดังนั้นผู้วิจัยมีแนวคิดในการศึกษาการขยายพันธุ์ต้นฮ่อมโดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพจำนวนมาก ในระยะเวลาอันรวดเร็ว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture) สามารถใช้กับไม้พุ่มได้ เช่น ต้นส้ม ซึ่งมีประโยชน์ทั้งในการใช้ทำสีย้อมผ้าและใช้เป็นยา คนไทยส่วนใหญ่รู้จักจากผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า “ผ้าหม้อส้ม” ซึ่งสีย้อมที่ได้มาจากต้นส้ม ส้มเป็นพืชที่พบตามพื้นที่ชุ่มชื้นในป่าดงดิบ ทางภาคเหนือ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นส้มนั้นยังไม่เป็นที่รู้จักมากนักในประเทศไทย เนื่องจากส้มเป็นพืชประจำท้องถิ่นและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากส้ม ที่เรียกว่า ผ้าหม้อส้ม เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอกลักษณ์ท้องถิ่น หรือที่เรียกว่า “ภูมิปัญญาท้องถิ่น” ดังนั้นใน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้ม จึงเป็นการส่งเสริมให้ชุมชนนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาใช้ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ผ้าหม้อส้มให้เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายและผู้สนใจสามารถนำความรู้ และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นส้มไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณต้นส้มให้ได้จำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.3.1 สามารถเลือกปริมาณฮอร์โมน BAP และ IAA ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงต้นส้มในสภาพที่ปลอดเชื้อ

1.3.2 ได้ข้อมูลด้านรูปแบบการพัฒนาของชิ้นส่วนตายอดของต้นส้มที่ตอบสนองต่อฮอร์โมน BAP ในสภาพที่ปลอดเชื้อ

1.3.3 ได้ข้อมูลด้านรูปแบบการพัฒนาความยาวของลำต้นและรากของต้นส้มที่ตอบสนองต่อฮอร์โมน IAA ในสภาพที่ปลอดเชื้อ

1.3.4 สามารถใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ต้นส้มด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทดแทนการขยายพันธุ์ต้นส้มด้วยการใช้เมล็ด

1.3.5 ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาเทคนิค การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดต่างๆ

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

1.4.1 ศึกษาอิทธิพลของปริมาณฮอร์โมน BAP ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนยอดส้มที่เลี้ยงในอาหารสูตร Murashige & Skoog, 1962 (MS) ในสภาพที่ปลอดเชื้อ

1.4.2 ศึกษาอิทธิพลของปริมาณฮอร์โมน IAA ต่อการพัฒนาความยาวของลำต้นและรากต้นส้มที่เลี้ยงในอาหารสูตร Murashige & Skoog, 1962 (MS) ในสภาพที่ปลอดเชื้อ

1.4.3 ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง 12 เดือน คือ เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2552

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.5.1 ต้นฮ่อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดและกระจายพันธุ์ในเขตภาคเหนือ มีความสำคัญกับวิถีชีวิต ความเชื่อ และภูมิปัญญาท้องถิ่นของคนในชุมชน ทั้งด้านการผลิตเครื่องนุ่งห่ม และยารักษาโรค ฮ่อมเป็นยาพื้นบ้านล้านนาใช้ใบต้มน้ำดื่ม แก้ไข้ ยาพื้นบ้านใช้รากและใบ ต้มน้ำดื่ม แก้ไข้ ปวดศีรษะ เนื่องจากหวัด เจ็บคอ หลอดลมอักเสบ ตาอักเสบ สำหรับชาวจังหวัดแพร่ได้จัดให้ฮ่อมเป็นพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบในการย้อมผ้าหม้อฮ่อม ซึ่งเป็นสินค้าที่มีชื่อเสียงและเป็นเอกลักษณ์ของจังหวัดแพร่

1.5.2 ฮอริโมนไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นสารสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ และการยืดตัวของเซลล์ ผลทางสรีรวิทยาของฮอริโมนไซโตไคนิน มีดังนี้

1. ส่งเสริมการสร้างแคลลัส
2. เร่งการแตกตาข้าง
3. ชะลอการชราภาพ (senescence)
4. ช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารในพืช
5. ส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีน
6. ชะลอการสูญเสียคลอโรฟิลล์

สารกลุ่มนี้ในธรรมชาติคือ kinetin (น้ำมะพร้าว) zeatin (ข้าวโพด)

1.5.3 ฮอริโมนออกซิน (auxins) เป็นกลุ่มของสารที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement) การแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม การขยายขนาดของใบ การเกิดราก การขยายขนาดของผล ป้องกันการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล ยับยั้งการแตกตาข้าง

1.5.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture) เป็นการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช เช่น เซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะของพืช มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ปลอดเชื้อ ในสภาพควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนของพืชมีการพัฒนาไปตามความต้องการ เทคนิคนี้ ต้องอาศัยความสามารถพิเศษของพืช ที่เรียกกันว่า โททิโพเทนซี (totipotency) คือ เซลล์พืชเพียงเซลล์เดียว สามารถเจริญเติบโตและพัฒนากลายเป็นพืชต้นใหม่ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ส้อม

2.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของส้อม

ส้อม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze. อยู่ในวงศ์ ACANTHACEAE มีการกระจายพันธุ์ในแถบอินเดีย จีนตอนใต้ ภูมิภาคอินโดจีน ประเทศไทยพบตามพื้นที่ชุ่มชื้นในป่าดงดิบทางภาคเหนือ ออกดอกช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ภาคกลางเรียกพืชชนิดนี้ว่า คราม ชาวเหนือเรียกว่า ส้อม จังหวัดน่านเรียกว่า ส้อมเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน เรียกว่า ครามลอย (เต็ม, 2544)

2.1.2 สภาพแวดล้อมและการเจริญเติบโต

ส้อมเป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรง สูงได้ถึง 1 เมตร ลำต้นและเหง้ารูปทรงกระบอก บริเวณข้อใบ โป่งพอง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปวงรี กว้าง 2.5 – 6 เซนติเมตร ยาว 5 - 16 เซนติเมตร ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยละเอียด ออกดอกเป็นช่อที่ซอกใบ มีดอกย่อยหลายดอก กลีบดอก สีม่วงเชื่อมติดกันเป็นหลอดโค้งงอเล็กน้อย ผลแห้งแตกได้เมล็ดแบนสีน้ำตาล ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและลำต้น โดยตามลำต้นมีข้อ ตัดแล้วนำมาปักชำไว้ ทุกข้อจะออกราก ส้อมมีอายุไม่แน่นอนแล้วแต่สภาพดินฟ้า อากาศ ในสถานที่นั้นๆ ถ้าอยู่ในที่ร่มเย็น แดดรำไร มีน้ำซึมอยู่เสมอ จะมีอายุได้นานถึง 8 - 9 ปี (เทคโนโลยีสร้างสรรค์ ผลิตภัณฑ์ OTOP, 2548)

2.1.3 ประโยชน์ของส้อม

2.1.3.1 ใบ ใช้รักษาโรคไข้หวัดใหญ่, เยื่อหุ้มสมองอักเสบ, สมองอักเสบจากไวรัส, ปอดบวม, คางทูม, อากาเร็บคอบ และผิวหนังอักเสบ (Ho et al., 2546) ต้นส้อมเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านซึ่งผู้เฒ่าผู้แก่สมัยก่อนนั้นใช้เป็นยาดูดพิษไข้ให้แก่ลูกหลาน ซึ่งต้นส้อมนั้นเป็นพุ่มมีใบสีเขียว รอบๆใบจะเป็นรอยหยัก ต้นส้อมนั้นจะขึ้นที่เย็นชื้นและอยู่ได้ตลอดปี สามารถนำมารักษาเวลาป่วยไข้ ปวดหัว ซึ่งบางครั้งทานยาแล้วไม่หายเราสามารถดูดพิษไข้ด้วยใบส้อมได้ และทำให้อาการไข้หายไปไหนที่สุดได้ การกอบส้อมมีมาตั้งแต่สมัยใดไม่อาจจะระบุได้ เพราะ การรักษาด้วยวิธีนี้มีการสืบทอดกันมาตั้งแต่ครั้งโบราณจนถึงปัจจุบันนี้ บางพื้นที่ก็ยังใช้วิธีกอบส้อมในการรักษาในยามเจ็บไข้ได้ป่วย ซึ่งใช้วิธีนี้รักษาคนในหมู่บ้านในสมัยนั้น การกอบส้อมต้องทำในช่วงเวลา

(9.00 - 11.00 น.) และเวลาบ่าย (14.00 - 16.00 น.) เท่านั้น ถ้าตะวันตกดินแล้วจะไม่ได้ผลที่ทำ
ให้ในช่วงเช้าและตอนบ่ายนั้น เพราะมีความเชื่อว่าพิษไข้จะออกมาตามตะวัน ถ้าตะวันตกดินแล้ว
จะไม่ได้ผล เวลาที่บอบส้อมใช้เวลาประมาณครึ่งวันคือตอนช่วงเวลาเช้า ประมาณ 9.00 - 11.00 โมง
เช้า และตอนบ่ายทำในช่วงเวลา 14.00 - 16.00 น. การที่บอบส้อมนั้นใช้ในเด็กที่มีอายุตั้งแต่ 1 ขวบ
ขึ้นไป การที่บอบส้อมจะควบคุมกับความเชื่อซึ่งมีมาตั้งแต่สมัย ปู่ย่า ตาทวด ปัจจุบันก็ยังมีการบอบ
ส้อมอยู่

การที่บอบส้อมมีวิธีการดังนี้ นำใบส้อมมาตำให้ละเอียด ใช้ผ้า 2 ชั้น ยาวพอพันมือและเท้า
ได้ แล้วนำส้อมที่ตำแล้ววางลงบนฝ่ามือข้างใดข้างหนึ่ง แล้วพันผ้าที่เตรียมไว้ และนำส้อมที่ตำแล้ว
วางลงบนฝ่าเท้าข้างใดข้างหนึ่งซึ่งสลับกับฝ่ามือ ถ้าฝ่ามือข้างขวาให้ใช้ฝ่าเท้าข้างซ้ายสลับกัน
และพันด้วยผ้าอีกชั้น ใช้เวลาช่วงเช้า 9.00 - 11.00 น. และช่วงบ่ายเวลา 13.00 - 16.00 น. ถึงจะ
แกะออกได้ แล้วสังเกตที่ฝ่ามือและฝ่าเท้าว่าจะมีรอยชาเลือดออกมาตรงฝ่ามือและฝ่าเท้าที่บอบ
ส้อมหรือไม่ ถ้ามีแสดงว่าพิษไข้ออกจากร่างกายแล้วแต่ถ้าเป็นสีเขียวของใบส้อมอยู่แสดงว่าไม่
ได้ผล จากภูมิปัญญาการบอบส้อมนี้ทำให้รู้ว่าสิ่งที่เรามีอยู่ในชุมชนนั้นย่อมมีประโยชน์และคุณค่า
สำหรับการใช้ชีวิตอยู่อย่างพอเพียงได้นั้นต้องอาศัยภูมิปัญญาที่เรามีอยู่ให้เป็นประโยชน์ และสืบ
ทอดรักษาสืบกันให้ได้ การที่บอบส้อมนั้นทำให้เรารู้ว่าสิ่งที่สืบกันมานั้นเป็นสิ่งที่ดีมีประโยชน์ในการ
รักษาใช้ได้เป็นอย่างดี และเป็นสิ่งที่บางคนไม่รู้ แต่คนที่เคยรักษาโดยการบอบส้อมจะรู้ว่ามัน
ได้ผลดีมากที่สุดของการนำสมุนไพรมารักษาโรค (จดหมายข่าวราชบัณฑิตยสถาน, 2533)

2.1.3.2 ใบ และลำต้น ให้สารสีคราม (Indigo) สีครามหรือสีอินดิโก (CI Natural Blue
1) เป็นสีที่ได้จากต้นส้อมซึ่งเป็นไม้พุ่มขนาดย่อมต้นสูงไม่เกิน 4 ฟุต ใบเล็กกลมโต ดอกคล้ายดอก
ถั่วสีม่วง มีฝักเล็ก ๆ ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ส่วนมากพบในภาคเหนือ สีคราม (Indigo Blue)
ได้จากการนำต้นส้อมแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องหรือน้ำอุ่นจนกระทั่งเกิดการหมัก (Fermentation)
ในระหว่างหมักจะเกิดการสลายตัวด้วยน้ำ (Hydrolysis) ของอินดิแคน (Indican) ที่อยู่ใน
ใบส้อมโดยเอนไซม์ จากนั้นแยกเอากากของใบส้อมออก และเติมอากาศเข้าไปในน้ำที่ได้จากการ
หมักโดยการตีให้เป็นฟองเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างน้ำหมักกับอากาศ ในช่วงนี้ สี
ของน้ำหมักจะเปลี่ยนจากสีเขียวเหลืองเป็นสีน้ำเงิน น้ำสีเขียวเหลืองเป็นสารประกอบระหว่าง
กลูโคสและอินดอกซิล (Indoxyl) หลังจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วจะได้อินดิโกตกตะกอนอยู่
ก้นถังหมัก สีอินดิโกเป็นสีเวท (Vat Dye) ไม่ละลายน้ำต้องนำไปรีดขึ้นในสภาพที่เป็นด่าง จึงจะใช้
ย้อมสีได้ สีอินดิโกเป็นสีที่เก่าแก่มากที่สุดหนึ่งมีหลักฐานการนำมาใช้ไม่น้อยกว่า 4,000 ปีมาแล้ว
(วนิดา และคณะ, 2531) สีครามธรรมชาติถูกสกัดจากใบส้อมสดในรูปของสารต้นตอ (Precursor)
หลังจากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอีกหลายครั้ง จึงเกิดเป็นสีครามเกาะจับเส้นผ้า สารต้นตอ

ในใบฮ่อม คือ สารอินดิแคน (Indican หรือ Indoxyl - b - d - glucoside) เป็นสารไม่มีสีและไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อถูกแช่ในน้ำ เอนไซม์ชนิดหนึ่งในใบฮ่อม คือ บีตา - กลูโคซิเดส (B - glucosidase) จะช่วยทำให้อินดิแคนแตกออกเป็น 2 ส่วน คือ อินดอกซิล (Indoxyl) และกลูโคส สาร 2 ชนิดนี้เป็นสารไม่มีสี ละลายน้ำได้ ทั้งคู่จึงละลายในน้ำครามซึ่งมี pH เท่ากันกับน้ำที่ใช้แช่ใบฮ่อม ปฏิกริยาการเปลี่ยนอินดิแคนในใบฮ่อมไปเป็นอินดอกซิลและกลูโคสในน้ำคราม เป็นปฏิกริยาแบบดูดความร้อน ที่อุณหภูมิของการแช่ 30 , 40 และ 50 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการแช่เพื่อให้ได้ปริมาณสีครามสูงสุดเป็น 18 , 15 และ 9.30 ชั่วโมงตามลำดับ (ไพศาล และคณะ, 2543) อินดอกซิลเป็นสารที่ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยออกซิเจนในอากาศ ยิ่งทำให้สารละลายเป็นต่าง อินดอกซิลยิ่งถูกออกซิไดส์ได้ง่าย กลายเป็นสาร Indigo blue ไม่ละลายน้ำ เมื่อเติมปูนขาวในน้ำครามและกวนแรง ๆ ให้เกิดฟองมาก ๆ จึงเกิดเนื้อครามซึ่งก็คือ Indigo blue ที่เกาะจับอยู่กับอนุภาคของปูนขาว ตกตะกอนจมอยู่ก้นภาชนะ การเตรียมสีครามเป็นการทำให้ Indigo blue เปลี่ยนเป็น Indigo white ซึ่งละลายได้ในต่าง การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นปฏิกริยารีดักชัน ซึ่งใช้ตัวรีดิวซ์ได้หลายชนิดดังกล่าวแล้ว อีกวิธีหนึ่งอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ร่วมด้วย โดยแบคทีเรียชนิดบาซิลลัส เช่น *Bacillus alkaliphylus* ร่วมในกระบวนการหมัก ปฏิกริยารีดักชันของ Indigo blue เกิดขึ้นที่ pH 10.5 - 11 เมื่อเกิดสีครามในน้ำฮ่อม โดยสังเกตสีของน้ำฮ่อมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวปนเหลืองจึงทำการย้อมผ้าที่ชุบน้ำแล้วบิดจนหมาด Indigo white ที่ละลายในน้ำฮ่อมจะแทรกซึมเข้าเนื้อผ้ายจับเซลล์โลสของใยผ้าด้วยพันธะไฮโดรเจน เมื่อยกผ้าผ่ายขึ้นจากน้ำฮ่อมสัมผัสกับอากาศ Indigo white จะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนในอากาศ กลับเป็น Indigo blue ถูกขังอยู่ภายในโครงสร้างของใยผ้ายดั่งเดิม ใยใหม่และขนสัตว์มีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเพปไทด์ จึงทำให้ย้อมด้วยสีครามได้ไม่ดีเท่าผ่ายซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นเซลลูโลส อย่างไรก็ตามการย้อมเส้นไหมที่อุณหภูมิต่ำ จะดูดซับสีดีกว่าการย้อมที่อุณหภูมิสูง แสดงว่าการย้อมสีครามเป็นกระบวนการคายความร้อน เมื่อย้อมที่อุณหภูมิสูงขึ้นการติดสีจะลดลง (ไพศาล และคณะ, 2543) การทำสีครามธรรมชาติเป็นปฏิกริยาเคมีทุกขั้นตอน โดยใช้สารต้นตอที่มีในใบฮ่อม, เอนไซม์ในใบฮ่อม ออกซิเจนในอากาศ, แบคทีเรียบาซิลลัสในธรรมชาติ, ขี้เถ้า และปูนขาว ก็ได้จากธรรมชาติ ปฏิกริยาต่อเนื่องในกระบวนการทำสีครามและการย้อมฮ่อม การย้อมสีครามธรรมชาตินั้น พบว่ามีการย้อมได้จากพืชหลายชนิด แต่ที่พบในประเทศไทยนั้น คือ ฮ่อม ซึ่งกรรมวิธีในการย้อมฮ่อม คือ การนำส่วนของฮ่อมมาหมักแช่น้ำให้น้ำเปื่อยแล้วแยกเอาส่วนของเนื้อสีออกมาโดยการตกตะกอนด้วยปูนขาว และอากาศ ปล่อยให้ตกตะกอนนอนก้นแล้วจึงแยกส่วนที่เป็นน้ำออก จะได้เนื้อครามหรือเนื้อฮ่อมเป็นตะกอนชั้นเหนียวเหมือนโคลน เนื้อครามที่ได้สามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นปี โดยเก็บไว้ในหม้อดินที่มีน้ำค้างหล่อเลี้ยงไม่ให้เนื้อครามแห้ง น้ำค้างที่

กล่าวถึง คือน้ำล้างขี้เถ้าของพืช เช่น ต้นกล้วย มะละกอ มะขาม เปลือกผลนุ่น เป็นต้น การย้อมผ้าครามที่เรียกกันว่า การย้อมฮ่อม หรือ หม้อฮ่อม จะนำเนื้อครามที่ได้จากการหมักมาทำการย้อมด้วยสภาวะที่เป็นด่าง โดยการผสมกับส่วนผสมต่างๆ มากมายตามสูตรหรือวิธีการของแต่ละท้องถิ่น เช่น น้ำด่าง ปูนขาว ขมิ้น เหล้าป่า ผักส้มป่อย ต้นอ้อย กล้วย ใบฝรั่ง แล้วกววนหรือโม่ให้โดนอากาศแล้วทิ้งไว้จนส่วนผสมต่างๆ ทำให้เนื้อครามเปลี่ยนจากสีครามน้ำเงินเป็นสีเหลืองอมเขียว จึงนำผ้าหรือด้ายที่ทำความสะอาดแล้วชุบน้ำพอหมาดลงย้อมให้เนื้อครามเข้าเกาะเส้นใย แล้วจึงนำขึ้นกระตุกให้โดนอากาศ ผ้าหรือฝ้ายจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีเหลืองของน้ำหม้อครามเป็นสีน้ำเงิน นำไปผึ่งให้แห้ง ถ้าต้องการให้สีครามเข้มก็ทำการย้อมหลายๆ ครั้ง หรือย้อมทับด้วยสีธรรมชาติอื่นๆ ก็จะได้สีแตกต่างกันไปตามชนิดของสีที่ใช้ผสมขึ้นอยู่กับเทคนิควิธีการของผู้ย้อมแต่ละคน (<http://www.indigothai.com/thai/prinya/3.htm>, 25 กันยายน 2551)

2.1.3.3 ราก ใช้รักษาโรคไข้หวัดใหญ่, เยื่อหุ้มไขสันหลังอักเสบจากไวรัสบี, ปอดอักเสบ, คางทูม และโรคที่เกี่ยวกับทางเดินหายใจเฉียบพลัน (SARS) (Tanaka *et al.*, 2004)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกำเนิดมาจากหลักการ Totipotency ที่ว่า “เซลล์พืชเดี่ยวๆ (Single cell) ทุกเซลล์มีลักษณะและองค์ประกอบทางพันธุกรรมสมบูรณ์เหมือนต้นแม่ ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชทั้งต้น (Whole plant) ได้” เซลล์พืชเหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (Nature cell) หรือเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (Differentiated tissue) ได้แก่ เนื้อเยื่อใบ สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัส (Callus) หรือพัฒนาเป็นอวัยวะ (Organ) เช่น ยอดอ่อน (Shoot) และราก (Root) ซึ่งสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นพืชทั้งต้นได้ ในทางเดียวกัน แคลลัส ซึ่งเป็นก้อนของกลุ่ม Parenchyma cell ซึ่งยังไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (Undifferentiated cell) สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัส หรือพัฒนาเป็นยอดอ่อนและรากขึ้นกับการกระตุ้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม (รังสฤษฎ์, 2545)

2.2.1 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) เป็นศาสตร์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology) สาขาหนึ่ง โดยนำเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) ในสภาพปราศจากเชื้อ (Aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้นเป็นต้น โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นอ่อน ที่ได้รับการเพาะเมล็ดแบบปราศจากเชื้อ เพราะทุก

ชิ้นส่วนของต้นอ่อน สามารถนำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงส่วนเนื้อเยื่อหรือส่วนต่างๆ ที่ได้จากพืชต้องนำมาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิว (Surface sterilization) ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถทำได้บนอาหารวุ้นแข็ง (Agar medium) หรือในอาหารเหลว (Liquid medium) ซึ่งอย่างหลังนิยมทำบนเครื่องเขย่า (Shaker) เพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่เซลล์ หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อไปได้ระยะเวลาหนึ่ง ต้องมีการถ่ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่ (Subculturing) เนื่องจากอาหารเดิมลดน้อยลง และของเสียที่เซลล์ขับออกมาเพิ่มมากขึ้น (รังสฤษฏ์, 2545)

2.2.2 ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการขยายพันธุ์พืช

2.2.2.1 การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยเฉพาะพืชที่มีค่าทางเศรษฐกิจ พืชที่มีปัญหาด้านการเพาะปลูกเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมและพืชสมุนไพรหายากโดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ จากตัวอย่างการเลี้ยงพืชเพียงต้นเดียวและย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง หากสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็น 10 ต้นแล้ว ในระยะเวลาเพียง 6 เดือน จะสามารถผลิตต้นพืชได้ถึง $1,000,000$ ต้น (1×10^6)

2.2.2.2 การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืช คือ การเกิดโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไมโคพลาสมา ที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้หากไม่แสดงอาการให้เห็นจะทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากที่จะแก้ไขหรือป้องกันกำจัดนอกจากกำจัดหรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป การใช้สารเคมีควบคุมเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ก่อนปลูกแม้จะช่วยลดปริมาณเชื้อที่อาจติดมากับผิวของวัสดุปลูกได้ แต่ไม่อาจใช้ได้ผลดีในกรณีการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมากลายในเซลล์พืชได้ การผลิตพืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราและแบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้วจะแสดงอาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรียและราเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถขจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมากและดำรงชีวิตอยู่ได้ในเซลล์พืช จึงมักไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็นแม้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็ตาม ในทางปฏิบัติจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงจนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อไวรัส ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (Apical meristem) และเนื้อเยื่อคัพภะ (Embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (Vascular tissues) ซึ่งได้แก่ท่อน้ำ (Xylem) และท่ออาหาร (Phloem) ที่ติดต่อกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืชที่เชื้อไวรัสจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อน

2.2.2.3 การปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน (Tolerant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (Resistant plant) ได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือชักนำการกลายพันธุ์ (Induced mutation) โดยใช้รังสี หรือสารเคมี เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนเค็มจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดเลือกสายพันธุ์ทนร้อนโดยการเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง การสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษของโรค แมลง และสารเคมีกำจัดวัชพืช นอกจากนั้นจากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอ็นเอ (DNA recombination) และการถ่ายยีน (Gene transformation) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (Transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด

2.2.2.4 การผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในกรณีเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก จึงต้องใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น โดยเริ่มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรในอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารเหลวแล้วหาวิธีการหรือเทคนิคต่างๆ ไปกระตุ้นให้เซลล์พืชผลิตสารให้มากขึ้น ได้แก่ การปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร การปรับเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อสารสำคัญนั้นๆ การเติมสารตั้งต้น (Precursors) ของขบวนการซึ่งสังเคราะห์ (Biosynthetic pathway) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเหนี่ยวนำเซลล์พืชให้เกิดความเครียด (Stress) เป็นต้น

ข้อได้เปรียบของการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อประโยชน์ในทางการค้า เหนือกว่าการปลูกแบบดั้งเดิม หลายประการดังนี้

- 1) สามารถกำหนดและควบคุมสภาวะมาตรฐานในการเจริญเติบโตได้แน่นอน
- 2) ไม่มีการผันแปรทางสภาพภูมิอากาศและฤดูกาล
- 3) ใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกสั้น
- 4) สามารถควบคุมปริมาณการผลิตให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาด
- 5) สามารถควบคุมคุณภาพของสารทุติยภูมิให้คงที่
- 6) การสกัดสารทุติยภูมิทำได้ง่ายกว่า ลดต้นทุนการผลิต

2.2.2.5 การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรค และแมลงศัตรูพืช สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์หรือ

เนื้อเยื่อพืชที่เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

2.2.2.6 การเก็บรักษาพันธุ์พืช ในปัจจุบัน พืชพรรณหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ที่หายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปไม่ช้า สาเหตุสำคัญอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์เอง นอกจากนั้นพืชบางชนิดยังยากที่จะขยายพันธุ์หรือเก็บรักษาพันธุ์ได้โดยวิธีปกติ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานและไม่คุ้มค่า นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีการเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในสภาพปลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้นาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งเช่นปกติ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ เก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ (รังสฤษฎ์, 2545)

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1) ปัจจัยทางด้านพืช

1.1) ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic factor)

การเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น และราก ของพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถเจริญและพัฒนาได้ไม่เหมือนกัน พืชบางชนิดสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น หรือ ราก ได้ง่าย บางชนิดก็ยาก แม้ว่าได้เลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม พืชบางชนิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น และราก โดยผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิสบางชนิดก็ผ่านขบวนการ เอ็มบริโอเจเนซิส (พรพิมล, 2545)

1.2) ฮอรโมน (Hormones)

ฮอรโมนที่มีอยู่ภายในพืช มีบทบาทอย่างมากกับขบวนการเกิดการเกิดลักษณะรูปร่างจากทฤษฎีของโฮป ได้มีผู้พยายามพิสูจน์ว่า การเกิดลักษณะรูปร่างควบคุมด้วยชนิด และระดับของฮอรโมน ดังนั้นภายในเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงจึงมีฮอรโมนบางชนิดส่งเสริมการเกิด ลักษณะรูปร่าง และมีฮอรโมนอีกบางชนิดที่ยับยั้งการเกิดขบวนการนี้ นอกจากนี้พบว่าชนิด (Kinds) และระดับ (Levels) ของฮอรโมนภายในชิ้นส่วนของพืชจะแตกต่างกันไปดังนี้

- ชนิดของพืช ภายในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณฮอรโมนชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น พืชบางชนิดอาจจะมีออกซินในปริมาณสูง เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้ไปเลี้ยง

เนื้อเยื่อก็สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสและรากได้ดี พืชบางชนิดอาจจะมีไซโตไคนิน เนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้เมื่อนำไปเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นหน่อได้ดี เป็นต้น

- ชนิดของเนื้อเยื่อ ในพืชชนิดเดียวกัน ปริมาณฮอร์โมนในแต่ละส่วนของต้นพืชจะไม่เหมือนกัน เช่น ส่วนปลายยอดจะมีออกซินปริมาณสูงกว่าส่วนต้น ในรังไข่ก็มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ส่วนในเมล็ดนอกจากจะมีออกซินค่อนข้างสูงแล้ว ปริมาณของจิบเบอเรลลินยังสูงด้วย เป็นต้น

ฮอร์โมนของพืชในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช เนื้อเยื่อพืชชนิดเดียวกันแตกต่างที่ชั้นส่วน เช่น ยอด ใบ ราก ก็มีฮอร์โมนที่อยู่ ภายในแตกต่างกัน สภาพของเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตกับเนื้อเยื่อที่มีการพักตัวจะมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชหลังจากนำมาเพาะเลี้ยง (พรพิมล , 2545)

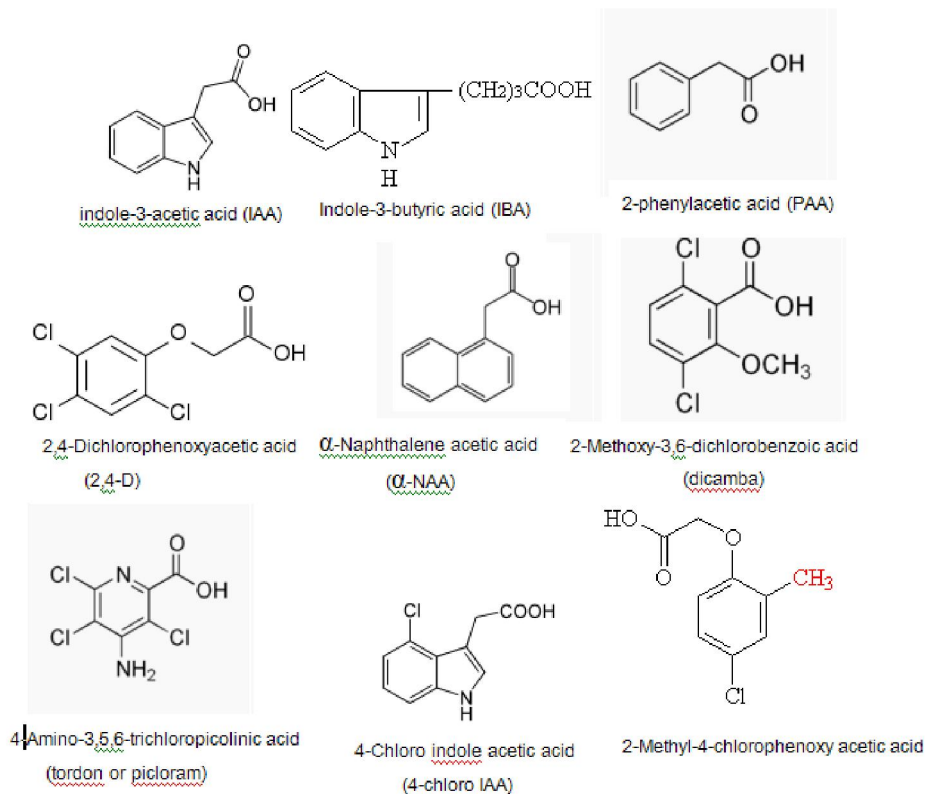
2) ปัจจัยทางด้านเคมี

2.1) สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulator) เป็นชื่อรวม ที่ใช้เรียกสารทั้งสารที่เกิดจากธรรมชาติและสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการเติบโตของพืช ถ้าเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติซึ่งพืชสร้างขึ้นมาเองจะเรียกว่า ฮอร์โมน สารเหล่านี้พืชจะสร้างขึ้นมาจากอวัยวะแห่งหนึ่งซึ่งเป็นคนละแห่งกับบริเวณที่มันทำงาน และออกฤทธิ์ของฮอร์โมนจะมีฮอร์โมนในปริมาณที่น้อยมากอย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันคำว่าฮอร์โมนมักใช้แทนสารที่สังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งมีอิทธิพลเหมือนกับฮอร์โมนที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมา (ประภัสสร, 2547)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ด้วยกันคือ ออกซิน (Auxins) , ไซโตไคนิน (Cytokinin) , จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) , กรดแอบไซซิก (Absciscic acid) และก๊าซเอทิลีน (Ethylene gas) ดังภาพที่แสดงให้เห็นถึงสูตรโครงสร้างของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1.1) ออกซิน ทำหน้าที่ควบคุมการยึดตัวของเซลล์ การข่มตาข้าง (apical dominance) และการเกิดราก ชนิดของออกซินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีทั้งชนิดที่พบในต้นพืช และชนิดที่เป็นออกซินสังเคราะห์ ออกซินที่พบในพืชทั่วไป ได้แก่ Indole-3-acetic acid (IAA) ส่วนออกซินสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ 1-naphthalene acetic acid (NAA), Indole-3-butyric acid (IBA) และ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในบางครั้งอาจใช้ออกซินผสมกันมากกว่า 1 ชนิด เช่น NAA ร่วมกับ 2,4-D เป็นต้น



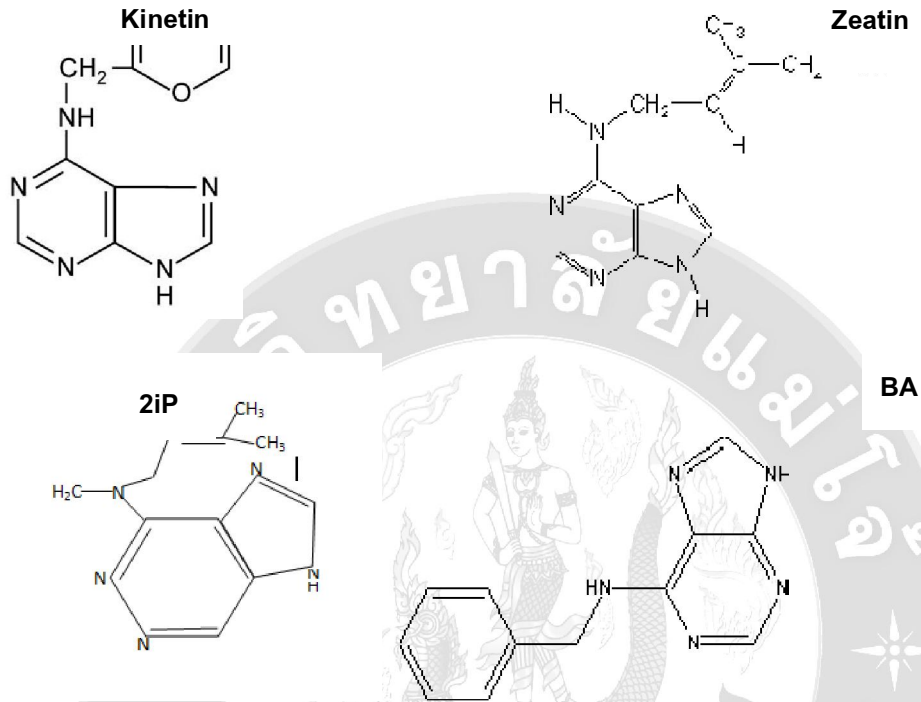
ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของสารออกซินชนิดต่างๆ

ที่มา : สมบุญ เตชะภิญญาวัดณ์. (2544)

วัตถุประสงค์ของการใช้ออกซินก็เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดราก และช่วยให้การเจริญของยอดเป็นไปได้ดี รวมทั้งเพื่อชักนำให้เกิด Somatic embryogenesis และในการใช้เพื่อทำให้เกิดยอด มักใช้ควบคู่ไปกับไซโตไคนิน เป็นที่ทราบกันดีว่าในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น อัตราส่วนความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่สูง จะชักนำให้เกิดราก หากอัตราส่วนที่ต่ำ จะชักนำให้เกิดยอด (พรพิมล, 2545) ออกซินที่เติมในอาหารจะให้ความเข้มข้นน้อยมาก IAA ใช้ 0.01 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้าเป็นสารสังเคราะห์ (IBA, NAA และ 2,4-D) ใช้ 0.001 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ศิริพงษ์, 2546)

2.1.2) ไซโตไคนิน เป็นสารที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์กระตุ้นการแตกตาข้าง และชะลอการแก่ชรา ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มักนิยมใช้สารสังเคราะห์ของไซโตไคนินมากกว่าชนิดที่พบในธรรมชาติสารสังเคราะห์ดังกล่าว ได้แก่ สารประกอบ Purine เช่น Benzylaminopurine หรือ Benzyladenine (BA) และ 6-furfurylaminopurine (Kinetin) ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นสาร Phenylureas เช่น Thidiazuron ส่วนไซโตไคนิน ที่เป็นสารธรรมชาติและใช้กันอยู่ ได้แก่ N_6 -

isopentenyladenine (2iP) ซึ่งเป็นไซโตไคนินที่ออกฤทธิ์มากที่สุดชนิดหนึ่ง ส่วน Zeatin เป็นไซโตไคนินธรรมชาติ อีกชนิดหนึ่งที่มีราคาแพง จึงนิยมใช้ในงานวิจัยเท่านั้น

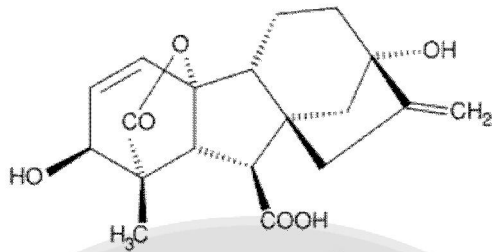


ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของสารไซโตไคนินชนิดต่างๆ

ที่มา : สมบุญ เตชะภิญญาววัฒน์. (2544)

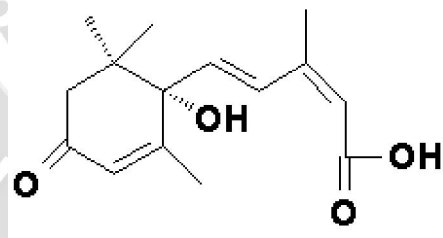
วัตถุประสงค์ของการใช้ไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการสร้างและเพิ่มจำนวนตา นอกจากนี้ไซโตไคนินยังมีผลยับยั้งการเกิดรากและยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอในกระบวนการ Embryogenesis ด้วย (พรพิมล, 2545) ไซโตไคนินใช้เติมในอาหารสูงกว่าออกซินมาก ความเข้มข้นของไซโตไคนินที่นิยมใช้กันอยู่ในระหว่าง 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ศิวพงษ์, 2546)

2.1.3) จิบเบอเรลลิน เป็นสารที่กระตุ้นการยืดตัวของลำต้น และกระตุ้นการออกดอก ในธรรมชาติพบมากกว่า 80 ชนิด ชนิดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ Gibberellic acid (GA_3) และ GA_{4+7} ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักใช้จิบเบอเรลลิน เพื่อกระตุ้นให้ยอดอ่อนมีการยืดตัวได้ ในกรณีที่มีปัญหาหยุดแคระ นอกจากนี้จิบเบอเรลลิน ยังมีผลยับยั้งการเกิดรากในเนื้อเยื่อและ



ที่มา : สมบุญ เตชะกิจนุญาวัฒน์. (2544)

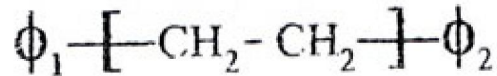
2.1.4) กรดแอบไซลิก หรือเรียกย่อๆ ว่า “ ABA ” ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปิดเปิดของปากใบ และกระตุ้นการพักตัวของตา และของเมล็ดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ABA ถูกนำมาใช้เพื่อส่งเสริมการพัฒนาของเอ็มบริโอในขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส โดยมีผลต่อการแก่ชราและการงอกของไซมาติคเอ็มบริโอ



ที่มา : สมบุญ เตชะกิจุญญาวัฒน์. (2544)

2.1.5) เจริณ เป็นสารที่อยู่ในรูปของก๊าซมีผลต่อการร่วง และการเสื่อมของส่วนต่างๆ ของพืช เกิดการโค้งงอของยอด (Apical hook) ทำให้เกิด Epinasty ที่ทำให้ก้านใบพืชชี้ลงดิน ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากด้านบนมีการแบ่งเซลล์ หรือมีการเจริญมากกว่าด้านล่าง ในเวลาที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติแล้ว มักจะมีเอริณสะสมอยู่ซึ่งเกิดจากการปล่อยมาจากเนื้อเยื่อพืช ดังนั้น

จึงอาจมีการเติมสารยับยั้งการสังเคราะห์เอธิลีนลงในอาหาร เช่น พวกเกลือของธาตุเงิน (Silver.Ag) หรือ นิกเกิล (Ni) เพื่อลดปริมาณเอธิลีน การเติมสารยับยั้งดังกล่าว พบว่าสามารถช่วยในการเกิดขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ได้ดีขึ้น (สมบุญ, 2544)



ภาพที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของสารเอธิลีน

ที่มา : สมบุญ เตชะภิญญาวัดณ์. (2544)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฮอริโมนที่นิยมใช้กันมาก มี 2 กลุ่ม ได้แก่ ไซโตไคนินและออกซิน ไซโตไคนินช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดยอด ส่วนออกซิน ช่วยให้เซลล์ยืดตัวและเกิดราก ความจริงแล้วสารทั้งสองกลุ่มนี้จะมีปฏิกริยาร่วมกันและยังได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอีกด้วย เช่น แสงและอุณหภูมิ ไม่ว่าจะเป็นกรณีใดก็ตามสิ่งที่สำคัญที่สุดก็คืออาหารจะต้องมีอัตราส่วนและชนิดของฮอริโมนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับพืชแต่ละชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยง ขึ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงอาจจะมีไซโตไคนินหรือออกซินอยู่ในเนื้อเยื่ออยู่แล้วจำนวนหนึ่ง หรือเนื้อเยื่อเหล่านี้สามารถสังเคราะห์ฮอริโมนขึ้นมาเองก็ได้ ถ้าในชิ้นส่วนพืชมีฮอริโมนเหล่านี้อยู่เพียงพอแล้วก็ไม่จำเป็นต้องเติมฮอริโมนลงไปในการเพาะเลี้ยง

การเจริญของชิ้นส่วนพืชในอาหารเพาะเลี้ยง อาจจะเจริญขึ้นมาโดยที่ไม่จำเป็นต้องมีออกซินหรือไซโตไคนิน หรืออาจจะต้องการออกซินหรือไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจจะต้องการทั้งออกซินและไซโตไคนินก็ได้ (ศิริพงษ์, 2546)

2.2. ธาตุอาหาร (Nutrients) นอกจากธาตุที่เป็นส่วนประกอบทั่วไปของสูตรอาหารแล้วพบว่า อาหารเสริมจำพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามีน แอสปาราจีน อาร์จินิน พูรีน และไพริมิดีน เคซีนไฮโดรไลเซต สารสกัดจากมอลต์ สารสกัดจากยีสต์และน้ำมะพร้าวมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส

องค์ประกอบหลักของสูตรอาหารต่าง ๆ มีดังนี้

1) เกลืออนินทรีย์ (Inorganic) ประกอบด้วย

1.1) ธาตุอาหารหลัก (Macro elements) คือ ธาตุที่พืชต้องการเป็นปริมาณมาก เช่น ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg)

และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งอยู่ในรูปของกรดหรือเกลือ เช่น แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และแมกนีเซียมซัลเฟต (Mg_2SO_4) (บุญยืน, 2544)

1.2) ธาตุอาหารรอง (Micro elements) คือ ธาตุที่พืชต้องการเป็นปริมาณน้อย เช่น เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) โมลิบดีนัม (Mo) และโคบอลต์ (Co) ซึ่งอยู่ในรูปของกรดหรือเกลือ เช่น กรดบอริก (HBO_3) (บุญยืน, 2544)

2) วิตามิน มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ Enzyme systems และต้องการเพียงเล็กน้อย (กัณยารัตน์, 2545)

3) สารอินทรีย์ (Organic compounds) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน (Energy source) ให้กับเนื้อเยื่อพืช เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้คือ น้ำตาล โดยน้ำตาล Sucrose จะเปลี่ยนรูปไปเป็น Glucose และ Fructose เมื่อน้ำตาลเข้าสู่อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเลยจุดที่เหมาะสมไปการเจริญเติบโตของต้นพืชจะลดลง (สมพร, 2549)

4) สารที่ไม่ออกฤทธิ์ เช่น วัชพืชน้ำที่ให้ต้นพืชพวงตัวอยู่ได้ และผิวน้ำจะช่วยดูดซับสารพิษที่พืชสร้างขึ้นและขับออกมาในอาหารที่เป็นพืชต่อพืช

4.1) วัช เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ที่ได้จากหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล การใส่วัชลงในอาหารจะต้องใส่ในปริมาณที่เหมาะสม ถ้าใส่มากเกินไปก็จะทำให้อาหารแข็งจะพืชสัมผัสกับอาหารได้น้อย และการดูดซับสารอาหารก็น้อยด้วย ทำให้พืชเจริญเติบโตช้า และถ้าใส่น้อยเกินไปก็จะทำให้ไม่สามารถพวงต้นพืชที่ตั้งตรงได้ (สมพร, 2549)

5) ระดับ pH ของอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร เรียกว่า pH เป็นตัวที่บอกว่าไฮดรอนของไฮโดรเจนอยู่ในสารละลายมากน้อยเพียงใด พืชชนิดต่างๆ จะต้องการ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน สารละลายที่เป็นกลางจะมี $\text{pH} = 7.0$ ถ้าเป็นด่าง pH จะสูงกว่า 7.0 และถ้าเป็นกรดค่า pH จะต่ำกว่า 7.0 สารละลายที่มี pH 5 ก็จะมีไฮโดรเจนไฮออน (H^+) สูงกว่าที่ pH 7 สิบเท่า ในทำนองเดียวกันในสารละลายที่มี pH 5 ก็จะมีไฮโดรเจนไฮออนเป็น 10 เท่า ของ pH 6 แต่ในทางตรงกันข้าม pH (OH^-) ในสารละลายเป็น 10 ของ pH 7

pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงไปเมื่อนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอล้างก่อนนึ่งอาหารมี pH 5.0-7.0 ภายหลังจากนึ่งแล้ว pH ของอาหารจะลดลง ประมาณ 0.3-0.5 หน่วย

ในงานวิจัยทางเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจจะมีการใช้สารบัฟเฟอร์เพื่อควบคุม pH ของอาหารบัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$), MEs [2-(N-morpholino)

Ethane sulphonic acid] และ [Tris (hydroxymethyl, methylamine)] บัฟเฟอร์ อาจจะทำให้สารบางอย่างในอาหารเปลี่ยนแปลงไป เช่น ทำให้น้ำตาลซูโครสกับฟรุกโทส หรือทำให้กลูโคสเปลี่ยนเป็นฟรุกโทส เป็นต้น

ถ้า pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงไปมากอย่างเห็นได้ชัด จะแสดงออกคือ อาหารแข็งจะกลายเป็นอาหารเหลวจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ ถ้าในการเตรียมอาหาร pH ของอาหารสูงหรือต่ำเกินไป จะปรับ pH ได้ โดยใช้ NaOH หรือ HCl ในความเข้มข้น 0.1-1.0 โมลาร์ (M)

pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 5.0-6.0 เมื่อเตรียมอาหาร โดยเติมสารละลายเกลือแร่ทั้งหลายครบถ้วนแล้ว แต่ pH ของสารละลายยังไม่อยู่ในช่วงที่ต้องการจะต้องมีการปรับ pH

3) ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1) อุณหภูมิ ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นอกจากจะมีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อแล้ว ยังมีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ การสร้างอวัยวะ ตลอดจนการเจริญของต้นพืชหลังย้ายปลูกลงนอกขวดแก้ว ในการควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้ได้ตามวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มักใช้ควบคุมอุณหภูมิที่มีแสง ส่วนในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วไปที่มีการติดตั้งเครื่องปรับอากาศ เพื่อช่วยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25-28 °C และเป็นอุณหภูมิคงที่ทั้งตอนกลางวันและกลางคืน (พรพิมล, 2545)

3.2) แสง มีการศึกษาเรื่องคุณสมบัติของแสงต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช ทั้งในด้านปริมาณความเข้มแสงและปริมาณแสงที่ได้รับ จำนวนชั่วโมงของแสงที่ได้รับต่อวัน สำหรับความเข้มของแสงจะมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช โดยส่วนใหญ่พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในขวดแก้วจะมีความเข้มแสงต่ำและน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ยังเกิดน้อยกว่าพืชที่ปลูกอยู่ในดิน จากการศึกษาของ Kozai และคณะ 1987 ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเพิ่มความเข้มของแสง เพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ และไม่ใส่น้ำตาลในอาหาร พบว่าสามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพและการสังเคราะห์แสงได้ นอกจากนี้ความเข้มของแสงยังมีผลต่อการเกิดยอดและราก การเกิดและการเจริญของยอดนั้นจะเป็นไปได้ดีในที่ที่มีแสงเพียงพอ ส่วนการเกิดรากและการเจริญของรากจะต้องการปริมาณแสงน้อยกว่ายอด นิยมใช้ที่ 12-16 ชั่วโมงต่อวัน (พรพิมล, 2545) ความเข้มแสง (light intensity) ช่วงแสง (photoperiod) และคุณภาพของแสง (light quality)

3.2.1) ความเข้มแสง (light intensity) มีรายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่าทางด้านช่วงแสง ถ้าหากพืชในสภาพ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับความเข้มแสงสูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย ควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1000-4,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสง คือ 3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันการให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้ มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูก

3.2.2) ระยะเวลาในการให้แสง (light duration) โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง 12 - 16 ชั่วโมง โดยหลักการแล้วช่วงแสงที่เหมาะสมควรเป็นช่วงแสงที่พืชนั้นเจริญอยู่ในธรรมชาติ ช่วงแสงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ในการเจริญเป็นราก และยอดของเนื้อเยื่อพืช ช่วงแสงที่เหมาะสมคือ 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการให้แสงกับความเข้มของแสงจะมีความสัมพันธ์กัน เช่น ถ้าให้แสงที่มีความเข้มสูง อาจจะใช้ระยะเวลาในการให้แสงน้อยลง เป็นต้น

3.2.3) คุณภาพของแสง (light quality) จากการทดลองพบว่าแสงสีแดง (red light) และแสงสีน้ำเงิน (blue light) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดยอดของพืชหลายชนิด เนื้อเยื่อที่ได้รับ Red light จะเกิดยอดปริมาณมาก

- เนื้อเยื่อที่ได้รับ F- Red light จะเกิดยอดน้อย
- เนื้อเยื่อที่ได้รับ Red..... F- Red light จะเกิดยอดน้อย
- เนื้อเยื่อที่ได้รับ F- Red light Red light จะเกิดยอดมาก

จากผลดังกล่าวจึงได้มีสมมุติฐานว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ถูกควบคุมด้วยระบบ phytochrome จึงนิยมใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) ซึ่งเหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากหลอดไฟที่ใช้แสงที่ให้แสงอัตราไวโอเลต จะยับยั้งการสร้างยอด การใช้แสงสีแดงจะดีกว่าสีน้ำเงิน ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช แสงสีแดง (660 nm.) ยังทำให้เกิดการสร้างราก มีรายงานว่าแสงสีแดงและอินฟราเรดจะกระตุ้นการเกิดยอด การสร้างตายอดต้องการทั้งแสงสีแดงและสีน้ำเงิน โดยถ้าได้รับแสงสีแดง 11 ชั่วโมง ตามด้วยสีน้ำเงิน 6 ชั่วโมง ทุกวันจะทำให้เกิดตายอดจำนวนสูงสุด แต่ถ้าให้แสงชนิดเดียวจะไม่ช่วยในการสร้างยอด จากตัวอย่างได้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะส่วน ต่างๆ ของพืช ต้องการคุณภาพแสง ความเข้มแสงและช่วงแสงที่เหมาะสม (พรพิมล, 2545)

3.3) ความชื้น (humidity)

เนื่องจากความชื้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำ ก็จะทำให้การสูญเสียน้ำภายในขวดส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกินไปก็จะเชื้ออเนกยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงมาก จะทำให้พืชเกิดอาการบวมน้ำ โดย

อากาศในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรจะมีควมชื้นอยู่ร้อยละ 70 ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช (พรพิมล, 2545)

2.2.5) การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช

พื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชปกติแล้วจะมีจุลินทรีย์มากมายที่ต้องทำการกำจัดก่อนนำลงเลี้ยงในขวดหรือภาชนะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การฟอกฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ทำได้โดยการสารเคมีซึ่งมีอยู่หลายชนิด โดยแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไป

สารฟอกฆ่าเชื้อที่นิยมใช้กันมากที่สุด ได้แก่ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (คลอโรกซ์) รองลงมาคือเอทานอล ในการฆ่าเชื้อ ควรพิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารและระยะเวลาการฟอกที่เหมาะสม เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการฟอกเชื้อได้เป็นอย่างดีโดยไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช สำหรับเนื้อเยื่อพืชที่ทำให้ปลอดเชื้อได้ยาก อาจต้องทำการฟอกซ้ำอีกหลังจากการฟอกครั้งแรก 1 - 2 วัน และตัดเล็มเนื้อเยื่อชั้นนอกทิ้งไปก่อนย้ายลงเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ ในเมล็ดพืชบางชนิดหรือเนื้อเยื่อพืชที่มีการปนเปื้อนมาก อาจต้องแช่ในน้ำไหล (Running water) เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมงก่อนแล้วจึงนำไปฟอกฆ่าเชื้อ วิธีการนี้จะช่วยลดการปนเปื้อนได้มาก สารฟอกฆ่าเชื้อโดยปกติจะต้องใช้ร่วมกับสารจับใบ เพื่อช่วยให้การแทรกซึมของสารฆ่าเชื้อได้ดีขึ้น สารจับใบที่นิยมใช้ได้แก่ Tween - 80, Tween - 20 และ Triton - x เป็นต้น นอกจากนี้ก่อนฟอกฆ่าเชื้ออาจจุ่มเนื้อเยื่อลงในเอทานอล 70% เป็นเวลา 30 - 60 วินาที เพื่อช่วยในการขจัดสารเคลือบใบพืชจะทำให้สารฟอกฆ่าเชื้อทำงานได้ดีขึ้น

การฟอกฆ่าเชื้อโดยสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เริ่มต้นด้วยการล้างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชด้วยน้ำยาและน้ำประปาให้สะอาด แล้วจึงนำมาแช่ในน้ำยาที่มีสารฟอกฆ่าเชื้อตามเวลาที่กำหนด จากนั้นให้ล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 - 5 ครั้ง นำไปผึ่งในจานแก้วปลอดเชื้อที่มีกระดาษกรองรอง เพื่อรอการผ่าตัด และย้ายลงขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อโดยเอทานอลนั้นใช้ความเข้มข้นในช่วง 70 - 95% ระยะเวลาไม่เกิน 10 วินาที วิธีการฟอกฆ่าเชื้อนี้ทำได้โดยวิธีต่างๆ กันคือ

- 1) ฉีดพ่นเอทานอลลงบนชิ้นส่วนของพืช เช่น ในช่อดอกอ่อนของข้าวหรือข้าวโพด ที่ยังมีใบธงหุ้มอยู่ แล้วปล่อยให้เอทานอลระเหยจนหมดไปในตู้ลามินาร์แอร์ฟลอส จากนั้นจึงผ่าตัดนำเอาอับละอองเกสรออกมาเลี้ยง
- 2) ฉีดพ่นเอทานอลลงบนชิ้นส่วนของพืชแล้วฉีกไฟ เช่น ผักกั้วยไม้ และเมล็ดพืชที่มีเปลือกแข็ง ซึ่งจะทำให้การผ่าตัดเอาเมล็ดหรือเอมบริโอออกมาเลี้ยง

3) แขนในเอทานอลตามด้วยการฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ เช่น เมล็ดพืชตระกูลถั่ว หรือเมล็ดน้อยหน่า ซึ่งเป็นเมล็ดที่มีเปลือกแข็งมาก ก่อนนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อที่มาจากส่วนต่างๆของพืช โดยทั่วไปแล้วมีความทนต่อการฟอกฆ่าเชื้อมากทำให้ตาย กล่าวคือเนื้อเยื่อที่ยังอ่อน ซึ่งมีลักษณะบอบบางจะมีความไว (Sensitive) ต่อการฟอกฆ่าเชื้อมากทำให้ตายได้ง่าย ในขณะที่เนื้อเยื่อที่อยู่ติดดินหรืออยู่ในดินจะมีการปนเปื้อนสูงทำให้การฟอกฆ่าเชื้อทำได้ยากที่สุด ดังนั้นวิธีการฟอกฆ่าเชื้อจึงมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของเนื้อเยื่อพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง (พรพิมล, 2545)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กู่คำ วิไลเสียง และ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร (2551) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์วุ้นนางคำ ในสภาพปลอดเชื้อ ของวุ้นนางคำซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่ง ที่ต้องการต้นพันธุ์จำนวนมาก สามารถนำมาขยายพันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณหน่อแขนงได้ โดยได้ทำการศึกษผลของชนิด และ ความเข้มข้นของ Cytokinins 3 ชนิดคือ BA, Kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มก./ล. ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณวุ้นนางคำ พบว่า TDZ 2.5 และ 2.0 มก./ล. จะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อส่วนต้นมีการเจริญสร้างยอดแขนงได้สูงสุดคือ 10.4 และ 10.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ เมื่อได้ต้นอ่อนแล้วนำมาย้ายปลูกในวัสดุปลูก 2 ชนิดคือ ทรายผสมขุยมะพร้าว และ พีทมอสผสมกับเวอร์มิคูไลท์ นำไปไว้ในสภาพต่างกัน คือ ไว้ในถุงพลาสติกใสปิดสนิท หรือ ไว้ในสภาพพ่นหมอก พบว่า วัสดุปลูกมีปฏิสัมพันธ์กับสภาพการปลูกต่อความสูงของต้นและความกว้างของใบแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ฐิติพร ผลธรรมพิทักษ์ และพรทิพย์ วงศ์แก้ว (2537) ในการทดสอบสภาพที่สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนอินทผลัมในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการสร้างดอก และแสดงลักษณะของเพศออกมาในระหว่างการเพาะเลี้ยง ได้ทำการทดลองตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากต้นกล้าอินทผลัมที่เพาะจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยตัดชิ้นส่วนที่งอกออกมาจากเมล็ดนับตั้งแต่วันที่เริ่มงอกในช่วงเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 สัปดาห์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารดัดแปลง MS ที่มีอัตราส่วนผสมของฮอร์โมน IAA และ BAP หรือ NAA และ BAP ในระดับต่างๆ และบ่มชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่างได้ เพื่อศึกษาอิทธิพลของสภาพแวดล้อมร่วมด้วย พบว่าสามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากต้นกล้าอินทผลัมอายุ 3-4 สัปดาห์ หลังจากออกจากเมล็ด มีการสร้างต้นใหม่และออกดอกได้ โดยพบทั้งต้นที่ออกดอกเป็นดอกตัวผู้และต้นที่ออกดอกเป็นดอกตัวเมีย ในสัดส่วนเท่าๆ กัน หลังจากการเพาะเลี้ยงประมาณ 6 เดือนในอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของ glucose 50 g/l ร่วมกับฮอร์โมน IAA 1 มก./ล. และ BAP 1

มก./ล. อุณหภูมิ 28 °C ความเข้มแสงประมาณ 3000 lux ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน แม้ว่าอัตรา การสร้างดอกที่พบต่อจำนวนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่ทดสอบอยู่ในระดับเพียง 15% แต่ก็แสดง ให้เห็นถึงความเป็นไปได้สำหรับการกระตุ้นให้อินทอล์มออกดอกแสดงเพศในระหว่างการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ณัฐกร ประดิษฐ์สรรพ และ กาญจน์วี พงษ์วี (2548) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขบาน้ำ (*Aponogeton madagascariensis* (Mirble) Van Bruggen, 1968) โดยนำช่อดอกมา ฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จนกระทั่งได้ต้นอ่อนปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำมาทำการ ทดลองเลี้ยง โดยการตัดแยกชิ้นส่วนยอดนำลงเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุม การเจริญเติบโตต่างกัน ที่มี 2 ปัจจัย ได้แก่ BA ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 4 มก./ล. และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1 และ 2 มก./ล. นำไปเลี้ยงใน ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25 °C ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็น เวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ออกปลูกทดสอบในบ่อขำน้ำ เป็นเวลา 3 เดือน ผลการทดลองพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิด คือ BA และ NAA มี อิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนและห้วยย่อยของขบาน้ำ โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดปลอด เชื้อของขบาน้ำ ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นอัตราความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดต้น อ่อนและห้วยย่อยได้มากที่สุด โดยมีจำนวนต้นอ่อนที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 7.00 ± 0.94 ต้นต่อชิ้น และมี จำนวนห้วยย่อย ที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 4.70 ± 0.67 หัวต่อชิ้น ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ต้นอ่อนขบาน้ำ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 6 สัปดาห์ มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.74 ± 0.159 กรัมต่อต้น เมื่อนำ ออกปลูกทดสอบในบ่อขำน้ำ พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยเมื่อ เลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน มีน้ำหนักเฉลี่ย 5.54 ± 0.984 กรัมต่อต้น ความยาวใบเฉลี่ย 15.89 ± 1.84 ซม. จำนวนใบเฉลี่ย 8.80 ± 1.31 ใบต่อต้น และมีอัตราการรอด 86%

นฤมล มงคลชัยภักดิ์ และคณะ (2549) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกระชายดำ ซึ่งมี ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker โดยเตรียมจากเหง้าที่ฟอกฆ่าเชื้อ แล้ว ตัดตาที่งอกมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร Murashighe and Skoog (MS) medium ที่ ปราศจากฮอร์โมนจนเกิดยอดอ่อน นำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน Benzylaminopurine (BAP) อย่างเดียว ขนาดความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7, 9 มก./ล. หรือรวมกับ Naphthalene acetic acid (NAA) 0, 0.1 และ 1 มก./ล. เพื่อให้เกิดยอดอ่อนหลายยอด พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP 7 มก./ล. ทำให้เกิดยอดอ่อนหลายยอดได้ดีที่สุด เฉลี่ยจำนวน ยอดอ่อน 4.2 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และเป็น 4.5 ยอดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2

เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อนในสูตรอาหารเหลว MS ที่มีฮอร์โมน BAP 3 มก./ล. ทำให้เกิดยอดอ่อนหลายยอดได้ แต่เนื้อเยื่อจะเขียวช้ำเมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อนในสูตรอาหารแข็ง MS ที่มีฮอร์โมน BAP ร่วมกับ 2,4 Dichloropyenoxy acetic acid (2, 4D) จะเกิดแคลลัส (Callus) ที่ไม่ค่อยพัฒนาเป็นยอดอ่อน ยอดอ่อนพัฒนาเป็นต้นอ่อนและสามารถเกิดรากได้ดีเมื่อใช้สูตรอาหารแข็ง MS ที่มีฮอร์โมน NAA 1 มก./ล. เมื่อนำต้นอ่อนออกปลูกบนดินในเรือนเพาะชำจะมีเปอร์เซ็นต์รอดที่ 1 เดือนเฉลี่ย 98 % และที่ 2 เดือนเฉลี่ย 96.5 %

ปัญจรัตน์ จินตนา และพนิดา รุ่งรัตนกุล (2545) การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ *Eucalyptus urophylla* โดยใช้ส่วนตาข้างที่แตกจากกิ่งเป็นชิ้นส่วนทดลอง (explant) ผลการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพบว่า การใช้ยาไฮเตอร์ (6% Sodium hypochlorite) ที่ระดับความเข้มข้น 5% ผสม Ampicyn 0.02 % Citric acid 0.02 % และน้ำยาฆ่าเชื้อ 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) มีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อประมาณ 90% การชักนำชิ้นส่วนให้เกิดยอดในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีน้ำตาลเพียง 2% และใช้ส่วนผสมของฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 μM และ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 μM ภายใต้สภาวะแวดล้อมควบคุมที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ความเข้มแสงประมาณ 2,500 ลักซ์ (lux) และระยะเวลาการให้แสงสว่างนาน 12 ชั่วโมง/วัน ปรากฏว่าสามารถชักนำ ชิ้นส่วนให้เกิดยอดได้ดีที่สุดได้จำนวนประมาณ 3-4 ยอด ภายในระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ สำหรับการทดลองชักนำรากจากยอดที่ได้ ใช้อาหาร MS ที่มีน้ำตาลเพียง 2% ที่ผสมผงถ่าน (activated charcoal) 0.2 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลาประมาณ 4-5 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีเช่นกัน

ประนอม เดชวิเศษสุกุล และนฤมล มงคลชัยภักดิ์ (2534) ได้นำส่วนของปลายยอด (shoot meristem) ของต้นชาสตุล มาฟอกที่ผิวให้ปราศจากเชื้อและเพาะเลี้ยงอย่างปราศจากเชื้อในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่มีฮอร์โมน Benzylaminopurine (BAP) 0.1, 1, 4 มก./ล. อย่างเดียว หรือ 3-Indole acetic acid (IAA) 0.05, 1 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.1, .5, 1, 4 มก./ล. และฮอร์โมน Kinetin (KN) 1 มก./ล. อย่างเดียว หรือ IAA 0.1, มก./ล. ร่วมกับ KN 1, 4 มก./ล. เพื่อดูผลของฮอร์โมน ไซโตไคนิน (cytokinin) จำพวก BAP และ KN ในการทำให้เกิดยอดอ่อนหลายยอด (multiple shoots) สำหรับฮอร์โมนที่ทำให้เกิดราก เปรียบเทียบระหว่าง IAA 1, 4 มก./ล., 1-Naphthalene acetic acid (NAA) 0.1 มก./ล. และ 3-Indole butyric acid (IBA) 2 มก./ล. จากการทดลองฮอร์โมน BAP 0.1 มก./ล. และ KN 1 มก./ล. เป็นฮอร์โมนที่เหมาะสมในการทำให้เกิดยอดอ่อนหลายยอด ฮอร์โมน IAA 1 มก./ล. เหมาะสมในการทำให้เกิดราก

พรทิพย์ ธนุทอง และคณะ (2529) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา และพันธุ์ P 502 ซึ่งเป็นพันธุ์นิยมปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย เนื้อเยื่อบริเวณที่นำมาทดสอบความสามารถในการพัฒนาการตามขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์ต้นพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อส่วนใบ กิ่งอ่อน epicoty1 และ hypocoty1 การตอบสนองของต้นมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์ในการนำมาเพาะเลี้ยงคล้ายคลึงกัน โดยชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดี คือ เนื้อเยื่อจากใบ กิ่งอ่อน ส่วนเนื้อเยื่อจาก epicoty1 และ hypocoty1 เจริญเป็นแคลลัสได้ค่อนข้างช้า อาหารที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสสำหรับเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ดังกล่าว คือ อาหาร MS ดัดแปลงที่มีระดับฮอร์โมนเป็น NAA 0.05 มก./ล. และ BAP 0.5 มก./ล. อาหารที่กระตุ้นให้แคลลัสเจริญเป็นต้นอ่อน คือ อาหาร MS ที่ประกอบด้วย NAA 0.05 มก./ล. และ BAP 5.0 มก./ล. หรือ NAA 0.1 มก./ล. และ 2iP 5.0 มก./ล. ซึ่งในสูตรแรกสามารถกระตุ้นให้สร้างต้นอ่อนได้จำนวนมาก แต่มักไม่เกิดราก ส่วนต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงในสูตรหลังมักจะแข็งแรงกว่าและเกิดรากที่สมบูรณ์ กรณีที่ลำต้นที่ได้ยังไม่เกิดรากหรือมีรากน้อย สามารถกระตุ้นให้เกิดรากให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยย้ายลงในอาหาร MS ที่มี NAA 0.001 มก./ล. และ BAP 0.0005 มก./ล. หรือย้ายอีกครั้งในอาหาร MS ปราศจากฮอร์โมน เนื้อเยื่อจาก ใบ กิ่งอ่อน และ epicoty1 สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและเกิดเป็นต้นที่เป็นก้อนแคลลัสลักษณะแข็งสีค่อนข้างขาวปนน้ำตาล และมีรากจำนวนมากในอาหารเกือบทุกสูตร สามารถกระตุ้นให้สร้าง shoot bud ได้น้อยมาก และมีการเจริญช้า

ราตรี พระนคร และ ปริญดา แข็งขัน (2548) การได้ศึกษาผลของ Benzyladenene (BA) ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* Linn.) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Block Design (RBD) ปัจจัยที่ศึกษา คือ ระดับความเข้มข้นของ BA ซึ่งมี 5 ระดับ ได้แก่ 0 1 3 6 และ 9 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงปลายยอดกรุงเขมาบนอาหารที่เติม BA แตกต่างกันเป็นเวลา 5 เดือนพบว่าปลายยอดกรุงเขมามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการสร้างยอดที่แตกต่างกัน ($P < 0.01$) คือเมื่อเติม BA 1 มก./ล. ในอาหารที่เพาะเลี้ยง มีผลทำให้ปลายยอดกรุงเขมามีเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตและการสร้างยอดสูงสุด เท่ากับ 90.63 % และ 26.34 ยอดต่อชิ้นส่วน

Charantharayil et al., (1994) ได้ศึกษาเรื่องการเพิ่มจำนวนของต้นอังกาบสีปุ่นในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้างมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดปลายยอด ผลการศึกษาพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อโดยนำชิ้นส่วนพืชมาล้างใน 1% Lanolene detergent นาน 6-8 นาที แล้วล้างผ่านน้ำไหล 15 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วย 0.1% $HgCl_2$ นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 6 - 8 ครั้ง เลี้ยงในอาหารสูตร Schenk & Hildebrand (SH) ที่เติมฮอร์โมน

BAP 3 มก./ล. ร่วมกับ Zip 0.5 มก./ล. และ IAA 1.0 มก./ล. และเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง อย่างสม่ำเสมอ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เร็ว

Girila *et al.*, (1999) ได้ศึกษาเรื่องการเพิ่มจำนวนยอด จากตาข้างและตายอดของต้น อังกาบสีปุ่น โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP และ Kinetin เพียงอย่างเดียวหนึ่งพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด จากนั้นทำการ subculture ลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม จะทำให้ตาข้างเกิดยอดได้มากถึง 45 - 49 ยอด/ชิ้นส่วน และตายอดเกิดยอด 40 - 43 ยอด/ชิ้นส่วน จากนั้นจึงทำการ subculture ในอาหารสูตรเดิมอีกครั้ง เพื่อให้ยอดยืดยาว และชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ IBA 1 มก./ล. แล้วย้ายลงปลูกดิน

Mangkita *et al.*, (2007) ได้ศึกษาเรื่องการเพิ่มจำนวนของต้นบัวควี (*Fagopyrum tataricum* Gaerth.) โดยการเพาะเลี้ยงยอดที่เกิดจากเมล็ดที่มีอายุได้ 3 สัปดาห์ ทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารสูตร Murashige & Skoog 1962 (MS) ที่เติม BAP 20 μM น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อ ลิตร และเจลแลน 1 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิ $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสงไฟจากหลอด Cool white fluorescent วันละ 16 ชั่วโมง อย่างสม่ำเสมอ สามารถชักนำให้เกิดปลายยอดได้ดี ที่สุด โดยภายในเวลา 6 สัปดาห์ สามารถชักนำยอดได้ 25 ยอด และชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงใน อาหารสูตร MS ที่ IBA 1 μM แล้วย้ายลงปลูกดิน

Rout (2004) ได้ศึกษาเรื่อง ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการขยายพันธุ์ของต้น อัญชัน โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้อมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดปลายยอดผลการศึกษาพบว่า การฟอก ตาข้อ โดยล้างตาข้อด้วยน้ำกลั่น จากนั้นล้างด้วยสสารฟอก 2% (v/v) ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้ว นำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ 0.1% Mercuric chloride เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4 - 5 ครั้ง แล้วเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige & Skoog 1962 (MS) ที่เติม BA 2.0 มก./ล. และ NAA 0.25 มก./ล. เลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสงไฟจากหลอด Cool white fluorescent วันละ 16 ชั่วโมง อย่างสม่ำเสมอ สามารถชักนำให้เกิดปลายยอดได้ดีที่สุด

Panigrahi *et al.*, (2006) ได้ศึกษาเรื่องการเพิ่มจำนวนของต้น *Asteracantha lonaifolia* (L) Nees จากโรงเรือนปิด โดยนำไปอ่อนมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอด ขณะที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสได้ดี และทำการชักนำรากบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล.

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ขั้นตอนเตรียมการ

3.1.1 ต้นพันธุ์ส้ม

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ห้องเตรียมอาหาร

3.1.2.1 เครื่องชั่ง (Balance)

3.1.2.2 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)

3.1.2.3 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

3.1.2.4 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (Hot plate and Magnetic stirrer)

3.1.2.5 เตาไมโครเวฟ (Microwave oven)

3.1.2.6 ตู้เย็น (Refrigerator)

3.1.2.7 เตาอบความร้อน (Hot oven)

3.1.2.8 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

3.1.2.9 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น หลอดทดสอบ (Test tube), ขวด (Bottle) ขนาดต่างๆ, ขวดรูปชมพู่ (Flask), ปิเปต (Pipette), กรวยแก้ว (Funnel) และแท่งแก้วคน เป็นต้น

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์ห้องย้ายเนื้อเยื่อ

3.1.3.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet)

3.1.3.2 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

3.1.3.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์, ตะเกียงแก๊ส หรือตะเกียงเบนซีน

3.1.3.4 กระดาษกรอง (Filter paper)

3.1.3.5 จานแก้ว (Petri dish)

3.1.3.6 มีดผ่าตัด (Knives and scalpel)

3.1.3.7 ปากคีบ (Forcep)

3.1.3.8 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น เข็มเย็บ, ลูป (Loop), คราดโลหะ เป็นต้น

3.1.4 วัสดุอุปกรณ์ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.4.1 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controlled)

3.1.4.2 ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ

3.1.4.3 ตัวตั้งเวลา (Timer)

3.1.5 สารเคมี

3.1.5.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Murashige & Shook 1962 (MS) (ภาคผนวก ก)

3.1.5.2 ฮอริโมน 2 ชนิด คือ BAP และ IAA

3.1.5.3 น้ำตาลซูโครส

3.1.5.4 ผงวุ้น (Agar)

3.1.5.5 โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (คลอโรกซ์)

3.1.5.6 แอลกอฮอล์ 70%

3.1.5.7 ไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.1.5.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.2 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.2.1 กระบวนการศึกษา

3.2.1.1 การวางแผนการทดลองการเพิ่มปริมาณต้น

ผู้ทดลองทำการทดลองโดยใช้ชิ้นส่วนพืช คือ ตายอด ซึ่งศึกษาปริมาณฮอริโมน BAP ที่มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอริโมน (Control) รวมทั้งหมดเป็น 5 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัวอย่าง

ความเข้มข้นของฮอริโมน BAP ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตายอดห่อ

Control ไม่ใส่ฮอริโมน BAP

ทรีตเมนต์ที่ 1 ฮอริโมน BAP 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 2 ฮอริโมน BAP 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 3 ฮอริโมน BAP 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 4 ฮอริโมน BAP 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร

3.2.1.2 การวางแผนการทดลองชักนำให้ยอดยืดยาวและชักนำราก

ผู้ทดลองทำการทดลองโดยใช้ยอดที่มีการยืดยาว ซึ่งศึกษาปริมาณฮอริโมน IAA ที่มีความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีอาหารสูตร MS ที่

ไม่เติมฮอร์โมน (Control) รวมทั้งหมดเป็น 7 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัวอย่าง

ความเข้มข้นของฮอร์โมนอินโดล อะซิติก แอซิด (IAA) ที่ใช้ในการชักนำให้ต้นยี่ดียว และชักนำรากฮ่อม

Control ไม่ใส่ฮอร์โมน IAA 0 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 1 ฮอร์โมน IAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 2 ฮอร์โมน IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 3 ฮอร์โมน IAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 4 ฮอร์โมน IAA 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 5 ฮอร์โมน IAA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 6 ฮอร์โมน IAA 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร

3.2.1.3 วิธีการทดลอง

1) การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการสำรวจต้นฮ่อมในแหล่งต่างๆ คือบ้านนาคูหา ตำบลสวนเขื่อน อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ บ้านนาตอง ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ บ้านห้วยฮ่อมพัฒนา ตำบลบ้านเวียง อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ ทำการเก็บรวบรวมต้นฮ่อมตามแหล่งๆ ไว้ในโรงเรือนปิด และคัดเลือกต้นฮ่อมที่มีความสมบูรณ์ ปราศจากโรคและแมลงมาเป็นต้นพันธุ์จำนวน 20 ต้น ซึ่งต้นพันธุ์ทั้งหมด ที่นำมาใช้นำมาจากบ้านนาคูหา เนื่องจากต้นพันธุ์จากแหล่งอื่น มีลักษณะใบหงิก ไม่สมบูรณ์

ขึ้นส่วนพืชที่ใช้ควรมีสภาพเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด คือเป็นขึ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญอายุน้อย จากการทดลองใช้ตายอด โดยเลือกขึ้นส่วนจากต้นที่มีการเจริญสมบูรณ์แข็งแรงดี ไม่มีโรคและแมลง โดยนำตายอดมาทำความสะอาดด้วยน้ำหลายๆ ครั้งตัดบริเวณ ที่ไม่ต้องการออกไป เพื่อใช้ในการทดลอง

2) การฟอกฆ่าเชื้อ

นำเอาส่วนยอดฮ่อมมา ฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 20%, 10% และ 5% ที่ผสมสารจับผิว (tween) 1-2 หยด ใช้เวลาในการฟอกที่แตกต่างกัน จากนั้น นำส่วนยอดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัวอย่าง ในแต่ละระดับความเข้มข้น เลี้ยงนาน 10 วัน ในห้องที่ควบคุมสภาพแวดล้อม โดยมีอุณหภูมิ

$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน แล้วทำการบันทึกการปนเปื้อนของเชื้อ และเลี้ยงต่อไปนาน 1 เดือน ทำการบันทึกลักษณะความสามารถในการเจริญเติบโตและการพัฒนาของส่วนยอดที่นำมาเลี้ยง

3) การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ข) ที่เติมฮอร์โมน BAP

เตรียมอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ข) ที่เติมฮอร์โมน IAA

4) วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

นำชิ้นส่วนตายอดของต้นหอมที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP โดยทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยควบคุมอุณหภูมิภายในห้องประมาณ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

5) วิธีการเพิ่มความยาวของราก

นำต้นหอมที่ผ่านการชักนำให้เกิดยอดมา Subculture ลงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IAA โดยทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยควบคุมอุณหภูมิภายในห้องประมาณ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.2.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูลในการศึกษานี้ ผู้ศึกษาใช้วิธีการเก็บข้อมูลทุกสัปดาห์ โดยมีวิธีการและขั้นตอน ดังนี้

3.2.2.1 ถ่ายรูปและสังเกตอัตราการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน ดังนี้

- 1) นับจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอด
- 2) นับจำนวนยอดต่อ 1 ชิ้นส่วน
- 3) วัดความยาวของราก

3.2.3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูล (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีการ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

3.3 สถานที่และระยะเวลาการศึกษา

3.3.1 สถานที่ที่ใช้ในการทดลอง คือ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช มหาวิทยาลัย

แม่โจ้ – แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ตำบลแม่ทราย อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่

3.3.2 ระยะเวลาการศึกษาตามระยะเวลา

ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง 12 เดือน คือ เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2552



ตารางที่ 3.1 แสดงระยะเวลาการดำเนินการศึกษา

วิธีการดำเนินการ	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
1. รวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้อง	←→										
2. หาต้นพันธุ์พืช		←→									
3. การพอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่ออ่อน			←→								
4. การชักนำให้เกิดต้น			←→								
5. การเพิ่มปริมาณต้น				←→							
6. การชักนำให้ต้นยืดยาวและการชักนำราก							←→				
7. การอนุบาลต้นอ่อน								←→			
8. การนำอ่อนออกปลูก									←→		
5. การติดตามผลการเจริญเติบโตในแปลงปลูก										←→	
6. วิเคราะห์ข้อมูลจัดทำรูปเล่มรายงาน								←→			

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาถึงส่วนต่างๆ ของฮ่อมที่ใช้เริ่มต้นเลี้ยง

ฮ่อมเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไปในที่ร่มเย็น แดดรำไร มีน้ำซึมอยู่เสมอ จึงมีการปนเปื้อนของเชื้อโรค ดังนั้น ก่อนที่จะนำขึ้นส่วนฮ่อมมาทำการศึกษาก็ได้ควบคุมสภาวะการเลี้ยงต้นพันธุ์ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อโรคให้น้อยที่สุด ซึ่งในการทดลองได้ใช้ส่วนของใบอ่อน ลำต้น และตายอด เพื่อหาว่าส่วนใดเหมาะสมที่จะใช้เริ่มต้นเลี้ยงเพื่อชักนำให้เจริญต่อไป หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าขึ้นส่วนตายอดเหมาะสมที่สุด เนื่องจากเมื่อนำลงเลี้ยงอาหารสูตร MS ตายอดมีการเจริญเติบโต ส่วนใบอ่อนนั้นไม่มีการเจริญ ขอบใบงอและมีสีน้ำตาล และลำต้นนั้นไม่มีการเจริญเช่นกัน ลำต้นมีสีน้ำตาลและดำ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกขึ้นส่วนตายอดฮ่อมมาทำการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 4.1 ต้นฮ่อมที่ใช้เป็นต้นพันธุ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

จากการทดลองได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตายอดหลายวิธีด้วยกัน (ตารางที่ 4.1) เมื่อเลี้ยงครบ 1 สัปดาห์ พบว่า

การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 มีอัตราการปนเปื้อน 17.5% มีอัตราการรอดชีวิต 82.5%

การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 2 มีอัตราการปนเปื้อน 22.5% มีอัตราการรอดชีวิต 77.5%

การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 3 มีอัตราการปนเปื้อน 30% มีอัตราการรอดชีวิต 70%

การปนเปื้อนเกิดจากเชื้อราสีขาวยและราสีดำ และการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.4)

ทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่เจริญและตายในที่สุด

สำหรับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับตายอดห่อมี ขั้นตอนดังนี้

1. ตัดชิ้นส่วนตายอดให้มีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร
2. ล้างด้วยน้ำประปาร่วมกับน้ำยาล้างจาน 3 หยด นาน 20 นาที
3. เปิดน้ำประปาไหลผ่านนาน 5 นาที
4. แช่แอลกอฮอล์ 70% นาน 10 วินาที
5. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 นาที
6. แช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 20% นาน 10 นาที
7. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
8. แช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10% นาน 10 นาที
9. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
10. แช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5% นาน 10 นาที
11. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
12. ตัดแต่งชิ้นส่วนพืช
13. นำไปเลี้ยงในอาหาร

หมายเหตุ ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 8 ทำในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet)

หลังจากที่ได้หาวิธีการฟอกที่เหมาะสมสำหรับชิ้นส่วนตายอดแล้ว ซึ่งหลังจากการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ได้นำชิ้นส่วนตายอดลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยเฉพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิภายในห้องประมาณ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน

ตารางที่ 4.1 ผลของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของตายอดฮ่อม

วิธีการฟอก	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย การปนเปื้อน	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย การรอดชีวิต	ผลการเจริญเติบโตของตายอด
1. ฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 20% ที่ผสมสารจับผิว (tween) 1-2 หยด นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที แช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10% นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ย้ายไปแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5% นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที	17.5	82.5	- ตายอดเจริญเติบโตดี - ยอดยืดยาว - ชิ้นส่วนเจริญขยายขนาด - ใบสีเขียว
2. ฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 20% ที่ผสมสารจับผิว (tween) 1-2 หยด นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที แล้วย้ายไปแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10% นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที แล้วย้ายไปแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5% นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที	22.5	77.5	- ตายอดเจริญเติบโต - ยอดยืดยาว - ชิ้นส่วนเจริญขยายขนาด - ใบสีเขียวอ่อน
3. ฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 20% ที่ผสมสารจับผิว (tween) 1-2 หยด นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที แล้วย้ายไปแช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10% นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที แล้วย้ายไปแช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที	30	70	- ตายอดเจริญเติบโตดี - ชิ้นส่วนเจริญขยายขนาด - ใบสีเขียว



ภาพที่ 4.2 ลักษณะปลายยอดอ่อนที่เริ่มเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.3 ปลายยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3 การปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรียของชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนตายอดฮ่อม เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อรา 15% ลักษณะของเชื้อราเป็นเส้นใยสีขาว (ภาพที่ 4.4ก) และเส้นใยสีดำ (ภาพที่ 4.4ข) เกิดขึ้นบริเวณรอบกิ่งยอด และมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.4ค) ซึ่งทุกทริตเมนต์จะมีการปนเปื้อนที่มีลักษณะเหมือนกัน เมื่อเชื้อราเจริญมากจะปกคลุมชิ้นส่วนตายอดทำให้ตายอดตาย สำหรับขวดที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและตายในที่สุด





(ก) การปนเปื้อนของเชื้อราสีขาว



(ข) การปนเปื้อนของเชื้อราสีดำ



(ค) การปนเปื้อนของแบคทีเรีย

ภาพที่ 4.4 ลักษณะชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน

- (ก) การปนเปื้อนของเชื้อราสีขาว
- (ข) การปนเปื้อนของเชื้อราสีดำ
- (ค) การปนเปื้อนของแบคทีเรีย

4.4 อิทธิพลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนตายอดเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของฮอร์โมน BAP ที่มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล มีผลต่อชิ้นส่วนตายอดห่อมนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอดห่อมนในแต่ละทรีตเมนต์เริ่มมีการพัฒนา (รูปที่ 4.5) มีจำนวนยอดที่มีความสูงน้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร 1.40, 3.05, 3.55, 3.30 และ 3.95 ยอด ตามลำดับ และมีจำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 0.5 เซนติเมตร 1.00, 3.20, 3.95, 3.85 และ 3.05 ยอด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดลองการเปรียบเทียบจำนวนยอดห่อมนกับความเข้มข้นของ BAP ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล ที่ระยะเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้นของ BAP (mg/L)	จำนวนยอดที่มีความสูง น้อยกว่า 0.5 cm Mean±S.D.	จำนวนยอดที่มีความสูง มากกว่า 0.5 cm Mean±S.D.
0	1.40±0.75 ^b	1.00±0.00 ^c
1	3.05±1.99 ^a	3.20±0.89 ^b
2	3.55±0.99 ^a	3.95±0.94 ^a
3	3.30±1.08 ^a	3.85±0.99 ^a
4	3.95±1.67 ^a	3.05±1.10 ^b

*คือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*ค่าตัวเลขเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ

P<0.05 โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการพัฒนาของชิ้นส่วนตายอดในแต่ละสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์

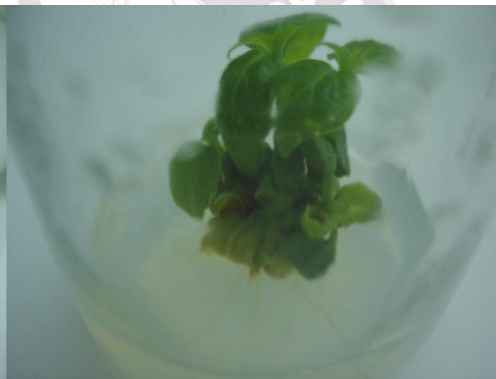
Treatments (BAP) (mg/L)	Control (0 mg/L)	Trt 1 (1 mg/L)	Trt 2 (2 mg/L)	Trt 3 (3 mg/L)	Trt 4 (4 mg/L)
สัปดาห์ที่ 2	- ชิ้นส่วนเจริญ ขยายขนาด - ไม่แตกยอด	- มียอดจำนวน 1-2 ยอด	- ชิ้นส่วนเจริญ ขยายขนาด - ไม่แตกยอด	- มียอดจำนวน 1-2 ยอด	- ชิ้นส่วนเจริญ ขยายขนาด - ไม่แตกยอด
สัปดาห์ที่ 3	- มียอดจำนวน 1 ยอด - ใบสีเขียว	- ไม่แตกยอดเพิ่ม - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 1-3 ยอด - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 2-4 ยอด - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 1-3 ยอด - ใบสีเขียวอ่อน
สัปดาห์ที่ 4	- ไม่แตกยอดเพิ่ม - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียว	- มียอดจำนวน 2-4 ยอด - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 3-5 ยอด - ยอดยืดยาว - ใบสีเขียวเข้ม	- มียอดจำนวน 2-5 ยอด - ยอดยืดยาว - ใบสีเขียวเข้ม	- มียอดจำนวน 2-4 ยอด - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียวอ่อน



Control



BAP 1 mg/l



BAP 2 mg/l



BAP 3 mg/l



BAP 4 mg/l

ภาพที่ 4.5 การเจริญเติบโตของยอดหอม เมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์

4.5 อิทธิพลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนตายอดเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

การศึกษาผลของฮอร์โมน BAP ที่มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล มีผลต่อชิ้นส่วนตายอดห่อมนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอดห่อมนในแต่ละทรีตเมนต์มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นมาก มีจำนวนยอดที่มีความสูงน้อยกว่า 1 ซม. 1.65, 5.45, 6.60, 6.25 และ 5.65 ยอด ตามลำดับ และมีจำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 1 ซม. 1.00, 6.70, 10.75, 6.90 และ 4.80 ยอด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.4 ผลการทดลองการเปรียบเทียบจำนวนยอดห่อมนกับความเข้มข้นของ BAP ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล ที่ระยะเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้นของ BAP (mg/L)	จำนวนยอดที่มีความสูง น้อยกว่า 1 cm Mean±S.D.	จำนวนยอดที่มีความสูง มากกว่า 1 cm Mean±S.D.
0	1.65±0.75 ^b	1.00±0.00 ^d
1	5.45±2.84 ^a	6.70±3.74 ^b
2	6.60±3.12 ^a	10.75±2.69 ^a
3	6.25±3.24 ^a	6.90±2.59 ^b
4	5.65±4.08 ^a	4.80±2.28 ^c

*คือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*ค่าตัวเลขเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ

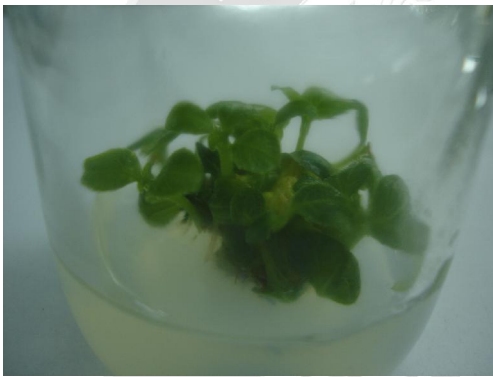
P<0.05 โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.5 ลักษณะการพัฒนารูปร่างของชิ้นส่วนตายอดในแต่ละสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

Treatments (BAP) (mg/L)	Control (0 mg/L)	Trt 1 (1 mg/L)	Trt 2 (2 mg/L)	Trt 3 (3 mg/L)	Trt 4 (4 mg/L)
สัปดาห์ที่ 5	- ชิ้นส่วนเจริญ ขยายขนาด -ไม่แตกยอด	- มียอดจำนวน 3-4 ยอด	- มียอดจำนวน 4-5 ยอด	- มียอดจำนวน 2-4 ยอด	- ชิ้นส่วนเจริญ ขยายขนาด -ไม่แตกยอดเพิ่ม
สัปดาห์ที่ 6	- มียอดจำนวน 1-2 ยอด - ใบสีเขียว	-มียอดจำนวน 3-5 ยอด - ยอดยืดยาว - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 5-6 ยอด - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 2-5 ยอด - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 3-5 ยอด - ใบสีเขียวอ่อน
สัปดาห์ที่ 7	-ไม่แตกยอดเพิ่ม - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียว	- มียอดจำนวน 5-8 ยอด - ยอดยืดยาว - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 6-10 ยอด - ยอดยืดยาว - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 5-7 ยอด - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียวอ่อน	-มียอดจำนวน 4-6 ยอด - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียวอ่อน
สัปดาห์ที่ 8	-ไม่แตกยอดเพิ่ม - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียว	- มียอดจำนวน 8-10 ยอด - ยอดยืดยาว - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 10-15 ยอด - ยอดยืดยาว - ใบสีเขียวอ่อน	- มียอดจำนวน 8-12 ยอด - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียวอ่อน	-ไม่แตกยอดเพิ่ม - ยอดยืดยาว เล็กน้อย - ใบสีเขียว เหลือง



Control



BAP 1 mg/l



BAP 2 mg/l



BAP 3 mg/l



BAP 4 mg/l

ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของยอดหอม เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

4.6 การชักนำให้ต้นหอมยืดยาวก่อนย้ายออกปลูก

จากการเพาะเลี้ยงต้นหอมบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมน IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มก./ล นาน 5 สัปดาห์ พบว่า ความสูงของต้นหอมก่อนย้ายออกปลูกมีความสูงเฉลี่ย คือ 3.66, 4.47, 4.79, 5.25, 5.24, 5.26 และ 5.32 ซม. ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของ IAA ที่ 1, 2, 3 และ 5 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสูงของต้นหอมก่อนย้ายออกปลูก ที่สัปดาห์ที่ 5

ความเข้มข้นของ IAA (mg/L)	ความสูงของต้นหอมก่อนย้ายออกปลูก (cm) Mean $\pm$ S.D.
0	3.66 $\pm$ 0.30 ^c
0.1	4.47 $\pm$ 0.08 ^b
0.5	4.79 $\pm$ 0.13 ^{ab}
1	5.25 $\pm$ 0.35 ^a
2	5.24 $\pm$ 0.60 ^a
3	5.26 $\pm$ 0.11 ^a
5	5.32 $\pm$ 0.08 ^a

*คือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*ค่าตัวเลขเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ

P<0.05 โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 4.7 แสดงความสูงของต้นห่อม เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 5 สัปดาห์

4.7 การชักนำให้ต้นหอมเกิดราก

การศึกษาผลของฮอร์โมน IAA ที่มีความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มก./ล ต่อการชักนำรากของต้นหอม โดยทำการสังเกตทุกสัปดาห์ พบว่า ความยาวของรากหอมในทุกที่รติเมนต์มีความยาวที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเลี้ยงครบ 5 สัปดาห์ ต้นหอมมีความยาวรากเป็น 3.09, 4.23, 4.32, 5.25, 5.13, 5.23 และ 5.26 ซม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

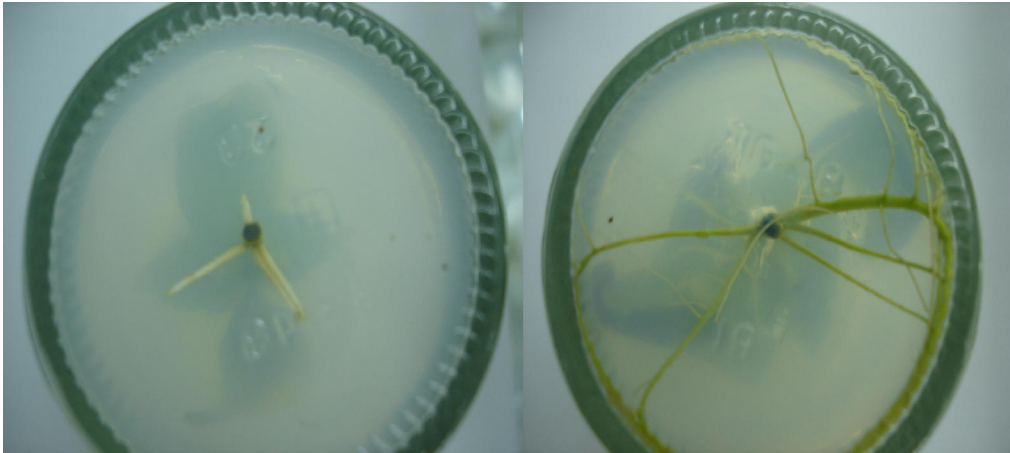
ตารางที่ 4.7 ผลการทดลองการเปรียบเทียบความยาวของรากหอมกับความเข้มข้นของ IAA ที่ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มก./ล เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ IAA (mg/L)	ความยาวของรากสัปดาห์ที่ 1 (cm) Mean $\pm$ S.D.	ความยาวของรากสัปดาห์ที่ 2 (cm) Mean $\pm$ S.D.	ความยาวของรากสัปดาห์ที่ 3 (cm) Mean $\pm$ S.D.	ความยาวของรากสัปดาห์ที่ 4 (cm) Mean $\pm$ S.D.	ความยาวของรากสัปดาห์ที่ 5 (cm) Mean $\pm$ S.D.
0	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0.38 $\pm$ 0.46 ^a	0.51 $\pm$ 0.08 ^c	1.45 $\pm$ 0.41 ^b	3.09 $\pm$ 0.69 ^c
0.1	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0.11 $\pm$ 0.07 ^a	0.68 $\pm$ 0.06 ^{bc}	2.01 $\pm$ 0.13 ^{ab}	4.23 $\pm$ 0.50 ^b
0.5	0.06 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.27 $\pm$ 0.21 ^a	0.79 $\pm$ 0.28 ^b	2.13 $\pm$ 0.45 ^{ab}	4.32 $\pm$ 0.07 ^{ab}
1	0.08 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.32 $\pm$ 0.03 ^a	0.95 $\pm$ 0.32 ^a	2.79 $\pm$ 0.52 ^a	5.25 $\pm$ 0.18 ^{ab}
2	0.09 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.25 $\pm$ 0.17 ^a	0.95 $\pm$ 0.13 ^a	2.79 $\pm$ 0.45 ^a	5.13 $\pm$ 0.25 ^a
3	0.09 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.32 $\pm$ 0.11 ^a	0.98 $\pm$ 0.10 ^a	2.89 $\pm$ 0.30 ^a	5.23 $\pm$ 0.12 ^a
5	0.12 $\pm$ 0.01 ^a	0.38 $\pm$ 0.12 ^a	1.05 $\pm$ 0.32 ^a	2.95 $\pm$ 0.18 ^a	5.26 $\pm$ 0.37 ^a

*คือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*ค่าตัวเลขเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ

P<0.05 โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 4.8 แสดงการพัฒนาการงอกของรากฮ่อม



ภาพที่ 4.9 ความสูงและความยาวของรากต้นฮ่อมก่อนย้ายออกปลูก

4.8 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการย้ายออกปลูก

จากการเพาะเลี้ยงต้นห่อมนบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมนแตกต่างกัน นาน 5 สัปดาห์ เมื่อย้ายออกปลูกภายในโรงเรือน พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นห่อมนหลังย้ายออกปลูกในโรงเรือน ที่ความเข้มข้นของ IAA ทั้ง 7 ความเข้มข้น ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้นที่สามารถทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นห่อมนเกิดขึ้นมากที่สุดอยู่ที่ 0.1, 0.5, 2 และ 5 มก./ล คือ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นห่อมนหลังย้ายออกปลูกอยู่ที่ 85 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.8 ผลการทดลองการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตกับความเข้มข้นของ IAA ที่ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มก./ล หลังการย้ายออกปลูก

ความเข้มข้นของ IAA (mg/L)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการย้ายออกปลูก Mean $\pm$ S.D.
0	75.00 $\pm$ 7.07 ^b
0.1	85.00 $\pm$ 7.07 ^a
0.5	85.00 $\pm$ 7.07 ^a
1	90.00 $\pm$ 0.00 ^a
2	85.00 $\pm$ 7.07 ^a
3	90.00 $\pm$ 0.00 ^a
5	85.00 $\pm$ 7.07 ^a

*คือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*ค่าตัวเลขเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ

P<0.05 โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 4.10 การรอดชีวิตของต้นหอมหลังการย้ายออกปลูกในโรงเรียน



ภาพที่ 4.11 ต้นหอมที่นำไปปลูกคืนสู่บ้านนาทอง



ภาพที่ 4.12 นำต้นฮ่อมที่เพาะเลี้ยงได้ปลูกลงในฮ่อมหมู่บ้านนาตอง



ภาพที่ 4.13 ต้นฮ่อมที่ปลูกลงในฮ่อมหมู่บ้านนาตอง ครบ 6 เดือน



ภาพที่ 4.14 นำต้นซ่อมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลูกเป็นแปลงสาธิตภายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ



ภาพที่ 4.15 นักศึกษาร่วมกันปลูกต้นซ่อมเพื่อเป็นแปลงสาธิตภายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของฮ่อมบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนแตกต่างกัน 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ ตายอด เนื่องจากตายอดมีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic tissue) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) อยู่ตลอดเวลา เป็นเซลล์ที่มีชีวิต ผนังเซลล์บางและเป็นเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย (Apical meristem) ทำหน้าที่ช่วยให้ส่วนต่างๆ ของพืชยืดยาวและสูงขึ้น ทำให้สามารถตอบสนองต่อฮอร์โมนได้เร็ว (สมบุญ, 2544) สำหรับชิ้นส่วนใบอ่อนและลำต้นนั้นไม่สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นยอดได้ เนื่องจากก่อนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้องมีการตัดแต่งชิ้นส่วนทำให้ชิ้นส่วนเกิดบาดแผล และโดยปกติเมื่อพืชเกิดบาดแผลจะสร้างสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ขึ้นจำนวนมากที่บริเวณบาดแผลเพื่อช่วยรักษาแผลมิให้จุลินทรีย์เข้าทำลาย และเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นแผลก็จะตายไปเพื่อปิดรอยเปิดไม่ให้เนื้อเยื่อสูญเสีย น้ำ แต่ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนฮ่อมชิ้นส่วนปลดปล่อยสารฟีนอลิกและสารให้สีอินดิโก (Indigo) ซึ่งไปมีผลในการขัดขวางการดูดซึมสารอาหารของชิ้นส่วนใบ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบ ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณรอยตัดมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จะลุกลามเข้าสู่ชิ้นส่วนจนชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมดและตาย จึงทำให้ชิ้นส่วนตายก่อนที่จะสามารถรักษาบาดแผลให้หายและมีการเจริญพัฒนาต่อไปเป็นเนื้อเยื่อใหม่ได้

การปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียของชิ้นส่วนพืช สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และจะเห็นว่าการปนเปื้อนนั้นเกิดจากเชื้อรา และแบคทีเรีย โดยถ้าเป็นการปนเปื้อนจากเชื้อราจะสังเกตเห็นเส้นใยของเชื้อราสีขาว และบางครั้งมีการสร้างสปอร์สีดำเกิดขึ้นบริเวณผิวตายอด ส่วนการปนเปื้อนแบคทีเรียจะสังเกตเห็นว่าอาหารขุ่นขึ้นกว่าปกติและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือเกิดเป็นโคโลนีของเชื้อเกิดขึ้น การปนเปื้อนเหล่านี้จะสังเกตเห็นได้ภายใน 4 วัน และมีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียจากชิ้นส่วนพืชเกิดขึ้นในทุกสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงครบ 2 สัปดาห์แล้วจะเห็นว่ามียืดรากการปนเปื้อนสูง เนื่องจากการปนเปื้อนนั้นเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ภายในเนื้อเยื่อของพืชเอง เช่น ในมัดท่อลำเลียงไซเลม (Xylem) ทำให้ไม่แสดงออกในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และไม่อาจกำจัดได้โดยการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืช จึงทำให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดการปนเปื้อนสูง

ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนได้ทุกระยะของการเลี้ยง ซึ่งถ้าหากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรียในขวดเพาะเลี้ยงแล้วจะพบว่าการเจริญเติบโตของ

จุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพราะสภาพแวดล้อมภายในขวดเพาะเลี้ยงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ อีกทั้งอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อยังประกอบด้วยน้ำตาลในระดับค่อนข้างสูง คือ 3% ทำให้เชื้อจุลินทรีย์พวกเชื้อราและแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว พร้อมทั้งปลดปล่อยสารพิษที่เกิดจากกระบวนการ เมตาบอลิซึม (Metabolism) ทำให้เนื้อเยื่อตายได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ กล่าวคือ จะต้องทำให้ภายในขวดเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพปลอดเชื้อตลอดเวลา (พรพิมล, 2545) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชก็เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของขวดอาหาร ดังนั้นควรเลือกสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของสาร, ระยะเวลาและชนิดของเนื้อเยื่อ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดีโดยไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาไม่เหมาะสมต่อเนื้อเยื่อ จะพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนั้นทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้คือ ชิ้นส่วนพืชชำเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเซลล์แตก ทำให้เกิดสี indigo และตายในที่สุด การปนเปื้อนของขวดเพาะเลี้ยงเนื่องจากการปนเปื้อน จุลินทรีย์จากชิ้นส่วนพืชจะต้องแก้ไขด้วยการเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนพืช สารปฏิชีวนะที่ใช้กันได้แก่ Penicillin, Tetracycline, Streptomycin, Chloromycetin, Gentamycin, Achromycin, Rifampicin และ 8- Hydroxyquinoline เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ส่งผลเท่าใดนัก ควรหลีกเลี่ยงไปใช้วิธี Meristem culture จึงจะสามารถแก้ปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชได้ สำหรับขวดเพาะเลี้ยงที่มีการปนเปื้อน ต้องทำการฆ่าเชื้อโดยการ Autoclave ด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เสียก่อนแล้วจึงล้างทำความสะอาด เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ (พรพิมล, 2545)

สำหรับผลของการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช และหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อพบว่า ชิ้นส่วนพืชที่แช่ในคลอรีน 20% นาน 10 นาที ล้างในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที คลอรีน 10% นาน 10 นาที ล้างในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที และ คลอรีน 5% นาน 10 นาที ล้างในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ตามลำดับ ให้ผลการรอดชีวิตมากที่สุด คือ 82.5% และมีการปนเปื้อน 17.5% เมื่อได้ชิ้นส่วนที่ปราศจากเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารที่มีฮอร์โมนเบนซิลอะมิโนพิวรีน (BAP) เพื่อเพิ่มปริมาณต้น พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. สามารถชักนำจำนวนยอดที่มีขนาดความยาวมากกว่า 1 ซม. ได้จำนวนมากที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 10.75 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.6) สอดคล้องกับรายงานของ ราตรี และ ปริญดา (2548) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดกรุงเขมา (*Cissampelos pareira* Linn.) ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารที่เติม BA แตกต่างกันเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า ปลายยอดกรุงเขมา มีเปอร์เซ็นต์การรอด

ชีวิต และการสร้างยอดที่แตกต่างกัน คือ BA 1 มก./ล. ปลายยอดกรุงเขมามีเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิต และการสร้างยอดสูงที่สุด เท่ากับ 90.63 เปอร์เซ็นต์ และ 26.34 ยอดต่อชิ้น และ Girila *et al.* (1999) ได้รายงาน การเพิ่มจำนวนยอด จากตาข้างและตายอดของต้นอังกาบสีปูน โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด จากนั้นทำการ subculture ลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม จะทำให้ตาข้างเกิดยอดได้มากถึง 45 - 49 ยอด/ชิ้นส่วน และตายอดเกิดยอด 40 - 43 ยอด/ชิ้นส่วน การเพิ่มจำนวนของยอดต่อชิ้นนี้เนื่องจากอิทธิพลของ BAP ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโทไคนิน ที่มีประสิทธิภาพดีในการกระตุ้นการเกิดยอดของพืช และปริมาณยอด เพิ่มมากขึ้น แต่มักพบว่ายอดจะมีความยาวเฉลี่ยลดลง (Bhojwani & Razdan, 1996) สำหรับลักษณะทั่วไปของยอดอ่อนที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มี BAP อยู่ในระดับสูง ใบจะมีสีเขียวเหลือง และหลุดร่วง เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก การที่พืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสมจึงเกิดสภาวะเครียดส่งผลให้พืชมีการสร้างสารเอทิลีนและปลดปล่อยออกมาจึงทำให้เกิดอาการใบร่วง (Bhojwani & Razdan, 1996)

การศึกษากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตายอดอ่อนในสภาพปลอดเชื้อในกรณีที่ไม่เติมฮอร์โมนพบว่า ชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับฮอร์โมนสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ภายในสัปดาห์ที่ 3 สร้างยอดได้เพียง 1 ยอดต่อชิ้นส่วนเท่านั้น ใบสีเขียวอ่อน มีการพัฒนาช้ามากและไม่สามารถสร้างยอดใหม่ได้ภายใน 4 สัปดาห์ เนื่องจากชิ้นส่วนพืชขาดฮอร์โมนเพื่อที่จะไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดการแบ่งเซลล์ และการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้

การชักนำให้ยอดยืดยาวโดยเลี้ยงบนอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 5 มก./ล. สามารถชักนำให้ยอดยืดยาวได้สูงสุด และไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือเท่ากับ 5.25, 5.24, 5.26 และ 5.32 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) และชักนำให้เกิดราก 100% ภายใน 3 สัปดาห์ สอดคล้องกับรายงานของ ประพนอม และ นฤมล (2534) ที่ได้นำส่วนของปลายยอด (shoot meristem) ของต้นชาสตูล มาชักนำให้เกิดราก พบว่า ฮอร์โมน IAA 1 มก./ล. เหมาะสมในการทำให้เกิดราก นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เติม IAA ในปริมาณที่น้อย คือ 0.1, 0.5 และไม่เติมสาร IAA สามารถชักนำยอดให้ยืดยาว และเกิดรากจากส่วนยอดได้ 90-95 % ภายใน 5 สัปดาห์ แสดงว่าในเนื้อเยื่อของยอด มีระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่ผลิตได้จากส่วนยอด อยู่เพียงพอต่อการกระตุ้นการเกิดราก (ศิวพงษ์, 2546)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการดูแลรักษาสภาพการปลูกเลี้ยงและสภาพทางสรีรวิทยาของต้นแม่พันธุ์ กล่าวคือ อุปกรณ์ทุกอย่างที่เกี่ยวข้องในการปลูกต้นแม่พันธุ์ควรมีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมากับวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยง และมีการควบคุมสภาวะการเลี้ยงดู ในเรื่องของปริมาณแสง น้ำ อุณหภูมิ การดูแลรักษา ตลอดจนปุ๋ยและสารเคมีที่ใช้ โดยมีตารางการให้ปุ๋ย การฉีดยากำจัดโรค และศัตรูพืชตามความเหมาะสม

5.3.2 จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนตายอดห่อมพบว่าการใช้ชิ้นส่วนตายอดนั้นจะต้องสูญเสียต้นพันธุ์เดิม ซึ่งหากเกิดปัญหาการปนเปื้อนจะทำให้สูญเสียต้นพันธุ์นั้นไปเลย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อหาชนิดและระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการชักนำให้ชิ้นส่วนอื่นๆ ของห่อม เช่น ชิ้นส่วนใบ หรือก้านใบ ให้มีการเจริญเติบโตพัฒนาเป็นยอดหรือแคลลัส เพื่อที่จะไม่ต้องสูญเสียต้นเดิม



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาถึงส่วนต่างๆ ของฮ่อมที่ใช้เริ่มต้นเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อฮ่อมในสภาพที่ปลอดเชื้อพบว่าระหว่างบิอ่อน ลำต้นและตายอด พบว่า ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตายอดเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเมื่อนำลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน ตายอดมีการเจริญเติบโตขยายขนาดขึ้น

5.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

การศึกษาการฟอกในเบื้องต้น พบว่าถ้าความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ต่ำ และเวลาไม่นานพอ จะทำให้เกิดการปนเปื้อนสูง แต่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่สูงขึ้น และเวลาที่นานขึ้น ก็ส่งผลทำให้ชิ้นส่วนชำ เนื่องจากเซลล์แตก ทำให้เกิดสีน้ำตาล เนื่องจาก Indigo หลุดออกมา เมื่อเพาะเลี้ยงไปชิ้นส่วนจะกลายเป็นสีน้ำตาล ไม่มีการเจริญเติบโต และตายในที่สุด

จากการทดสอบการฟอกฆ่าเชื้อด้วยฮ่อมที่หลายระดับความเข้มข้นของ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ในเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า การฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 20% ซึ่งผสมสารจับผิว (tween) 1-2 หยด นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10% นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ย้ายไปแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5% นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เมื่อนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยง ยอดมีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยที่ 82.5% และสามารถเจริญเติบโตได้ดี (ตารางที่ 4.1)

5.1.3 อิทธิพลของฮอร์โมน BAP ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนยอดฮ่อม

จากการศึกษาการตอบสนองต่อปริมาณฮอร์โมน BAP ของชิ้นส่วนตายอดของต้นฮ่อมที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ปลอดเชื้อ ที่มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มก./ล. ในอาหารสูตร MS โดยจะมีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นชุดควบคุม (Control) พบว่าเมื่อเลี้ยงส่วนยอดของฮ่อมครบ 8 สัปดาห์ ชิ้นส่วนตายอดฮ่อมในแต่ละทรีตเมนต์มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นมาก โดย อาหารสูตร MS ที่มี BAP 2.0 มก./ล. มีจำนวนยอดที่มี

ความสูงน้อยกว่า 1 ซม. 6.60 ยอด และมีจำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 1 ซม. 10.75 ยอด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.6

5.1.4 อิทธิพลของฮอร์โมน IAA ต่อความสูงของต้นหอม

จากการเพาะเลี้ยงต้นหอมบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมนแตกต่างกัน นาน 5 สัปดาห์ พบว่า ความสูงของต้นหอมก่อนย้ายออกปลูกที่สัปดาห์ที่ 5 ที่ความเข้มข้นของ IAA ทั้ง 7 ความเข้มข้น โดยความเข้มข้นของ IAA ที่ 1, 2, 3 และ 5 ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้นที่สามารถทำให้เกิดความสูงของต้นหอมได้มากที่สุดอยู่ที่ 2 มก./ล. คือ มีความสูงของต้นหอมอยู่ที่ 4.63 ถึง 5.83 ซม. (ตารางที่ 4.6)

5.1.5 อิทธิพลของฮอร์โมน IAA ต่อการพัฒนาความยาวของราก

เพื่อเป็นการลดขั้นตอน และประหยัดเวลาในการเพาะเลี้ยงต้นหอม การชักนำให้ยอดยืดยาวและชักนำราก จากส่วนยอดสามารถที่จะทำไปพร้อมๆ กันได้ โดยการเพาะเลี้ยงส่วนยอดของหอมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยอด ขนาดความยาว 1 ซม. บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนอินโดล อะซิติก แอซิด (IAA) ที่มีความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มก./ล. ในอาหารสูตร MS พบว่า อาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 5 มก./ล. สามารถชักนำให้ยอดยืดยาวได้สูงสุด และไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือเท่ากับ 5.25, 5.24, 5.26 และ 5.32 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) และชักนำให้เกิดราก 100% ภายใน 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารที่เติม IAA ในปริมาณที่น้อย คือ 0.1, 0.5 และไม่เติมสาร IAA สามารถชักนำยอดให้ยืดยาว (ตารางที่ 4.7) และเกิดรากจากส่วนยอดได้ 90-95 % ภายใน 5 สัปดาห์ พบว่า ความยาวของรากต้นหอมที่สัปดาห์ที่ 5 ที่เพาะเลี้ยงสามารถตอบสนองต่อฮอร์โมน IAA ได้ในทุกความเข้มข้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของ IAA 2, 3 และ 5 มก./ล. ให้ผล(ความยาวของราก)ไม่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้นที่สามารถตอบสนองได้ดีที่สุด คือ ที่ความเข้มข้น 5 มก./ล. ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดความยาวของรากได้ 4.89 ถึง 5.62 ซม. ซึ่งมีความยาวของรากมากกว่าทุกทรีตเมนต์ สามารถนำออกปลูกในโรงเรือนได้

5.1.6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังย้ายออกปลูกในโรงเรือน

จากการเพาะเลี้ยงต้นหอมบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมนแตกต่างกัน นาน 5 สัปดาห์ เมื่อย้ายออกปลูกภายในโรงเรือน พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นหอมหลังย้ายออกปลูกในโรงเรือน ที่ความเข้มข้นของ IAA ทั้ง 7 ความเข้มข้น ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้นที่

สามารถทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นห่อมเกิดขึ้นมากที่สุดอยู่ที่ 0.1, 0.5, 2 และ 5 มก./ล.
คือ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นห่อมหลังย้ายออกปลูกอยู่ที่ 77.93 ถึง 92.07 เปอร์เซ็นต์
(ตารางที่ 4.8)





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กุ่มคำ วิไลเสียง และวิไลลักษณ์ ชินะจิตร. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านนางคำ. แก่น

เกษตร 36 : 229-233

จดหมายข่าวราชบัณฑิตยสถาน. 2533. ประโยชน์ของฮ่อม ; การก๊อบฮ่อม. [ออนไลน์].

แหล่งข้อมูล : <http://gotoknow.org/create-sutuch/125290>, (วันที่ค้น : 25 กันยายน

2551).

ฐิติพร ผลธรรมพิทักษ์ และพรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2537. การชักนำการออกดอกของอินทผลัม ภายใต้

สภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่

32: 318- 329

ณัฐกร ประดิษฐ์สรรพ และกาญจน์ พงษ์ฉวี. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขบ่าน้ำ: เอกสาร

วิชาการ ฉบับที่ 33. กรมประมง สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ. กรุงเทพฯ

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้

สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

เทคโนโลยีสร้างสรรค์ ผลิตภัณฑ์ OTOP. 2548. เล่ม 4 : เทคนิคการย้อมผ้าหม้อฮ่อมให้มี

คุณภาพได้มาตรฐาน. หน้า 8 : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ไทย.

นฤมล มงคลชัยภักดิ์ ณัฐตรา จันทรสุวานิชย์ และปภาวดี สุจันทบุตร. 2549. การเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพืชของกระชายดำ.วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 48 (3) 145-155 :

ประภัศร สุททกวาทิน. 2547. งานวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ.[ออนไลน์].

แหล่งข้อมูล : <http://www.gpo.or.th/rdi/html/tissue.html>. (วันที่ค้น:27 กันยายน 2551).

ประนอม เดชวิศิษฐ์สกุล และนฤมล มงคลชัยภักดิ์. 2534. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของชาสตูล

Gynostemma pentaphyllum Mak. เอกสารการประชุมวิชาการ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 4 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ศูนย์ประสานงาน

วิชาการ, 401-413.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ :

สำนักพิมพ์ โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์.

ปัญจรัตน์จินตนา และพนิดา รุ่งรัตนกุล. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ *Eucalyptus urophylla*. รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ ประจำปี 2545.

พรทิพย์ ธนทอง บุญเรือน เพียรงาน และ สุภาทิพย์ ฤกษ์วรชัย. 2529. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจาก

ส่วนต่าง ๆ ของมะเขือเทศ. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 4 ฉบับที่ 3

พรพิมล สุริยจันทร์หาทอง. 2545. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาพืชสวน คณะ

เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

พืชให้สี. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล : http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/use/color7.htm

(วันที่ค้น : 29 กันยายน 2551).

ไพศาล คงคาอุยชัย สการวัฒน์ หิรัญกิจมงคล และอรุณศิริ ชิตางกูร. 2543. จลนพลศาสตร์ของ

ปฏิกิริยาหมักไบโक्रาม. การประชุมวิชาการ วิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย

ไทย ครั้งที่ 10

รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 3.

กรุงเทพ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ราตรี พระนคร และ ปริญดา แข่งขัน. 2548. ผลของเบนซิลอะดีนีนต่อการเจริญเติบโตของ

เนื้อเยื่อปลายยอดกรูเซมา (*Cissampelos pareira* Linn.) ในสภาพปลอดเชื้อ.

ขอนแก่น : ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วนิดา สุบรรณเสถียร สมควร ศวิตชาติ และ ประเชษฐ สร้อยทองคำ. 2531. สีสรรชาติจากพืชและ

สัตว์ในประเทศไทย. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล :

https://pindex.ku.ac.th/file_research/Kinetic.pdf (วันที่ค้น : 20 กันยายน 2551).

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี :

สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

สุรีย์ พุตระกูล สุปราณี เสี่ยงใส สรศักดิ์ เหลียวไชยพันธุ์ อนงค์ จิระโสทธิกุล สุานิส บุตรเพชรรัตน์

และอัจฉรา สายหยุด. 2543. การพัฒนาสารย้อมสีธรรมชาติในเขตภาคเหนือตอนบน.

เชียงใหม่ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. ชีววิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะ

วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. จามจุรีโปรดักท์. หน้า 103-104.

สมพร ประเสริฐสงสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชา

วิทยาศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยา

เขตปัตตานี. ปัตตานี. (ม.ป.ท.)

Bhojwani, S. S., & Razdan, M. K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice,
a Revised Edition, Elsevier Science B. V. Amsterdam

Charantharayil, G. Sydga and Seeni, S. 1994. "*In vitro* multiplication and field
establishment of *Adhatoda beddomei* C.B. Clarke, a rare medicinal plant.
Plant Cell Reports. 13 : p. 203-207.

Girija, S. Ganapathi, A and Vengadesan, G. 1999. Micropropagation of *Crossandra*
infundibuliformis (L.) Nees. Scientia Horticulturae. 82 : p. 331-337.

Ho YL, K.C. Kao, H.Y. Tsai, F.Y. Chueh and Y.S. Chang. 2003. Evaluation of
antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Strobilanthes*
cusia leaf extract in male mice and rats. Am J Chin Med. 31(1) : p. 61-69.

Nathakorn Pradissan and Kanchanaree Pongchawee. 2005. *In vitro* Multiplication of
laceleaf plant, *Aponogeton madagascariensis* (Mirbel) Van Bruggen. 4: p. 1-4.

Mangkita, W., O. Anugoolprasert, R. Ohsawa and S. Hisajima. 2007. Micropropagation
of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) plant *in vitro*.
Environment Control in Biology 45(2): 127-132.

Panigrahi, J. Mishra, R. and Behera, M. 2006. *In vitro* multiplication of *Asteracantha*
longifolia (L.) Nees- A medicinal herb. Indian Journal of Biotechnology. 5 :
562-564.

Rout, GR. 2004. Effect of cytokinins and auxins on micropropagation of

Clitoria termatea L. Available online at <http://www.biollett.amu.edu.pl>.

(Access data : 4 August 2008).

Tanaka, T. *et al.* 2004. A new lignan glycoside and phenylethanoid glycosides from

Strobilanthes cusia BREMER. Chem Pharm Bull (Tokyo). 52 (10) : p. 1242-1245





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร Murashige & Skoog, 1962 (MS)

ตารางภาคผนวก1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร Murashige & Skoog, 1962 (MS) และ

	ปริมาณที่	เตรียม	ปริมาณ
--	-----------	--------	--------



ปริมาตรที่ใช้

ชนิดของสาร	ใช้ตามสูตร (mg/l)	สารละลาย เข้มข้น (g/l)	ที่ใช้ต่อ อาหาร 1 ลิตร
1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) 100 เท่า			
Magnesiumsulphateheptadydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370	3.7	100 ml
Potassiumnitrate (KNO_3)	1900	19.0	
Ammoniumnitrate (NH_4NO_3)	1650	16.5	
Potassiumdihydrogen dehydrate (KH_2PO_4)	170	1.7	
Calciumchloride dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440	4.4	
2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) 10 เท่า			
Mangnesesulphate Monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.9	1690	10 ml
Potassium iodide (KI)	0.83	83	
Zincsulphate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6	860	
Broric acid (H_3BO_3)	6.2	60	
Sodiummolydate ehydrate ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25	25	
Coppersulphate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025	2.5	
Coboltchloride hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025	2.5	
NaFeEDTA	37.3	3730	
3. วิตามิน 10 เท่า			
Glycine	2	200	10 ml
Myo-inositol	100	1000	
Thiamine-HCl	0.25	25	
Pyridoxine-HCl	0.25	25	
Nicotinic acid	0.25	25	



ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร
Murashige & Skoog, 1962 (MS)

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร Murashige & Skoog, 1962 (MS)

1. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (ภาคผนวก ก)

1.1 ชั่งสารเคมีแต่ละชนิดตามจำนวนเท่าที่ต้องการเตรียม

1.2 ละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น

1.3 เทสารละลายแต่ละชนิดรวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยเติม

สารละลายทีละชนิด คือ Potassiumdihydrogen dehydrate (KH_2PO_4), Ammoniumnitrate (NH_4NO_3), Magnesiumsulphateheptadyrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Calciumchloride dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และPotassiumnitrate (KNO_3) ตามลำดับ แต่ละครั้งหลังเติมสารละลายควรใช้น้ำกลั่นกลั้วล้างภาชนะใส่สารเล็กน้อยแล้วเทตามลงไป ในขวดวัดปริมาตรด้วย เพราะอาจมีสารตกค้างอยู่

1.4 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.5 เก็บสารละลายเข้มข้นในขวดสีชา ที่ข้างขวดติดฉลากระบุชื่อสารละลายเข้มข้น, ความเข้มข้นของสารละลาย, ปริมาตรที่ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร และ วัน เดือน ปี ที่เตรียมสาร

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (ภาคผนวก ก)

2.1 ชั่งสารเคมีแต่ละชนิดตามจำนวนเท่าที่ต้องการเตรียม

2.2 ละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น

2.3 เทสารละลายแต่ละชนิดรวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยเติม

สารละลายทีละชนิด คือ Coppersulphate pentahhydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) และ Coboltchloride hexahhydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ให้ไปเติมมาใช้ 1 มิลลิลิตร จากสารละลายความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมเอาไว้แล้ว

2.4 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2.5 เก็บสารละลายเข้มข้นในขวดสีชา ที่ข้างขวดติดฉลากระบุชื่อสารละลายเข้มข้น, ความเข้มข้นของสารละลาย, ปริมาตรที่ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร และ วัน เดือน ปี ที่เตรียมสาร

3. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของวิตามิน (ภาคผนวก ก)

การเตรียมสารละลายเข้มข้นของวิตามิน ควรคำนึงถึงชนิดของตัวทำละลายด้วย เพราะสารแต่ละชนิดมีตัวทำละลายต่างกัน การเตรียมสารละลายเข้มข้นในความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำได้โดย

3.1 ชั่งสารแต่ละชนิด คือ Glycine, Myo-inositol, Thiamine-HCl, Pyridoxine-HCl และ Nicotinic acid มา 100 มิลลิกรัม

3.2 หยดตัวทำละลายลงไปเล็กน้อย แต่พยายามใช้ตัวทำละลายให้น้อยที่สุด เมื่อสารละลายดีแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ คนให้เข้ากัน

3.3 เติสสารละลายลงในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.4 เก็บสารละลายเข้มข้นในขวดสีชา ที่ข้างขวดติดฉลากระบุชื่อสารละลายเข้มข้น, ความเข้มข้นของสารละลาย, ปริมาตรที่ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร และ วัน เดือน ปี ที่เตรียมสาร

4. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

4.1 เมื่อเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของสูตรอาหาร MS (ภาคผนวก ก)

4.2 ดูดสารละลายจาก stock solution ต่างๆมารวมกัน

4.3 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

4.4 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ IAA และ BA ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้

4.5 ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

4.6 ปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วย HCl และ NaOH ให้ได้ประมาณ 5.8

4.7 เติมน้ำ 7.5 กรัมต่อลิตร

4.8 เคี้ยวอาหารเพื่อหอยมละลายน้ำ โดยใช้เตาแก๊ส

4.9 เทอาหารลงในขวด และปิดฝาขวด

4.10 นำขวดอาหารไปนั่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4.11 เก็บอาหารไว้ในที่สะอาดหรือที่ปลอดเชื้อ