



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดโครงการวิจัย :

การวิจัยและพัฒนาหมากจอบเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้ชุมชน

โครงการวิจัยย่อยที่ 3

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ

(Tissue culture of *Scaphium affine* (Mast.) Pierre)

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
2. นางวาริณี พลสาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

ผู้อำนวยการชุดโครงการ

ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ

ประจำปีงบประมาณ 2548 – 2549

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	132
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	134
บทที่ 1 บทนำ	135
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	137
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	143
บทที่ 4 ผลการวิจัย	147
บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผลการวิจัย	158
เอกสารอ้างอิง	161
ภาคผนวก	164
ภาคผนวก ก สารเคมีและการเตรียมสารเคมี	165
ภาคผนวก ข การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	170

บทคัดย่อ

หมากจอบ (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) เป็นไม้ต้นในวงศ์ Sterculiaceae พบกระจายในป่าเขตร้อนชื้นของประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน รากและเมล็ดใช้ประกอบเป็นอาหารและเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีการเก็บเมล็ดเพื่อส่งขายต่างประเทศปริมาณมากโดยการโค่นต้น ซึ่งมีโอกาสทำให้หมากจอบสูญพันธุ์ได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของออกซินและไซโตไคนินต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กรรม โดยได้เพาะเลี้ยงส่วนปีกของผลอ่อนหมากจอบในสูตรอาหาร woody plant medium (WPM) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นคู่ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ benzyladenine (BA) กับ thidiazuron (TDZ), BA กับ TDZ ที่ทุกคู่เติม 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 0.1 mg l^{-1} , naphthaleneacetic acid (NAA) กับ BA, และ 2, 4-D กับ kinetin โดยที่ทุกคู่ของแต่ละความเข้มข้นฮอร์โมนได้เติมและไม่เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) 500 mg l^{-1} และได้เลี้ยงเมล็ดอ่อนในอาหาร WPM ที่มี BA กับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติม 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และ PVP 500 mg l^{-1} ผลการทดลอง พบว่า มีหลายคู่ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้งในปีกของผลอ่อนและเมล็ดอ่อน PVP 500 mg l^{-1} ที่เติมในสูตรอาหารบางสูตรมีผลส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้เพิ่มขึ้น แต่ในบางสูตร PVP ทำให้อัตราการเกิดแคลลัสลดลง และพบว่าอาหารที่มี BA คู่กับ TDZ ที่เติม 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และ PVP 500 mg l^{-1} สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากปีกของผลและเมล็ดอ่อนได้ทุกคู่ความเข้มข้น

ABSTRACT

Makjong (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) is a tree belonging to the family Sterculiaceae. It distributes in the tropical rain forest of Thailand and neighboring counties. Gel form seed coat can be used for food and traditional medicinal purpose and thus has high economic value. People collect seeds by cutting its trunk for exporting in mass volume. This might be able to reduce number of Makjong causing its extinction. Therefore, the purposes of this research were to studies the effects of auxins and cytokinins on tissue culture of Makjong. These investigations would be used for propagation and conservation goals in the future. Green wings of immature fruits were cultured on woody plant medium (WPM) supplemented with different concentrations of combinations of benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ), BA and TDZ in which every combinations contained 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 0.1 mg l^{-1} , naphthaleneacetic acid (NAA) and BA, and 2, 4-D and kinetin. These combinations added and did not add polyvinylpyrrolidone (PVP) 500 mg l^{-1} . Besides, immature seeds were cultured on WPM contained different concentrations of BA and TDZ in which every combination contained 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} and PVP 500 mg l^{-1} . Results showed that there were many combinations of hormones could induce callus formation from green wing explants and immature seeds. PVP 500 mg l^{-1} in some combinations caused increasing callus formation. However, callus formation decreased in some combinations supplemented with PVP. In addition, all combinations of BA and TDZ with 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} and PVP 500 mg l^{-1} could induce callus initiation from green wing explants and immature seeds.

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BA	=	benzyladenine
BT	=	อาหารที่มีการเติม BA และ TDZ (BT : B = BA และ T= TDZ)
BTB	=	อาหารที่มีการเติม BA TDZ และ 2, 4-D (BTB : B = A, T = TDZ และ D = 2, 4-D)
CTAB	=	hexadecyltrimethyl ammonium bromide
D	=	genetic distance
DK	=	อาหารที่มีการเติม 2, 4-D และ kinetin (DK : D = 2, 4-D และ K = kinetin)
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetic acid
EtBr	=	ethidium bromide
NAA	=	naphthaleneacetic acid
NB	=	อาหารที่มีการเติม NAA และ BA (NB : N = NAA และ B=BA)
OD	=	optical density
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
RAPD	=	randomly amplified polymorphic DNA
S	=	similarity index
TDZ	=	thidiazuron
WPM	=	woody plant medium
2, 4-D	=	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หมากจอบ (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) เป็นพืชในวงศ์ Sterculiaceae กระจายตัวอยู่ในป่าชนิด lowland forest ของประเทศไทยและประเทศข้างเคียง เช่น พม่า กัมพูชา จีน มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และ สาธารณรัฐประชาชนลาว หมากจอบจัดเป็นไม้หวงห้ามประเภท ข¹ เปลือกหุ้มเมล็ดที่มีลักษณะเป็นวุ้น นำมาใช้ประกอบอาหารคาว หวาน และมีประโยชน์ทางยา ใช้ทำเครื่องดื่ม แก้วร้อนใน แก้กะหาย แก้อาเจียน ขับเสมหะ และนำมาใช้เป็นสมุนไพรแก้หอบหืด โรคบิด ลำไส้อักเสบ วุ้นล้างสะอาดสามารถนำมาพอกตา รักษาอาการตาอักเสบ บวมแดงได้ (www.rit.ac.th, www.tungsong.com, www.siemkwang.com และ www.se-ed.net) จากคุณสมบัติเหล่านี้ ปัจจุบันหมากจอบได้รับความสนใจจากนักวิจัย ในแง่ของการใช้วุ้นเพื่อผลิตเป็นเครื่องดื่มประเภทต่างๆ นักวิจัยพยายามปรับปรุงผลิตภัณฑ์ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีและสามารถเก็บรักษาได้นานและที่สำคัญส่วนของวุ้นสามารถนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคได้หลายอย่าง นักวิจัยจึงให้ความสนใจเป็นพิเศษกับคุณสมบัตินี้

หมากจอบ พบมากในป่าบางจังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ จันทบุรี ตราด และ อุบลราชธานี สำหรับที่ จ. อุบลราชธานี หมากจอบจะพบมากที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จากการสำรวจตลาดที่ด่านช่องเม็ก อ. สิรินคร จ. อุบลราชธานี พบว่าราคาขายปลีกของเมล็ดหมากจอบสูงถึงกิโลกรัมละ 150-200 บาท จากราคาที่ค่อนข้างสูงที่สร้างรายได้ให้กับชาวบ้าน ทำให้ชาวบ้านที่อาศัยอยู่รอบ ๆ บริเวณอุทยานฯ เก็บลูกจอบไปขายจำนวนมาก โดยธรรมชาติต้นหมากจอบแต่ละต้นจะออกดอกและให้ผล ใช้ระยะเวลาไม่ต่ำกว่า 10 ปีขึ้นไป ประกอบกับลักษณะต้นที่สูง ลำต้นกลมเกลี้ยงและผลจะออกที่เรือนยอดเท่านั้น ทำให้มีการเก็บผลที่ผิดวิธี คือจะโค่นต้นเพื่อเก็บผล (www.guideubon.com) หากมีการเก็บผลหมากจอบลักษณะนี้นานๆ จะทำให้ต้นหมากจอบมีจำนวนลดลงจนถึงสูญพันธุ์ได้ นอกจากนี้ความต้องการผลของหมากจอบมีปริมาณสูง อัตราการแข่งขันการเก็บผลหมากจอบมีมาก ทำให้ชาวบ้านเก็บผลหมากจอบขณะที่ยังไม่แก่จัด ทำให้เปอร์เซ็นต์การร่วงหล่นลงสู่ดินและงอกเป็นต้นตามธรรมชาติต่ำลง ส่งผลให้ประชากรต้นหมากจอบในธรรมชาติลดจำนวนลง จากเหตุผลนี้จึงทำให้ผู้ทำการวิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหมากจอบ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนพืชชนิดออกซินและไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของหมากจอบ

¹ไม้ประเภท ข คือไม้หวงห้ามพิเศษหรือไม้หายากใกล้จะสูญพันธุ์ ห้ามทำไม้ก่อนได้รับอนุญาตโดยเด็ดขาดหรือได้รับอนุญาตเป็นกรณีพิเศษจากรัฐมนตรีก่อนเท่านั้น

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ถ้าสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบได้ จะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการขยายพันธุ์หมากจอบโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ต่อไป และถ้ามีสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้จำนวนมาก ก็สามารถขยายผลได้ โดยการผลิตต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้แก่ประชาชนเพื่อนำไปปลูก หรือสำหรับการปลูกป่าทดแทนได้ต่อไป
2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคหนึ่งที่ประยุกต์ใช้กับสมุนไพร โดยที่หากต่อไปพบว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง สามารถผลิตสารสำคัญทางยาได้ ก็อาจจะชักนำให้เนื้อเยื่อนี้สร้างสารในปริมาณสูงกว่าธรรมชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของหมากจอบ

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของพืช อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา รวมถึงอาศัยข้อมูลระดับโมเลกุลช่วยในการจัดจำแนก หมากจอบมีลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Angiospermae

Subclass : Dicotyledoneae

Order : Malvales

Family : Sterculiaceae

Genus : *Scaphium*

Species : *Scaphium affine*

Scientific name : *Scaphium affine* (Mast.) Pierre

Common name : Malva nut

หมากจอบเป็นพืชในวงศ์ Sterculiaceae ซึ่งพืชในวงศ์นี้มีประมาณ 50 สกุล ในประเทศไทยพบประมาณ 16 สกุล โดยเป็นไม้หวงห้ามประเภท ก. ก็คือสกุล *Sterculia*, *Firmiana*, *Heritiera*, *Pterygota*, *Pterospermum* (*P. diversifolium* B1 : ลำป้าง, *P. acerifolium* Wild. : กระหนามปลิง), *Pterocymbium* (*P. javanicum* R.Br. : สำรองหนูหรือปออีแก) และที่เป็นไม้หวงห้ามประเภท ข. คือสกุล *Scaphium* (*S. macropodum* Beaum.) (เต็ม, 2523) ปัจจุบันมีการปรับเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ของหมากจอบให้ถูกต้องเป็น *Scaphium affine* (Mast.) Pierre

Scaphium affine (Mast.) Pierre มีชื่อพื้นเมืองเรียกต่างๆ กันไปตามบริเวณที่พบ เช่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียก หมากจอบหรือบักจอบ ส่วนบริเวณภาคกลางตะวันออกและภาคใต้ เรียก สำรอง หรือ พุงทะลาย

2.2 การกระจายตัวของหมากจอบ

หมากจอบ พบกระจายตัวตามบริเวณป่าดงดิบและป่าพื้นราบ ของพื้นที่ที่เป็นป่าเขตร้อน หรือกึ่งเขตร้อน ของประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า เวียดนาม กัมพูชา อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ลาว รวมถึงประเทศไทย (Dallwitz, Paine and Zurcher, 1993; Dallwitz, 1980) จะพบมากในป่าบางจังหวัดของไทย เช่น จันทบุรี ตราด ระยอง กาญจนบุรี ยะลา นราธิวาส และ อุบลราชธานี

แหล่งที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการแพร่พันธุ์ของหมากจอบ ควรเป็นบริเวณที่มีความชื้นค่อนข้างสูง และเป็นบริเวณที่แดดส่องถึง

2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหมากจอบ

หมากจอบเป็นไม้ต้น สูงประมาณ 20-30 เมตร (ภาพที่ 2.1) เรือนยอดเป็นพุ่มกลมรูปกรวย กิ่งก้านมักแตกออกรอบต้นในจุดเดียวกันที่เรือนยอด แล้วจะปลิดกิ่งลงหลังส่งยอดสูงขึ้นไป โคนมีพูพอน ลำต้นกลมตรง เปลือกนอกสีเทา มีรอยแผลเป็นทั่วไปเพราะเกิดจากก้านใบปลิดร่วงลงไป ใบเดี่ยว เรียงสลับ ใบมี

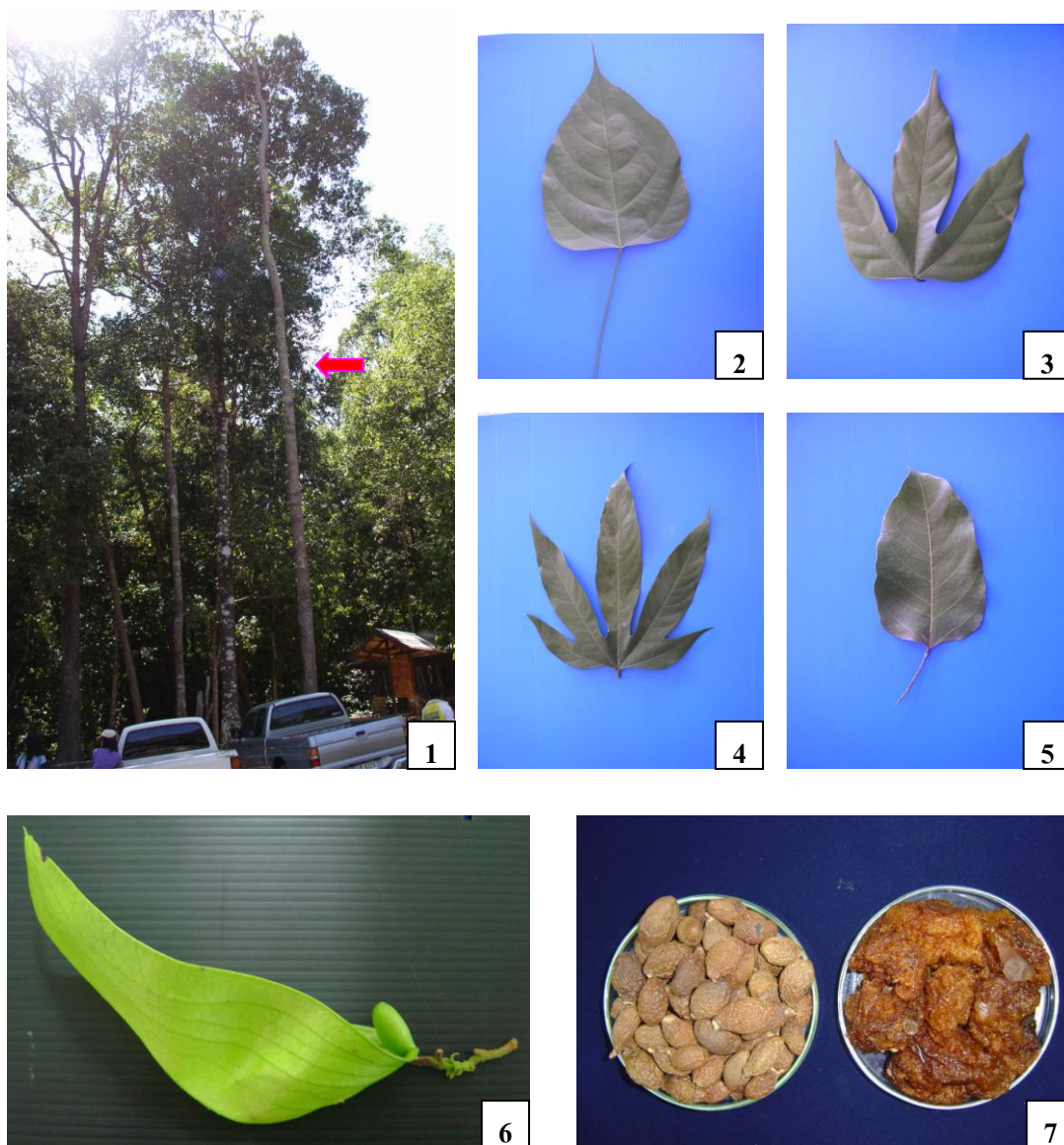
รูปแบบ ขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญจะมีรูปร่างแตกต่างกันไป (ภาพที่ 2.1) โดยต้นพืชที่มีอายุประมาณ 1 ปี จะมีลักษณะใบรูปปลายแหลมฐานโค้ง (cordate shape) ขนาดใบกว้าง 10-12 ซม. ยาว 15-25 ซม. จากนั้นประมาณปีที่ 2 จะเริ่มเปลี่ยนรูปร่างเป็นใบลักษณะคล้ายรูปฝ่ามือแต่มี 3 แฉก (palmately three-lobed shape) เมื่ออายุประมาณ 3-4 ปี ใบจะมีลักษณะคล้ายรูปฝ่ามือมี 5 แฉก (palmately five-lobed shape) ระยะสุดท้ายอายุประมาณ 4-6 ปี หรือมากกว่าขึ้นไป ใบจะมีลักษณะเป็นรูปไข่แกมขอบขนานหรือคล้ายรูปกระสวย (ovate shape) ซึ่งเป็นระยะแพร่พันธุ์ แผ่นใบบาง เกือบเป็นมันทั้งสองด้าน เนื้อใบเหนียว ก้านใบยาว 15 –20 ซม. เกือบกลม ปากใบมีรูปร่างแบบ anisocytic และพบต่อม (glandular trichomes) มีลักษณะรูปร่างกลม (globular shape) (Khamparat *et al.*, 2004) และพบกระจายทั่วใบ ดอกมีลักษณะเป็นดอกช่อ ออกดอกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีเขียวยาวอ่อน มีขนสีแดงที่กลีบเลี้ยง ดอกแยกเพศ ผลเป็นชนิด follicle มี capsule ขนาดใหญ่ ผลมีปีกมีลักษณะแผ่เป็นแผ่นขนาดใหญ่ แตกขณะยังอ่อนอยู่ ทำให้มีลักษณะโค้งงอคล้ายเรือ (ภาพที่ 2.1) สามารถปลิวตามลมไปได้ไกล เมล็ดเดี่ยว รูปรี สีน้ำตาล ผิวขรุขระขนาดกว้าง 1-1.5 ซม. ยาว 2-3 ซม. รังไข่ไม่หุ้มเมล็ด เมล็ดมีเยื่อหุ้มและเปลือกหุ้มเมล็ดด้านนอกสามารถพองตัวได้ 5-10 เท่าตัวในน้ำมีลักษณะคล้ายวุ้น (ภาพที่ 2.1) ออกดอกและให้ผลปีละ 1 ครั้ง ในราวเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ จากนั้นผลที่แก่จัดจะร่วงหล่นในเดือนเมษายน การออกดอกและให้ผลมีลักษณะพิเศษคือ แต่ละต้นมักจะให้ผลดกทุก 3-4 ปี (Dallwitz, 1980; Dallwitz, Paine and Zurcher, 1993; Toshihiro and Eizi, 1996; Zhong, 1998; Santisuk *et al.* และ ก่องกานดา, 2001)

2.4 การขยายพันธุ์ของหมากจอบ

การขยายพันธุ์หมากจอบตามธรรมชาติ เกิดจากการที่เมล็ดแก่ร่วงหล่นสู่พื้นดิน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น มีฝนตกและมีแดดส่องถึง ก็จะงอกเป็นต้นอ่อนได้เองตามธรรมชาติ ส่วนการขยายพันธุ์ทั่วไปใช้การเพาะเมล็ด เจริญได้ดีในดินร่วนหรือดินร่วนปนทราย การเพาะเมล็ดที่ไม่ใช่สภาวะตามธรรมชาติจะทำให้ต้นอ่อนข้างยาก ในระยะแรกจึงนิยมทำการเพาะเมล็ดเป็นต้นกล้าในถุง หรือในแปลงเพาะ จากนั้นต้องคอยดูแล เอาใจใส่ค่อนข้างมาก ก่อนที่จะนำไปปลูกในหลุม บริเวณที่ปลูกควรเป็นบริเวณที่มีความชื้นค่อนข้างสูง และเป็นบริเวณที่แดดส่องถึง นอกจากนี้ควรพรวนดิน ใส่ปุ๋ย และกำจัดวัชพืชบ่อยๆ จนกว่าต้นกล้าจะแข็งแรง (www.dailynews.co.th)

มานิชญ์และคณะได้มีการศึกษาการขยายพันธุ์หมากจอบ โดยการตอนกิ่งและตัดชำกิ่งของหมากจอบ ชูบรอยแผลด้วยฮอร์โมน IBA ความเข้มข้นในระดับต่างๆ แล้วปักชำในถุง พบว่า กิ่งตอนของหมากจอบเกิดรากได้ทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนและกิ่งตอนที่มีรากปริมาณมาก สามารถรอดตายได้ 96.30% ส่วนการตัดชำกิ่ง พบว่า กิ่งชำของต้นหมากจอบไม่เกิดรากและกิ่งชำส่วนใหญ่ตาย

(www.rit.ac.th/research/manoch.pdf)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหมากจอง 1) ต้นหมากจอง 2) ใบรูปร่างแบบ cordate 3) ใบรูปร่างแบบ palmately three-lobed 4) ใบรูปร่างแบบ palmately five-lobed 5) ใบรูปร่างแบบ ovate 6) ผลอ่อน และ 7) เมล็ดแก่ และลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ดที่พองตัวเมื่อแช่น้ำ

2.5 การใช้ประโยชน์และผลิตภัณฑ์จากหมากจอง

หมากจองสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ได้แก่ การใช้เป็นพืชอาหารทั้งคาวและหวาน เช่น ผลหมากจองเมื่อนำไปแช่น้ำ เปลือกที่หุ้มเมล็ดจะพองออกมีลักษณะคล้ายวุ้น สามารถนำไปทำเป็นอาหารจำพวกลาบ ปั่นอีสาน แกงจืด (แทนสาหร่ายทะเล) หรือเติมน้ำตาลหรือน้ำเชื่อมลงบนส่วนของวุ้นนี้ รับประทานเป็นของหวาน หรือการผลิตน้ำหมากจอง นอกจากนี้วุ้นของหมากจองยังมีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร เมื่อใช้เปลือกหุ้มเมล็ดที่พองตัว ประคบกับน้ำตาลทรายแดง หรือชะเอมเทศ รับประทานแก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้ไข้ แก้ไอ แก้เจ็บคอ ขับเสมหะ และยังช่วยรักษาโรคหอบหืด แก้อาการคันและลดอาการอักเสบ ส่วนวุ้นใสใช้พอกตาแก้อักเสบวมแดงได้ (www.rit.ac.th, www.tungsong.com, www.siemkwang.com and www.se-ed.net) นอกจากนี้ยังได้รับความสนใจในด้านการใช้เป็นไม้

ระดับ เนื่องจากรูปทรงลำต้นที่ตรง สวยงาม เรือนยอดเป็นพุ่มกลมคล้ายร่ม ใบมีหลายรูปแบบแปลกตา และใบอ่อนมีสีแดงเรื่อสดใส การนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น การนำเปลือกต้นหมากจองมาปูพื้นหรือทำฝาบ้าน เนื่องจากเปลือกต้นหมากจองที่แห้งซึ่งจะมีความแข็งแรงทนทาน ส่วนเนื้อไม้ของต้นหมากจองค่อนข้างอ่อน สามารถนำมาใช้ทำส่วนประกอบของเครื่องใช้ภายในบ้านที่ไม่ถูกแดดหรือความชื้นได้ โดยมีการอบน้ำยาเคมีก่อน เป็นต้น

หมากจอง กำลังจะกลายเป็นพืชเศรษฐกิจในหลายภูมิภาค เนื่องจากมีความต้องการผลแห้งของหมากจองในปริมาณมาก เพื่อส่งออกไปขายในต่างประเทศ เช่น ประเทศจีน ฮองกง ไต้หวัน และประเทศแถบตะวันออกกลาง และในขณะนี้ได้มีการนำวุ้นหมากจองมาทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น น้ำหมากจองบรรจุกระป๋อง หรือนำวุ้นหมากจองมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์คล้ายรังนก ฯลฯ ซึ่งเป็นสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่สำคัญที่สร้างรายได้ให้กับชุมชน เช่น กลุ่มแม่บ้าน ในพื้นที่ อ. นาจะหลวย จ. อุบลราชธานี (www.guideubon.com) และ อ. สอยดาว จ. จันทบุรี (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 น้ำสำรอง ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากหมากจอง

2.6 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอง

2.6.1 ความหมายและ ความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) คือ การนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยง นิยมใช้ส่วนของพืชที่กำลังเจริญ เช่น เนื้อเยื่อเจริญ ยอดอ่อน ใบอ่อน ตา มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปลอดเชื้อ องค์ประกอบสำคัญที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยง คือ ฮอโมนออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังขึ้นอยู่กับ ชนิดของเนื้อเยื่อ หรือชนิดของพืชอีกด้วย (บุญยืน, 2544)

จุดประสงค์หลักประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ เพื่อขยายพันธุ์พืช โดยอาศัยคุณสมบัติของพืช ที่สามารถพัฒนาตัวเองจากเซลล์หนึ่งเซลล์ให้แบ่งตัวและเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้ หากนำมาเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม เรียกทฤษฎีนี้ว่า Totipotency ปัจจุบันนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวาง และมีพืชหลายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ นอกจากประโยชน์ด้านการขยายพันธุ์ ยังพบว่าในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้สำหรับ

ด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การผลิตพืชปลอดโรค การผลิตยาและสารเคมีจากพืช การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ และการเก็บรักษาพันธุ์พืช

2.6.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจง

ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจง แต่จากการทดลองเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นโดยผู้ทำการวิจัยเอง ทำการศึกษาหาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อของใบและเมล็ด พบว่าสามารถฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชทั้ง 2 ส่วนได้ (ภาคผนวก ข) อย่างไรก็ตามมีเอกสารทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของโกโก้ (*Theobroma cacao*) ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับหมากจง โดยมีการรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ได้ โดยการเลี้ยง immature zygote embryo แต่ผลของรายงานนี้ไม่ได้นำมาใช้ในแง่การขยายพันธุ์มากนัก (Esan, 1975 และ Pence *et al.*, 1980) Litz (1986) สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo จากใบโกโก้ได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ Lopez-Baez *et al.* (1993) และ Sondahl *et al.* (1993) สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ของโกโก้ได้ เช่นเดียวกัน แต่อัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ต่ำมาก ซึ่งผลมาจากลักษณะทางพันธุกรรมของพืช Li *et al.* (1998) สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo และต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงดอกของโกโก้ได้ โดยการเพาะเลี้ยงดอกตัวผู้ (staminode) บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสก่อน แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด somatic embryo อีกครั้งหนึ่ง

Tan and Furtek (2003) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด somatic embryogenesis จากการเลี้ยงดอกอ่อนของโกโก้ได้ โดยที่ส่วนของ staminode สามารถเกิด somatic embryogenesis ได้ดีที่สุด และยังพบว่า อายุของดอก genotype และน้ำตาลมีผลต่อการเกิด embryogenesis ด้วย somatic embryogenesis เหล่านี้เกิดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี gibberellic acid (GA) 2 mg l^{-1} , 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0.01 mg l^{-1} และ Thidiazuron (TDZ) 0.01 mg l^{-1}

Velho *et al.* (1990) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด somatic embryo จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *T. grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับหมากจง และเป็นพืชที่ใกล้ชิดกับโกโก้ โดยการเพาะเลี้ยง immature zygote embryo บนอาหาร MS ที่มี 1 mg l^{-1} 2, 4-D และมีน้ำมะพร้าว 10% somatic embryo เจริญมาจากแคลลัส พบว่าเนื้อเยื่อเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มี 2, 4-D และน้ำตาล อย่างไรก็ตามพบว่าไม่สามารถชักนำให้ somatic embryo เหล่านี้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของพืชป่าและพืชปลูกบางชนิดมีปริมาณน้อย เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างจำกัด เช่น การติดของเมล็ดปริมาณน้อย มีระยะการพักตัวของเมล็ดที่ยาวนาน ความสามารถในการเจริญเติบโตช้า รวมถึงการถูกบุกรุกและทำลายพืชในพื้นที่ป่าเพื่อผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจ ส่งผลให้พืชบางชนิดลดจำนวนลงและใกล้จะสูญพันธุ์ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกนำมาเข้ามามีบทบาทในการช่วยเพิ่มปริมาณพืชให้ได้จำนวนมาก ในระยะเวลาสั้น เพื่อช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำโดยตรงจากชิ้นส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยง เช่น บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง ฯลฯ หรือการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสก่อนที่จะนำไปชักนำให้กลายเป็นต้นใหม่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้ยืนต้นและไม้ผลพืชบางชนิด ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากพืชมีลักษณะบางอย่างที่เป็นข้อจำกัด อาทิ มีปริมาณยางมาก เช่น ในมังคุดและหมากจง

ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด โดยในไม้ยืนต้น เช่น มังคุด แอปเปิล และขนุน มีการปรับปรุงสูตรอาหารโดย Greg Lloyd and Brent McGown (1980) เรียกว่าสูตร woody plant medium (WPM) โดยมีการปรับเปลี่ยนปริมาณของโซเดียมและคลอไรด์ เพียง

เล็กน้อย และสูตรอาหาร WPM ต้องการแอมโมเนียมและไนเตรตเพียง 75% และโปแตสเซียมเพียง 60% เมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS ซึ่งผลที่ได้จะสามารถชักนำให้เกิดยอดตรงจากชิ้นเนื้อเยื่อพืช หรือกระตุ้นให้เกิดเป็นแคลลัส

มีรายงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้ต้นหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จ เช่น การใช้ meristematic nodular callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) บนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA 2.22 μ M และ TDZ 2.25 μ M จากนั้นย้ายแคลลัสดังกล่าว มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร WPM ที่มีการเติม BA 0.44 μ M สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก (Te-chato and Lim, 2000) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบสะเดาช้าง (*Azadirachta excelsa* L.) บนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม NAA 10 μ M และ kinetin 1 μ M ชักนำให้สร้างยอดได้ 31 – 37 ยอด/แผ่นใบ และสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ (Te-chato and Rungnoi, 2000)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พืชทดลอง

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเก็บส่วนปีกของผลที่เป็นสีเขียว (green wings) และเมล็ดอ่อนของหมากจอบ (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อ. นาจะหลวย

จ. อุบลราชธานี เดือนมีนาคม พ.ศ. 2548

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีดังนี้

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารตามสูตร woody plant medium (WPM) ในภาคผนวก ก และสารควบคุมการเจริญของพืชในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ได้แก่ naphthaleneacetic acid (NAA), 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), benzyladenine (BA), kinetin, thidiazuron (TDZ)

3.2.2 สารเคมีที่เติมเพื่อดูดซับยาง ได้แก่ polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 40000

3.2.3 สารเคมีที่ใช้การฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ 95% ethyl alcohol, Clorox และ tween 20

3.3 วิธีการวิจัย

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหมากจอบ โดยเลือกชิ้นส่วนของส่วนปีกของผลอ่อนที่เป็นสีเขียว (green wings) และเมล็ดอ่อน มาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาวะปลอดเชื้อ

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ โดยใช้ส่วนปีกของผลที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ หรือส่วนใบประดับรูปคล้ายเรือสำเภาที่ติดอยู่กับผลของหมากจอบ นำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยการล้างด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างผ่านน้ำไหล 30 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ฟอกฆ่าเชื้อใน Clorox ความเข้มข้น 10% ที่เติม tween20 ประมาณ 3 - 4 หยด (ต่อ Clorox 100 ml) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำปีกของผลวางบนจานเพาะเชื้อ ตัดให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5×0.5 ซม. นำมาเลี้ยงบนอาหาร WPM (ภาคผนวก ก) ที่มีความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 3.1-3.8) จำนวน 2 ชั้น โดยแต่ละหน่วยการทดลอง (treatment) ทำ 4 ซ้ำ

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหาร WPM ที่มี BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ (mg l^{-1}) โดยที่ทุกสูตรอาหารมี PVP 500 mg l^{-1}

TDZ	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0
BA					
0.0	BT1+P*	BT2+P	BT3+P	BT4+P	BT5+P
0.5	BT6+P	BT7+P	BT8+P	BT9+P	BT10+P
1.0	BT11+P	BT12+P	BT13+P	BT14+P	BT15+P
2.0	BT16+P	BT17+P	BT18+P	BT19+P	BT20+P
4.0	BT21+P	BT22+P	BT23+P	BT24+P	BT25+P

*BT : B = BA, T= TDZ และ +P = เติม PVP 500 mg l^{-1}

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหาร WPM ที่มี BA และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg l^{-1}) และไม่มีการเติม PVP

TDZ	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0
BA					
0.0	BT1-P*	BT2-P	BT3-P	BT4-P	BT5-P
0.5	BT6-P	BT7-P	BT8-P	BT9-P	BT10-P
1.0	BT11-P	BT12-P	BT13-P	BT14-P	BT15-P
2.0	BT16-P	BT17-P	BT18-P	BT19-P	BT20-P
4.0	BT21-P	BT22-P	BT23-P	BT24-P	BT25-P

*BT : B = BA , T= TDZ และ -P = ไม่เติม PVP

ตารางที่ 3.3 สูตรอาหาร WPM ที่มี BA และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg l^{-1}) โดยที่ทุกสูตรอาหารมี 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และ PVP 500 mg l^{-1}

TDZ	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0
BA					
0.0	BTD1+P*	BTD2+P	BTD3+P	BTD4+P	BTD5+P
0.5	BTD6+P	BTD7+P	BTD8+P	BTD9+P	BTD10+P
1.0	BTD11+P	BTD12+P	BTD13+P	BTD14+P	BTD15+P
2.0	BTD16+P	BTD17+P	BTD18+P	BTD19+P	BTD20+P
4.0	BTD21+P	BTD22+P	BTD23+P	BTD24+P	BTD25+P

*BTD : B = BA, T= TDZ, D = 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และ +P = เติม PVP 500 mg l^{-1}

ตารางที่ 3.4 สูตรอาหาร WPM ที่มี BA และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg l^{-1}) โดยที่ทุกสูตรอาหารมี 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และไม่มีการเติม PVP

TDZ	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0
BA					
0.0	BTD1-P*	BTD2-P	BTD3-P	BTD4-P	BTD5-P
0.5	BTD6-P	BTD7-P	BTD8-P	BTD9-P	BTD10-P
1.0	BTD11-P	BTD12-P	BTD13-P	BTD14-P	BTD15-P
2.0	BTD16-P	BTD17-P	BTD18-P	BTD19-P	BTD20-P
4.0	BTD21-P	BTD22-P	BTD23-P	BTD24-P	BTD25-P

*BTD : B = BA, T= TDZ, D = 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และ -P = ไม่เติม PVP

ตารางที่ 3.5 สูตรอาหาร WPM ที่มี NAA และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg l^{-1}) โดยที่ทุกสูตรอาหารมี PVP 500 mg l^{-1}

BA	0.0	1.0	2.5	5.0	10.0
NAA					
0.0	NB1+P*	NB 2+P	NB 3+P	NB 4+P	NB 5+P
0.5	NB 6+P	NB 7+P	NB 8+P	NB 9+P	NB 10+P
1.0	NB 11+P	NB 12+P	NB 13+P	NB 14+P	NB 15+P
2.0	NB 16+P	NB 17+P	NB 18+P	NB 19+P	NB 20+P
4.0	NB 21+P	NB 22+P	NB 23+P	NB 24+P	NB 25+P

*NB : N= NAA, B = BA และ +P = เติม PVP 500 mg l^{-1}

ตารางที่ 3.6 สูตรอาหาร WPM ที่มี NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ (mg l^{-1}) และไม่มีการเติม PVP

BA	0.0	1.0	2.5	5.0	10.0
NAA					
0.0	NB1-P*	NB 2-P	NB 3-P	NB 4-P	NB 5-P
0.5	NB 6-P	NB 7-P	NB 8-P	NB 9-P	NB 10-P
1.0	NB 11-P	NB 12-P	NB 13-P	NB 14-P	NB 15-P
2.0	NB 16-P	NB 17-P	NB 18-P	NB 19-P	NB 20-P
4.0	NB 21-P	NB 22-P	NB 23-P	NB 24-P	NB 25-P

*NB : N= NAA, B = BA และ -P = ไม่เติม PVP

ตารางที่ 3.7 สูตรอาหาร WPM ที่มี 2, 4-D และ Kinetin ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg l^{-1}) โดยที่ทุกสูตรอาหารมี PVP 500 mg l^{-1}

Kinetin	0.0	0.5	1.0	3.0	6.0
2, 4-D					
0.0	DK1+P*	DK 2+P	DK 3+P	DK 4+P	DK 5+P
0.1	DK 6+P	DK 7+P	DK 8+P	DK 9+P	DK 10+P
1.0	DK 11+P	DK 12+P	DK 13+P	DK 14+P	DK 15+P
2.0	DK 16+P	DK 17+P	DK 18+P	DK 19+P	DK 20+P
4.0	DK 21+P	DK 22+P	DK 23+P	DK 24+P	DK 25+P

*DK : D = 2, 4- D, K= kinetin และ +P = เติม PVP 500 mg l^{-1}

ตารางที่ 3.8 สูตรอาหาร WPM ที่มี 2, 4-D และ Kinetin ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg l^{-1}) และไม่มีการเติม PVP

Kinetin 2, 4-D	0.0	0.5	1.0	3.0	6.0
0.0	DK1-P*	DK 2-P	DK 3-P	DK 4-P	DK 5-P
0.1	DK 6-P	DK 7-P	DK 8-P	DK 9-P	DK 10-P
1.0	DK 11-P	DK 12-P	DK 13-P	DK 14-P	DK 15-P
2.0	DK 16-P	DK 17-P	DK 18-P	DK 19-P	DK 20-P
4.0	DK 21-P	DK 22-P	DK 23-P	DK 24-P	DK 25-P

*DK : D = 2, 4- D, K= kinetin และ -P = ไม่เติม PVP

3.3.2 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอง โดยใช้ส่วนเมล็ดอ่อนของหมากจอง (ขนาดโดยเฉลี่ยกว้าง 10 mm และยาว 20 mm) ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวผลอ่อน โดยการล้างด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างผ่านน้ำไหล 30 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ย้ายตัวอย่างเข้าไปในตู้ laminar air flow ฟอกฆ่าเชื้อใน Clorox ความเข้มข้น 10% ที่เติม tween 20 ประมาณ 3 - 4 หยด (ต่อ Clorox 100 ml) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำผลอ่อนวางบนจานเพาะเชื้อและ ฝาครึ่งของผลอ่อน นำมาเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่มีออกซินและไซโตไคนินความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 3.3) ทุกสูตรอาหารประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 3%, 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 mg l^{-1} PVP ความเข้มข้น 500 mg l^{-1} เติมน้ำ 0.5 % และปรับค่า pH ที่ 5.2 วางชิ้นส่วนจำนวน 2 ชิ้น (1 ผล) นำไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีอุณหภูมิ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

3.3.3 การทดสอบทางสถิติ การศึกษาครั้งนี้ได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) ทำจำนวน 4 ซ้ำต่อ 1 หน่วยการทดลอง (treatment) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบกับวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหามาจอง

การศึกษากิจกรรมของฮอร์โมนพืชต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหามาจอง ทั้งการเพาะเลี้ยงปักของผลและเมล็ดอ่อน ได้วัดผลการทดลองดังนี้ พื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน โดยระดับการให้คะแนน พื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน แบ่งเป็น 0-4 คะแนน โดยที่แบ่งพื้นที่ชิ้นส่วนเป็น 4 ส่วน การเกิดแคลลัสทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง (ระดับคะแนน = 4) เกิดแคลลัส 3 ส่วน (ระดับคะแนน = 3) เกิดแคลลัสครึ่งหนึ่งของชิ้นตัวอย่าง (ระดับคะแนน = 2) เกิดแคลลัสเพียงส่วนเดียว (ระดับคะแนน = 1) และไม่เกิดแคลลัส (ระดับคะแนน = 0) เพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและจำนวนการเกิดแคลลัสต่อหนึ่งชั่วโมง และในการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนหามาจองยังได้วัดขนาด (cm^2) ของแคลลัสเพิ่มขึ้นด้วย

4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปักของผลอ่อนที่เป็นสีเขียว (green wings) ของหามาจอง

4.1.1 ผลของระดับความเข้มข้นของ BA และ TDZ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปักของผลอ่อนที่เป็นสีเขียวของหามาจอง

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปักของผลอ่อนที่เป็นสีเขียว ในอาหารสูตร WPM ที่มี BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 mg l^{-1} และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 mg l^{-1} รวม 25 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ BA และ TDZ ในอาหารมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนต่างกัน (ตารางที่ 4.1) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่มีการเติม TDZ เพียงอย่างเดียวหรือ BA ร่วมกับ TDZ มีผลชักนำให้เกิดแคลลัสในทุกระดับความเข้มข้นของ BA และ TDZ แตกต่างกันไป แต่จะไม่พบการเกิดแคลลัสในอาหารที่มีแต่ BA อย่างเดียวหรือไม่มี TDZ หรือไม่มีทั้ง BA และ TDZ โดยสูตรอาหารที่มี BA 0.5 mg l^{-1} และ TDZ ความเข้มข้น 4 mg l^{-1} ที่ไม่เติม PVP มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด คือสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100% และได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัส 2.38 คะแนน จากการสังเกตพบแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) และมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.1 และ 4.2)

การเติม PVP 500 mg l^{-1} ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกือบทุกสูตร ไม่มีผลส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน สูตรอาหารที่มี TDZ 4 mg l^{-1} อย่างเดียวที่มี PVP สามารถส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด คือสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100% และได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัส 3.25 คะแนน

ตารางที่ 4.1 ผลของระดับความเข้มข้นของ BA และ TDZ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปึกของผลอ่อนที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

Treatments	BA	TDZ	ค่าคะแนนของพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน		เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส		จำนวนแคลลัสต่อหนึ่งซ้า	
	(mg l ⁻¹)		ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP
BT 1***	0.0	0.0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
BT 2	0.0	0.5	0.38±0.52 cd	0.63±0.74 bc	37.50±47.87 cde	50.00±40.82 bcd	0.75±0.96 cde	1.00±0.82 abcd
BT 3	0.0	1.0	1.50±1.60 abcd	1.38±1.06 bc	75.00±28.87 abc	75.00±28.87 ab	1.50±0.58 abc	1.50±0.58 ab
BT 4	0.0	2.0	1.50±0.93 abcd	0.88±0.64 bc	87.50±25.00 ab	75.00±28.87 ab	1.75±0.50 ab	1.50±0.58 ab
BT 5	0.0	4.0	1.63±1.85 abc	3.25±1.39 a	50.00±57.74 bcd	100.00±0.00 a	1.00±1.15 bcd	2.00±0.00 a
BT 6	0.5	0.0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
BT 7	0.5	0.5	1.38±1.30 abcd	0.63±0.74 bc	62.50±47.87 abcd	50.00±40.82 abcd	1.25±0.96 abcd	1.00±0.00 abcd
BT 8	0.5	1.0	2.13±0.83 ab	1.13±0.92 ab	100.00±0.00 a	75.00±28.87 ab	2.00±0.00 a	1.50±1.00 ab
BT 9	0.5	2.0	0.75±0.46 bcd	0.38±0.52 bc	75.00±28.87 abc	37.50±47.87 bcd	1.50±0.58 abc	0.75±0.96 bcd
BT 10	0.5	4.0	2.38±1.06 a	0.38±0.52 bc	100.00±0.00 a	37.50±47.87 bcd	2.00±0.00 a	0.75±0.96 bcd
BT 11	1.0	0.0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
BT 12	1.0	0.5	0.00±0.00 d	1.38±1.69 bc	0.00±0.00 e	62.50±47.87 abc	0.00±0.00 e	1.25±0.96 abc
BT 13	1.0	1.0	0.75±0.46 bcd	0.50±0.76 bc	75.00±28.87 abc	37.50±47.87 bcd	1.50±0.58 abc	0.75±0.96 bcd
BT 14	1.0	2.0	0.75±1.39 bcd	0.63±0.92 bc	37.50±47.87 cde	37.50±47.87 bcd	0.75±0.50 cde	0.75±0.96 bcd
BT 15	1.0	4.0	2.25±1.91 ab	0.50±0.53 bc	75.00±28.87 abc	50.00±40.82 abcd	1.50±1.00 abc	1.00±0.82 abcd
BT 16	2.0	0.0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
BT 17	2.0	0.5	2.13±0.64 ab	0.38±0.74 bc	100.00±0.00 a	25.00±28.87 bcd	2.00±0.00 a	0.50±0.58 bcd
BT 18	2.0	1.0	1.50±1.60 abcd	1.13±1.36 c	75.00±28.87 abc	62.50±47.87 abc	1.50±0.58 abc	1.25±0.96 abc
BT 19	2.0	2.0	0.75±0.46 bcd	0.38±0.52 bc	75.00±28.87 abc	37.50±47.87 bcd	1.50±0.58 abc	0.75±0.96 bcd
BT 20	2.0	4.0	1.38±1.03 abcd	1.13±1.81 bc	75.00±28.87 abc	37.50±47.87 bcd	1.50±0.58 abc	0.75±0.96 bcd
BT 21	4.0	0.0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
BT 22	4.0	0.5	1.88±0.64 abc	0.63±0.52 bc	100.00±0.00 a	62.50±47.87 abc	2.00±0.00 a	1.25±0.96 abc
BT 23	4.0	1.0	2.25±1.16 ab	1.63±1.06 b	87.50±25.00 ab	100.00±0.00 a	1.75±0.50 ab	2.00±0.00 a
BT 24	4.0	2.0	1.26±0.71 abcd	0.25±0.46 bc	87.50±25.00 ab	25.00±28.87 bcd	1.75±0.50 ab	0.50±0.58 bcd
BT 25	4.0	4.0	2.38±1.51 a	0.13±0.35 bc	100.00±0.00 a	12.50±25.10 cd	2.00±0.00 a	0.25±0.05 cd

* คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน โดยที่แบ่งพื้นที่ชิ้นส่วนเป็น 4 ส่วน 4 = การเกิดแคลลัสทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง 3 = เกิดแคลลัส 3 ส่วน 2 = เกิดแคลลัสครึ่งหนึ่งของชิ้นตัวอย่าง 1 = เกิดแคลลัสเพียงส่วนเดียว และ 0 = ไม่เกิดแคลลัส

** ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

*** BT : B = BA และ T = TDZ

4.1.2 ผลของระดับความเข้มข้นของ BA, TDZ และ 2, 4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปีกของผลอ่อนในอาหารสูตร WPM ที่มี BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 mg l⁻¹ และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 mg l⁻¹ โดยที่ทุกสูตรอาหารประกอบด้วย 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 mg l⁻¹ รวม 25 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ BA TDZ และ 2, 4-D ในอาหารมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนต่างกัน (ตารางที่ 4.2) พบการชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารในทุกระดับความเข้มข้นของ BA TDZ และ 2,4-D แตกต่างกันไป โดยสูตรอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg l⁻¹, BA 0.5 mg l⁻¹ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ ที่ไม่เติม PVP มีผลต่อพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด โดยได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัส 1.75 คะแนน และในสูตรอาหารที่มี BA 0.5 mg l⁻¹ ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.0, 1.0 และ 2.0 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100% จากการสังเกตพบแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น และมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.3 และ 4.4)

การเติม PVP 500 mg l⁻¹ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทุกสูตรมีผลส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนแตกต่างกัน และในสูตรอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg l⁻¹ เพียงอย่างเดียว มีผลต่อพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด คือได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัส 3.5 คะแนน ซึ่งมากกว่าในสูตรอาหารที่ไม่มีการเติม PVP 2 เท่า และยังพบว่าสูตรอาหารที่มีการเติม PVP สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 100% ได้ถึง 10 สูตร ในขณะที่สูตรที่ไม่เติม PVP ชักนำให้เกิดแคลลัส 100% ได้เพียง 5 สูตร และจากผลการทดลอง พบว่า สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA 2 และ 4 mg l⁻¹ ที่ไม่เติม PVP ส่วนใหญ่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่น้อยถึงไม่เกิดเลย แต่ในสูตรอาหารเดียวกันที่เติม PVP จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงและพื้นที่การเกิดแคลลัสสูงขึ้นด้วย

4.1.3 ผลของระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปีกของผลอ่อน ในอาหารสูตร WPM ที่มี NAA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 mg l⁻¹ และ BA ความเข้มข้น 0, 1, 2.5, 5 และ 10 mg l⁻¹ รวม 25 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA ในอาหารมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนต่างกัน (ตารางที่ 4.3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่มีการเติม NAA เพียงอย่างเดียว หรือ NAA ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ หรือไม่มีทั้ง NAA และ BA ที่ไม่เติม PVP ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ส่วนในอาหารที่มี NAA ร่วมกับ BA มีผลชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันไป โดยสูตรอาหารที่มี NAA 0.5 mg l⁻¹ และ BA 0.5 mg l⁻¹ สามารถส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด คือสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 87.50% และได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัส 1.25 คะแนน จากการสังเกตพบแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่นและมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.5 และ 4.6)

การเติม PVP 500 mg l⁻¹ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ มีผลส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน โดยในสูตรอาหารที่มี NAA 2.0 mg l⁻¹ BA 5.0 mg l⁻¹

และในสูตรอาหารที่มี NAA 4.0 mg l⁻¹ BA 10.0 mg l⁻¹ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100% และพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับในสูตรอาหารที่ไม่มีการเติม PVP

ตารางที่ 4.2 ผลของระดับความเข้มข้นของ BA, TDZ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

Treatments	BA	TDZ	ค่าคะแนนของพื้นที่การเกิดแคลลัส ต่อชิ้นส่วน		เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส		จำนวนแคลลัสต่อหนึ่งซ้า	
	2,4-D 0.1							
	(mg l ⁻¹)		ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP
BTD 1***	0.0	0.0	0.38±0.52 de	0.25±0.46 g	37.50±25.00 bc	25.00±28.87 c	0.75±0.50 bc	0.50±0.58 c
BTD 2	0.0	0.5	1.50±1.07 abc	3.5±1.07 a	87.50±25.00 ab	100.00±0.00 a	1.75±0.50 ab	2.00±0.00 a
BTD 3	0.0	1.0	1.13±0.64 abcd	2.50±1.51 abcde	87.50±25.00 ab	87.50±25.00 ab	1.75±0.50 ab	1.75±0.50 ab
BTD 4	0.0	2.0	1.50±1.31 abc	1.63±1.19 cdefg	87.50±25.00 ab	87.50±25.00 ab	1.75±0.50 ab	1.75±0.50 ab
BTD 5	0.0	4.0	0.50±0.53 cde	1.88±1.64 cdef	50.00±57.74 abc	75.00±28.87 ab	1.00±1.15 abc	1.50±0.58 ab
BTD 6	0.5	0.0	1.63±0.74 ab	1.00±1.31 efg	100.00±0.00 a	50.00±40.82 bc	2.00±0.00 a	1.00±1.15 bc
BTD 7	0.5	0.5	1.75±1.58 a	1.38±1.41 cdefg	75.00±50.00 ab	75.0±28.87 ab	1.50±1.00 ab	1.50±0.58 ab
BTD 8	0.5	1.0	1.50±0.53 abc	2.88±1.13 abc	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	2.00±0.00 a	2.00±0.00 a
BTD 9	0.5	2.0	1.13±0.35 abcd	2.63±0.92 abcd	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	2.00±0.00 a	2.00±0.00 a
BTD 10	0.5	4.0	0.63±0.52 bcde	1.25±0.71 defg	62.50±47.87 ab	87.5±25.00 ab	1.25±0.96 ab	1.75±0.50 ab
BTD 11	1.0	0.0	1.38±0.52 abcd	2.88±1.46 abc	100.00±0.00 a	87.5±25.00 ab	2.00±0.00 a	1.75±0.50 ab
BTD 12	1.0	0.5	1.38±0.74 abcd	3.38±1.06 ab	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	2.00±0.00 a	2.00±0.00 a
BTD 13	1.0	1.0	0.38±0.52 de	2.13±0.83 abcdef	37.50±25.00 bc	100.00±0.00 a	0.75±0.96 bc	2.00±0.00 a
BTD 14	1.0	2.0	0.00±0.00 e	0.75±0.71 fg	0.00±0.00 c	62.50±25.00 ab	0.00±0.00 c	1.25±0.50 ab
BTD 15	1.0	4.0	0.63±0.52 bcde	1.13±0.83 defg	62.50±47.87 ab	75.00±28.87 ab	1.25±0.96 ab	1.50±1.00 ab
BTD 16	2.0	0.0	0.88±0.64 abcde	2.25±1.04 abcde	75.00±50.00 ab	100.00±0.00 a	1.50±1.00 ab	2.00±0.00 a
BTD 17	2.0	0.5	1.38±0.92 abcd	2.75±0.89 abc	87.50±25.00 ab	100.00±0.00 a	1.75±0.50 ab	2.00±0.00 a
BTD 18	2.0	1.0	0.00±0.00 e	2.13±1.13 abcdef	0.00±0.00 c	100.00±0.00 a	0.00±0.00 c	2.00±0.00 a
BTD 19	2.0	2.0	0.00±0.00 e	1.13±0.83 defg	0.00±0.00 c	75.00±28.87 ab	0.00±0.00 c	1.50±0.58 ab
BTD 20	2.0	4.0	0.00±0.00 e	1.38±0.74 cdefg	0.00±0.00 c	87.50±25.00 ab	0.00±0.00 c	1.75±0.50 ab
BTD 21	4.0	0.0	0.50±0.76 cde	2.25±1.39 abcde	37.50±25.00 bc	100.00±0.00 a	0.75±0.50 bc	2.00±0.00 a
BTD 22	4.0	0.5	0.75±1.04 abcde	1.75±1.39 cdef	37.50±25.00 bc	75.00±28.87 ab	0.75±0.50 bc	1.50±0.58 ab
BTD 23	4.0	1.0	0.38±0.52 de	2.00±0.93 bcdef	37.50±25.00 bc	100.00±0.00 a	0.75±0.96 bc	2.00±0.00 a
BTD 24	4.0	2.0	0.38±0.52 de	1.38±0.74 cdefg	37.50±25.00 bc	87.50±25.00 ab	0.75±0.96 bc	1.75±0.50 ab
BTD 25	4.0	4.0	0.00±0.00 e	2.38±1.51 abcde	0.00±0.00 c	87.50±25.00 ab	0.00±0.00 c	1.75±0.50 ab

* คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน โดยที่แบ่งพื้นที่ชิ้นส่วนเป็น 4 ส่วน 4 = การเกิดแคลลัสทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง 3 = เกิดแคลลัส 3 ส่วน 2 = เกิดแคลลัสครึ่งหนึ่งของชิ้นตัวอย่าง 1 = เกิดแคลลัสเพียงส่วนเดียว และ 0 = ไม่เกิดแคลลัส

** ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

*** BTD : B = BA, T= TDZ และ D = 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹

ตารางที่ 4.3 ผลของระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปักของผลอ่อนที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

Treatments	NAA	BA	ค่าคะแนนของพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน		เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส		จำนวนแคลลัสต่อหนึ่งซ้า	
	(mg l ⁻¹)		ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP
NB 1***	0.0	0.0	0.00±0.00 b	0.00±0.00 f	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d
NB 2	0.0	1.0	0.00±0.00 b	0.00±0.00 f	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d
NB 3	0.0	2.5	0.00±0.00 b	0.50±0.76 cdef	0.00±0.00 b	37.50±47.87 bcd	0.00±0.00 b	0.75±0.96 bcd
NB 4	0.0	5.0	0.00±0.00 b	0.38±0.74 def	0.00±0.00 b	25.00±28.87 cd	0.00±0.00 b	0.50±0.58 cd
NB 5	0.0	10.0	0.13±0.35 b	0.13±0.35 bc	12.50±25.00 b	12.50±25.00 d	0.25±0.50 b	0.25±0.50 d
NB 6	0.5	0.0	0.00±0.00 b	0.00±0.00 f	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d
NB 7	0.5	1.0	0.00±0.00 b	0.25±0.46 def	0.00±0.00 b	25.00±28.87 cd	0.00±0.00 b	0.50±1.00 cd
NB 8	0.5	2.5	0.25±0.46 b	0.63±0.52 bcdef	25.00±28.87 b	62.50±25.00 abc	0.50±0.58 b	1.25±0.50 abc
NB 9	0.5	5.0	1.25±0.71 a	0.75±0.71 bcdef	87.50±25.00 a	62.50±25.00 abc	1.75±0.50 a	1.25±0.50 abc
NB 10	0.5	10.0	0.50±0.53 b	0.13±0.35 ef	50.00±40.82 ab	12.50±25.00 d	1.00±0.82 ab	0.25±0.50 b
NB 11	1.0	0.0	0.00±0.00 b	0.00±0.00 f	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d
NB 12	1.0	1.0	0.50±0.53 b	0.88±0.64 bcde	50.00±40.82 ab	75.00±28.87 ab	1.00±0.82 ab	1.5±0.58 ab
NB 13	1.0	2.5	0.13±0.35 b	0.25±0.46 def	12.50±25.00 b	25.00±28.87 cd	0.25±0.50 b	0.50±0.50 cd
NB 14	1.0	5.0	0.38±0.74 b	0.38±0.52 def	25.00±28.87 b	37.50±47.87 bcd	0.50±0.58 b	0.75±0.96 bcd
NB 15	1.0	10.0	0.50±0.53 b	1.25±0.89 b	50.00±40.82 ab	75.00±28.87 ab	1.00±0.82 ab	1.50±0.58 ab
NB 16	2.0	0.0	0.00±0.00 b	0.00±0.00 f	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d
NB 17	2.0	1.0	0.13±0.35 b	0.25±0.46 def	12.50±25.00 b	25.00±28.87 cd	0.25±0.50 b	0.50±0.58 cd
NB 18	2.0	2.5	0.38±0.74 b	0.75±0.46 bcdef	25.00±28.87 b	75.00±28.87 ab	0.50±0.58 b	1.50±0.58 ab
NB 19	2.0	5.0	0.25±0.46 b	1.00±0.00 bcd	25.00±28.87 b	100.00±0.00 a	0.50±0.58 b	2.00±0.00 a
NB 20	2.0	10.0	0.25±0.46 b	1.13±0.83 bc	25.00±28.87 b	75.00±28.87 ab	0.50±1.00 b	1.50±0.58 ab
NB 21	4.0	0.0	0.00±0.00 b	0.00±0.00 f	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d
NB 22	4.0	1.0	0.38±0.74 b	0.25±0.46 def	25.00±28.87 b	25.00±28.87 cd	0.50±1.00 b	0.50±0.58 cd
NB 23	4.0	2.5	0.38±0.74 b	0.38±0.52 def	37.50±25.00 b	37.50±47.87 bcd	0.75±0.50 ab	0.75±0.96 bcd
NB 24	4.0	5.0	0.25±0.46 b	0.88±0.64 bcde	25.00±28.87 b	75.00±28.87 ab	0.50±1.00 b	1.50±1.00 ab
NB 25	4.0	10.0	0.38±0.52 b	2.13±1.25 a	37.50±25.00 b	100.00±0.00 a	0.75±0.95 ab	2.00±0.00 a

* คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน โดยที่แบ่งพื้นที่ชิ้นส่วนเป็น 4 ส่วน 4 = การเกิดแคลลัสทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง 3 = เกิดแคลลัส 3 ส่วน 2 = เกิดแคลลัสครึ่งหนึ่งของชิ้นตัวอย่าง 1 = เกิดแคลลัสเพียงส่วนเดียว และ 0 = ไม่เกิดแคลลัส

** ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

*** NB : N= NAA และ B = BA

ตารางที่ 4.4 ผลของระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปีกของผล อ่อนที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

Treatments	2,4-D	kinetin	ค่าคะแนนของพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน		เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส		จำนวนแคลลัสต่อหนึ่งชิ้น	
	(mg l ⁻¹)		ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP	ไม่เติม PVP	เติม PVP
DK1***	0	0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 2	0	0.5	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 3	0	1	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 4	0	3	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 5	0	6	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 6	0.1	0	0.13±0.35 cd	0.13±0.35 cd	12.50±25.00 cd	12.50±25.00 b	0.25±0.50 cd	0.25±0.50 b
DK 7	0.1	0.5	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 8	0.1	1	1.13±0.35 a	0.38±0.52 abc	100.00±0.00 a	37.50±25.00 ab	2.00±0.00 a	0.75±0.96 ab
DK 9	0.1	3	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 10	0.1	6	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 11	1	0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 12	1	0.5	0.50±0.53 bc	0.50±0.53 ab	50.00±57.74 bc	50.00±57.74 a	1.00±1.15 bc	1.00±1.15 a
DK 13	1	1	0.25±0.46 bc	0.13±0.35 cd	25.00±28.87 bcd	12.50±25.00 b	0.50±0.58 bcd	0.25±0.50 b
DK 14	1	3	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 15	1	6	0.13±0.35 cd	0.25±0.46 bc	12.50±25.00 cd	25.00±28.87 ab	0.25±0.50 cd	0.50±0.58 ab
DK 16	2	0	0.13±0.35 cd	0.00±0.00 c	12.50±25.00 cd	0.00±0.00 b	0.25±0.50 cd	0.00±0.00 b
DK 17	2	0.5	0.63±0.52 b	0.00±0.00 c	62.50±47.87 ab	0.00±0.00 b	1.25±0.96 ab	0.00±0.00 b
DK 18	2	1	0.25±0.46 bc	0.13±0.35 cd	25.00±28.87 bcd	12.50±25.00 b	0.50±0.58 bcd	0.25±0.50 b
DK 19	2	3	0.00±0.00 d	0.13±0.35 cd	0.00±0.00 d	12.50±25.00 b	0.00±0.00 d	0.25±0.50 b
DK 20	2	6	0.63±0.52 b	0.25±0.46 bc	62.50±47.87 ab	25.00±28.87 ab	1.25±0.96 ab	0.50±0.58 ab
DK 21	4	0	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b
DK 22	4	0.5	0.63±0.52 b	0.13±0.35 cd	62.50±47.87 ab	12.50±25.00 b	1.25±0.96 ab	0.25±0.50 b
DK 23	4	1	0.38±0.52 bcd	0.13±0.35 cd	37.50±47.87 bcd	12.50±25.00 b	0.75±0.96 bcd	0.25±0.50 b
DK 24	4	3	0.13±0.35 cd	0.13±0.35 cd	12.50±25.00 cd	12.50±25.00 b	0.25±0.50 cd	0.25±0.50 b
DK 25	4	6	0.63±0.52 b	0.63±0.52 a	62.50±47.87 ab	37.50±47.84 ab	1.25±0.96 ab	0.75±0.96 ab

* คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน โดยที่แบ่งพื้นที่ชิ้นส่วนเป็น 4 ส่วน 4 = การเกิดแคลลัสทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง 3 = เกิดแคลลัส 3 ส่วน 2 = เกิดแคลลัสครึ่งหนึ่งของชิ้นตัวอย่าง 1 = เกิดแคลลัสเพียงส่วนเดียว และ 0 = ไม่เกิดแคลลัส

** ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

*** DK : D = 2, 4- D และ K= kinetin

4.1.4 ผลของระดับความเข้มข้นของ 2, 4-D และ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปึกของผลอ่อนที่เป็นสีเขียวของหมากจอบ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปึกของผลอ่อน ในอาหารสูตร WPM ที่มี kinetin ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 3 และ 6 mg l^{-1} และ 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 2 และ 4 mg l^{-1} รวม 25 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ 2, 4-D และ kinetin ในอาหารมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนต่างกัน (ตารางที่ 4.4) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่มีการเติม kinetin เพียงอย่างเดียว หรือไม่มีทั้ง 2, 4-D และ kinetin ทั้งในสูตรที่เติมและไม่เติม PVP ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ สำหรับสูตรอาหารที่มี 2,4-D เพียงอย่างเดียว ชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยมากถึงไม่เกิดเลย ส่วนในอาหารที่มี 2, 4-D และ kinetin มีผลชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันไป โดยสูตรอาหารที่มี kinetin 1.0 mg l^{-1} และ 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} สามารถส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ได้ 100% และส่งผลกระทบต่อพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด โดยได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัส 1.13 คะแนน จากการสังเกตพบแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่นและมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.7 และ 4.8)

การเติม PVP 500 mg l^{-1} ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกือบทุกสูตร ไม่มีผลส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน



ภาพที่ 4.1 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปึกของผลอ่อนของหมากจอบ ในอาหารที่มี BA และ TDZ ที่ไม่เติม PVP เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.2 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปึกของผลอ่อนของหมากจอบ ในอาหารที่มี BA และ TDZ มีการเติม PVP 500 mg l^{-1} เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.3 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนของหมากจอง ในอาหารที่มี BA, TDZ และ 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} ที่ไม่เติม PVP เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.4 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนของหมากจอง ในอาหารที่มี BA, TDZ และ 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และมีการเติม PVP 500 mg l^{-1} เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์



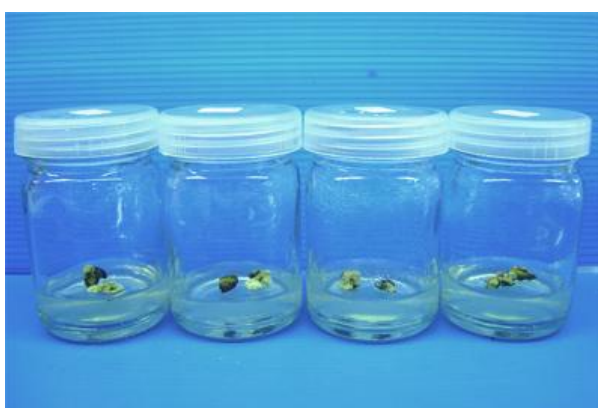
ภาพที่ 4.5 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนของหมากจอง ในอาหารที่มี NAA และ BA ที่ไม่เติม PVP เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.6 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนของหมากจอบ ในอาหารที่มี NAA และ BA มีการเติม PVP 500 mg l⁻¹ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.7 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนของหมากจอบ ในอาหารที่มี 2, 4-D และ kinetin ที่ไม่เติม PVP เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.8 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปีกของผลอ่อนของหมากจอบ ในอาหารที่มี 2, 4-D และ kinetin มีการเติม PVP 500 mg l⁻¹ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

4.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดอ่อนของหมากจอบ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ส่วนปีกของผลอ่อนของหมากจอบ พบว่าในสูตรอาหารที่มี BA TDZ และ 2, 4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และมีการเติม PVP 500 mg l^{-1} สามารถชักนำให้มิเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีกว่าอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญอื่นๆ (ตารางที่ 4.2) จึงได้เลือกมาศึกษาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเมล็ดอ่อนของหมากจอบ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเมล็ดอ่อนหมากจอบในอาหารสูตร WPM ที่มี BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 mg l^{-1} และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 mg l^{-1} โดยที่ทุกสูตรอาหารประกอบด้วย 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และ PVP 500 mg l^{-1} รวม 25 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ BA TDZ และ 2, 4-D ในอาหารมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส พื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนและขนาดของแคลลัสต่างกัน (ตารางที่ 4.5) พบว่าในทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยที่สูตรอาหารส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100% สูตรอาหารที่มี BA 4.0 mg l^{-1} และ 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} มีผลต่อพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด คือได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัส 4.00 คะแนนและในสูตรอาหารที่มี BA 2.0 mg l^{-1} TDZ 0.5 mg l^{-1} และ 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} มีขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุด โดยมีขนาด 1.91 cm^2 จากการสังเกตพบแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่นและมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนผลอ่อนของหมากจอบ ในอาหารที่มี BA, TDZ, 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} และมี PVP 500 mg l^{-1} เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

ตารางที่ 4.5 ผลของระดับความเข้มข้นของ BA, TDZ, 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ และ PVP 500 mg l⁻¹ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดอ่อนของหมากจอบ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

Treatments	BA	TDZ	ค่าคะแนนของพื้นที่ การเกิดแคลลัสต่อ ชิ้นส่วน	เปอร์เซ็นต์การ เกิดแคลลัส	จำนวนแคลลัสต่อ หนึ่งชิ้น	ขนาดของแคลลัส (cm ²)
	2, 4-D 0.1					
	(mg l ⁻¹)					
BTD 1***	0.0	0.0	2.88 ±1.13 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.31 ±0.97 abcde
BTD 2	0.0	0.5	2.63 ±1.19 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.57 ±1.35 abcde
BTD 3	0.0	1.0	1.88 ±1.55 bcd	87.50±25.00 ab	1.75 ±0.50 ab	0.84 ±0.68 bcde
BTD 4	0.0	2.0	2.75 ±1.16 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.17 ±1.06 abcde
BTD 5	0.0	4.0	3.13 ±0.99 abc	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.18 ±0.98 abcde
BTD 6	0.5	0.0	1.38 ±1.30 d	75.00±50.00 ab	1.50 ±1.00 ab	0.90 ±1.35 abcde
BTD 7	0.5	0.5	3.13 ±0.99 abc	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.42 ±0.95 abcde
BTD 8	0.5	1.0	1.75 ±1.91 bcd	50.00±57.74 b	1.00 ±1.15 b	0.74 ±0.88 cde
BTD 9	0.5	2.0	3.38 ±1.19 ab	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.83 ±1.18 ab
BTD 10	0.5	4.0	1.63 ±1.06 cd	87.50±25.00 ab	1.75 ±0.50 ab	0.82 ±0.72 bcde
BTD 11	1.0	0.0	1.63 ±1.30 cd	87.50±25.00 ab	1.75 ±0.50 ab	1.23 ±0.96 abcde
BTD 12	1.0	0.5	3.13 ±0.99 abc	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.70 ±1.03 abc
BTD 13	1.0	1.0	2.63 ±1.06 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.20 ±1.18 abcde
BTD 14	1.0	2.0	2.50 ±1.31 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	0.68 ±0.71 cde
BTD 15	1.0	4.0	2.50 ±1.31 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	0.87 ±0.48 abcde
BTD 16	2.0	0.0	3.13 ±0.99 abc	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.66 ±1.30 abcd
BTD 17	2.0	0.5	2.75 ±1.16 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.91 ±1.42 a
BTD 18	2.0	1.0	1.63 ±1.30 cd	87.50±25.00 ab	1.75 ±0.50 ab	1.01 ±0.99 abcde
BTD 19	2.0	2.0	1.25 ±0.46 d	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	0.61 ±0.40 e
BTD 20	2.0	4.0	3.25 ±0.89 abc	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.50 ±0.72 abcde
BTD 21	4.0	0.0	4.00 ±0.00 a	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.23 ±0.81 abcde
BTD 22	4.0	0.5	2.25 ±1.91 bcd	75.00±50.00 ab	1.50 ±1.00 ab	0.80 ±0.84 bcde
BTD 23	4.0	1.0	2.63 ±1.41 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.21 ±0.82 abcde
BTD 24	4.0	2.0	1.38 ±1.19 d	75.00±50.00 ab	1.50 ±1.00 ab	0.64 ±0.49 de
BTD 25	4.0	4.0	2.63 ±1.30 abcd	100.00±0.00 a	2.00 ±0.00 a	1.48 ±0.69 abcde

* คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วน โดยที่แบ่งพื้นที่ชิ้นส่วนเป็น 4 ส่วน 4 = การเกิดแคลลัสทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง 3 = เกิดแคลลัส 3 ส่วน 2 = เกิดแคลลัสครึ่งหนึ่งของชิ้นตัวอย่าง 1 = เกิดแคลลัสเพียงส่วนเดียว และ 0 = ไม่เกิดแคลลัส

** ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

*** BTD : B = BA, T= TDZ และ D = 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ

ในการชักนำให้เกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไปแล้วมีปัจจัยหลายอย่างที่อิทธิพลต่อจำนวนและชนิดของแคลลัส ซึ่งปัจจัยที่กล่าวถึงนั้น ได้แก่ ชนิดและอายุของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (ประศาสตร์, 2538) รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรมของพืชด้วย โดยทั่วไปชิ้นส่วนและอายุพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีความสามารถที่นำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากการสร้างและสะสมสารควบคุมการเจริญในตัวพืชเองหรือมีการเติมสารควบคุมการเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ชนิดของสารควบคุมการเจริญ รวมถึงอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างของออกซินและไซโตไคนิน ที่ได้รับถ้ามีสัดส่วนที่เหมาะสมพืชก็สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบโดยใช้ชิ้นส่วนของปีกของผลอ่อน ในอาหารสูตร WPM ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสในสูตรอาหารที่มีการเติม BA, TDZ และ 2, 4-D (ตารางที่ 4.2) มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนของหมากจอบ รองลงมาคือ สูตรอาหารที่มี BA และ TDZ (ตารางที่ 4.1) สูตรอาหารที่มี NAA และ BA (ตารางที่ 4.3) และสูตรอาหารที่มี 2, 4-D และ kinetin (ตารางที่ 4.4) ตามลำดับ นอกจากนี้พบวาระดับความเข้มข้นของ kinetin 3 และ 6 mg l^{-1} เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไป ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัส และคูอร์โมนชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอัตราที่ต่ำกว่าคูอร์โมนอื่น (ตารางที่ 4.4) สูตรอาหารที่มี BA 0.5 mg l^{-1} , TDZ 0.5 mg l^{-1} และ 2, 4-D 0.1 mg l^{-1} (ตารางที่ 4.2) สามารถส่งผลต่อพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนปีกของผลหมากจอบได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการรายงานของสมปอง (2545) ที่ได้เพาะเลี้ยงใบอ่อนของหน่่าวัวโดยใช้ไซโตไคนิน 2 ชนิดรวมกันคือ BA และ TDZ ในอัตราความเข้มข้นที่เท่ากัน 0.5 mg l^{-1} ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชมีความจำเป็นจะต้องใช้ออกซินด้วย ซึ่งใบอ่อนของหน่่าวัวที่นำมาศึกษาน่าจะมีการสร้างและสะสมออกซินไว้ในระดับที่เหมาะสม จึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้ออกซินที่เติมในอาหาร เช่นเดียวกับ การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของเสเดาเทียม (Gautam *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่า BA ส่งเสริมการเจริญเป็นยอด แต่ถ้ามีการเติม TDZ ร่วมด้วยจะชักนำให้เกิดแคลลัสแทนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของใบมังคุด (Te-chato and Rungnoi, 2000)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ธาตุอาหารในแต่ละสูตรอาหารมีความจำเป็นในการชักนำให้พืชมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลง อาจจะมีการชักนำให้เกิดแคลลัสหรือสามารถชักนำให้เกิดยอดหรือรากได้ การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้อาหารสูตร WPM และมีการเติมสารควบคุมการเจริญชนิดต่างๆพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเท่านั้น ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดหรือรากได้ เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของสารในสูตรอาหาร WPM พบว่า มีสารกลุ่มอนินทรีย์ คือ ไนโตรเจน (ไนเตรทและแอมโมเนียม) ในปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดยอด Fasolo *et al.* (1989) รายงานว่าปริมาณอาหารของแร่ธาตุโดยเฉพาะ ไนโตรเจนอาหาร โปตัสเซียมอาหาร และแอมโมเนียมอาหาร ส่งผลต่อการพัฒนายอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของใบแอปเปิล เช่นเดียวกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากเมล็ดของมังคุดในอาหารสูตร WPM ให้ปริมาณยอดต่ำ เนื่องจากปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาณน้อย (Normah *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามในการศึกษาค้างนี้เน้นเพียงการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญของพืชชนิดไซโตไคนินและออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหมากจอบเท่านั้น ดังนั้นหากต้องการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสเหล่านี้ อาจจะต้องเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ (regeneration medium) ให้เท่ากับในสูตร MS นอกจากนี้ในการศึกษาการเติม PVP 500 mg l⁻¹ ลงในอาหารทุกสูตร พบว่าสามารถส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้สูงขึ้นและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีขึ้นในบางสูตรอาหาร เช่น สูตรอาหารที่มีการเติม BA, TDZ และ 2, 4-D (ตารางที่ 4.2) และสูตรอาหารที่มี NAA และ BA (ตารางที่ 4.3) ได้ 1-2 เท่าเมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่มีการเติม PVP เนื่องจากหมากจอบเป็นพืชที่มียางปริมาณมาก ซึ่งเป็นสารประกอบพวก polysaccharide ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของพืช PVP มีคุณสมบัติช่วยดูดซับยาง อย่างไรก็ตาม ในสูตรอาหารที่มี BA และ TDZ (ตารางที่ 4.1) และสูตรอาหารที่มี 2, 4-D และ kinetin (ตารางที่ 4.4) ส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนลดลงเมื่อเติม PVP

จากผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดอ่อนของหมากจอบ ในอาหาร WPM ที่มี BA, TDZ ความเข้มข้นต่างๆ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ และเติม PVP 500 mg l⁻¹ (ตารางที่ 4.5) พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส โดยที่สูตรอาหารส่วนใหญ่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100% นอกจากนั้นสูตรอาหารที่มี BA 4.0 mg l⁻¹ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ สามารถส่งผลกระทบต่อพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด และในสูตรอาหารที่มี BA 2.0 mg l⁻¹ TDZ 0.5 mg l⁻¹ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ มีขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุด การชักนำให้เกิดแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดอ่อน สามารถให้แคลลัสได้ในปริมาณมาก และจะเห็นได้ว่าหลายสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ การศึกษาในอนาคต อาจมีการย้ายแคลลัสเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดหรือต้นใหม่ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในมังคุด ที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในเมล็ดก่อน จากนั้นจึงชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณยอด และส่งเสริมให้พัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ (Te-chato and Aengyong, 1988 และ Te-chato *et al.*, 1992) เทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์พืชและการเพิ่มจำนวนในพืชเพื่อการค้าหรือการอนุรักษ์ได้ นอกจากนี้พบว่าโดยธรรมชาติของไม้ยืนต้นบางชนิด เช่น หมากจอบ ไม่สามารถแตกตาข้างได้ เมื่อถูกเด็ดตายออก ลักษณะนี้อาจทำให้ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ยาก นอกจากนี้หากพบว่าส่วนต่างๆ ของหมากจอบมีคุณสมบัติด้านสมุนไพร (อยู่ระหว่างการศึกษาค้นคว้า) การวิจัยและพัฒนาหมากจอบเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้ชุมชน โดยได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี 2548-2550) แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบเหล่านี้สามารถใช้เป็นแหล่งศึกษาด้านสมุนไพรได้ต่อไป

สรุปผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ

6.1 การศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนพืชต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหมากจอบ โดยใช้ส่วนปีกของผลอ่อนในอาหารสูตร WPM โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ในสูตรอาหารที่มีการเติม BA, TDZ และ 2, 4-D (ตารางที่ 4.2) สามารถให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด โดยที่สูตรอาหารที่มี BA 0.5 mg l⁻¹, TDZ 0.5 mg l⁻¹ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ (ตารางที่ 4.2) สามารถส่งผลกระทบต่อพื้นที่การเกิดแคลลัส

ต่อชิ้นส่วนได้ดีที่สุด และการเติม PVP 500 mg l⁻¹ ในอาหารที่มี BA, TDZ และ 2, 4-D (ตารางที่ 4.2) และอาหารที่มี NAA คู่กับ BA (ตารางที่ 4.3) ส่วนใหญ่สามารถส่งเสริมให้มิเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้มากขึ้น และสามารถเพิ่มพื้นที่การเกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนได้ 1-2 เท่า เมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่มีการเติม PVP

6.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงผลอ่อนของหมากจอบ ในอาหารสูตร WPM ที่มีการเติม BA, TDZ, 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ และ PVP 500 mg l⁻¹ พบว่าในสูตรอาหารส่วนใหญ่ ชักนำให้มิเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100% และที่เหลือสามารถเกิดแคลลัสได้ 50%ขึ้นไป สูตรอาหารที่มี BA 4.0 mg l⁻¹ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ ได้คะแนนพื้นที่การเกิดแคลลัสสูงสุด คือ 4.00 คะแนนและในสูตรอาหารที่มี BA 2.0 mg l⁻¹ TDZ 0.5 mg l⁻¹ และ 2, 4-D 0.1 mg l⁻¹ มีขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุด โดยมีขนาด 1.91 cm² สูตรอาหารส่วนใหญ่ที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ พบว่าแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นเกาะกันแน่น (compact callus) และมีสีเขียวอ่อน

เอกสารอ้างอิง

- ก่องกานดา ชยามฤต. 2545. คู่มือจำแนกพรรณไม้. กรุงเทพฯ : หอพรรณไม้ กรมป่าไม้.
 “คุณสมบัติทางสมุนไพรของหมากจอบ,” *Scaphium macropodum* Beaum.
<http://www.rit.ac.th> พฤษภาคม, 2548.
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ : หอพรรณไม้ กรมป่าไม้.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ฉบับปรับปรุง). ภาควิชาชีววิทยา
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรี้นติ้งเฮ้าส์.
- ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ : เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรทาง
 พันธุกรรม. มหาสารคาม : อภิชาติการพิมพ์.
- มานิชญ์ กุลพลกษี, เพ็ญศักดิ์ สุทธิวารี และสมหวัง วิเชียรฉันท. ศึกษาการเจริญเติบโตของสำรอกจาก
 การขยายพันธุ์ด้วยการตอนกิ่งและตัดชำ. (<http://www.rit.ac.th/research/manoch.pdf>.)
 “มูสมุนไพร,” พงทะลาย <http://www.dailynews.co.th>. พฤษภาคม, 2548.
- สมปอง เตชะโต, สมัชชา นาคสมบัติ และจารุวรรณ บุญศิริ. 2545. ผลของพันธุ์และชิ้นส่วนต่อการ
 สร้างแคลลัส และการขยายพันธุ์หน้าวุ้นด้วยวิธีการไมโครพรอพากेशन. วารสารวิทยาศาสตร์
 และเทคโนโลยี : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 24(4) : 569-578.
- “สำรอก,” Sterculiaceae <http://www.tungsong.com/Modify-Lifetsgcity/samunpai/Drink/sumrong/sumrong>. พฤษภาคม, 2548.
- “สำรอก,” Sterculiaceae <http://www.se-ed.net/oldpe/sara/samunphai/Soomrorng/soomrorng.htm> พฤษภาคม, 2548.
- “หมากจอบ ไม้ผลส่งออกประเทศจีน พืชเศรษฐกิจ อ.นาจะหลวย,”
<http://www.guideubon.com/gubn0506.htm> มกราคม, 2548. “product,” สารานุกรมเกี่ยวกับสมุนไพร <http://www.siemkwang.com>. พฤษภาคม, 2548
- Esan, E.B. 1975. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) a
 supplementation of current research, in : Proceedings of the Fifth International
 Cacao Research Conference. Cacao Res. Int. Nigeria, Ibadan. 116-125.
- Fasolo, F., Zimmerman, R.H. and Fordham, I. 1989. Adventitious shoot formation on
 excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars. Plant Cell Tiss Organ
 Cult. 16 : 75-87.
- Gautam, V.K., Nanda, K. and Gupta, S.C. 1993. Development of shoots and roots in
 anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss : a medicinal tree. Plant Cell
 Tiss Organ Cult. 34 :13-18.
- Khamparat, S., Swasdipan, N., Palasarn, W., and Pimmongkol, A. 2004. Stomata, guard
 cell and trichome structures of Makjong (*Scaphium macropodum* Beaum.).
 30th Congress on Science and Technology of Thailand.

- Li, Z., Traore, A., Maximova, S. and Guiltinan, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 34 : 293-299.
- Litz, R.E. 1986. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. in : P.S. Dimick (Ed.) *Proceedings of Cacao Biotechnology Symposium*, Pennsylvania State University, University Park, PA. 111-120.
- Litz, R.E. & Gray, D.J. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: F.A. Hammerschlag and R.E. Litz (eds), *Biotechnology of perennial fruit crops*, *Biotechnology in Agriculture No. 8*. C.A.B International, Wallingford. 3-34.
- Lloyd G. and McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30 : 421-427.
- Lopez-Baez, O., Bollon, H.; Eskes, A. and Petiard V. 1993. Embryogenese Somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. a partir de pieces florales. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 316 : 579-584.
- Manshardt, R.M. 1992. Papaya. In : F.A. Hammerschlag and R.E. Litz (eds), *Biotechnology of perennial fruit crops*. *Biotechnology in Agriculture No. 8*. C.A.B. International, Wallingford. 489-511.
- Normah, M.N., Rosnah, H. and Noor-Azza, A.B. 1992. Multiple shoots and callus formation from seeds of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured *in vitro*. *Acta hortic.* 292 : 87-91.
- Normah, M.N., Noor-Azza, A.B. and Aliudin, R. 1995. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. *Plant cell tissue organ cult.* 43 : 291-294.
- Pence, V.C., Hasegawa, P.M. and Janick, J. 1980. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. *in vitro*. *Z. pflanzenphysiol.* 98 : 1-14.
- Santisuk, T., Larsen K. and Nielsen I. 2001. Flora of Thailand volume 7 part 3. The forest herbarium : Royal Forest Departmen. 621-624.
- Sondahl, M.R., Liu, S., Bellato, C. and Bragin, A. 1993. Cacao somatic embryogenesis. *Acta Hort.* 336 : 245-248.
- “Sterculiaceae,” Sterculiaceae.
<http://www.rbge.org.uk/rbge/web/science/research/systematics/sterculia.jsp>. July, 2546.
- Tan, C.L. and Furtek, D.B. 2003. Development of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Science.* 164 : 407-412.
- Te-chato, S. and Aengyong, W. 1988. Micropropagation of mangosteen by culture seed. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 10 : 7-11.

- Te-chato, S. and Lim, M. 1999. Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 59 : 89-93.
- Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. *Scientia Horticulturae*. 86 : 291-298.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992. Enhanced efficiency micropropagation of mangsteen through young leaf culture. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 14 : 1-7.
- Te-chato, S. and Rungnoi, O. 2000. Induction of somstic embryogenesis from leave of Sadao Chang (*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs). *Scientia Horticulturae*. 86 : 311-321.
- Toshihiro.Y. and Eizi S. 1996. Ontogenic chahge in leaf shape and crown form of a tropical tree, *Scaphium macropodum* (Sterculiaceae) in Borneo. *J. Plant Res.* 109 : 211-217.
- Velho, C.C., Whipkey, A. and Janick, J. 1990. Cupuassu : a new beverage crop for Brazil. In : J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland.
- Zhong Y. C. 1998. The habit of flowering and fruiting of *Scaphium lychnophurum*. *National Library of Medicine*. 21(10) : 487-489.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

- Laminar air flow (Faster S.R.L., Bio 72, Italy)
- Autoclave (ALP Co., L TD, Japan)
- Hot air oven (Contherm Scientific LTD, New Zealand)
- Water bath (Contherm Scientific LTD, New Zealand)
- 713 pH Meter (Metrohm, Switzerland)
- เครื่อง PCR (Thermo Hybaid Px2 Thermal Cycler, Franklin, MA)
- Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (Gibco BRL, Scotland)
- Hot plate stirrer (HS115, HL Instrument, Thailand)
- Gel documentation (BioDoc-It System, Ultra-Violet Products, UK)
- Microwave oven (Sharp Carousel, Thailand)
- Ultraviolet Crosslinkers (Ultra-Violet Products, UK)
- UV/VIS spectrometer Lambda EZ 201 (Perkin Elmer Ltd., England)
- เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 200, Diethelm & Co., LTD., Thailand)
- Bio Vortex SLV1 (Seoulin Bioscience, Korea)
- mortar and pestal
- ตู้เย็น (Hitachi, Thailand)
- ตู้แช่แข็ง (Sanyo, Thailand)

1.2 สารเคมีและวิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- Macro nutrient element
 - Ammonium nitrate (JT Baker, Inc., U.S.A.)
 - Calcium nitrate (Merck, Germany)
 - Potassium sulphate (Merck, Germany)
 - Magnesium sulphate (Fluka Chemika-Bio Chemika, Switzerland.)
- Micro nutrient element
 - Zinc sulphate (Fluka Chemika-Bio Chemika, Switzerland.)
 - Curic sulphate (Merck, Germany)
 - Calcium chloride (Merck, Germany)
 - Potassium dihydrogen ortho-phosphate (BDH, England)
 - Boric acid (BDH, England)

- Sodium molybdate (Fluka Chemika-Bio Chemika, Switzerland.)
- Ferrous sulphate (JT Baker, Inc., U.S.A.)
- Sodium EDTA (Fluka Chemika-Bio Chemika, Switzerland.)
- Vitamins and amino acids
 - Thiamine HCl (Vitamin B₁) (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
 - Nicotinic acid (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
 - Pyridoxine HCl (Vitamin B₆) (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
 - Glycine (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
 - myo-inositol (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
- Naphthaleneacetic acid (NAA) (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
- 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
- Benzyladenine (BA) (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
- Kinetin (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
- Thidiazuron (TDZ) (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 40000 (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)
- 95% ethyl alcohol
- Clorox (Bleach, U.S.A.)
- tween 20 (Sigma Chemicals Co., U.S.A.)

1.2.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารตามสูตร Woody Plant Medium

(WPM)

สารเคมีในสูตรอาหาร Woody Plant Medium (WPM)

Compound	Stage III (mg/litre)
Ammonium nitrate	400
Boric acid	6.2
Calcium chloride	96
Calcium nitrate	556
Cupric sulfate	0.025
Magnesium sulfate	370
Manganese sulfate	22.3
Potassium phosphate	170
Potassium sulphate	990
Sodium molybdate	0.025
Zinc sulphate	8.6
MS iron	65.1
Inositol	100
KThiamine HCl	0.1
K ₂ iP	None
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Sucrose	20,000
Agar	6,000

pH 5.2

1.2.2.2 การแบ่งกลุ่มสารเคมีและการเตรียมสารละลายเข้มข้นสูตรอาหาร WPM
(ต่อปริมาตร 1,000 ml ของ stock นั้นๆ)

กลุ่มสารเคมีและการเตรียมสารละลายเข้มข้นสูตรอาหาร WPM

Stock	สารเคมีในกลุ่ม	ปริมาณ(g)	ความเข้มข้น(เท่า)	ปริมาตรที่ดูดไปใช้(ml/L)
1 เตรียม 1,000 ml	NH ₄ NO ₃ MgSO ₄ · 7 H ₂ O KH ₂ PO ₄	20 18.5 8.5	50	20
2 เตรียม 1,000 ml	CaCl ₂ · 2H ₂ O	9.6	100	10
3 เตรียม 500 ml	H ₃ BO ₄ Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3.1 0.0125	1,000	1
4 เตรียม 1,000 ml	MgSO ₄ · 4 H ₂ O ZnSO ₄ · 7 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O	2.23 0.86 0.0025	100	10
5 เตรียม 1,000 ml	Na ₂ -EDTA FeSO ₄ · 7 H ₂ O	3.73 2.78	100	10
6 เตรียม 500 ml	Inositol Nicotinic acid Pyridoxine HCl Thiamine HCl Glycine	5.0 0.025 0.025 0.05 0.1	100	10
7 เตรียม 1,000 ml	CaNO ₃	12.0	50	20
8 เตรียม 2,000 ml	KSO ₄	99.0	50	20

1.2.3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.3.1 การเตรียมอาหารสูตร Woody Plant Medium (WPM)

- 1) นำ stock solution ต่างๆ มารวมกันตามปริมาตรตามตารางที่ เพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร โดยเท stock solution ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้วประมาณ 500 ml
- 2) เติมน้ำตาลซูโครส 30% ในอาหาร 1 ลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม คนให้ละลาย

- 3) เติมหอริโมนในปริมาตรตามที่กำหนดไว้ในแต่ละสูตรอาหารปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร
- 4) นำมาวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ให้ได้ค่า pH 5.2 โดยใช้ NaOH 1 N และ HCl 1 N
- 5) เติมน้ำ 0.5% ในอาหาร 1 ลิตร เติมน้ำ 5 กรัม หลอมนํ้าให้ละลายโดยใช้ตุ๋บไมโครเวฟ
- 6) นำอาหารมาแบ่งใส่ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เหมาะสมตามขนาดของขวด ปิดฝาขวดให้สนิท
- 7) นำขวดอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 15 นาที

1.2.3.2 การเตรียมฮอร์โมน

- 1) ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (Auxins) ได้แก่ Naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- 2) ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin) ได้แก่ Benzyladenine (BA), Kinetin Thidiazuron (TDZ)

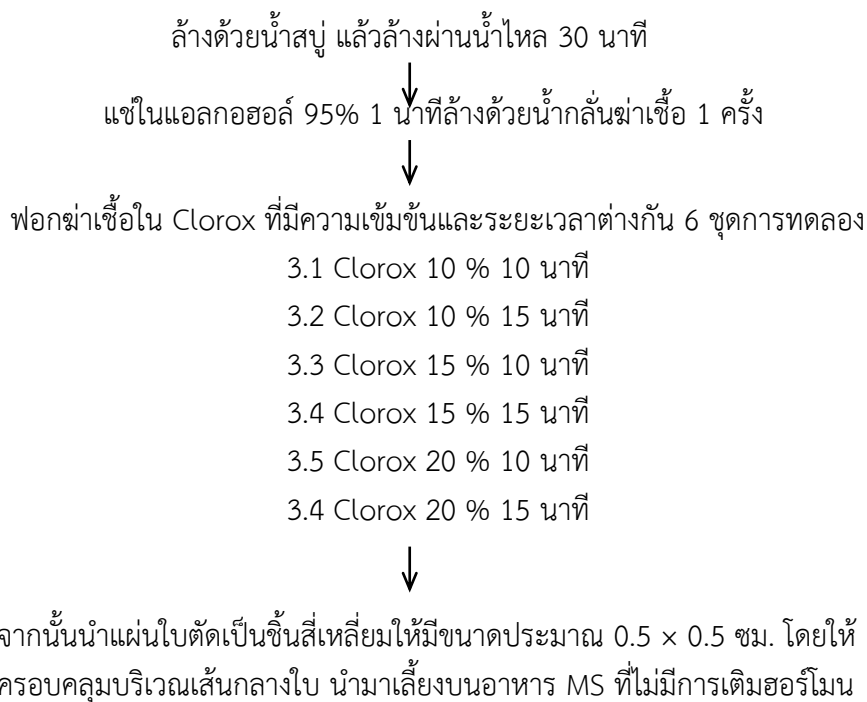
เตรียมฮอร์โมนความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 25 ml ซึ่งการเตรียมฮอร์โมนแต่ละชนิดจะเตรียมแยกขวดกัน โดยชั่งฮอร์โมนแต่ละชนิดมา 25 mg ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยค่อยๆ เติมตัวทำละลายทีละน้อยจนฮอร์โมนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 ml เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมฮอร์โมน

ฮอร์โมน	ตัวทำละลาย
NAA	1N NaOH
2,4-D	50% EtOH หรือ 1N NaOH
BA	1N NaOH
Kinetin	1N NaOH
TDZ	1N NaOH หรือ 1N KOH

ภาคผนวก ข
การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนใบ
 ทำการศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ส่วนใบของต้นหมากจอบ โดยแบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้



ผล

การศึกษา

พบว่าทุกสภาวะการทดลองสามารถฟอกฆ่าเชื้อผิวใบได้ดี แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสหรือส่วนต่างๆได้และพบว่ามีน้ำยางลักษณะใสไหลออกมาในปริมาณมากและใบจะมีลักษณะแห้ง สีน้ำตาล ในสัปดาห์ที่ 3

2. การทดสอบการดูดซึมน้ำยางโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีการเติมผงถ่าน

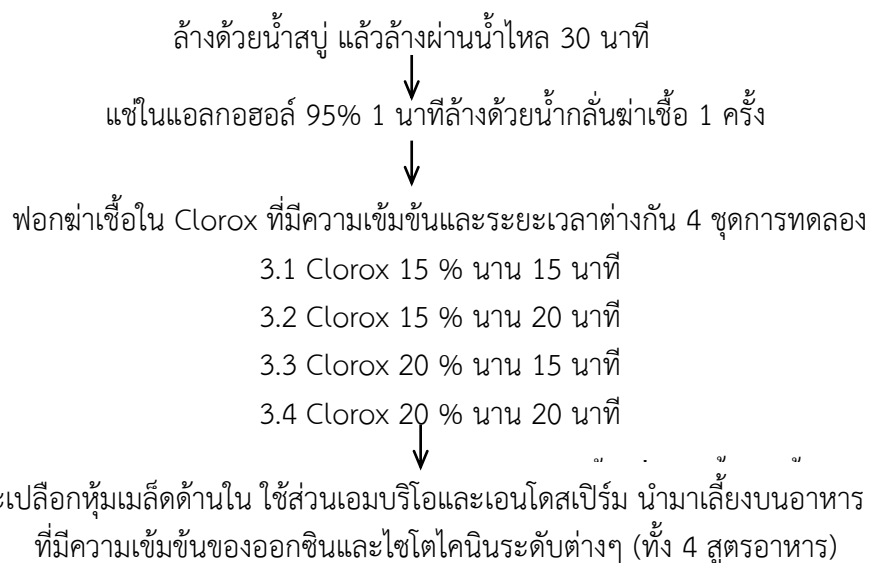
ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนใบของหมากจอบ ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวใบ โดยการล้างด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างผ่านน้ำไหล 30 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ฟอกฆ่าเชื้อใน Clorox ความเข้มข้น 10 % ที่เติม tween 20 ประมาณ 3-4 หยด (ต่อ Clorox 100 ml) นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นใบตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมให้มีขนาดประมาณ 0.5×0.5 ซม. โดยให้ครอบคลุมบริเวณเส้นกลางใบ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน ที่มีการเติมผงถ่าน 0.2% และไม่เติมผงถ่าน

ผลการศึกษา

พบว่าในอาหารที่มีการเติมผงถ่าน 0.2% มีการดูดซึมน้ำยางของใบหมากจอบได้ปริมาณน้อยมากและชิ้นส่วนของใบไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสหรือส่วนต่างๆได้ ใบจะมีลักษณะแห้ง สีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 4

3. การศึกษาภาวะการฟอกฆ่าเชื้อของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบโดยใช้ส่วนของเอมบริโอของเมล็ดแก่หมากจอบ (ครั้งที่ 1)

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ โดยใช้ส่วนของเอมบริโอของเมล็ดแก่หมากจอบ แบ่งการทดสอบการฟอกฆ่าเชื้อเป็น 4 ชุดการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้



ผลการศึกษา

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเอมบริโอของเมล็ดแก่หมากจอบ ทุกชุดการทดลองไม่สามารถฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดแก่หมากจอบได้

สูตรอาหารที่ 1 และ 2 : สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินระดับต่างๆ

สูตรอาหาร	2,4-D	Kinetin
DK1	0.0	0.0
DK2	0.1	0.0
DK3	2.0	0.0
DK4	0.0	1.0
DK5	0.1	1.0
DK6	2.0	1.0
DK7	0.0	3.0
DK8	0.1	3.0
DK9	2.0	3.0

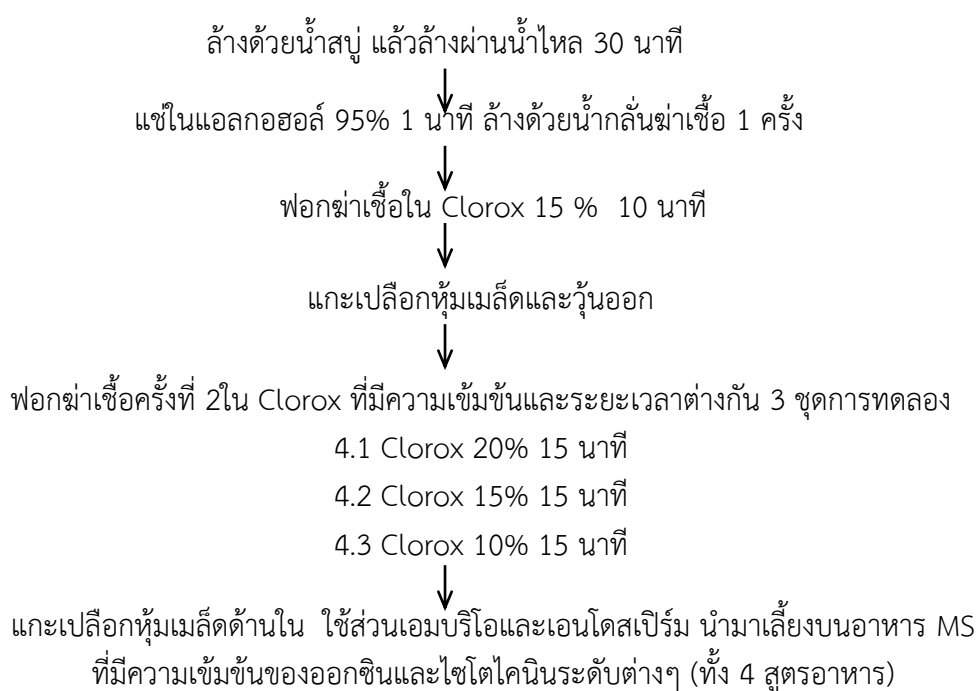
สูตรอาหาร	BA	NAA
NB1	0.0	0.0
NB2	1.0	0.0
NB3	5.0	0.0
NB4	0.0	0.5
NB5	1.0	0.5
NB6	5.0	0.5
NB7	0.0	2.0
NB8	1.0	2.0
NB9	5.0	2.0

สูตรอาหารที่ 3 และ 4 : สูตรอาหาร สูตรอาหาร MS + ผงถ่าน 0.2% ที่มีการเติมความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินในระดับต่างๆ

สูตรอาหาร	2,4-D	Kinetin	สูตรอาหาร	BA	NAA
A	0.0	0.0	I	0.0	0.0
B	0.1	0.0	II	1.0	0.0
C	2.0	0.0	III	5.0	0.0
D	0.0	1.0	IV	0.0	0.5
E	0.1	1.0	V	1.0	0.5
F	2.0	1.0	VI	5.0	0.5
G	0.0	3.0	VII	0.0	2.0
H	0.1	3.0	VIII	1.0	2.0
I	2.0	3.0	IX	5.0	2.0

4. การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบโดยใช้ส่วนของเอมบริโอของเมล็ดแก่หมากจอบ (ครั้งที่ 2)

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ โดยใช้ส่วนของเอมบริโอของเมล็ดแก่หมากจอบ แบ่งการทดสอบการฟอกฆ่าเชื้อเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

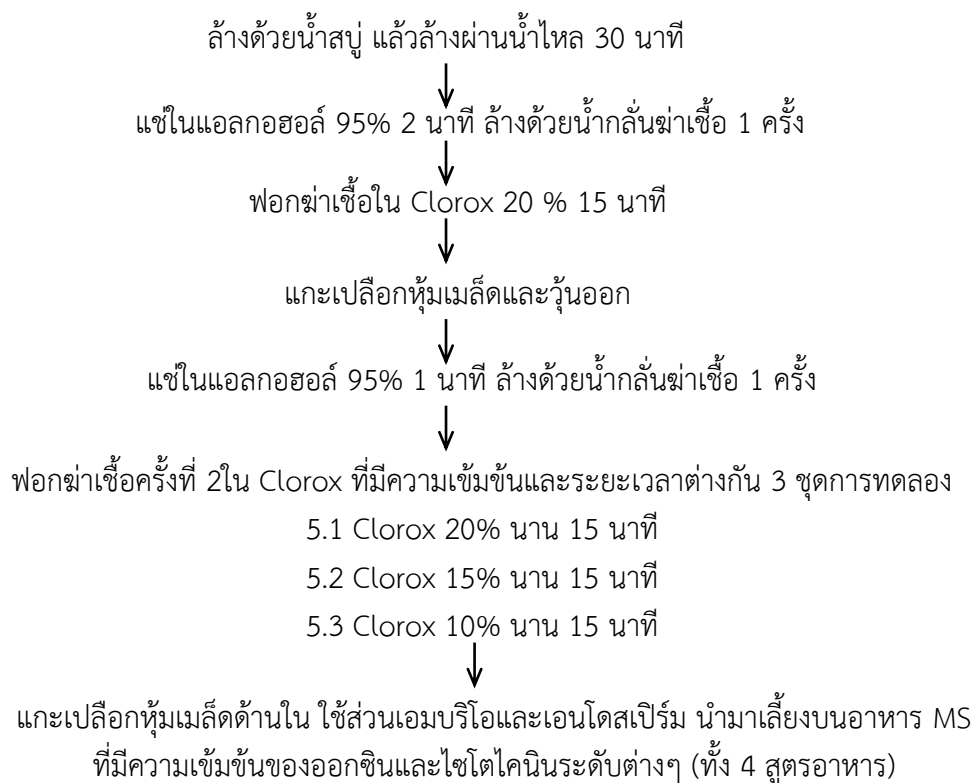


ผลการศึกษา

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเอมบริโอของเมล็ดหมากจอบ ทุกชุดการทดลองสามารถฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดหมากจอบได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า เอมบริโอของเมล็ดหมากจอบในทุกสูตรอาหารมีลักษณะบวม พอง แต่ยังไม่สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสหรือส่วนต่างๆ ได้

5. การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบโดยใช้ส่วนของเอ็มบริโอของเมล็ดหมากจอบ (ครั้งที่ 3)

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ โดยใช้ส่วนของเอ็มบริโอของเมล็ดหมากจอบ แบ่งการทดสอบการฟอกฆ่าเชื้อเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

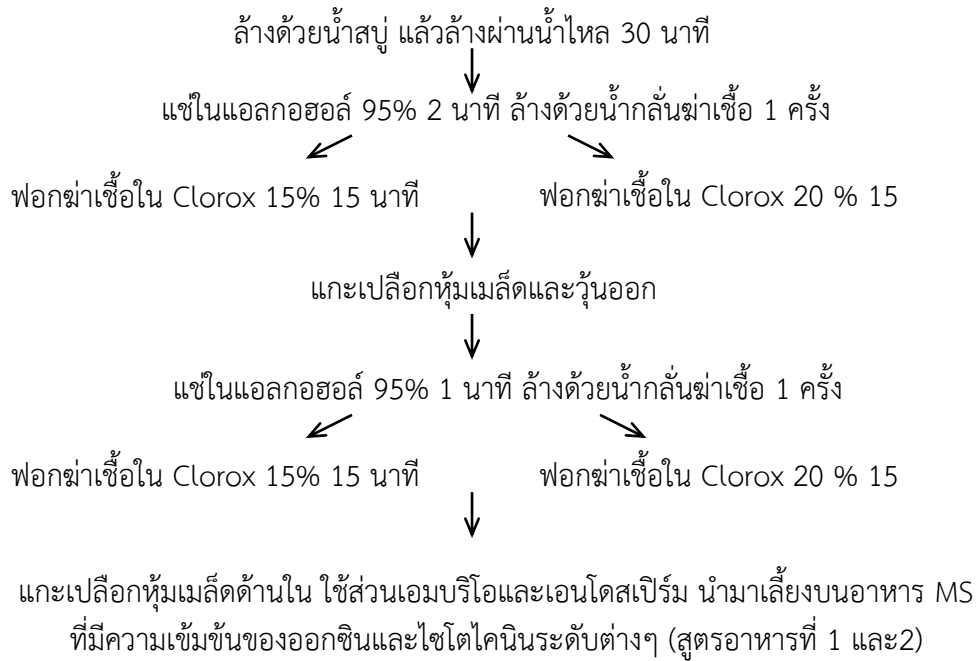


ผลการศึกษา

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเอ็มบริโอของเมล็ดหมากจอบ ทุกชุดการทดลองสามารถฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดหมากจอบได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า เอ็มบริโอของเมล็ดหมากจอบในทุกสูตรอาหารมีลักษณะบวม พอง แต่ยังไม่สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสหรือส่วนต่างๆ ได้

6. การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบโดยใช้ส่วนของเอ็มบริโอของเมล็ดหมากจอบ (ครั้งที่ 4)

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจอบ โดยใช้ส่วนของเอ็มบริโอของเมล็ดหมากจอบ แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้



ผลการศึกษา

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเอมบริโอของเมล็ดหมากจอบทั้ง 2 ชุดการทดลอง สามารถฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดหมากจอบได้ดี เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า เอมบริโอของเมล็ดหมากจอบในทุกสูตรอาหารมีลักษณะบวม พอง แต่ยังไม่สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสหรือส่วนต่างๆ ได้
