การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราก กวาวเครือขาว Pueraria mirifica ในเชิงพาณิชย์

นางสาว กนกพร สมพรไพลิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-423-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16458412

TISSUE CULTURE AND COMMERCIALIZED DEVELOPMENT OF ROOT CULTURE IN *Pueraria mirifica*

Miss Kanokporn Sompornpailin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-423-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราก
กวาวเครือขาว Pueraria mirifica ในเชิงพาณิชย์

โดย นางสาว กนกพร สมพรไพลิน

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กนกพร สมพรไพลิน : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากกวาวเครือขาว Pueraria mirifica ในเชิงพาณิชย์ (TISSUE CULTURE AND COMMERCIALIZED DEVELOPMENT OF ROOT CULTURE IN Pueraria mirifica) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 151 หน้า. ISBN 974-632-423-3

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาว (Pueraria mirifica) เพื่อการขยายพันธุ์ในภาวะปลอดเชื้อ พบว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดให้ผลการชักนำแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนอื่นของพืชทดลองในอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA และ BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีการรักษาสภาพแคลลัสที่ดีที่สุดคือ การย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร 1.25xMS ร่วมกับ NAA และ BAP 0.5 : 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวสามารถมีผลกระตุ้นการเกิดต้นจากแคลลัสได้ ด้วยวิธีการชักนำให้เกิดต้นใหม่วิธีที่เหมาะสม คือ การเพิ่มจำนวนยอดจากเนื้อเยื่อเจริญส่วนข้อบนอาหารสูตร WPM ที่มีธาตุเหล็กเพิ่ม 0.5 เท่ามี BAP 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลร้อยละ 2 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยประมาณ 4 ยอด แอมโมเนียมไนเตรท 200 มิลลิโมล อัตราส่วนน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ 60:50 มิลลิโมล และ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีส่วนช่วยเพิ่มจำนวนยอดเป็น 5-6 ยอด ยอดจะสามารถยืดตัวในอาหารสูตรเดิมที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต และชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารเดียวกันที่ปรับให้มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลร้อยละ 2 ซึ่งให้อัตราการเกิดรากร้อยละ 91.67 ในระยะเวลา 1 เดือน เมื่อนำออกปลูกในสภาวะแวดล้อมภายนอกในเรือนเพาะชำพบว่า มีอัตราการรอดร้อยละ 60 ในระยะเวลา 2 เดือน การเลี้ยงรากพืชที่ชักนำด้วย NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะให้อัตราการเจริญของรากสูงที่สุด กวาวเครือขาวไม่ให้ผลในการชักนำด้วย Agrobacterium rhizogenes 5 สายพันธุ์ การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบางพบว่ารากและแคลลัสจากสภาพปลอดเชื้อไม่สามารถสังเคราะห์สารได้มากเท่าพืชที่ปลูกในเรือนเพาะชำ

ภาควิชา – ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม –

C526475 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : Pueraria mirifica / ISOFLAVONOID / ROOT CULTURE / SECONDARY METABOLITE
KANOKPORN SOMPORNPAILIN : TISSUE CULTURE AND COMMERCIALIZED DEVELOPMENT OF ROOT CULTURE IN Pueraria mirifica. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. WICHAI CHERDSHEWASART, Ph.D. 151 pp. ISBN 974-632-423-3

Tissue culture of Pueraria mirifica at in vitro multiplication shows successive callus induction from shoot tip tissue cultured in MS medium containing 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP. Callus is maintained in 1.25xMS containing 0.5 mg/l NAA and 1.0 mg/l BAP. Shoot induction is also emerged in such media. Multiple shoot induction is induced from the seedling nodal tissue. The average of 4 shoots are obtained from the nodal tissue grown on WPM medium containing 0.25 mg/l BAP and 2% sucrose. The supplementation of 200 mM NH_4NO_3 , sucrose and alcoholic sugar (60:50 mM) and 0.2 mg/l NAA promote the increasing of the shoot numbers. The shoot tissue is elongated in the same medium. The root induction results from WPM medium supplemented with 1.0 mg/l NAA and 2% sucrose with the highest yield of 96% within 1 month and 60% survival rate after plantation in the greenhouse condition within 2 months. Root culture shows maximal yield in liquid MS containing 0.5-1.0 mg/l NAA. Genetic transformation with 5 strains of Agrobacterium rhizogenes shows no response to this plant tissue. Thin Layer Chromatography analysis shows the presence of chemical compounds in greenhouse-cultivated tuberous root or natural tuberous root are detected more than that of in vitro root culture.

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์ ที่ได้ให้คำปรึกษาคำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ยุทธนา สมิตะสิริ ที่ได้กรุณาให้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับกวาวเครือขาว

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล และคณาจารย์ของภาควิชาชีววิทยา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำด้านการเรียนและเอื้อเฟื้อสถานที่อุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและให้กำลังใจ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ โครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ (UDC) ทบวงมหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือในด้านการศึกษาและทุนอุดหนุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในระหว่างการศึกษาด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญรูป ..... ญ

สารบัญตาราง ..... ฌ

คำย่อ ..... น

บทที่

1 บทนำ

การขยายพันธุ์พืชในระดับเล็ก 2

เอมบริโอเจเนซิส 5

การเลี้ยงรากพืช 6

วัตถุประสงค์ 11

ขั้นตอนการวิจัย 12

2 วิธีการทดลอง

ครุภัณฑ์ 13

วัสดุและเคมีภัณฑ์ 13

การเตรียมอาหารและภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 14

การเตรียมอาหารและภาวะมาตรฐานในการเลี้ยงแบคทีเรีย 15

การเตรียมเมล็ดและท่อนพันธุ์กวาวเครือ 15

ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อ 17

ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ศึกษาภาวะที่เหมาะสม ในการเลี้ยงและชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของแคลลัส 20
ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด 24
ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการยืดตัวของตายอด 26
ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก 26
ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงรากพืชแบบแขวนลอย 27
ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้นกวาว 28
ศึกษาการขยายพันธุ์ต้นกวาวในสภาพแวดล้อมภายนอก 29
การเตรียมตัวอย่างพืชและสกัดสาร 29
การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากกวาวเครือขาว ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง 30
3 ผลการทดลอง
การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ของสารควบคุมการเจริญเติบโต 31
การชักนำให้เกิดแคลลัส 37
ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงและชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของแคลลัส 42
ปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด 64
ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการยืดตัวของตายอด 71
ปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก 76
ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงรากพืชแบบแขวนลอย 79
ปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้นกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ 85
การปลูกและขยายพันธุ์กวาวในสภาพแวดล้อมภายนอก 89
การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากกวาวเครือขาว ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง 89

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 93
รายการอ้างอิง.....107
ภาคผนวก
ก ส่วนประกอบของอาหาร.....119
ข ข้อมูลการทดลอง.....121
ประวัติผู้ชียน.....151

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะเมล็ดพันธุ์กวาวเครือขาวที่ใช้ในการทดลอง..... 16

2.2 ลักษณะต้นกวาวเครือขาว ที่ใช้ในการทดลอง เลี้ยงบนอาหารสูตร WPM + 0.5 Fe (อายุ 4 สัปดาห์)..... 18

2.3 ลักษณะชิ้นส่วนพืชทดลองส่วนยอด ข้อ ใบและรากจากพืชรูปที่ 2.2..... 19

3.1 กราฟแสดงผลของสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA 2,4-D) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อยอด ข้อ ราก และใบ (น้ำหนักเป็นกรัมต่อชิ้นของเนื้อเยื่อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 32

3.2 กราฟแสดงผลของสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (IAA NAA และ 2,4-D) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดรากชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอด ข้อ รากและใบ (จำนวนรากต่อชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 33

3.3 กราฟแสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนยอด รากและแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากเรือนเพาะชำในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 35

3.4 กราฟแสดงผลการทำงานร่วมกับของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนยอด รากและแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากภาวะปลอดเชื้อในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 36

3.5 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัส ที่ได้จากการชักนำด้วย NAA ต่อ BAP เท่ากับ 0.5:0.5 มก.ต่อลิตร จากเนื้อเยื่อส่วนยอด (กำลังขยาย 1200 เท่า).. 38

3.6 กราฟแสดงคะแนนการเกิดแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อยอด ข้อ ใบและเมล็ดกำลังงอกชักนำด้วย NAA ต่อ BAP ระดับต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 39

3.7 ภาพการชักนำให้เกิดแคลลัส ในภาวะมีแสงและปราศจากแสงของเนื้อเยื่อส่วน

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

ยอดและราก ในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 40
3.8 กราฟแสดงคะแนนการชักนำให้เกิดแคลลัส ในภาวะมีแสงและปราศจากแสงของเนื้อเยื่อยอดและราก (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 41
3.9 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS มี NAA 0.5 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 43
3.10 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร MS มี BAP 1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 44
3.11 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร B5 WPM SH และ MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 45
3.12 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS ความเข้มข้นระดับ 0.5 0.75 1.0 1.25 และ 1.50 เท่า มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 47
3.13 กราฟแสดงอัตราการเจริญแคลลัส ในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5: 1.0 มก.ต่อลิตร ในที่มีแสงและปราศจากแสง (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์).. 48
3.14 กราฟแสดงอัตราการเจริญแคลลัสในอาหารสูตร MS WPM และ 1.25 MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ในสภาพมีแสง (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์)..... 49
3.15 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25 MS ที่ NAA 0.25 และ 0.50 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 1.0 1.5 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 51
3.16 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในสูตรอาหาร MS มี NAA ต่อ BAP

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

0.5:1.0 มก.ต่อลิตรร่วมกับ Kinetin 0 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 52

3.17 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS 1.25xMS มี NAA 0.5 มล.ต่อลิตร และ 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 53

3.18 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 0 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 55

3.19 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA:BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ ABA 0 0.25 0.5 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 56

3.20 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลร้อยละ 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 57

3.21 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับกลีเซอรอล 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 58

3.22 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับไมโออิโนซิทอล 100 250 500 และ 1000 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 60

3.23 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซต ระดับความเข้มข้น

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

0 0.25 0.50 และ 1.0 กรัมต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).... 61

3.24 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS ที่มีกรดอะมิโนร่วมกับ BAP 0 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 62

3.25 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี 0.5 มก. ต่อลิตรร่วมกับ BAP 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ในภาวะความเข้มแสง 2000 และ 3000 ลักส์ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 63

3.26 ภาพแสดงยอดที่เกิดจากแคลลัสและต้นที่ได้จากยอดชักนำของแคลลัส..... 65

3.27 กราฟแสดงจำนวนยอด จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนข้อ บนอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่มี BAP ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 1.0 และ 2.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์)..... 66

3.28 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อ บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์) 68

3.29 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NH_4NO_3 0 200 400 และ 800 มิลลิโมล (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 69

3.30 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนข้อ บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sorbital) อัตราส่วน 60:0 90:0 60:50 และ 30:100 มิลลิโมล (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 70

3.31 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0 0.1 0.2 0.25 0.3 0.4 และ 0.5 มล.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 72

3.32 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วยยอด บนอาหารสูตร

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 และ 0.2 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 73
3.33 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนข้อ บนอาหารสูตร WPM มี TDZ 0 0.1 0.25 0.5 1.0 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 74
3.34 กราฟแสดงความยาวยอดเฉลี่ย (มม.) ที่ GA_3 ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร จากตายอดส่วนข้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 75
3.35 กราฟแสดงความยาวยอดเฉลี่ย (มม.) ที่น้ำตาลระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 จากตายอดส่วนยอดและข้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 77
3.36 กราฟแสดงผลการชักนำด้วย NAA 1-2 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลร้อยละ 1 2 และ 3 ต่อการเกิดราก ต้นและแคลลัส (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)... 78
3.37 กราฟแสดงเปอร์เซนต์การเกิดต้นจากการชักนำให้เกิดราก ในอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่มี น้ำตาลร้อยละ 2 NAA 1 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 80
3.38 กราฟแสดงผลของอาหารสูตร WPM ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 0.75 และระดับปกติ ต่อการชักนำให้เกิดราก (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 81
3.39 กราฟแสดงผลของอาหารสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 0.75 และระดับปกติ ต่อการชักนำให้เกิดราก (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 82
3.40 ภาพแสดงผลการชักนำให้เกิดราก โดยแบคทีเรีย Agrobacterium rhizogenese ในอาหารสูตร MS และ MS ที่มี NAA ต่อ BAP 0.5:0.5 มก.ต่อลิตร ในกวาวเครือขาวเปรียบเทียบกับยาสูบ..... 83

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.41 กราฟแสดงน้ำหนักสดของรากที่เพิ่มขึ้น ในอาหารเหลวสูตร MS B5 SH และ WPM (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 84

3.42 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักสดรากธรรมชาติ และรากจากการชักนำด้วย NAA ในอาหารสูตร MS (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 86

3.43 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักของรากชักนำ ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 1 2 3 4 และ 5 (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)... 87

3.44 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักสดของรากธรรมชาติและรากชักนำ ในอาหารเหลว สูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร... 88

3.45 ภาพแสดงต้นกวาวเครือขาว ที่ได้จากการขยายพันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อ ในระยะเวลา 2 เดือน และหัวกวาว ในระยะเวลา 6 เดือน จากการปลูกในเรือนเพาะชำ..... 90

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1ก แสดงผลของสารเร่งปฏิกิริยาการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อยอด ข้อ รากและใบ (น้ำหนักเป็นกรัมต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 121

1ข แสดงผลของสารเร่งปฏิกิริยาการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อยอด ข้อ รากและใบ (น้ำหนักเป็นกรัมต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 122

2ก แสดงผลของสารเร่งปฏิกิริยาการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อยอด ข้อ รากและใบ (จำนวนรากเป็นกรัมต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 123

2ข แสดงผลของสารเร่งปฏิกิริยาการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน IAA ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อยอด ข้อ รากและใบ (จำนวนรากเป็นกรัมต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 124

2ค แสดงผลของสารเร่งปฏิกิริยาการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อยอด ข้อ รากและใบ (จำนวนรากเป็นกรัมต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 125

3ก แสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากเรือนเพาะชำ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 126

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3ข แสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากเรือนเพาะชำ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 127

3ค แสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนรากต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากเรือนเพาะชำ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 128

4ก แสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 4 มก. ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากสภาวะปลอดเชื้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 129

4ข แสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 4 มก. ต่อลิตร ต่อการเกิดรากต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากสภาวะปลอดเชื้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 130

4ค แสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 4 มก. ต่อลิตร ต่อการเกิดยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากสภาวะปลอดเชื้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 131

5 แสดงคะแนนการเกิดแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อยอด ข้อ ใบและเมล็ดกำลังงอกชักนำด้วย NAA ต่อ BAP ระดับต่าง ๆ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).... 132

6 แสดงคะแนนการชักนำให้เกิดแคลลัส ในสภาวะมีแสงและปราศจากแสงของเนื้อเยื่อและราก (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 132

7 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS มี NAA 0.5 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 133

8 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS มี BAP 1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มก.ต่อลิตร (ใน

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
	ระยะเวลา 4 สัปดาห์).....	133
9	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร B5 WPM SH และ MS มี NAA ต่อ BAP 0.5 : 1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).	134
10	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS ความเข้มข้นระดับ 0.5 0.75 1.0 1.25 และ 1.50 เท่า มี NAA ต่อ BAP 0.5: 1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).....	134
11	แสดงอัตราการเจริญแคลลัส ในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5: 1.0 มก.ต่อลิตรในที่มีแสงและปราศจากแสง(ในระยะเวลา 8 สัปดาห์).	135
12	แสดงอัตราการเจริญแคลลัส ในอาหารสูตร MS WPM และ 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0มก.ต่อลิตร ในสภาพมีแสง (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์).....	136
13	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS ที่ NAA 0.25 และ 0.50 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 1.0 1.5 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร.....	137
14	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในสูตรอาหาร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin 0 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).....	137
15	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS 1.25xMS มี NAA 0.5 มล.ต่อลิตร และ 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5 : 1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).....	138
16	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในสูตรอาหาร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 0 0.1 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).....	139

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

17 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA:BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ ABA 0 0.25 0.5 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 139

18 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA : BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลร้อยละ 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 140

19 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA : BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับกลีเซอรอล 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 141

20 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA : BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับไมโออิโนซิทอล 100 250 500 และ 1000 มิลลิโมลต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 141

21 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS มี NAA:BAP 0.5: 1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซต ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.50 และ 1.0 กรัมต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).... 142

22 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS ที่มีกรดอะมิโน ร่วมกับ BAP 0 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).. 142

23 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี 0.5 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ในสภาวะความเข้มแสง 2000 และ 3000 ลักส์ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 143

24 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อ บนอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่มี BAP ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 1.0 และ 2.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์)..... 143

25 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อยอดและข้อ บนอาหารสูตร

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

WPM มี BAP 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์). 144

26 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NH_4NO_3 0 200 400 และ 800 มิลลิโมล (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 144

27 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sorbital) อัตราส่วน 60:0 90:0 60:50 และ 30:100 มิลลิโมล (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 145

28 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0 0.1 0.2 0.25 0.3 0.4 และ 0.5 มล.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 145

29 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 และ 0.2 มก.ต่อลิตร(ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 146

30 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนข้อบนอาหารสูตร WPM มี TDZ 0 0.1 0.25 0.50 1.0 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 146

31 แสดงความยาวยอดเฉลี่ย (มม.) ที่ GA_3 ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร จากตายอดส่วนข้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 147

32 แสดงความยาวยอดเฉลี่ย (มม.) ที่น้ำตาลระดับความเข้มข้น 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ จากตายอดส่วนยอดและข้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..... 147

33 แสดงผลการชักนำด้วย NAA 1-2 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลร้อยละ 1

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
	2 และ 3 ต่อการเกิดราก แคลลัสและต้น (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)..	148
34	แสดงน้ำหนักสดรากที่เพิ่มขึ้นในอาหารเหลงสูตร MS B5 SH และ WPM (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).....	148
35	กราฟแสดงน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของรากธรรมชาติ และรากจากการชักนำด้วย NAA ในอาหารสูตร MS (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).....	149
36	แสดงน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของรากชักนำ ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 2 3 4 และ 5 (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์).	149
37	แสดงน้ำหนักสดของรากธรรมชาติและรากชักนำที่เพิ่มขึ้น ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร.	150

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
ซม.	เซนติเมตร
BAP	เบนซิลอะมิโนพิวรีน (benzylaminopurine)
GA_3	จิบเบอเรลลิก แอซิด (gibberellic acid)
NAA	แนบทาลีน อะซิติก แอซิด (naphthaleneacetic acid)
TDZ	ไทไดอะซูรอล (thidiazuron)
ABA	แอบไซซิค แอซิด (abscisic acid)
2,4-D	2,4-ไดคลอโรฟีนอคซี อะซิติก แอซิด (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)
MS	อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog
WPM	อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Woody Plant
B5	อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร B5
YEB	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YEB
AVE.	ค่าเฉลี่ย