สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิจากผักหวานป่า: การเพิ่มจำนวนต้นผักหวานป่าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Conservation and Utilization of Secondary Metabolites from *Meliantha suavis* Pierre): Micropropagation of *Meliantha suavis* Pierre

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 8 มิ.ย. 2565
เลขทะเบียน 1052759
เลขเรียกหนังสือ 9 SD 394 .064 ค1211ร 2560

รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต

สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร

สิงหาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2559 เป็นส่วนหนึ่งในแผนงาน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามราชกุมารี มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการชักนำแคลลัสของเนื้อเยื่อก้านของผักหวานป่าสำเร็จ โดยนำเนื้อเยื่อก้านลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 6-BA ความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด และค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดนั้นพบในก้านที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแคลลัสไม่สามารถเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปยอดหรือรากการเพาะเลี้ยงแคลลัสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิต ฟลาโวนอยด์หรือ อัลคาลอยด์ในผักหวานป่า

ABSTRACT

Callus was sucessful induced from young stem of *Melientha suavis* Pierre on Murashige and Skoog medium supplemented with 3% sucrose and various concentrations of (0.0.5 mg/l) of Benzyl aminopurine (BA) in light 12 hours conditions. The highest number of callus formation, percentage of callus formation and average weight of callus were obtained from young cultured on the medium supplemented with 0.3 mg/l BA. The callus could not be regenerated to plantlets. The callus could be application in production of flavonoids or alkaloids.

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่	
1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญ	1
จุดมุ่งหมายงานวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ลักษณะทางพฤษศาสตร์	3
- ประโยชน์ของผักหวาน	4
- คุณค่าทางโภชนาการของผักหวาน	4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 วิธีการศึกษา.	6
ศึกษาการเจริญของผักหวานป่าจากการเพาะเมล็ด	6
การทดลองที่ 1 ศึกษาที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อ	7
- ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ	7
- หาเปอร์เซ็นต์การรอดที่มีผลต่อการตอบสนองชิ้นเนื้อเยื่อพืช	7
การทดลองที่ 2 ศึกษาปัจจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักหวานป่า	8
- ขั้นตอนการเตรียมอาหาร	9

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลและวิจารณ์**	
	การเจริญของผักหวานป่าจากการเพาะเมล็ด	10
	ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อ	15
	ปัจจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักหวานป่า	16
5	**บทสรุป**	
	สรุปผลการวิจัย	24
เอกสารอ้างอิง		25
ภาคผนวก		27

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
4.1	บันทึกผลการงอกของผักหวานป่า	10
4.2	วัดการเจริญเติบโต	11
4.3	ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อ	15
4.4	การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของก้านจากต้นผักหวานป่าบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	16
4.5	การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบจากต้นผักหวานป่าบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	18
4.6	การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของยอดจากต้นผักหวานป่าบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	20

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ผักหวานป่า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Meliantha suavis* Pierre จัดอยู่ในวงศ์ Opiliaceae ผักหวานป่ามีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มักจะพบต้นผักหวานป่าได้ตามป่าเบญจพรรณในที่ราบ หรือเชิงเขาที่มีความสูงไม่เกิน 600 เมตร จากระดับน้ำทะเล และโดยปกติจะชอบขึ้นอยู่บนดินร่วนปนทราย สามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยจัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีความสูงของต้นประมาณ 4-11 เมตร เปลือกต้นเรียบกิ่งอ่อนเป็นสีเขียวเข้ม เมื่อแก่แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเทาอมสีน้ำตาลอ่อน เนื้อไม้มีความแข็ง เป็นพืชผลัดใบตามฤดูกาล จึงเก็บสะสมอาการไว้ที่รากและลำต้น

หลังจากที่มนุษย์ได้นำผักหวานป่าจากป่ามาบริโภคมาเป็นเวลาช้านานแล้วเป็นผักพื้นบ้านที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในพื้นที่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง เนื่องจากเป็นผักที่มีรสชาติหวานอร่อย แต่หารับประทานได้ค่อนข้างยากเพราะผักชนิดนี้จะให้ผลผลิตในบางช่วงฤดูกาลเท่านั้น คือในช่วงประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน และส่วนใหญ่จะเก็บมาจากป่า แต่ในปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาปลูกผักหวานป่าเพื่อการค้ากันมากขึ้นทำให้ในหลายๆ พื้นที่มีผลผลิตออกจำหน่ายมากขึ้น โดยแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญในประเทศไทยอยู่ที่จังหวัดสระบุรี และพื้นที่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผักหวานป่าเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น นอกจากนั้นยังมีวิตามินซีและสารฟีนอลิก ทั้งมีเส้นใยเป็นกากอาหาร

ปัจจุบันมีเกษตรกรได้นำผักหวานป่ามาปลูกเป็นอาชีพและการค้าเช่น การตอนกิ่ง การปักชำราก แต่ที่นิยมมากคือขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด หากผู้ขยายพันธุ์ไม่มีความชำนาญ หรือ ไม่มีประสบการณ์ การขยายพันธุ์ดังกล่าวจะไม่ประสบผลสำเร็จ ผักหวานป่ามีราคาสูง เกษตรกรที่อยู่ใกล้แหล่งป่าธรรมชาติเช่น ป่าบริเวณเขื่อนสิริกิติ์เข้าเผาป่าเพื่อกระตุ้นให้ผักแหวานป่าแตกยอดจึงเป็นปัญหาการทำลายป่าไม้ การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ผักหวานป่าโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีความน่าสนใจและมีความสำคัญต่อการลดการทำลายป่าลงได้ รวมทั้งเกษตรกรยังคงมีรายได้

การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อของพืชชนิดต่างๆ เช่น กล้วยไม้ กล้วย รวมทั้งไม้ดอกไม้ประดับอื่นๆ สามารถเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์พืชที่ต้องการในปริมาณอันมากในเวลาอันรวดเร็วได้ สามารถผลิตต้นพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นที่เป็นต้นแบบได้ ผลิตต้น

พืชจำนวนหลายๆต้นที่มีขนาดสม่ำเสมอกันได้ ผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรคได้ ได้พันธุ์พืชที่มีลักษณะที่ดี จึงสนใจนำเทคนิคนี้มาใช้ในการขยายจำนวนต้นของผักหวานป่า

การนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย เกลือแร่ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมด้วยอุณหภูมิและแสงสว่าง ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนการแตกหน่อได้มาก และใช้ระยะเวลา สั้น เซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะพืชจะเจริญเติบโตได้ดีในหลอดทดลองก็ต่อเมื่อให้อาหารที่เหมาะสมกับความต้องการ อาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดมีองค์ประกอบแตกต่างกันไปขึ้นกับบุคคลที่คิดค้นขึ้นมา ไม่มีอาหารเพาะเลี้ยงชนิดใด ชนิดหนึ่งที่ทำให้การเจริญของชิ้นส่วนพืชทุกชนิดเจริญได้ดีเท่ากันหมด สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (Plant Growth Regulator) จัดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ของพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะสารในกลุ่มไซโตไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่มี บทบาทชักนำการแบ่งเซลล์และเกิดยอด แต่ยับยั้งการเกิดราก (คำนูน 2544, Pierik,1989)

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในปัจจุบันได้แบ่งตามคุณสมบัติที่มีต่อพืชออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่มไซโตไคนิน กลุ่มออกซิน กลุ่มจิบเบอเรลลินส์ กลุ่มกรดแอบซิซิก และกลุ่มเอทิลีน (คำนูญ, 2544) กลุ่มที่มีความจำเป็นต่ออาหารเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิดโดยส่วนใหญ่มักจะมีส่วนประกอบระหว่าง ออกซิน (Auxin) และไซโตไคนิน (Cytokinin) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งจะมีผลถึงการเกิดยอดและราก สารกลุ่มไซโตไคนินมี คุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ และช่วยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ให้เกิดยอด เช่น ไคเนติน (Kinetin), BA (6-benzyladenine) แต่ถ้ามีสารกลุ่มออกซินจะกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ ทำให้เกิดราก เช่น IBA (3-Indolebutyric acid), IAA (Indole acetic acid), NAA (Naphthalene acetic acid), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (ปิยะดา,2551) สูตรอาหาร ชนิดของออกซินและไซโทไคนินที่รวมทั้งการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อในการเพาะเลี้ยงจึงเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จของเทคนิคนี้ต่อพืชแต่ละชนิดที่ยังไม่มีรายงานความสำเร็จ

จุดประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการฟอกเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อยอดอ่อนของผักหวานป่า
2. เพื่อศึกษาผลของ BA ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดอ่อนของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ

ขอบเขตของการศึกษา

ศึกษาพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักหวานป่า(*Meliantha suavis* Pierre.) โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อ ใบ ก้าน และยอดอ่อนของผักหวานป่ามา เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้ผักหวานป่าเพิ่มปริมาณการแตกหน่อ

สถานที่ทำการวิจัย

คณะเกษตรศาสตร์ฯ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชื่อสามัญ ผักหวานป่า ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Milientha suavis* Pierre วงศ์ Opiliaceae เป็นพืชพื้นบ้านที่นิยมนำยอดอ่อนมารับประทาน ส่วนมากพบเป็นอย่างมากในพื้นที่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง เนื่องจากเป็นผักที่มีรสชาติหวานอร่อยราคาแพง แต่หารับประทานได้ค่อนข้างยากเพราะผักชนิดนี้จะให้ผลผลิตในบางช่วงฤดูกาลเท่านั้น

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ผักหวานป่าเป็นไม้ยืนต้นขนากลาง สูง 5-10 เมตร ต้นที่โตเต็มที่สูงถึง 13 เมตร ลักษณะเป็นไม้พุ่มใหญ่ อายุหลายปี เนื่องจากมีการตัดแต่งกิ่ง การหักกิ่ง เด็ดยอด เพื่อกระตุ้นให้เกิดกิ่งและยอดอ่อน ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้บริโภค ผักหวานป่าเป็นพืชที่มี ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น (dioecious)

ใบ (leaf)

ผักหวานป่าเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (simple leaf) การเรียงของใบเป็นแบบสลับกันคนละข้าง (alternate) ใบอ่อนมีรูปร่างเรียวแคบ (lanceolate) ปลายใบแหลม (acuminate) สีเขียวอมเหลืองใบแก่เต็มที่ รูปร่างรีกว้างถึงรูปไข่ (elliptical to ovate or obovate) สีเขียวเข้ม ปลายใบป้าน (obtuse) มีเส้นใบ 5-8 คู่

ลำต้น (stem)

เป็นไม้เนื้อแข็ง กิ่งก้านเกลี้ยง ผิวเปลือกเรียบ กิ่งอ่อน เปลือกมีสีเขียวเข้ม และจะเปลี่ยนเป็นสีเทาอ่อนอมน้ำตาล ผิวขรุขระ เมื่อมีอายุมากขึ้น

ดอก (flower)

ช่อดอกเป็นแบบ panicle ยาว 15-20 เซนติเมตร ดอกตัวผู้ (male flower) ไม่มีก้านดอก (sessile) อาจเป็นดอกเดี่ยวหรือกลุ่ม 3-5 ดอก ก้านชูเกสรตัวผู้ (filament) สั้นเกือบติดฐานของอับเกสรตัวผู้ (anther) ค่อนข้างใหญ่ ก้านดอกตัวเมีย (pedicel) ยาวประมาณ 3-7 มิลลิเมตร จะเกิดดอกเดี่ยวหรือกลุ่มประมาณ 3-4 ดอก การผสมเกสร (pollination) เป็นการผสมข้าม เนื่องจากอยู่กันคนละต้น

ผล (fruit)

เป็นผลเดี่ยวที่มีรูปไข่ ถึงค่อนข้างกลม (ellipsoid to slightly ovoid or obvoid) มีขนาด 2.3-4.0 เซนติเมตร x 1.5-2.0 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียว มีนวลเคลือบโดยรอบ และต่อมาจะปลี่ยนเป็นสีเหลืองครีม หรือเหลืองอมส้มเมื่อแก่ เปลือก (pericarp) บาง เนื้อมีความฉ่ำน้ำ มีเมล็ดเดี่ยว (เกษม และคณะ)

ประโยชน์ของผักหวานป่า

ผักหวานป่าเป็นพืชสมุนไพรพืชผักพื้นบ้านที่มีชื่อเสียง มีอายุยืนยาวนานเป็นร้อยๆปี ใช้ประโยชน์ได้ทั้งใบอ่อน ยอดอ่อน และช่อผล มาบริโภคเป็นเวลานานเพราะ ผักหวานป่ามีรสชาติที่อร่อย หวาน มัน กรอบ ปลอดภัยจากสารพิษนำไปประกอบอาหารได้เกือบทุกอย่างและอุดมด้วยคุณค่าอาหารที่เป็นประโยชน์ อาทิ สารเบต้า-แคโรทีน วิตามินซี และวิตามินบี 2 เป็นต้น (ธนภัทร.2548)

คุณค่าทางโภชนาการของผักหวานป่า

คุณค่าทางสารอาหารของยอดอ่อนและใบอ่อนผักหวานป่าในส่วนที่กินได้ 100 กรัม และสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีคุณค่าทาง โภชนาการสูง ประกอบด้วยคุณค่าทางสารอาหารต่างๆ ดังนี้ (มนตรี.2550)

พลังงาน	39.0กิโลแคลอรี่	ไขมัน	0.6 กรัม
โปรตีน	0.1 กรัม	แคลเซียม	24.0 มิลลิกรัม
คาร์โบไฮเดรต	8.3 กรัม	เหล็ก	1.3 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	68 มิลลิกรัม	วิตามิน B1	0.12 มิลลิกรัม
วิตามิน A	8,500 หน่วยสากล	ไนอาซีน	3.6 มิลลิกรัม
วิตามิน B2	1.65 มิลลิกรัม	เบต้าแคโรทีน	516.33 ไมโครกรัม
วิตามิน C	168.0 มิลลิกรัม	น้ำ	87.1กรัม
ใยอาหาร	2.1 กรัม	เถ้า	1.8 กรัม

ที่มา :ฝ่ายวิเคราะห์อาหารและโภชนาการ กองโภชนาการ กรมอนามัย, 2535

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผักหวานป่าจำแนกออกเป็นสองสายพันธุ์ได้แก่พันธุ์ยอดเหลืองและพันธุ์ยอดเขียวมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในเอเชียตะวันออก พบทั่วทุกภาคในประเทศไทย โดยเฉพาะในป่าเบญจพรรณ หรือที่สูงไม่เกิน 600 เมตรจากระดับน้ำทะเล จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ลำต้นสูงประมาณ 4-11 เมตร เปลือกลำต้นเรียบกิ่งอ่อนเป็นสีเขียวเข้มแก่แล้วเปลี่ยนสีเป็นเทาอมน้ำตาล เนื้อไม้แข็งเป็นพืชผลัดใบตามฤดูกาลเก็บสะสมอาหารไว้ที่รากและลำต้น นิยมขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด สรรพคุณ เป็นอาหารและยาประจำฤดูร้อนช่วยแก้อาการธาตุไฟ ใบและรากมีรสเย็น แก้ไข้ ยอดใช้เป็นยาเขียวลดไข้ ยางใช้กวาดคอเด็กแก้ลิ้นฝ้าขาว (ณัฏฐากร 2552)

ผักหวานป่าเป็นพืชในธรรมชาติจึงมีการเผาป่าเพื่อให้ผักหวานแตกยอด เนื่องจากผักหวานป่าเป็นที่ต้องการบริโภคในปริมาณมากกว่าที่ธรรมชาติผลิตได้ดังนั้นการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขปัญหานี้ นอกจากนั้นยังเป็นเทคโนโลยีเบื้องต้นในการนำไปใช้ประโยชน์ผลิตสารทุตยภูมิโดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

อรพิน .(2557) การศึกษาผลของ BA และ IBA ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณหน่อและการออกรากของยอดผักหวานป่าที่ เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากเลี้ยง เป็นเวลา 90 วัน พบว่า มีผลต่อการเพิ่มปริมาณหน่อใหม่ของชิ้นส่วนผักหวานป่ามากที่สุด แต่ลักษณะของหน่อที่ แตกใหม่อ้วนสั้น ค่อนข้างอวบน้ำ สีเขียวอ่อน และสูตรอาหารที่ไม่เติม BA มีผลให้การแตกหน่อใหม่น้อยที่สุด แต่ ลักษณะต้นสมบูรณ์ดีกว่าต้นที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นอื่น ๆ ส่วนในด้านการออกรากหลังจาก เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนผักหวานป่าบนสูตรอาหาร MS ทั้งที่ไม่เติม IBA และเติม IBA ทุกความเข้มข้นไม่สามารถชักนำ ให้ยอดผักหวานป่าที่เพาะเลี้ยงออกรากใหม่ได้

นิภาวรรณ์.(2556) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชท้องถิ่นที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของจังหวัดสุรินทร์ โดยศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน วิธีการฟอกฆ่าเชื้อส่วนของตาข้างผักหวานป่าด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้าง ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที พบว่าตาข้างสามารถรอดชีวิตสูงสุดเฉลี่ยร้อยละ 65

นิตยา.(2556) การศึกษา BA เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก พบว่า ความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากพบในอาหารเหลว ½ MS และอาหารวุ้นสูตร

MS ที่เติมฮอร์โมน BA 5 มก./ล. โดยมีค่าเฉลี่ยของการเกิดยอดสูงสุด คือ 7.8 และ 6.0 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ แสดงให้เห็นว่าผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารทั้งสองแบบมีความคล้ายคลึงกัน

BA เป็นไคเนตินที่นิยมใช้ชักนำยอด และกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดอ่อนของผักหวานป่าที่นำมาศึกษาครั้งนี้

ปี 1996 พบรายงานการนำเอ็มบริโอของ *M. suavis* เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ไม่เติมฮอร์โมน หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วันมีเปอร์เซ็นต์การงอก 80 % ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดมีการพัฒนาไปเป็นยอดเล็กๆ บนอาหารที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเนื้อเยื่อเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล

ปี 2000 มีการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรผักหวานป่า โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD 7-10 mer primers ให้ผลเกิดเป็นแถบทั้งหมด 46 แถบ มี 36แถบเป็น polymorphic พบว่า ผักหวานป่าแถบอีสานและภาคเหนือมีลักษณะ RAPD ที่มีความแตกต่างกันโดยใช้ค่า Shanon's diversity

จากรายงานที่พบยังไม่มีรายงานที่สามารถค้นพบวิธีการเพิ่มจำนวนผักหวานป่าแบบ *in vitro* ได้สำเร็จ และไม่มีรายงานด้านสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ การวิจัยนี้เป็นความพยายามพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดนี้เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์และผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

การเตรียมต้นอ่อนผักหวานป่าจากการเพาะเมล็ด

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ดินร่วน
2. ถุงดำ
3. เมล็ดผักหวาน
4. ตระกร้า
5. ป้ายชื่อกับปากกาสำหรับเขียน

วิธีการเพาะเมล็ดในดิน

เมล็ดผักหวานป่าได้รับการอนุเคราะห์จากสวนนายพรรวิจักร จังหวัดหนองบัวลำภู

1. นำเมล็ดผักหวานป่า มาแช่น้ำ 1 คืนก่อนนำไปปลูก
2. นำเมล็ดที่แช่น้ำ 1 คืน มาขัดในตะกร้าที่ใส่น้ำเล็กน้อย ขัดเอาเปลือกที่เมล็ดออกหมด
3. นำไปวางในถุงดำ ให้เมล็ดโผล่ขึ้นมาครึ่งเมล็ด
4. จดบันทึกวันที่ปลูก
5. รดน้ำดูแลสังเกตการเจริญเติบโตบันทึกการ เปอร์เซ็นต์การงอก ความสูงต้น จำนวนใบ

การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองนี้ใช้ Sodium hypochlorite ฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อ โดยเตรียมในความเข้มข้น 10% ,15% และ 20% ส่วนระยะเวลาในการฟอกที่ใช้ในการศึกษานี้คือ 8 นาที

ตาราง 3.1 ความเข้นข้นของ Sodium hypochlorite ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อก้าน ใบ และยอดอ่อนของผักหวานป่า

Treatment	Concentrations of Sodium hypochlorite
1	10%
2	15%
3	20%

1. **การฟอกฆ่าเชื้อ** (Suface Sterilization)

เลือกเด็ดช่อผักหวานป่าที่เขียวมีส่วนยอด ใบ และ กิ่ง สมบูรณ์ แล้วนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน 1 หยด ผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 5 นาที เพื่อขจัดคราบฝุ่นละอองหรือเศษซากพืชหรือแมลงที่ติดอยู่กับส่วนส่วนเนื้อเยื่อของผักหวานป่าที่นำมาใช้เป็นตัวอย่าง จากนั้นนำไปแช่ด้วย Sodium hypochlorite 10% ,15% และ 20% เป็นเวลา 8 นาที

2. **ศึกษาผลต่อการตอบสนองชิ้นเนื้อเยื่อพืชในขั้นตอน** Suface Sterilization

หลังจากการฟอกเนื้อเยื่อด้วย Sodium hypochlorite 10% ,15% และ20% เป็นเวลา 8 นาที แล้วนำเนื้อเยื่อตัวอย่างเข้าในตู้ปลอดเชื้อ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว สามครั้ง แล้วแยกออกเป็นส่วนๆ คือใบ ก้าน และยอด ตัดเป็นชิ้นขนาด 1 เซ็นติเมตร แล้วนำแต่ละส่วนผักหวานป่าลงเพาะเลี้ยงในบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

ในสภาพปลอดเชื้อ บนชั้นวางในห้องที่ตั้งอุณหภูมิที่ 24 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูโอเรสเซนต์สีขาว ที่ความเข้มข้นแสง35-40 µmol m-2 s-1 ให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ BA (Benzyl aminopurine) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ

1. เตรียมอาหาร

MS ที่เติม ฮอร์โมน Benzyl aminopurine (BA) ในความเข้มข้นที่ต่างกันทั้งหมด 6 สูตร ดังแสดงในตาราง 3.2

ตาราง 3.2 สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักหวานป่า MS (Murashige and Skoog) semi-solid mediumที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ

Treatment	Concentrations of BA (mg/l)
1	0
2	0.1
3	0.2
4	0.3
5	0.4
6	0.5

\

2. **อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร**

1. เตรียมน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
2. บีกเกอร์ขนาด	1000	มิลลิลิตร
3. Stock solution 1 และ 2 อย่างละ	20	มิลลิลิตร
4. Stock solution 3-7 อย่างละ	5	มิลลิลิตร
5. เตรียม Benzyl aminopurine (BA)	0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
6. ชั่งสาร MYO -Inositol	0.1	กรัม
7. ชั่งน้ำตาล	30	กรัม
8. ผงวุ้น	8	กรัม/ลิตร

3. **ขั้นตอนการเตรียมอาหาร**

1. ใส่ Stock 1-7 และ BA ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วใส่น้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
2. นำไปวางบนเครื่องคนสาร (magnetic stirrer) ใส่ MYO – Inositol คนให้เข้ากันแล้วใส่น้ำตาลลงไป
3. เมื่อสารละลายแล้วนำไปปรับค่า pH = 5.6 โดยเครื่อง pH meter
4. เมื่อได้ค่า pH ที่ต้องการแล้วนำไปปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (Volumetic flask) ให้ได้ 1 ลิตร แล้วใส่กลับลงไปในบีกเกอร์
5. เทผงวุ้น คนให้เข้ากัน นำถุงพลาสติกคลุมปากบีกเกอร์แล้วใช้หนังยางรัด
6. นำไปเข้าเครื่องไมโครเวฟ เป็นเวลา 3 นาทีแล้วนำออกมาคนให้ผงวุ้นใสและนำกลับเข้าเครื่องจนกว่าจะเดือด
7. เมื่อคนจนใส เทใส่ขวดขนาด 2 ออนส์ แล้วปิดฝาให้สนิท นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121℃ ที่ความดัน

4. **ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ**

เลือกส่วนของชิ้นเนื้อเยื่อผักหวานป่าแล้ว ทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานเป็นเวลา 5 นาที เพื่อขจัดคราบฝุ่นละอองหรือเศษซากของแมลงที่อาจติดอยู่กับใบ แช่ผักหวานป่าด้วย Sodium

hypochlorite เขย่าเป็นเวลา 8 นาที แล้วล้างด้วย น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละประมาณ 1 นาที ย้ายตัวอย่างลงในจานแก้ว ทิ้งไว้ให้แห้งพอหมาดๆ

5. **ขั้นตอนการย้ายลงในอาหาร**

ชิ้นส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อผักหวานป่า 3 ชิ้นส่วน ใบ ก้าน และยอด ใบและก้านมาตัดแต่งให้ใบเป็นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร และก้านตัดแต่งให้ยาวขนาด 1 เซนติเมตร วางชิ้นเนื้อเยื่อเป็นแนวราบไปกับอาหาร ส่วนยอดให้ตัดส่วนที่ติดกับใบทั้งสองแล้วปักลงตรงกลางอาหารให้เนื้อเยื่อตั้งตรง นำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยง

6. **การวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

การบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสที่เกิดขึ้น โดยข้อมูลในการทดลองมีจำนวน 12 ซ้ำต่อหน่วยการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์

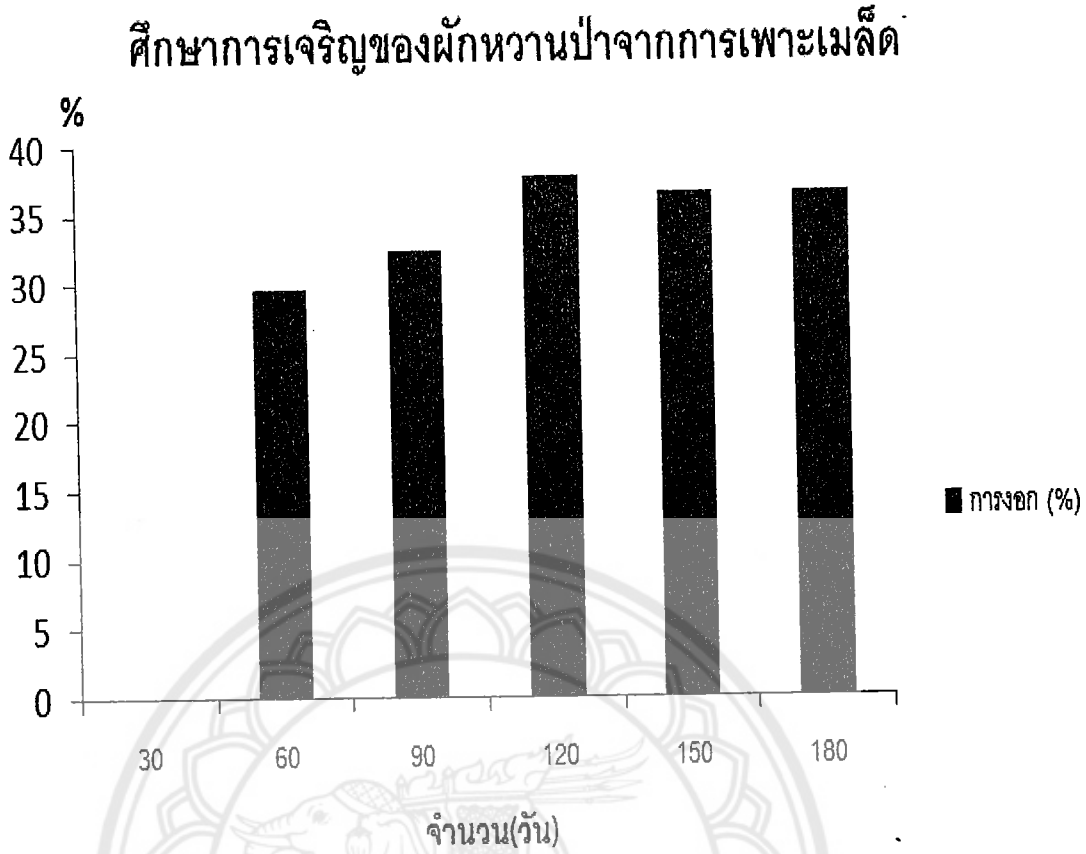
4.1 การเจริญของผักหวานป่าจากการเพาะเมล็ด

จากผลการศึกษาเจริญของผักหวานป่าจากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 6 เดือน จากผลการทดลองพบว่าเมล็ดผักหวานป่ามีการเจริญเติบโตช้ามีเปอร์เซ็นต์การงอกที่เดือนแรกเป็น 0 ต่อมาในเดือนที่ 2 พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 29.73 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นสูงสุด (37.84%) เมื่อเพาะเลี้ยงไป 4 เดือน หลังจากนั้นที่ 6 เดือน ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง สังเกตุได้ว่าเมล็ดผักหวานป่างอกช้า และมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมาก มีความเห็นว่ายังคงต้องมีการศึกษาว่าปัจจัยจำกัดที่ทำให้เมล็ดไม่สามารถเจริญได้นั้นเกิดจากสาเหตุใด คาดว่าเนื่องจากผักหวานป่าในธรรมชาติ อยู่ในสภาพที่มีความชื้นสูงกว่าในสภาพที่นำมาเพาะในโรงเรือนที่คณะเกษตรฯ

ตาราง 4.1 บันทึกผลการงอกของผักหวานป่า

สีเมล็ดผักหวานป่า	การงอก (%)					
	30 วัน	60 วัน	90 วัน	120 วัน	150 วัน	180 วัน
สีเหลือง	0	29.73	32.43	37.84	36.49	36.49

หลังจากเพาะเมล็ดผักหวานป่าลงดินสังเกตุการงอก จำนวนใบ ความสูงลำต้น สังเกตุและเก็บผลเป็นระยะเวลา 180 วัน พบว่าหลังจากงอกแล้วต้นจะมีความสูงเฉลี่ย 16.08 เซ็นติเมตร มีใบในระหว่าง 5-8 ใบ ในช่วงที่ศึกษาผลที่สังเกตุได้นั้นจัดได้ว่าผักหวานป่าเจิญเติบโตช้ามาก



ภาพ 4.1 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักหวานป่าในระยะเวลาการเพาะในดิน 180 วัน

105759

สำนักหอสมุด
8 มิ.ย. 2565

ตาราง 4.2 ความสูง จำนวนใบ ของผักหวานป่าที่งอกมาจากการเพาะเมล็ดในดิน (เดือนมิถุนายน กันยายน 2559)

ระยะเวลา / ต้นที่	ระยะเวลาเพาะ 60 วัน		ระยะเวลาเพาะ 90 วัน		ระยะเวลาเพาะ 120 วัน	
	ความสูง (cm)	จำนวนใบ	ความสูง (cm)	จำนวนใบ	ความสูง (cm)	จำนวนใบ
1	1	-	4	6	6	5
2	-	-	4	4	3	4
3	2.5	3	6.5	7	6.5	7
4	6.5	7	7	9	8.3	7
5	1.5	-	5	16	3.5	6
6	2	4	4	6	4.5	6
7	2.5	5	4	6	4.3	6
8	-	-	3	3	4.5	3
9	-	-	1.5	2	4	4
10	-	5	6	7	5.8	5
11	4	3	5	6	7.5	6
12	3	6	6	17	9.5	7
13	4	4	5	6	5.4	6
14	4	5	5	5	5.8	5
15	7	6	7.5	8	8	8
16	3	5	4	6	5.5	6
17	2	5	5	5	6	5
18	-	-	1	-	6.5	3
19	4	4	6	5	7	5
20	-	-	1.5	-	4.5	5
21	3	5	4	7	5	7
22	-	-	-	-	2	3
23	2	4	4.5	16	5.5	7
24	4	6	5	8	4.6	8
25	-	-	3	-	4	5
26	4	4	5	6	5	7
27	6	6	6	8	6	7
28	1.5	-	-	-	-	-

ตาราง 4.2 ความสูง จำนวนใบ ของผักหวานป่าที่งอกมาจากการเพาะเมล็ดในดิน (เดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2559)

ระยะเวลา / ต้นที่	ระยะเวลาเพาะ 150 วัน		ระยะเวลาเพาะ180 วัน	
	ความสูง(cm)	จำนวนใบ	ความสูง(cm)	จำนวนใบ
1	16	5	16	5
2	13	4	13	4
3	15	7	16.5	7
4	13	7	18.3	7
5	13.5	6	13.5	6
6	14.5	6	14.5	6
7	14	6	14.3	6
8	14	3	14.5	3
9	14	4	14	4
10	15.8	5	15.8	5
11	17.5	6	17.5	6
12	15	7	19.5	7
13	15.4	6	15.4	6
14	15	5	15.8	5
15	16	8	18	8
16	15	6	15.5	6
17	16	5	16	5
18	16	3	16.5	3
19	17	5	17	5
20	14	5	15	5
21	15	7	15	7
22	12	3	12	3
23	15	7	15.5	7
24	12.6	8	14.6	8
25	13	5. 3	.15	5
26	15	7	15	7
27	16	7	16	7
	-	-	Mean 16.08	-

4.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite ต่อการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างกันและแช่ไว้เป็นเวลา 8 นาที พบว่าที่ 10% มีอัตราการรอดเนื้อเยื่อใบเท่ากับ 40 เนื้อเยื่อก้านมีอัตราการรอด 40 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเยื่อยอดมีอัตราการรอด 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 15% มีอัตราการรอดของเนื้อเยื่อส่วนใบ ก้านและยอด เป็น 60 80 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ 20% มีอัตราการรอดของเนื้อเยื่อใบ ก้าน ยอด เป็น 36.67 40 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมคือที่15% ซึ่งจะใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงผักหวานป่าในขั้นต่อไป

ตาราง 4.3 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อ

Sodium hypochlorite(%)	อัตราการรอด(%)		
	ใบ	ก้าน	ยอด
10	40	40	30
15	60	80	50
20	36.6	40	30

4.3 ผลของ BA ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่าง ๆของผักหวานป่า

4.3.1ผลของ BA ต่อการชักนำแคลลัสชิ้นส่วนของก้าน

จากผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของก้านโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตรวจนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส พบว่าในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดคือ 33 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตาราง 4.4 การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชินส่วนของก้านจากต้นผักหวานป่าบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

BA	สัปดาห์ที่ (เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส)							
(mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	25	17	17	17	8	8
0.2	0	0	17	8	8	8	8	8
0.3	0	8	33	25	25	17	8	8
0.4	0	0	17	17	17	8	8	0
0.5	0	0	25	17	17	8	8	8

4.3.2 ผลของ BA ต่อการชักแคลลัสของนำชิ้นส่วนใบ

จากผลการศึกษาการชักนำชิ้นส่วนของใบโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส พบว่าในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำการเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดคือ 8 เปอร์เซ็นต์ ใน 35 วัน และ MS ที่มีฮอร์โมน BA 0, 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำการเกิดแคลลัสเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ 0, 8, 0, 8, 8 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตาราง 4.5 การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบจากต้นผักหวานป่าบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

MS+BA	สัปดาห์ที่ (เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส)							
(mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	8	8	8	8
0.2	0	0	0	0	0	0	0	0
0.3	0	0	0	0	0	0	8	8
0.4	0	0	0	0	0	0	8	8
0.5	0	0	0	0	0	0	8	8

4.3.3 **ผลของ** BA **ต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนยอด**

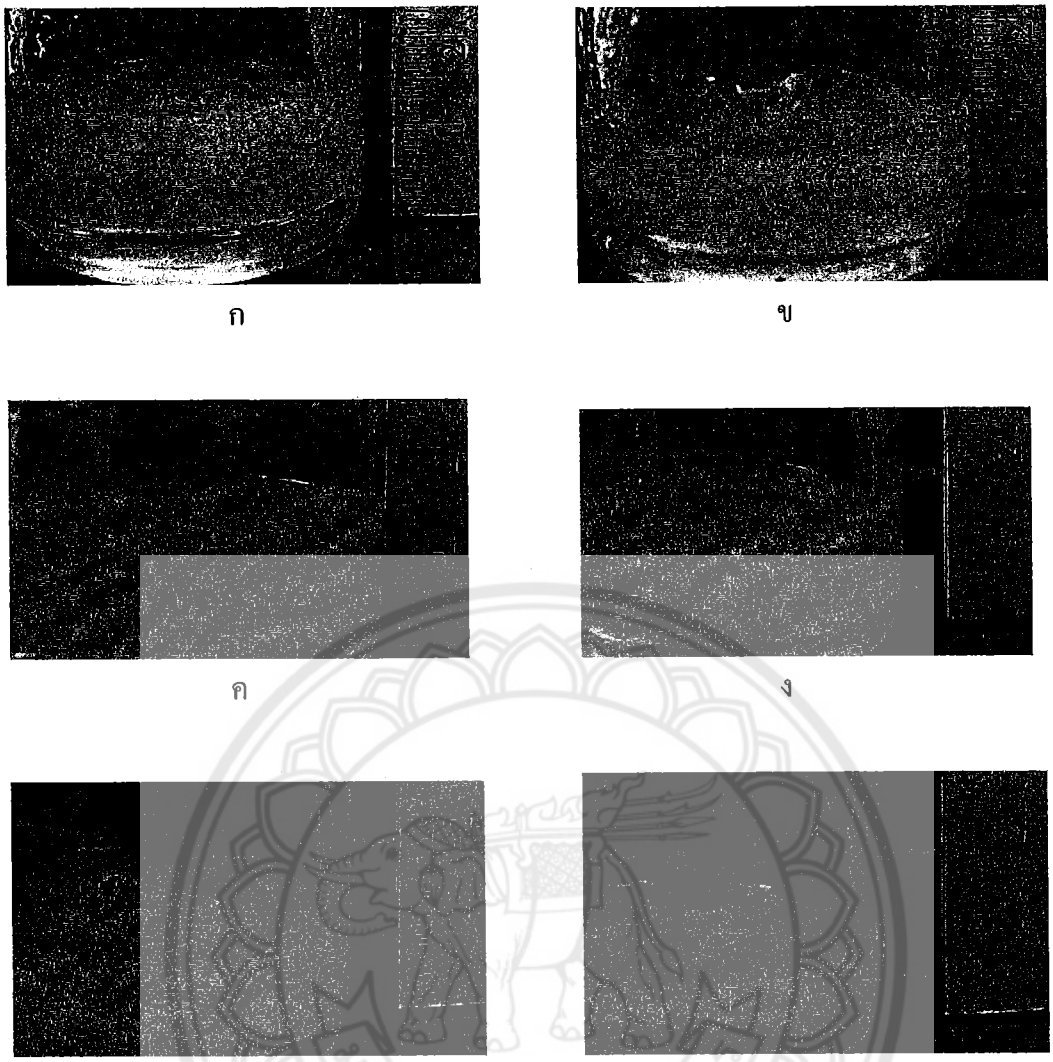
จากผลการศึกษาการชักนำชิ้นส่วนของยอดโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อตรวจนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส พบว่าในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำการเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดคือ 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยง 21 วันและเปอร์เซ็นต์คงที่ จนปกระทั่ง 35 วัน MS ที่มีฮอร์โมน BA 0, 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นนื้อเยื่อยอดผักหวานป่าไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส

ตาราง 4.6 การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของยอดจากต้นผักหวานป่าบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

MS+BA	วัน							
(mg/l)	7(%)	14(%)	21(%)	28(%)	35(%)	42(%)	49(%)	56(%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	8	8	8	0	0	0
0.2	0	0	0	0	0	0	0	0
0.3	0	0	0	0	0	0	0	0
0.4	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0

จากการศึกษาปัจจัยของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ จากผลการทดลองจะพบว่า Sodium hypochlorite 15% นาน 8 นาที เหมาะสมต่อการฟอกชิ้นเนื้อเยื่อเนื่องจากยังมีเนื้อเยื่อมีสีเขียวและมีอัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อของผักหวานสูงที่สุด 60 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจำนวนมาก ในการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อผักหวานป่า โดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม BA เพื่อชักนำให้ผักหวานป่าเพิ่มปริมาณแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา นาน 8 สัปดาห์ พบว่า MS ที่มีฮอร์โมน BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของก้านมากที่สุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดคือ 33 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 21 วัน ต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ผลการค้นพบนี้แตกต่างจากการศึกษาก่อนที่ส่วนใหญ่นำปลายยอดและตาข้างมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง แต่เนื้อเยื่อมักจะไม่มีการเกิดรากและประสบปัญหาเรื่องการเกิดยอดช้าและไม่แตกยอดใหม่



ก ข

ค ง

จ ฉ

ภาพ 4.1 ผลของ BA ต่อการชักนำแคลลัสชิ้นส่วนของก้านผักหวานป่า แคลลัสมีสีเขียวอมเหลือง

ก. สูตรที่ 1 MS

ข. สูตรที่ 2 MS+BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สูตรที่ 3 MS+BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สูตรที่ 4 MS+BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. สูตรที่ 5 MS+BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. สูตรที่ 6 MS+BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเพาะเมล็ดเปรียบเทียบกับการทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ การเพาะเมล็ดมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนผักหวานป่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งได้ต้นผักหวานป่าที่สมบูรณ์และแข็งแรงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของพินิจ กรินท์ธัญญกิจ และคณะ (2539) ได้นำาชิ้นส่วนปลายยอดของต้นอ่อนผักหวานป่าที่เจริญมาจากคัพภะ (Embryo) โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ในระดับ 0.0 0.1 0.5 1.0 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่เจริญมาจากคัพภะสามารถแตกหน่อใหม่ได้ในสูตร อาหารที่เติม BA ในความเข้มข้นตั้งแต่ระดับ 0.0 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ยังได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ปรานอม และคณะ (2539) ที่ทำการทดลองเลี้ยงคัพภะผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อจากผลระยะต่างๆ บนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน ผลปรากฏว่า คัพภะจากผลระยะเขียว อ่อนมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุด 88.07 เปอร์เซ็นต์ และนำยอดผักหวานป่าเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 60 และ 90 วัน พบว่า ยอดผักหวานป่าจากต้นที่เจริญมาจากคัพภะสามารถแตกตาข้างได้บนสูตรอาหารที่เติม BA ระดับ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้สอดคล้องกับมะลิวัลย์และคณะ (2552) ได้ทำาการขยายพันธุ์ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทำาการทดลองเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรที่เติม BA ความ เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำาให้เกิดจำานวนตายอดเพิ่มมากที่สุด โดยเฉลี่ย 7.6 ยอดต่อต้น เช่นเดียวกับงานทดลองของบงกช กรณ์ (2545) ที่ทำาการทดลองเพาะเลี้ยงปลายยอดผักหวานป่าจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดย ตัดปลายยอดผักหวานป่ามาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารทุกสูตรไม่สามารถชักนำาให้ยอดผักหวานป่าที่ทดลองเลี้ยงเกิดรากใหม่

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการลอง

จากการศึกษาปัจจัยของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ จากผลการทดลองจะพบว่า Sodium hypochlorite 15% นาน 8 นาที เหมาะสมต่อการฟอกชิ้นเนื้อเยื่อ เนื่องจากยังมีเนื้อเยื่อมีสีเขียวและมีอัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อของผักหวานสูงที่สุด 60 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจำนวนมาก ในการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อผักหวานป่า โดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม BA ในความเข้มข้นที่ต่างกัน 0.1 mg/l , 0.2 mg/l , 0.3 mg/l , 0.4 mg/l , 0.5 mg/l เพื่อชักนำให้ผักหวานป่าเพิ่มปริมาณแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า MS ที่มีฮอร์โมน BA 0.3 มก./ล. เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของก้านมากที่สุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดคือ 33 เปอร์เซ็นต์ ใน 21 วัน ต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ

นพดล และคณะ 2554 รายงานการตรวจพบสารกลุ่มลิกแนนใน เปลือก ใบ และกิ่งของสารสกัดเมทานอลของผักหวานป่า รวมทั้งนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ S.aureus, B.subtilis, E.coli, พบว่าสารสกัดเปลือก มีค่าการยับยั้ง E.coli ให้ขนาดวงใส 9.00 มิลลิเมตร

Laksana et al.,2013 รายงานสารสกัดเฮกเซนของผักหวานป่าพบสารดังต่อไปนี้ alkaloids, carbohydrates, reducing sugars, flavonoids, sterols and tannins

ดังนั้นการค้นพบวิธีการชักนำแคลลัสของผักหวานป่าจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสารจากเซลล์เพาะเลี้ยงได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2535). คุณค่าทางโภชนาการ. สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2559, จาก http://www.pakwanpa.com/food.html.

โครงการวิจัย KIP 17.36 "การอนุรักษ์และปลูกเลี้ยงผักพื้นบ้าน". (3 พฤศจิกายน 2546). ผักหวานป่า สืบค้นเมื่อ 16 สิงหาคม 2559, จาก http://www.ku.ac.th/e-magazine/november46/agri/plant.html.

ธนภัทร ภคสกุลวงศ์. (21 เมษายน 2551). คนปลูกผักหวานป่า... ผักหวานป่าเลี้ยงคนปลูก ที่เมืองปากน้ำโพ. สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2559, จาก http://www.bloggang.com/viewblog.php?id=hoonvi&date=21-04-2008&group=8&gblog=81.

นพดล สำเภา (2554) ฤทธิ์ทางชีวภาพของลิกแนนที่คัดกรองได้จากไม้ยืนต้นที่กระจายตัวในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา วิทยานิพนธ์ คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

ณัฏฐากร เสมสันทัด บัณฑิต โพธิ์น้อย 2552. ผักหวานป่า กลุ่มงานวนวัฒนวิจัย สำนักวิจัย กมป่าไม้ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์เกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

บงกชกรณ์ อาณานุการ. (2545). การเพาะเลี้ยงผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ. สืบค้นเมื่อ 19 ธันวาคม 2559, จาก http://www.tdc.thailis.or.th/tdc/browsc.php?option=shows browse.

ปรานอม พฤฒพงษ์, ฉลองชัย แบบประเสริฐ, พินิจ กรินท์ธัญญกิจ. (2539). การศึกษาการขยายพันธุ์ผักหวานป่า ด้วยวิธีจุลภาค สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2559, จาก http://www.tdc.thailis.or.th/tdc/browsc.php?option=shows browse.

มนตรี แก้วดวง. (2550). ชาผักหวานป่า. ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2559, จาก http://www.snc.lib.su.ac.th/serindex/dublin.php?ID=13399509124.

ศิริวิมล พรมมี. (2553). การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาชิ้นเนื้อเยื่อของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ วท.บ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก. สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2559, จาก http://eds.a.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=2&sid=9c81fbae-fccf-451e-9509-82f09dd4275e%40sessionmgr4007&hid=4203&bdata=JnNpdGU9ZWRzLWxpdmU%3d#AN=nare.b297317&db=cat00995a

สุเมธ ตรีศักดิ์ศร. (2557). ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BAต่อการเพาะเลี้ยง แคลลัสกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิ๋ว. แก่นเกษตร สืบค้นเมื่อ 19 ธันวาคม 2559, จาก http://ag2.kku.ac.th/kaj/PDF.cfm?filename=O_003.pdf&id=1616&keeptrack=3.

Laksana Charoenchai1, Sukunya Settharaksa, Thanapat Songsak, Nijsiri Ruangrungsi and Krisana Kraisintu, 2013, PHYTOCHEMICAL SCREENING TESTS OF MELIENTHA SUAVIS PIERRE AND UROBOTYRA SIAMENSIS HIEPKO EXTRACTS, Bulletin of Health, Science and Technology Vol11(2).

Pierik, R.L.M.. (1989). *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2559, จาก https://books.google.co.th/books?hl=th&lr=&id=eUWe9894KzwC&oi=fnd&pg=PA1&ots=cbGSDkGh8M&sig=JmgveMpiRnxP-vzJYQd2YE9cCDM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.

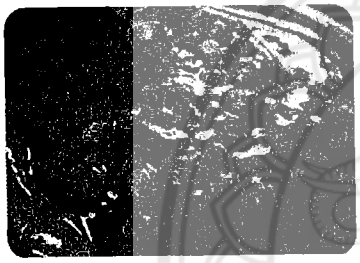
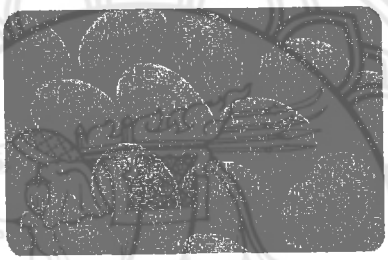
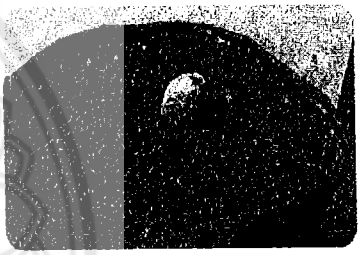
Preecha Prathepha, 2000. Detection of RAPD variation in a Forest Tree Species, *Meliantha suavis* Pierre (Opilliaceae)from Thailand. Science Asia 26:213-218.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

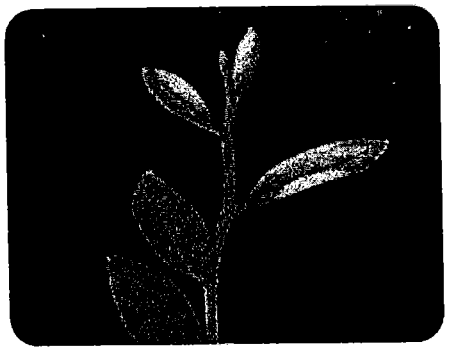
ขั้นตอนการเตรียมเพาะเมล็ด

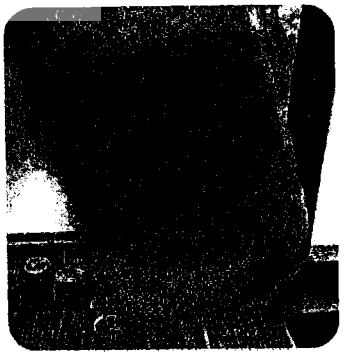
1. นำเมล็ดผักหวานป่ามาแช่น้ำ 1 คืนก่อนนำไปปลูก
2. นำเมล็ดที่แช่น้ำ 1 คืน มาขัดในตะกร้าที่ใส่น้ำเล็กน้อย ขัดเอาเปลือกที่เมล็ดออกหมด
3. นำไปวางในถุงดำ ให้เมล็ดโผล่ขึ้นมาครึ่งเมล็ด
4. จดบันทึกวันที่ปลูก (26 พฤษภาคม 2559)
5. รดน้ำดูแลสังเกตการณ์เจริญเติบโต

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ

1. เลือกยอดอ่อนผักหวานป่า
2. ทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน 1 หยด ผ่านน้ำเป็นเวลา 5 นาที เพื่อขจัดคราบฝุ่นละออง หรือเศษซากพืชของแมลงที่ติดอยู่กับส่วนส่วนของผักหวานป่า
3. นำไปแช่ด้วย Sodium hypochlorite 10% ,15% และ15%, 20% เป็นเวลา 8 นาที





ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

1. ใส่Stock 1-7 และ BA ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วใส่น้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
2. นำไปวางบนเครื่องคนสาร (magnetic stirrer) ใส่ MYO – Inositol คนให้เข้ากันแล้วใส่น้ำตาลลงไป
3. เมื่อสารละลายแล้วนำไปปรับค่า pH = 5.6 โดยเครื่อง pH mater
4. เมื่อได้ค่า pH ที่ต้องการแล้วนำไปปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (Volumetic flask) ให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วใส่กลับลงไปในบีกเกอร์
5. เทผงวุ้น คนให้เข้ากัน นำถุงพลาสติกคลุมปากบีกเกอร์แล้วใช้หนังยางรัด
6. นำไปเข้าเครื่องไมโครเวฟ เป็นเวลา 3 นาทีแล้วนำออกมาคนให้ผงวุ้นใสและนำกลับเข้าเครื่องจนกว่าจะเดือด
7. เมื่อคนจนใส เทใส่ขวดขนาด 2 ออนส์ แล้วปิดฝาให้สนิท นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121°C