สรุปผลการวิจัย

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน
2. แคลลัสจากส่วนใบอ่อนมีการเจริญในที่มืดสูงกว่าในที่มีแสง และมีการเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6
3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสจากส่วนใบอ่อน คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ใส่วิตามินตามสูตร Nitsch เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน
4. แคลลัสจากส่วนใบอ่อนที่มีการพัฒนาเป็นยอดแล้ว สามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 0.1 มก./ล.
5. สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดีที่สุดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อนในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย Kinetin 12 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน
6. แคลลัสจากส่วนยอดอ่อนที่มีการพัฒนาเป็นยอดแล้ว สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีในอาหารสูตร MS ที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต และในอาหารที่เสริมด้วย NAA 0.01 มก./ล.
7. ต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาณสตีวีโอไซด์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นในธรรมชาติ
8. ต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อย้ายลงดินได้ต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชัยฤทธิ์ สัตยาประเสริฐ. 2529. ความปลอดภัยในการบริโภคสารหวานจากหญ้าหวาน วิศวกรรมสาร. 39 (2) : 83-87

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอภาส. 2531. สตีวีโอไซด์สารที่มีรสหวานใช้แทนน้ำตาลทราย. วารสารวิทยาศาสตร์. 42 (3) : 149-152.

นันทนา แก้วอุบล. 2525. หญ้าหวาน วิทยาศาสตร์สำหรับประชาชน ครั้งที่ 365 หน้า 1-4

สืบศิลป์ รักวิทางกูร. 2525. หญ้าหวาน กสิกร ฉบับที่ 52 (4) หน้า 231-234.

อัญชลี เติมวิชากร. 2521. การขยายพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Barton, L.V. 1953. Seed storage and viability. Boyce Thouson Inst. Plant Res. 17 : 87-103.

Beu, F. 1954. Stevioside a Unique Sweetening Agent. Chemistry and Industry July 17 : 897-898.

Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1983. Plant Tissue Culture Theory and Practice., Amsterdam, Elsevier Science, 502

Buschman, J. C. M. 1983. Gladiolus as a Cutflower in Subtropical and Tropical Regions. Lisse, Holland. 19

Chevreau, E., Skirvin, R.M., Abu-Qaoud, H.A., Rorban, S.S. and Sullivan, I.G. 1989. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (Pyrus sp.) cultivars in vitro. Plant Cell Rep., 7, 688-691.

Davidonis, G.H. and Hamilton, R.H. 1983. Plant regeneration from callus tissue of Gossypium Hirsutum L." Plant Science Letters., 32, 89-93.

Delouche, J.C. 1980. Environmental effects on seed development and seed quality. HortSci. 25 (6): 775-780

Delouche, J.C. 1968. Seed Maturation. Mississippi: Seed Technology Laboratory, Mississippi State University Press.

Dixon, R.A. 1987. Plant Cell Culture a Practical Appraoach. Department of Biochemistry, Royal Holloway collage Egham Hill, UK. 236

The Document of the company. 1982. Culture and Development of Stevia as a new Natural Resource for Sweetening. Tra-Asia Trading Co., Ltd.

The Document of the company. 1982. Inspection Metho9d for Dried Stevia Leaf at Loading Port. Overseas Merchandisc Inspection Co., Ltd.: 1-3.

Evan, D.A., Sharp W.R. and Ammirato, P.V. 1986. "Protoplast isolation and fusion. In : Handbook of Plant Cell Culture., Vol. 4 New York: Macmillan, 475-479.

_____.1983. Theniques for propagation and breeding. In Handbook of Plant Cell Culture., Vol.1 New York: Macmillan, 970

Ferriara C.M., and Handro W. 1988. Micropropagation of Stevia rebaudiana through leaf explants from adult plants. Planta Medic. 53:167-160.

Flick, C.E. 1983. Isolation of mutant from cell culture. 1983. In Evan, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y. (ed.) Handbook of plant cell culture. New York : Macmillan publishing co.

Freytag, A.H., Rao-Arelli, A.P. Anand, S.C., Wrather, J.A. and Owens, L.D. 1989. Somaclonal vatiation in soybean plants regenerated from tissue culture. Plant Cell Rep., 8, 199-202.

Fujita Hideo.1979.Safetyand Utilization of Stevia Sweetener. ShokuhinShokuhin Kogyo. 22:65-72.

Gawel, N.J., Rao, A.P. and Robacker, C.D. 1980. Somatic embryogenesis from leaf and petiole callus cultures of Gossypium Hirsutum L. Plant Cell Rep., 5, 457-459.

Gamborg O.L. 1970. The effects fo amino acids and ammonium or the growth of plant cells in suspension. Plant Physiology. 45:372-375.

Gamborg, O.L., Davis, B.D., and Stahlhut, R.W. 1983. Somatic embryogenesis in cell cultures of Glycine speacies. Plant cell Rep. 2:209-212

Hackett, W.P. and J.M. Anderson. 1967. Aseptic multiplication and maintenance of defferentiated carnation shoot tissue derived from tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 90:365-369.

Harrington, J.F. 1971. The necessity for high-quality vegetable seed. Hort. Sci. 6 (6): 550-551.

_____. 1972. The necessity for high-quality vegetable seed. Hort. Sci. 6(6): 550-551.

_____. 1972. Seed storage and longivity, 147-245. IN T.T. Kozlowski (ed.). Seed Biology. Vol III. Academic Press, New York.

Hussey, G. 1977. In vitro propangation of gladiolus by precocious axillary shoot formation. scientia Hort. 6:287-296.

Jelaska, S. and R. Sutina. 1977. Maintained culture of multiple plantlets from carnation shoot tips. Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes. 333-337.

Kerbauy, G.B. 1984. In vitro flowering of Oncidium varicosum Mericlones (orchidaceae). plant Science Letters., 35, 73-75,

Kysely, W., Myers, J.R., Lazzeri, P.A., Collins, G.B. and Jacobsen, H. 1987."Plant regeneration via somatic embryogenesis in pea (Pisum sativumL.). Plant Cell Rep., 6, 305-308,

Mantell, S.H., and Smith, H. 1986. Plant Biotechnology. Sydney : Cambridge University Press.

Martha, W., Susan, B. 1983. Stevioside, The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Merck & Co., Inc, U.S.A. 1259.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 135-166.

Murashige, T. and Huang, L.C. 1985. Organogenesis in vitro : physiological and bilchemical aspects. In Biotechnology in International Agricultural Research, Manila, Philipines.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497

Pareddy, D.R., and Greyson, R.I. 1985. In vitro Culture of immature tassels of and inbred field variety of Zea mays Cv. oh 43. Plant Cell Tissue Organ Cult. 5:119-128.

Pierik, R. L. M.; J. L. M. Jansen; A. Maasdam; and C. M. Binnendik. 1975. Optimalization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. Scientia Hort. 3:351-357.

Rao, A.N. 1977. Tissue culture in the orchid industry. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and organ Culture (Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. eds) Berlin: Springer-Verlag Press : 44-45

Skoog, F. and Miller, C.D. 1957. Chemical regeneration of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Sym. Exp. Biol., 11, 118-137.

Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H. and Tabata, M. 1984. Clonal propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by stem-tip. Plant Cell Report. 3:183-185.

Thomas, E. 1937. Structure of Stevioside , Bull. Ass. Chim., 54, 844.

Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration In R.A. Dixon (ed). Plant Cell culture: A practical Approach. pp 79-106. Washington D.C. : TRL press.

Tomoyoshi, H.F. 1979. Safety and Utilization of Stevia Sweetener shokuhim kogyo, Ikeda Tohka Ind. Co., Ltd, 22 (22), 65-72 (Eng).

Yukiyoshi,T., Shigeharu,N., Hiroshi F and Mamoru T.1984. Clonal propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by stem-tip culture. Plant Cell Report. 3:183-185.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1

สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)

Macronutrients	มก./ล.	Iron	มก./ล.
NH_4NO_3	1650	Sodium EDTA	37.25
KNO_3	1900	$FeSO_4 . 7H_2O$	27.85
$CaCl_2 . 2H_2O$	440		
$MgSO_4 . 7H_2O$	370	Organic component	มก./ล.
KH_2PO_4	170	Glycine	2
Micronutrients	มก./ล.	Nicotinic acid	0.5
H_3BO_3	6.2	Pyridoxine-HCi	0.5
$MnSO_4 . H_2O$	6.9	Thiamine-HCi	0.1
$ZnSO_4 . H_2O$	6.14		
KI	0.83		
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.25		
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025		
$CoCi_2 . 6H_2O$	0.025		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 2

สูตรอาหาร Gamborg B5 (1970)

Macronutrients	มก./ล.	Iron	มก./ล.
$CaC_2.2H_2O$	150	NaFeEDTA	28.0
$NaH_2PO_4.H_2O$	150		
KNO_3	2500	Organic components	มก./ล.
$MgSO_4.7H_2O$	250		
$(NH_4)_2SO_4$	134	myoinositoi	100.0
		nicotinic acid	1.0
Micronutrients	มก./ล.	Pyridoxine-HCi	1.0
H_3BO_3	3.0	thiamine-HCi	10.0
$CoCi_2.6H_2O$	0.025		
$CuSo_4$	0.025		
KI	0.750		
$MnSo_4.H_2O$	10.0		
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	0.25		
$ZnSo_4.7H_2O$	2.0		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 3

สูตรอาหาร N_6 (1975)

Macronutrients	มก./ล.	Iron	มก./ล.
$(NH_4)SO_4$	463	NaFeEDTA	28.0
KNO_3	2,830		
KH_2PO_4	400		
$MgSO_4.7H_2O$	185		
$CaCl_2.2H_2O$	166	Organic components	มก./ล.
		Glycine	2.0
Micronutrients	มก./ล.	Thiamine.HCi	1.0
$MnSO_4.4H_2O$	4.4	Pyridoxine. HCi	0.5
$ZnSO_4.7H_2O$	1.5	Nicotinic acid	0.5
H_3BO_3	1.6		
KI	0.8		
$MnSo_4.H_2O$	10.0		
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	0.25		
$ZnSO_4.7H_2O$	2.0		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 4

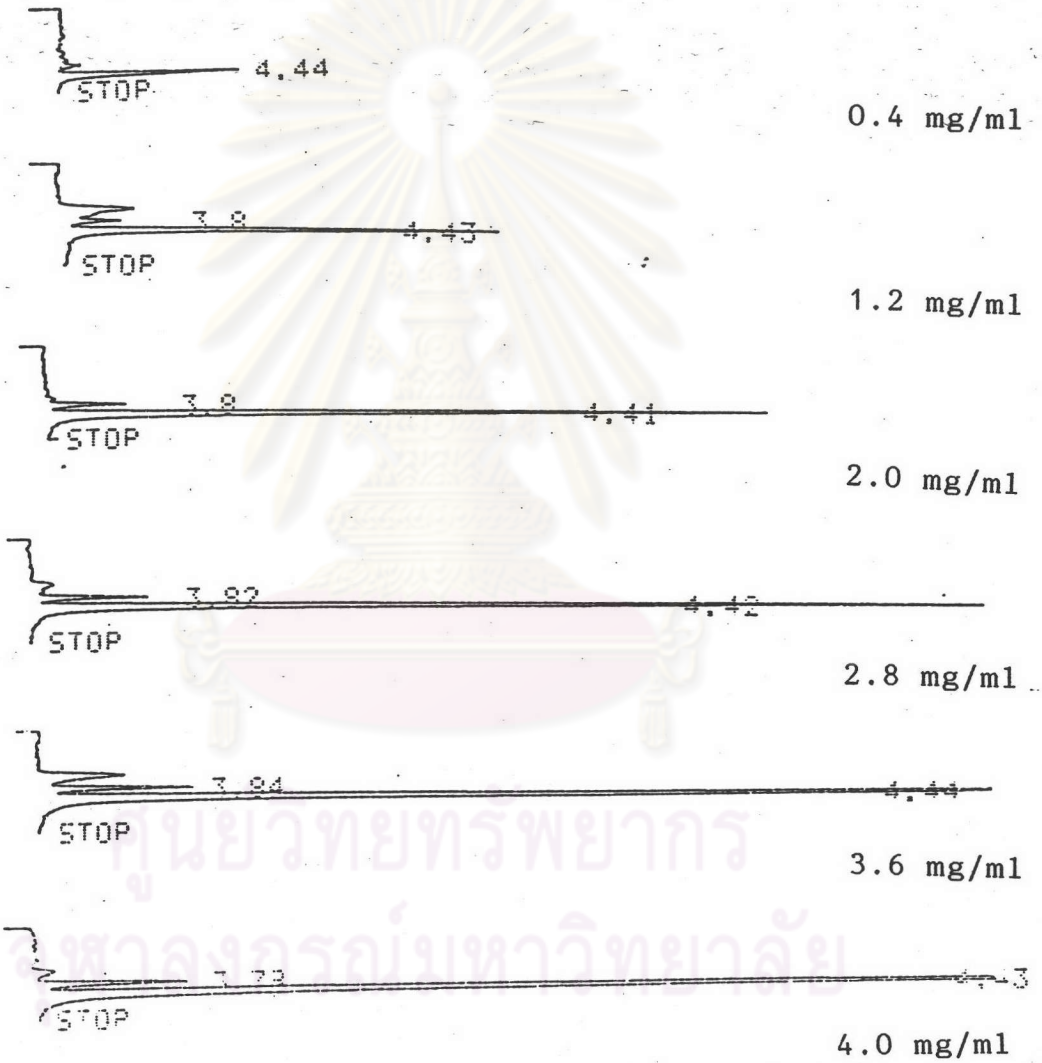
สูตรอาหาร Nitsch and Nitsch (1969)

Macronutrients	มก./ล.	Iron	มก./ล.
KNO_3	950	$FeSO_4.4H_2O$	27.85
$MgSO_4.7H_3O$	185	Na_2 EDTA	37.35
KH_2NO_4	720		
KH_4PO_3	68	Organic components	มก./ล.
$CaCi_2$	166	Biotin	0.05
		Folic acid	0.5
Micronutrients	มก./ล.	Glycine	5.0
$MnSO_4.\ 4H_2O$	25	Meso-inositol	2.0
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	10	Nicotinic acid	0.5
$CuSO_4.\ 5H_2O$	0.025	Pyridoxine hydrochloride	0.5
H_3BO_3	10	Thiamine hydrochloride	0.5
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 5

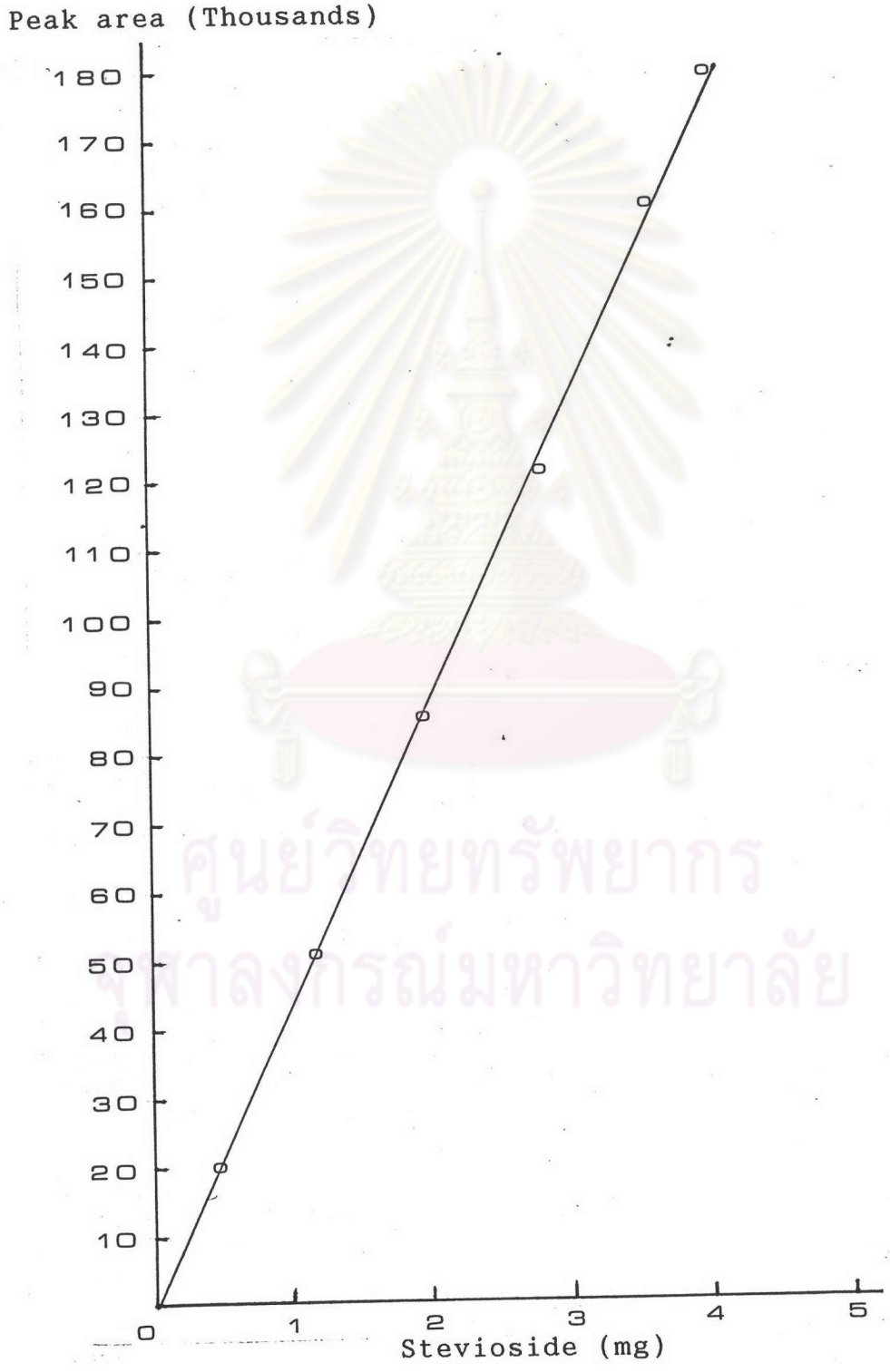
แสดง Chromatogram และพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของสตีรีอไซด์มาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



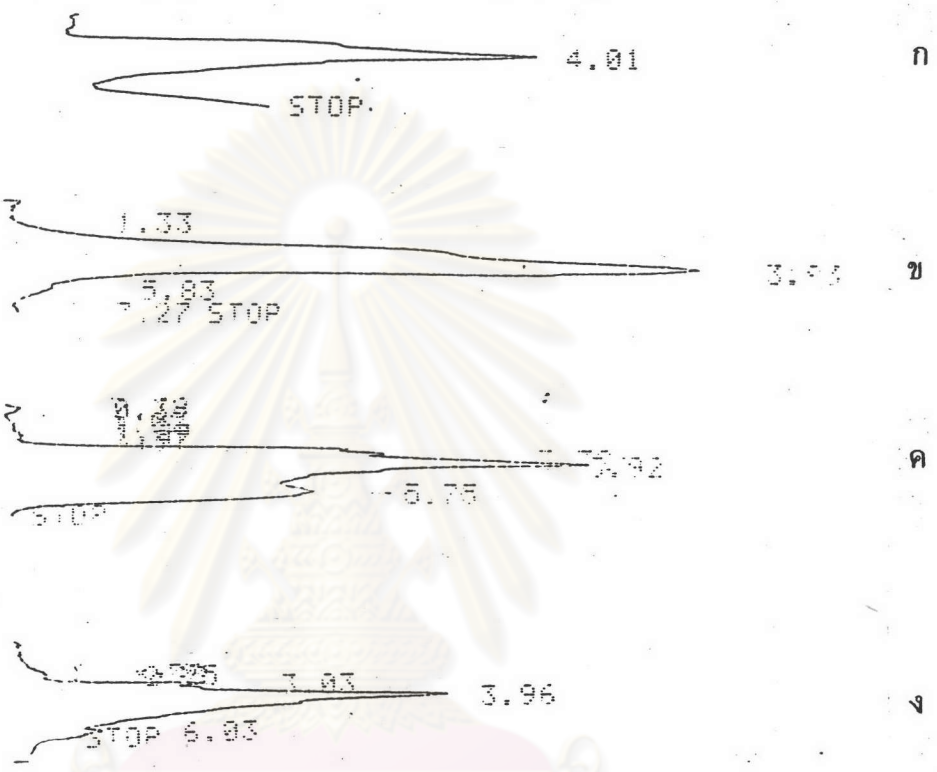
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 6

แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสตีวีโอไซด์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 7 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.ในที่ได้รับแสง ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

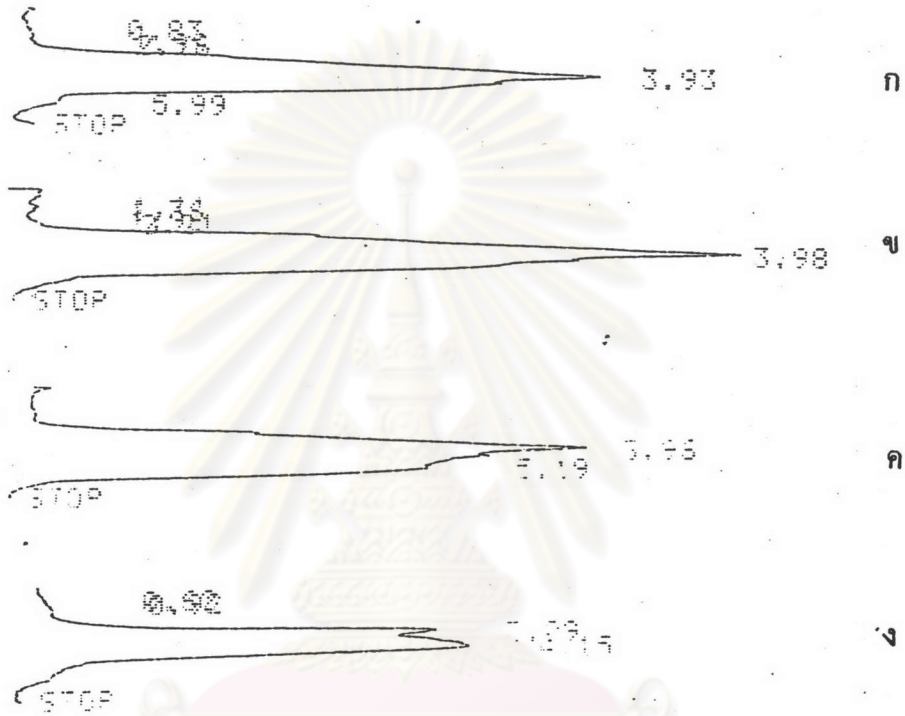
ก. แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์

ข. แคลลัสอายุ 4 สัปดาห์

ค. แคลลัสอายุ 5 สัปดาห์

ง. แคลลัสอายุ 6 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 8 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 กม./ล. ในที่มืด ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ก. แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์

ข. แคลลัสอายุ 4 สัปดาห์

ค. แคลลัสอายุ 5 สัปดาห์

ง. แคลลัสอายุ 6 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 9 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากส่วนใบของต้นจากธรรมชาติ

ก. ใบ 5 คู่แรก จากต้นอายุ 6 เดือน

ข. ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน จากต้นอายุ 6 เดือน

ค. ใบ 5 คู่แรก จากต้นอายุ 9 เดือน

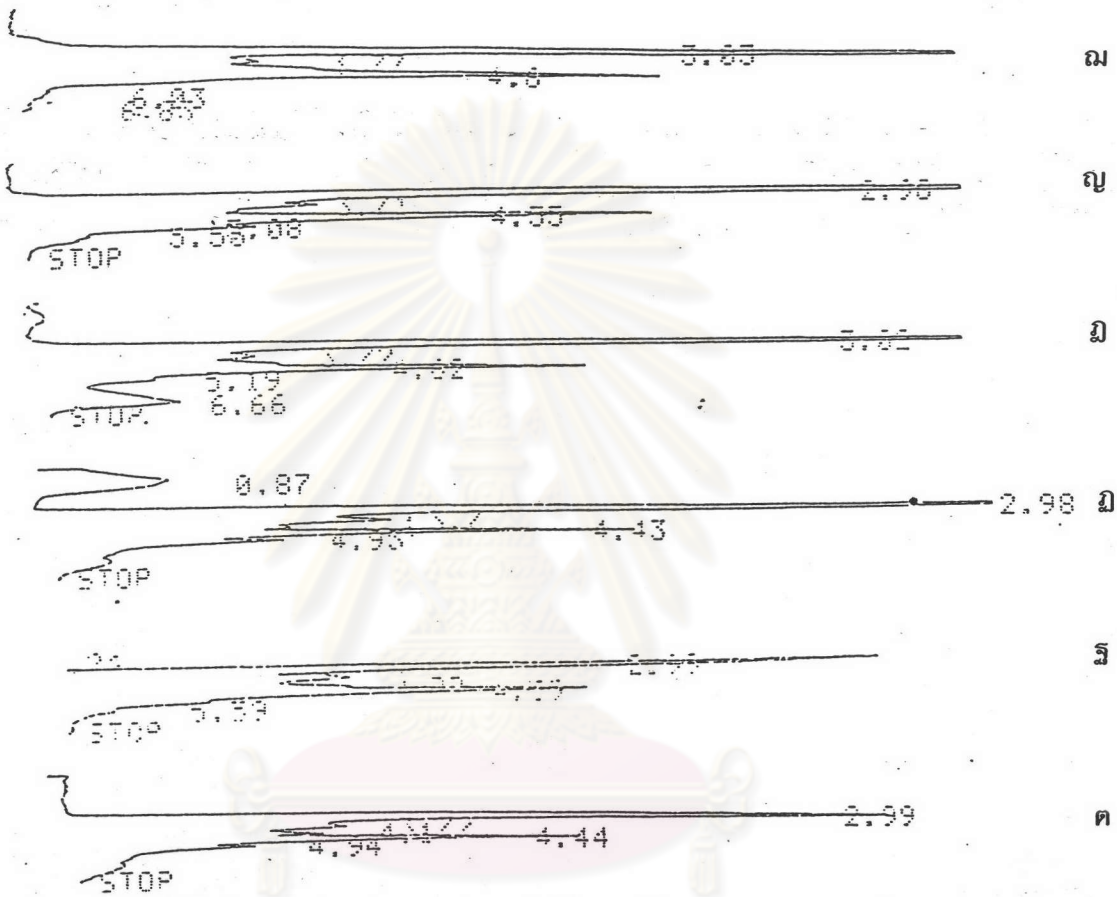
ง. ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน จากต้นอายุ 9 เดือน

จ. ใบ 5 คู่แรก จากต้นอายุ 12 เดือน

ฉ. ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน จากต้นอายุ 12 เดือน

ช. ใบ 5 คู่แรก จากต้นอายุ 15 เดือน

ซ. ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน จากต้นอายุ 15 เดือน



ภาคผนวกที่ 9 (ต่อ)

ณ. ใบ 5 คู่แรก จากต้นอายุ 18 เดือน

ญ. ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน จากต้นอายุ 18 เดือน

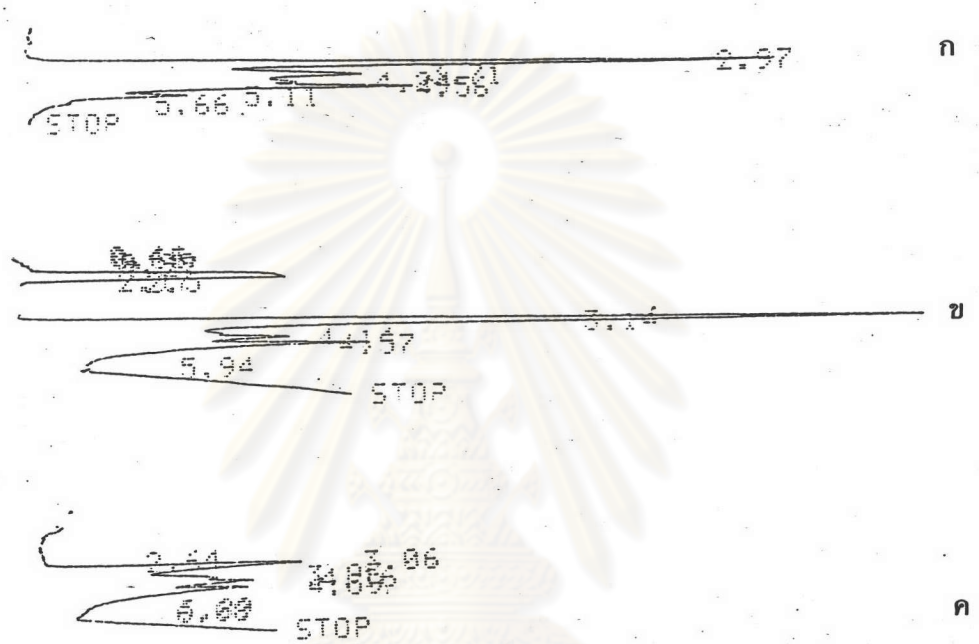
ฎ. ใบ 5 คู่แรก จากต้นอายุ 21 เดือน

ฎ. ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน จากต้นอายุ 21 เดือน

ฐ. ใบ 5 คู่แรก จากต้นอายุ 24 เดือน

ต. ใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน จากต้นอายุ 24 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

ข

ค

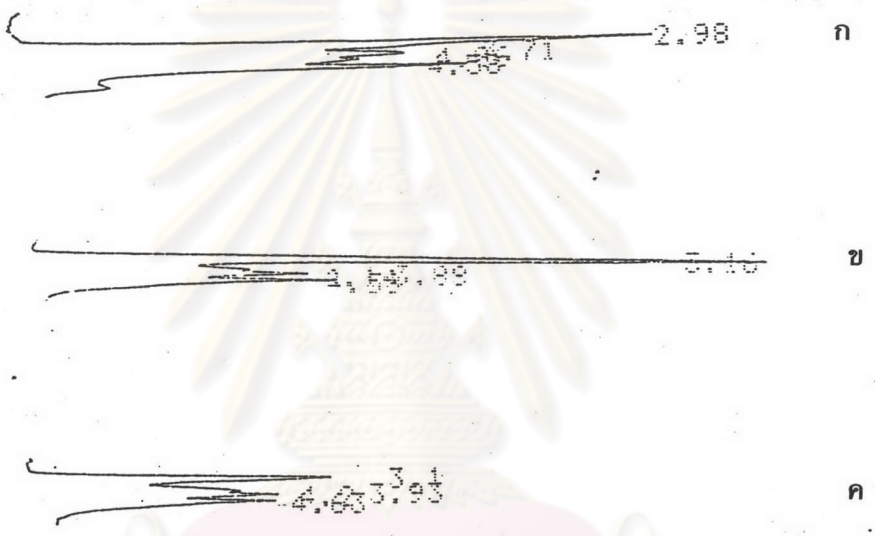
ภาคผนวกที่ 10 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ก. ส่วนใบ

ข. ส่วนลำต้น

ค. ส่วนราก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 11 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นที่เกิดจากการชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

ก. ส่วนใบ

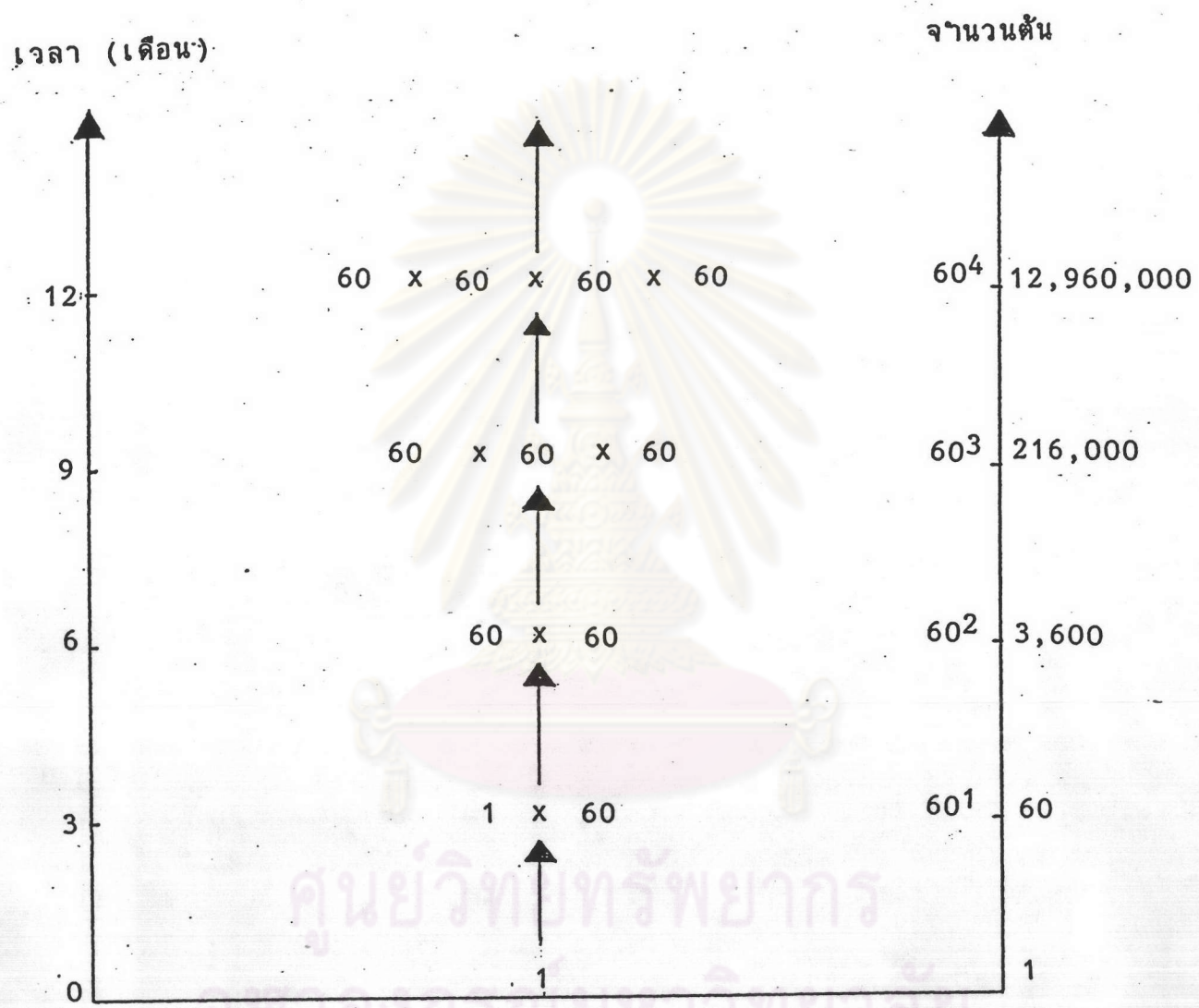
ข. ส่วนลำต้น

ค. ส่วนราก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 12

ตัวอย่างการผลิตต้นหน้าหวานเชิงพาณิชย์โดยวิธี Micropropagation



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพัชรินทร์ ศรีทองคำ เกิดวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2510 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2532

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย