



รูปแบบการเจริญและการผลิตสารพฤษเคมีจากการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ
ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.)

Developmental Pattern and Phytochemical Production from Hypocotyl
Culture of Soursop (*Annona muricata* L.)

อภิญญา บุญคุ้ม
Apinya Boonkhum

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Botany
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



รูปแบบการเจริญและการผลิตสารพฤกษเคมีจากการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ
ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.)

Developmental Pattern and Phytochemical Production from Hypocotyl
Culture of Soursop (*Annona muricata* L.)

อภิญญา บุญคุ้ม

Apinya Boonkhum

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Botany

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ รูปแบบการเจริญและการผลิตสารพิษจากเชื้อเหี้ยงลำต้น
 ใต้ใบเลี้ยงของทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.)

ผู้เขียน นางสาวอภิญญา บุญคุ้ม

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)

.....ประธานกรรมการ
 (ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ญัฐธยาน์ ฟาน เหม)

.....กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
 ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

.....
 (ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้างู๋สง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นางสาวอภิญญา บุญคุ้ม)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวอภิญญา บุญคุ้ม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	รูปแบบการเจริญและการผลิตสารพิษเคมีจากการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบ เลี้ยงของทุเรียนเทศ (<i>Annona muricata</i> L.)
ผู้เขียน	นางสาวอภิญญา บุญคุ้ม
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.) เป็นพืชในวงศ์ Annonaceae มีสารพิษเคมีที่สำคัญ เช่น สารกลุ่มแอนโนเนเซียส อะซิโตเจนิน (Annonaceous acetogenins, ACGs) ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง จึงเป็นพืชที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัย ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานในหลอดทดลองรวมถึงตรวจสอบสารอะซิโตเจนิน ไขมัน และผลิตภัณฑ์คลอโรฟีลล์ โดยนำชิ้นส่วนบางตัดตามขวางลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของทุเรียนเทศในหลอดทดลองอายุ 5 สัปดาห์ วางเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มก./ล.) ร่วมกับ 6-benzyl adenine (BA) (ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล.) และอาหารสูตร MS ที่มี Indole-3-butyric acid (IBA) (ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มก./ล.) ร่วมกับ BA (ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล.) พบว่า อาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสมากที่สุด เนื่องจากให้แคลลัสที่มีสีเขียวอ่อนและเกาะกันหลวม ขณะที่อาหารสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว ให้เปอร์เซ็นต์การชักนำยอดสูงสุด (60.00 ± 17.72) เมื่อนำส่วนยอดที่ได้ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มี IBA 1 มก./ล. เป็นเวลา 32 สัปดาห์ พบว่าส่วนยอดที่ได้มีการพัฒนาของรากและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากการตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินด้วย เคดด์ รีเอเจนต์ (Kedd's reagent) พบสารดังกล่าวในโครงสร้าง Subspherical idioblast ในใบจากธรรมชาติ ทุกตำแหน่งของใบ (1, 3 และ 8) และในใบที่ได้จากการชักนำยอดในหลอดทดลอง แต่ไม่พบในแคลลัส นอกจากนี้พบการสะสมไขมันในใบจากธรรมชาติ ใบที่ได้จากการชักนำยอดและในแคลลัส สำหรับผลิตภัณฑ์คลอโรฟีลล์พบเฉพาะในใบธรรมชาติ แต่ไม่พบในใบที่ได้จากการชักนำยอดและในแคลลัส

Thesis Title	Developmental Pattern and Phytochemical Production from Hypocotyl Culture of Soursop (<i>Annona muricata</i> L.)
Author	Ms. Apinya Boonkhum
Major Program	Botany
Academic Year	2018

ABSTRACT

Soursop (*Annona muricata* L.) which belongs to the Annonaceae family has some important phytochemical substances, especially annonaceous acetogenins (ACGs) with anti-tumor activity. Therefore, this plant has received attention for many researchers. Plant growth regulators affecting *in vitro* morphogenesis, detection of ACGs and fats, and the presence of calcium oxalate crystals were examined. The transverse thin cell layer (tTCL) explants excised from hypocotyls of *in vitro* germinated seedlings were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (0, 2 and 4 mg/L) in combination with 6-benzyladenine (BA) (0, 1, 2, 3 and 4 mg/L) and indole-3-butyric acid (IBA) (0, 0.5 and 1 mg/L) in combination with 6-benzyladenine (BA) (0, 1, 2, 3 and 4 mg/L). The results showed that MS medium containing 0.5 mg/L IBA and 3 mg/L BA was the most suitable medium for induction of light green friable callus. The MS medium supplemented with 1 mg /L IBA alone gave the highest percentage of shoot formation (60.00±17.72). The shoots were rooted and grew well after culture on MS medium supplemented with 1 mg/L IBA for 32 weeks. The ACGs detected by Kedd's reagent were found in the subspherical idioblasts appearing at all position of the 1st, 3rd and 8th leaves from both nature and *in vitro* induced shoots. Unfortunately, ACGs were absent in callus. Fat body accumulation was observed in callus from natural leaves and leaves of *in vitro* induced shoots. However, calcium oxalate crystals were found only in the natural leaves.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง รวมทั้งตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน รวมทั้งเป็นที่ปรึกษาและให้แนวทางในการใช้ชีวิต ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัล สิริตวงค์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา เดชอดิษฐ์ กรรมการสอบ โครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ช่วยให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขโครงร่างให้สมบูรณ์ขึ้น รวมทั้งต้องขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ญัฐธยาน์ ฟาน เบม ที่เสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบ และตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ คุณละม้าย ทองบุญ ในการช่วยแนะนำ และสอนเทคนิคต่างๆ ในการเตรียมตัวอย่าง และการศึกษาเนื้อเยื่อพืช รวมทั้งขอขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพทางพืชทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ เป็นที่ปรึกษา และให้คำแนะนำที่ดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะผู้บริหารโรงเรียน มอ.วิทยานุสรณ์ ในการสนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา ขอขอบพระคุณ บิดามารดา และครอบครัว ซึ่งให้การเลี้ยงดู สั่งสอน อบรม และเป็นผู้ให้โอกาสในการศึกษาเล่าเรียนกับข้าพเจ้าตั้งแต่อติตจนถึงปัจจุบัน ข้าพเจ้าต้องขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาส นี้ด้วย

อภิญญา บุญคุ้ม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการตารางภาคผนวก	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	3
1.3 วัตถุประสงค์	8
2. วิธีการวิจัย	9
3. ผลการศึกษา	16
4. บทวิจารณ์	34
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	49
ประวัติผู้เขียน	64

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชุดการทดลองการชักนำแคลลัสและยอด ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ร่วมกับ BA ในอาหารวุ้นสูตร MS	11
2	ชุดการทดลองการชักนำแคลลัสและยอด ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ร่วมกับ BA ในอาหารวุ้นสูตร MS	12
3	การตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินและการสะสมไขมันในชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของทุเรียนเทศ	15
4	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 -D ร่วมกับ BA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์	19
5	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 -D ร่วมกับ BA เป็นเวลา 5 สัปดาห์	20
6	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์	24
7	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดรวมของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BA เป็นเวลา 5 สัปดาห์	25
8	การตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินและการสะสมไขมันในชิ้นส่วนของทุเรียนเทศ	30

รายการตารางภาคผนวก

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบสูตรอาหาร MS (Murashing and Skoog, 1962) ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	50
2	สูตรน้ำยา Tertiary butyl alcohol ดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ลำดับ	51

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของทุเรียนเทศ	4
2	โครงสร้างสาร Annonacin	6
3	ตำแหน่งในการตัดของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยง	10
4	ตำแหน่งใบที่ได้จากการชักนำยอดอายุ 8 เดือน	13
5	การพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 2, 4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	17
6	การชักนำแคลลัสและยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ	18
7	การพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 2 สัปดาห์	22
8	การชักนำแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.	23
9	การเจริญของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. ระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในสภาวะมีแสงสว่าง	26
10	การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.	27
11	การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์	28
12	การเกิดยอดจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงผ่านทาง direct organogenesis เมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เป็นเวลา 5 สัปดาห์	28
13	เอนโดสเปิร์มของทุเรียนเทศ ที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็น ที่ความหนา 25 ไมโครเมตร ใช้เป็นชุดควบคุมการตรวจสอบสารสะสมในเซลล์	31
14	การตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินในใบ โดยใช้ เคตต์ รีเอเจนท์	31
15	การตรวจสอบไขมันในใบ โดยใช้ ออย เรด โอ จากใบตำแหน่งต่างๆบนลำต้น	32
16	การตรวจสอบไขมันในใบ โดยใช้ ซูดาน IV จากใบตำแหน่งต่างๆบนลำต้น	32
17	การตรวจสอบไขมันในแคลลัสพบไขมันกระจายอยู่ภายในเนื้อเยื่อแคลลัส	33
18	โครงสร้างตัดตามขวางของใบทุเรียนเทศ	33

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ACGs	=	Annonaceous acetogenins
BA	=	6-Benzyladenine
C	=	Callus
EX	=	Explant
GA ₃	=	Gibberellic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
MS	=	Murashige and Skoog
SAM	=	Shoot apical meristem
tTCL	=	transverse Thin Cell Layer
2, 4-D	=	2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Annonaceae เป็นพืชกึ่งเขตร้อนและเขตร้อน มีการกระจายในบริเวณเขตร้อนของเอเชีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ (Badrie and Schauss, 2010) โดยในประเทศไทยมีการปลูกในบริเวณภาคเหนือและภาคใต้ แต่มีปริมาณการปลูกไม่มากนัก (วีระชัย, 2541) การใช้ประโยชน์ของทุเรียนเทศ จะใช้ผลในการรับประทานสุก และนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลายรูปแบบ เช่น น้ำเชื่อม ลูกอม ไอศกรีม และเครื่องดื่ม อีกทั้งทุเรียนเทศยังถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาอาการตามแบบแพทย์พื้นบ้าน โดยมีการใช้อย่างแพร่หลายในแอฟริกาและอเมริกา ทุเรียนเทศสามารถใช้ในการรักษาอาการเจ็บป่วย เช่น ปวดศีรษะ ลดไข้ ผื่นคัน ถ่ายพยาธิ นอนไม่หลับ ท้องเสีย เพิ่มน้ำนมมารดาหลังคลอดบุตร เบาหวาน มาลาเรีย ภาวะแพ้ะปัสสาวะอักเสบ และมะเร็ง เป็นต้น (Moghadamtousi et al., 2015) ดังนั้นจึงเป็นพืชที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยและผู้สนใจด้านสมุนไพรเป็นอย่างมาก รวมทั้งยังเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่สำคัญในงานทางด้านเภสัชกรรมและการแพทย์

สารพฤกษเคมีที่สำคัญได้แก่ ไซโคลเฮกซะเปปไทด์ (Cyclo hexapeptide) แอนโนเนเซียส อะซิโตเจนิน (Annonaceous acetogenin) สเตอรอยด์ (Steroids) อัลคาลอยด์ (Alkaloid) ซาโปนิน (Saponnin) แทนนิน (Tannin) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycoside) และแอนทราควิโนน (Anthraquinone) (Gajalakshmi et al., 2012; Dayeef et al., 2013) สำหรับทางเภสัชวิทยา สารกลุ่มแอนโนเนเซียส อะซิโตเจนิน มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการต้านเชื้อปรสิต (Gajalakshmi et al., 2012) โดยสารกลุ่มนี้พบในทุเรียนเทศและพืชอีกหลายชนิดในวงศ์ Annonaceae เช่น *A. squamosa*, *Asimina triloba*, *Goniothalamus giganteus* และ *Rollinia mucosa* เป็นต้น (McLaughlin, 2008) ซึ่งสารแอนโนเนเซียสอะซิโตเจนิน ในสารสกัดของทุเรียนเทศในชั้นเอทานอลสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของมะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer) ได้ดีกว่าสารฟลาโวนอยด์ (Yang et al., 2015) และจากการศึกษาของ Chen และคณะ (2012) ซึ่งศึกษาสารกลุ่มแอนโนเนเซียสอะซิโตเจนิน ชนิด 12, 15 ซิส สควิมอสแตติน เอ (12, 15-cis-squimostatin-A) และบูลลาเทซิน (Bullatacin) โดยสารดังกล่าวแสดงค่ากิจกรรมการยับยั้งมะเร็งชนิด MCF-7 และ HepG 2 ได้สูง ดังนั้นสารกลุ่ม

ดังกล่าวจึงเป็นสารกลุ่มสำคัญที่วงการแพทย์และเภสัชวิทยา ให้ความสนใจถึงโทษและประโยชน์ ในการยับยั้งและชะลอเซลล์มะเร็ง ซึ่งปัจจุบันได้ผลดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดในสัตว์ทดลอง และในหลอดทดลอง แต่ยังไม่มีการวิจัยในระดับการศึกษาในคน เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีความเป็นพิษสูง ต่อสมองและไต (นพมาศ และคณะ, 2558) แต่ยังคงมีการพัฒนาสารกลุ่มดังกล่าวเพื่อใช้ในมนุษย์ด้วย สารสำคัญดังกล่าวมักจะพบสะสมอยู่ในส่วนต่างๆของพืชแตกต่างกัน เช่น ใบ ลำต้น เปลือก หรือเมล็ด (Mulia et al., 2013) นอกจากนั้นอายุและชนิดของเนื้อเยื่อที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการสร้างและการสะสม ของสารที่แตกต่างกันไป จากการศึกษาทางกายวิภาคและฮิสโตเคมีในเอนโดสเปิร์มของ *A. macrophyllata* พบสารกลุ่มอะซิโตเจนิน ในโครงสร้างเซลล์ที่มีการเก็บสะสมผลึก (Idioblasts) (Laguna-Hernandez et al., 2017) จากการศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคของใบ *A. muricata* พบมีผลึกแคลเซียมออกซาลेटในใบ ก้านใบ ลำต้น ช่อ และดอก (Pelden, 2016) ซึ่งการสะสมผลึก แคลเซียมออกซาลेट เป็นกลไกควบคุมระดับแคลเซียมในเนื้อเยื่อและอวัยวะพืชให้อยู่ในสถานะสมดุล รวมทั้งการเก็บสะสมผลึกในพืช ยังเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันจากการกัดกินของศัตรูพืชอีกด้วย (Franceschi, 2001) อย่างไรก็ตามการบริโภคผักใบที่มีออกซาลेटสูง สามารถทำให้เกิดนิ่วในไต โดยเฉพาะนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลेट ซึ่งมีการรายงานว่านิ่วชนิดนี้พบมากที่สุดในประเทศไทย (พัชรินทร์, 2554; นัทรมน, 2560) ดังนั้นการบริโภคทุเรียนเทศ นอกจากจะคำนึงสรรพคุณในการ รักษาโรคแล้ว ยังต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงอื่นๆด้วย

การศึกษาการขยายพันธุ์ทุเรียนเทศ หรือพืชในสกุล *Annona* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการใช้ส่วนต่างๆมาศึกษา เช่น เอนโดสเปิร์ม ลำต้นเหนือใบเลี้ยง (Epicotyl) ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) อับเรณู (Anther) กลีบดอก ผล ใบ ก้านใบ ช่อ และปล้อง (Rasai et al., 1995; Lemos and Baker, 1996; Wang et al., 2002; Padilla and Encina, 2004; Santana et al., 2011) สูตรอาหารที่นิยมใช้มีด้วยกันหลายสูตร เช่น Murashige and Skoog (MS) White's medium (W) Gamborg medium (B5) และ Nitsch medium (N) Woody plant medium (Bejoy and Hariharan, 1992; Freitas et al., 2016) โดยเป็นการศึกษาเพื่อชักนำยอด ชักนำราก ชักนำแคลลัสและเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์ โดย Freitas และคณะ (2016) ศึกษาการชักนำยอด จากส่วนช่อของ *A. emarginata* ในอาหารสูตร WPM ที่มี 6-benzyl adenine (BA) 1 ไมโครโมลลาร์ รวมทั้งการใช้ชิ้นส่วนฐานใบของ *A. muricata* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 6-Benzylaminopurine (BAP) 1.5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 2.0 มก./ล. สามารถชักนำแคลลัสได้ดี และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็น proembryo รวมทั้งการชักนำยอด โดยใช้ส่วนของช่อ สามารถชักนำได้ดีเมื่อ เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1.0 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และ IBA 1.5 มก./ล. (Abubacker and Deepalaskshmi, 2017) นอกจากนั้น

ยังมีการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารพฤษเคมีบางกลุ่มที่สำคัญ เช่น สารเอนโนนเซียสอะซิโตเจนิน เป็นต้น โดย Wang และคณะ (2002) ศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัส *A. squamosa* ในอาหารสูตร Gamborg ที่มี 1-Naphthyl acetic acid (NAA) 5.0 มก./ล. ร่วมกับ ซีเอติน (Zeatin) 4.0 มก./ล. ตรวจพบสาร squamocin 67.8 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง (กรัม)

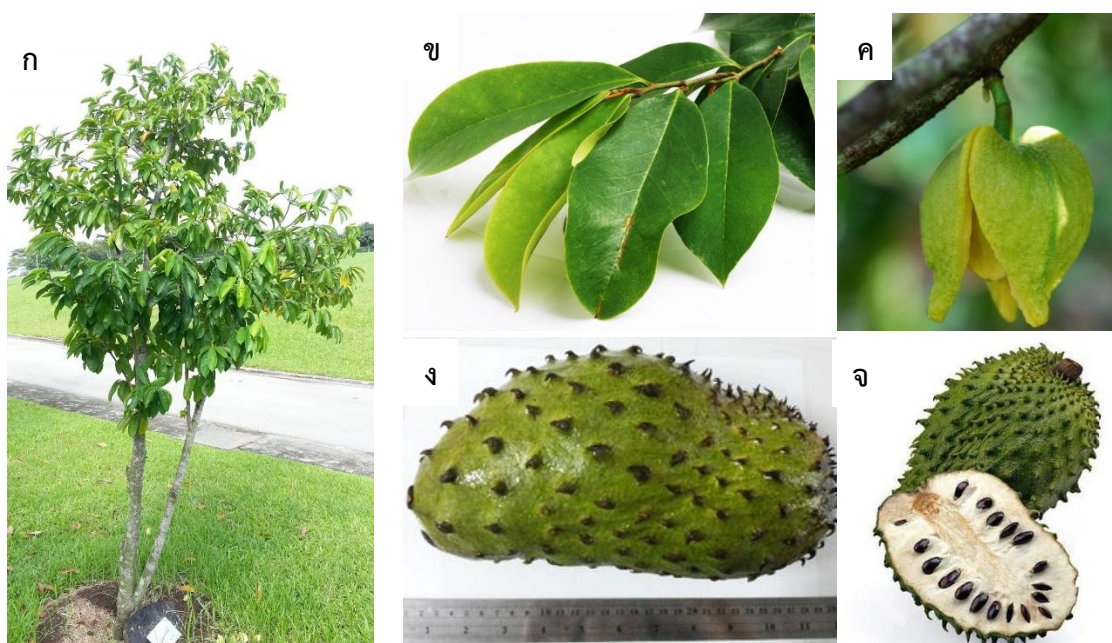
จากความสำคัญดังกล่าว จึงมีผู้สนใจขยายพันธุ์ทุเรียนเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณพืชได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และคงลักษณะทางพันธุกรรมเดิมไว้ (วรรัตน์, 2549) ทดแทนวิธีการดั้งเดิม นั่นคือการเพาะเมล็ด ซึ่งเจริญเติบโตช้า โดยให้ดอกเมื่อต้นอายุ 3 ปีขึ้นไป (อายุทธ์ และคณะ, 2550) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการชักนำแคลลัสและชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของทุเรียนเทศ รวมทั้งเปรียบเทียบการสร้างสารกลุ่มอะซิโตเจนินและผลิตภัณฑ์ออกซาเลตจากใบที่ได้จากการชักนำในหลอดทดลองและจากธรรมชาติ และแคลลัส ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้นอกจากจะเพิ่มองค์ความรู้ทางด้านกายวิภาคและการเจริญแล้ว ยังเป็นแนวทางในการผลิตสารสำคัญโดยปราศจากผลข้างเคียงของผลิตภัณฑ์ที่พบต่อไป

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 ลักษณะทั่วไปของทุเรียนเทศ (Soursop)

ทุเรียนเทศ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Annona muricata* L. มีชื่อสามัญ Soursop, Graviola, Guanabana, Durian belanda, Paw paw อยู่ในวงศ์ Annonaceae มีเขตการกระจายพันธุ์ในบริเวณ เขตร้อน (Tropic) บริเวณกึ่งเขตร้อน (Subtropic) ตะวันตกของอินเดีย อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ บริเวณลุ่มต่ำของแอฟริกาและอเมริกาใต้ หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยประเทศที่ปลูกและมีผลผลิตส่งออกมากได้แก่ ประเทศบราซิล แม็กซิโก เวเนซุเอลา (Badrie and Schauss, 2010; Moghadamtousi et al., 2015; Pinto et al., 2005) ในประเทศไทยปลูกทางภาคใต้ และภาคเหนือ แต่มีปริมาณไม่มาก ออกดอกเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน ติดผลเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม ลักษณะเป็นไม้ยืนต้น ไม่ผลัดใบ สูงประมาณ 4-10 เมตร (ภาพที่ 1 ก) ลำต้นกลม ผิวขรุขระ สีน้ำตาลเข้ม กิ่งอ่อนจะมีขนสีน้ำตาลแดง ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับกัน รูปไข่กลับ ปลายใบเป็นติ่งแหลม โคนใบมน ขอบใบเรียบ ด้านบนของใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างสีอ่อนกว่า กว้าง 4.3-7 ซม. ยาว 5-15 ซม. ก้านใบสั้น (ภาพที่ 1 ข) ดอก เป็นดอกเดี่ยว ออกจากลำต้นหรือกลางกิ่ง สีเหลือง กลิ่นหอมแรง กลีบเลี้ยง 3 กลีบ รูปหัวใจ กลีบดอกอวบหนา มี 6 กลีบ แบ่งเป็น 2

ชั้น กว้าง 2 ซม. ยาว 2-3 ซม. (ภาพที่ 1 ค) เกสรตัวผู้และรังไข่ มีเป็นจำนวนมาก ดอกบานในช่วงเช้า ผล เป็นผลกลุ่มมีเนื้อ รูปกลมป้อมแกมรูปไข่ โคนกว้างกว่าส่วนปลาย เปลือกหนาเหนียว มีหนามโค้งสั้นๆ โดยรอบ ผลยาว 12-20 ซม. สีเขียวเข้ม เมื่อสุกสีจะเป็นสีเขียวอ่อนถึงเหลือง ผลมีน้ำหนักประมาณ 4 – 10 กิโลกรัม (ภาพที่ 1 ง) เนื้อผลสีขาว เนื้อนุ่ม มีรสชาติผสมระหว่างสับปะรดและมะม่วง โดยผลสดประกอบไปด้วย น้ำ 80% โปรตีน 1% คาร์โบไฮเดรต 18% วิตามินบี บี 2 ซี โฟแทสเซียม และไฟเบอร์ เมล็ดสีน้ำตาลเข้ม ความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร หนัก 0.33-0.59 กรัม มีประมาณ 127-170 เมล็ด กระจายทั่วเนื้อผล (ภาพที่ 1 จ) (วีระชัย, 2558 ; Pinto et al., 2005)



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของทุเรียนเทศ (ก) ต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) ผล และ (จ) เนื้อผลและเมล็ด

ที่มา: ภาพที่ 1 ก <http://riverineparks.blogspot.com/2013/01/soursop-annona-muricata.html>

ภาพที่ 1 ข และ จ <https://fancynewme.com/soursop-heals-fibromyalgia>

ภาพที่ 1 ค [https://en.wikipedia.org/wiki/Soursop#/media/File:](https://en.wikipedia.org/wiki/Soursop#/media/File:Annona_muricata_fleur2.jpg)

[Annona_muricata_fleur2. jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Soursop#/media/File:Annona_muricata_fleur2.jpg)

ภาพที่ 1 ง ถ่ายภาพโดย อภิญญา บุญคุ้ม

1.2.2 การนำมาใช้ประโยชน์

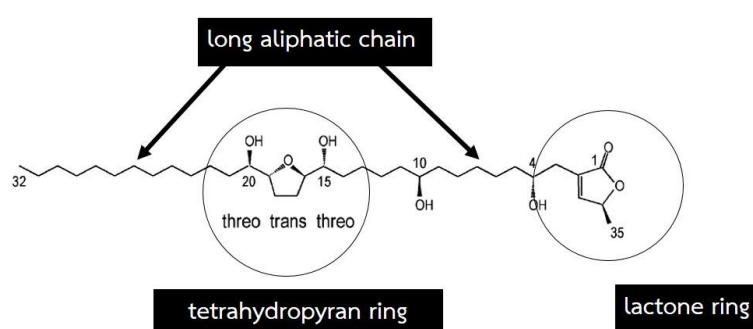
ทุเรียนเทศ มีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในหลายพื้นที่ทั่วโลก โดยสรรพคุณคือ ส่วนผล ใช้บรรเทาและรักษาโรคข้ออักเสบ โรคปวดเส้นประสาท ลดไข้ โรคบิด ผื่นผิวหนัง ถ่ายพยาธิ และเพิ่มน้ำนมให้กับมารดาที่เพิ่งคลอดบุตร ช่วยบรรเทาอาการท้องเสีย ผลสุกใช้รับประทานได้ สามารถนำมาแปรรูปเป็นเครื่องดื่ม ไอศกรีม ลูกอม และน้ำเชื่อม ใบ ใช้รักษา อาการกระเพาะปัสสาวะอักเสบ เบาหวาน ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ อาการผื่นคัน กลากเกลื้อน และสามารถนำมาพอกบรรเทาอาการไขข้ออักเสบ รวมทั้งการนำใบมาียดในหมอนช่วยให้หลับสนิทขึ้น เมล็ดนำมาบด ช่วยถ่ายพยาธิ และเมื่อนำมาผสมน้ำและสบู่ ฉีดพ่น สามารถป้องกันตัวอ่อนแมลงได้ นอกจากนี้ยังมีการนำทุเรียนเทศมาใช้ ลดอาการเกร็งกล้ามเนื้อ และสามารถใช้ในการกำจัดตัวเรือด (Bed bug) เหา (Head lice) รักษาภาวะความดันโลหิตต่ำ น้ำตาลในเลือดต่ำ รวมทั้งพบว่า มีสรรพคุณในการรักษาโรคมะเร็งได้ ซึ่งเป็นโรคที่นักวิจัยทางการแพทย์และนักพฤกษเคมีให้ความสนใจ (George and Pamplona, 1999 อ้างใน Solomon-Wisdom, 2014; Moghadamtousi et al., 2015; Pinto et al., 2005)

1.2.3 การศึกษาสารพฤกษเคมี

สารพฤกษเคมีในส่วนต่างๆ ของทุเรียนเทศ ได้แก่ ใบ ราก เปลือกลำต้น ผล และเมล็ด พบสาร อะซีโตเจนิน อัลคาลอยด์ เทอร์ปีน ฟลาโวนอยด์ ไชมัน โดยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้แก่ สารกลุ่ม อะซีโตเจนิน (Bejamin and Stone, 2003; Pinto et al., 2005) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดไขมัน มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสภาพของระดับ ATP โดยการยับยั้งการทำงานของ complex I (Ubiquinone oxidoreductase) ในไมโทคอนเดรีย รวมทั้งยับยั้ง NADH oxidase ของเยื่อหุ้มเซลล์ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งขัดขวางการเคลื่อนที่ของ ATP ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Alali et al., 1999)

สารกลุ่มอะซีโตเจนินลักษณะเป็นแว็กซ์ สีขาว โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงแกมมาแลคโตนต่ออยู่ที่ปลายโซ่ไฮโดรคาร์บอน มีหมู่ไฮดรอกซิล อะซีทอกซิล คีโตน อีพอกไซด์ วงเตตระไฮโดรฟูแรน และวงเตตระไฮโดรไพแรน รวมทั้งพันธะคู่และพันธะสามเกาะอยู่ภายในโซ่ (Yang et al., 2010; Mulia et al., 2013; Phonkerd, 2014; Laguna-Hernandez et al., 2017) มีโครงสร้างเป็น long chain fatty acid ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และที่สำคัญมี chiral center ที่มีคาร์บอนอะตอมหลายตำแหน่ง ตัวอย่างเช่น สาร Annonacin (ภาพที่ 2) มี chiral center 7 ตำแหน่ง คือ คาร์บอนที่ 4, 10, 15, 16, 19, 20 และ 34 ซึ่งเป็นการยากที่จะสังเคราะห์สารให้เหมือน

จากธรรมชาติ (นพมาศ, 2558) สำหรับการทดสอบทางฮีสโตเคมี ใช้เคดด์ รีเอเจนต์ (Kedd's reagent) ในการทดสอบ โดยจะเกิดปฏิกิริยากับวงแกมมาแลคโตนที่อยู่ปลายโซ่ไฮโดรคาร์บอน ให้สีชมพู หรือม่วงแดง ซึ่งพบในสารกลุ่มอะซีโตเจนินทุกชนิด (Mulia, 2013; Laguna-Hernandez et al., 2015; Laguna-Hernandez et al., 2017)



ภาพที่ 2 โครงสร้างสาร Annonacin

ที่มา: Champy และคณะ (2004)

Solomon-Wisdom และคณะ (2014) ได้ศึกษาสารพิษจากพืชและการต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบทุเรียนเทศ พบว่าสารสกัดในชั้นน้ำและเมทานอล มีสารกลุ่ม สเตอรอยด์ อัลคาลอยด์ ซาโปนิน เทนิน ฟลาโวนอยด์ คาตีเอคไกลโคไซด์ และแอนทราควิโนน และสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* โดยสารสกัดในชั้นเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อได้ในทุกความเข้มข้น โดยสารที่พบได้แก่ ไซโคลเฮกซะเปปไทด์ แอนโนเนเซียสอะซีโตเจนิน

สำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารกลุ่มอะซีโตเจนิน ได้แก่ การต้านมะเร็ง ความเป็นพิษต่อเซลล์ การต้านเชื้อปรสิต (Gajalakshmi, et al., 2012) และเมื่อศึกษาสารพิษเคมีจากเมล็ดในผลสุก พบสาร แอนโนเนเซียสอะซีโตเจนิน แอนโนเนซิน ไอโซแอนโนเนซิน (Isoannonacin) ไอโซแอนโนเนซิน-10-วัน (Isoannonacin-10-one) โจนีโอทาลามิซิน (Goniothalamycin) ไจเจนติโทรซิน (Gigantetrocin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A-549 (A-549 lung carcinoma) มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (MCF-7 breast carcinoma) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HT-29 (HT-29 colon adenocarcinoma) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งในมนุษย์ (Badrie and Schauss, 2010) สารสกัดจากใบพบสารกลุ่มอะซีโตเจนิน ได้แก่ มูริโคเรียซิน (Muricoreacin) และ มูริเฮกโซซิน (Murihexocin) ซึ่งส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง รวมทั้งมะเร็งตับอ่อนชนิด PACA-2 (PACA-2

pancreatic carcinoma) และมะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 (PC-3 prostate adenocarcinoma cell) (Kim et al., 1998)

Chen และคณะ (2012) ศึกษาสารพฤกษเคมีและเภสัชวิทยา ของเมล็ดน้อยหน่า โดยพบสารประกอบหลัก 2 ชนิด ของแอนโนเนเซียสอะซิโตเจนิน ได้แก่ 12, 15 ซิส สควมอสแตติน เอ 12 และ บูลลาเทซิน โดยใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ สารดังกล่าวแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 และ HepG 2 ได้ดี รวมทั้งการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากใบทุเรียนเทศโดยใช้เอทานอล ซึ่งพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไอโซควิโนลิน อัลคาลอยด์ และแอนโนเนเซียสอะซิโตเจนิน โดยการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบสารสกัดที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูง (Flavonoid enrich fraction) สารสกัดที่มีปริมาณอะซิโตเจนินสูง (Acetogenin enrich fraction) และสารสกัดจากใบทุเรียนเทศ พบว่า สารสกัดที่มีอะซิโตเจนินสูง สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของมะเร็งต่อมลูกหมากในหนูทดลองได้ดีกว่าสารสกัดที่มีฟลาโวนอยด์สูง ส่วนสารสกัดที่มีอะซิโตเจนินสูง มีความเป็นพิษทำให้หนูทดลองตาย (Yang et al., 2015)

1.2.4 การศึกษาด้านการขยายพันธุ์

1.2.4.1 การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์ทุเรียนเทศโดยทั่วไป จะใช้วิธีการเพาะเมล็ดโดยเมล็ดจะงอกภายใน 7 วัน แต่ต้นกล้าที่ได้โดยวิธีนี้จะโตช้า และออกดอกเมื่ออายุไม่ต่ำกว่า 3 ปี ดังนั้นจึงนิยมขยายพันธุ์โดยการเสียบยอดและทาบกิ่ง (อูยर्थ และคณะ, 2550)

1.2.4.2 การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารสำหรับการชักนำขึ้นส่วนของพืชวงศ์ Annonaceae ในการเกิดยอดนิยมใช้สูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) สูตรอาหาร woody plant medium (WPM) Nitsch and Nitsch (1969) (NN-69) White's medium (W) Gamborg medium (B5) และ Schenk and Hilderbrandt (SH) (วรรัตน์, 2549) Jordan และคณะ (1991) ได้นำบริเวณข้อซึ่งห่างจากปลายยอดลงมา 10 เซนติเมตร ของต้นเชอริโมย่า (*A. cherimoya*) สายพันธุ์ Concha Lisa มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Nitsch medium โดยใช้ BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. พบว่า 50% เจริญเป็นต้นอ่อน และ 40% เจริญเป็นยอด Nagori และ Purohit (2004) ได้ชักนำตายอดใหม่

ของน้อยหน้า โดยใช้ส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงใกล้กับส่วนราก ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในซอริท (Soilrite) เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จึงเปลี่ยนมาให้แสง เมื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงยาว 7 ซม. แบ่งเป็นช่วงละ 1 ซม. (H) นับจากใบเลี้ยงลงมา (H₁ - H₅ โดย H₅ อยู่ใกล้ราก) ฟอกฆ่าเชื้อ ด้วย 0.1% HgCl₂ 5 นาที เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญ BAP 5.0 มก./ล. เป็นเวลา 10 วัน พบว่าตำแหน่ง H₄ ให้การตอบสนองดีและสามารถผลิตตายอด ได้สูงสุด 23 ยอดต่อชิ้นส่วน และเมื่อผสมระหว่าง BAP และไคเนติน ให้จำนวนยอด 17 ยอดต่อชิ้นส่วน โดยความเข้มข้นของ BAP และไคเนติน ที่มากจะส่งผลให้จำนวนยอดยิ่งลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ไซโตคินิน ไม่ทำให้เกิดแคลลัส ยกเว้น Thidiazuron (TDZ) ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดแคลลัสจำนวนมาก แต่ไม่ทำให้เกิดยอด Krishna และคณะ (2011) ได้ใช้ชิ้นส่วนข้อของ *A. muricata* เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ผสม BAP 2.5 มก./ล. ส่งผลให้เกิดยอดรวม (multiple shoot) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ โดยให้จำนวนยอดประมาณ 6-8 ยอด Inwanna และคณะ (2014) ศึกษาการชักนำยอดและแคลลัสใน *A. muricata* โดยใช้ส่วนของยอดและก้านใบที่ได้จากการเพาะเมล็ดในขุยมะพร้าวและแกลบ เป็นเวลา 90 วัน นำชิ้นส่วนมาล้างน้ำประปา ฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ HgCl₂ 10% และ tween 20 เป็นเวลา 10 นาที และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 2% ผงวุ้น 0.8% และมี BAP 0.2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 86% ขณะที่สูตรอาหารที่มี BAP 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.05 มก./ล. สามารถชักนำให้ยอด 60% Padilla และ Encina (2004) ศึกษาการชักนำยอดแขนง จากชิ้นส่วนข้อของต้นเซอร์โมย่า บนอาหาร MS ที่เติมซีเอติน 2.28 ไมโครโมลาร์ (0.5 มก./ล.) เกิดยอดที่สูงมากกว่า 1 ซม. 40% และชักนำรากโดยนำส่วนยอด ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนมาทำการปรับสภาพ (pretreatment) โดยไว้ในที่สว่าง 3 วัน บนอาหาร MS ผสมผงถ่าน (Activated charcoal) 1 ก./ล. หลังจากนั้นเลี้ยงต่ออีก 10 วัน โดยเลี้ยงในสภาวะมืด 7 วัน และให้แสงสว่าง 3 วัน บนอาหาร MS ที่มี IBA 492 ไมโครโมลาร์ ซูโครส 15 ก./ล. กรดซิตริก (Citric acid) 200 มก./ล. การปรับสภาพส่งเสริมให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงการชัก นำรากจากส่วนของยอดบนอาหารเดิม โดยไม่เติม auxin และใช้ ½ macroelement ซูโครส 20 ก./ล. เกิดราก 68% โดยต้นที่เกิดจากการชักนำราก รอดชีวิตหลังจากมีการปรับตัว 65%

1.3 วัตถุประสงค์

- 1.3.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการชักนำแคลลัสและชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของทุเรียนเทศ
- 1.3.2 เปรียบเทียบการสร้างสารกลุ่มอะซิโตเจนินและผลึกแคลเซียมออกซาเลตจากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและจากธรรมชาติ รวมถึงในแคลลัส

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

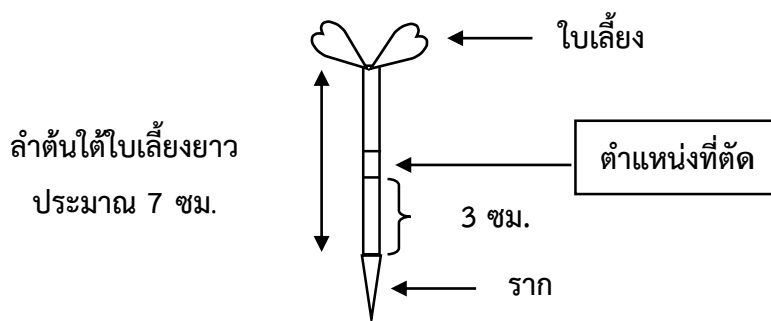
2.1 การเตรียมวัสดุพืช

2.1.1 การเตรียมต้นกล้าทุเรียนเทศในหลอดทดลอง

นำเมล็ดสดจากผลทุเรียนเทศสุกมาล้างน้ำทำความสะอาดจากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ฟอกฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วเพาะบนอาหารวุ้นสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 2.88 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 ก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดต่าง 5.7-5.8 ในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส 2 สัปดาห์ หรือจนเมล็ดเริ่มแตกราก จึงย้ายมาวางเลี้ยงในสภาวะแสงและมืด 16 และ 8 ชั่วโมง ภายใต้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาวโทนเย็น 36 วัตต์ (Philips, Thailand) ที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จนได้ต้นอ่อนมีขนาดความสูง 7 ซม.

2.1.2 การปรับสภาพเนื้อเยื่อก่อนการเพาะเลี้ยง

นำต้นอ่อนทุเรียนเทศที่ได้มาตัดชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยง โดยวัดจากส่วนรอยต่อระหว่าง รากแก้วกับส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง วัดขึ้นมา 3 ซม. (ภาพที่ 3) และตัดชิ้นส่วนตามขวางเป็นชิ้นบางๆ นำชิ้นส่วนบาง (Transverse thin cell layer, tTCL) วางเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ผสมผงถ่านกัมมันต์ 2.0 ก./ล. น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 ก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดต่าง 5.7-5.8 โดยเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 3 ตำแหน่งในการตัดของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยง

2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสและยอด

คัดเลือกชิ้นส่วน tTCL ลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพที่มีสีเขียว ไม่มี ส่วนดำ นำมาวางเลี้ยงบนอาหารฐานสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มก./ล. (ตารางที่ 1) และสูตร MS ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 มก./ล. (ตารางที่ 2) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) โดยจัดชุดการทดลอง 15 ชุดการทดลอง จำนวน 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงขวดละ 5 ชิ้นส่วน โดยเลี้ยงใน สภาวะแสงและมีด 16 และ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกค่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการเกิดยอด จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ รวมทั้งบันทึกลักษณะของแคลลัสและยอดที่ได้จากการสังเกต ย้ายเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากชุดทดลองที่ให้ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและให้ลักษณะแคลลัสที่สมบูรณ์ที่สุด ไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม ทุก 5 สัปดาห์ สำหรับชิ้นส่วนที่เกิดยอด คัดเลือกชิ้นส่วนที่เกิดยอดและมีสภาพของยอดที่สมบูรณ์ ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

ตารางที่ 1 ชุดการทดลองการชักนำแคลัสและยอด ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ร่วมกับ BA ในอาหารวุ้นสูตร MS

ชุดการทดลอง	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล)	
	2,4-D	BA
T ₁	0	0
T ₂	0	1
T ₃	0	2
T ₄	0	3
T ₅	0	4
T ₆	2	0
T ₇	2	1
T ₈	2	2
T ₉	2	3
T ₁₀	2	4
T ₁₁	4	0
T ₁₂	4	1
T ₁₃	4	2
T ₁₄	4	3
T ₁₅	4	4

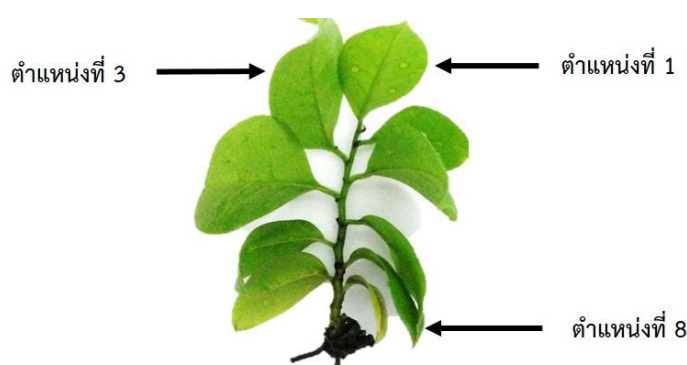
ตารางที่ 2 ชุดการทดลองการชักนำแคลลัสและยอด ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ร่วมกับ BA ในอาหารวุ้นสูตร MS

ชุดการทดลอง	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล)	
	IBA	BA
T ₁	0	0
T ₂	0	1
T ₃	0	2
T ₄	0	3
T ₅	0	4
T ₆	0.5	0
T ₇	0.5	1
T ₈	0.5	2
T ₉	0.5	3
T ₁₀	0.5	4
T ₁₁	1	0
T ₁₂	1	1
T ₁₃	1	2
T ₁₄	1	3
T ₁₅	1	4

2.3 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

เพื่อตรวจสอบรูปแบบการเจริญ จุดกำเนิดของแคลลัส และยอดรวม จากชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคของใบทุเรียนเทศที่ได้จากการชักนำ 3 ตำแหน่ง คือ ใบ 1, 3 และ 8 จากปลายยอด (ภาพที่ 4) โดยการเก็บชิ้นส่วนพืชจากสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสหรือยอดรวมที่ดีที่สุด และใบจากยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอายุ 8 เดือน ในตำแหน่งใบที่ 1, 3 และ 8 ตัดใบขนาดประมาณ 5x5 ตร.มม. โดยให้ผ่านเส้นกลางใบ เก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในน้ำยาคงสภาพ FAA II ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยสารละลาย Tertiary butyl alcohol

(TBA) (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ได้ไปเตรียมด้วยวิธีพาราฟิน (Paraffin method) (Johansen, 1964; Ruzin, 1999) และฝังตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยเครื่องฝังเนื้อเยื่อ (Histoembedding center) นำชิ้นส่วนมาตัดตามขวางด้วยเครื่องไมโครโทม ที่ความหนา 6-8 ไมโครเมตร ติดตัวอย่างเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์และนำตัวอย่างไปย้อมสี โดยชิ้นส่วนพืชที่ชักนำแคลลัสและยอด ย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin และ Safranin (ภาคผนวก ข) ใบตำแหน่งที่ 1, 3 และ 8 ที่ได้จากการชักนำยอด ย้อมด้วยสี Safranin และ Fast green (ภาคผนวก ข) ปิดสไลด์ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



ภาพที่ 4 ตำแหน่งใบที่ได้จากการชักนำยอดอายุ 8 เดือน

2.4 การตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินและการสะสมไขมัน

ตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนิน และการสะสมไขมัน โดยวิธีสีสโตเคมีจากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4) ใบธรรมชาติจากแปลงเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในตำแหน่งของใบที่ 1, 3 และ 8 และแคลลัส โดยใช้เอนโดสเปิร์มของทุเรียนเทศเป็นชุดควบคุม เตรียมชิ้นตัวอย่างขนาด 25 ไมโครเมตร โดยวิธีการตัดภายใต้ความเย็น (Cryostat) ที่อุณหภูมิระหว่าง -14 ถึง -18 องศาเซลเซียส โดยใช้สารโคริโอสแตตต์มีเดีย (Cryostat medium) เป็นตัวประสาน นำเนื้อเยื่อสดที่ผ่านการตัดมาย้อมด้วย เคดด์ รีเอเจนต์ (Kedde's reagent) (Laguna-Hernandez et al., 2017) มาศึกษาการมีสารกลุ่มอะซิโตเจนิน และตำแหน่งเซลล์ที่พบสาร ซึ่งจะติดสีชมพู รวมทั้งศึกษาการสะสมไขมัน และตำแหน่งที่พบการสะสม โดยเปรียบเทียบในแคลลัส ใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และใบจากธรรมชาติ โดยย้อมด้วยสียออยเรดโอ (Oil red O) และ ซูดาน IV (Sudan IV) ไขมันจะติดสีส้มแดง (Brown, 1969) (ตารางที่ 3) ตรวจสอบการย้อมติดสีและบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง

ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17.0

ตารางที่ 3 การตรวจสอบสารกลุ่มอะซีโตเจนินและการสะสมไขมันในชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ
ทุเรียนเทศ

สารที่ต้องการ ทดสอบ	สารทดสอบ (reagent)	การเกิดสีจากปฏิกิริยา	ชิ้นส่วนที่ทดสอบ	
			แคลลัส	
อะซีโตเจนิน	เคดด์ รีเอเจนต์ (Kedde's reagent)	ชมพู/ม่วงแดง	ใบ (เพาะเลี้ยง)	ใบตำแหน่ง 1
				ใบตำแหน่ง 3
				ใบตำแหน่ง 8
			ใบ (ธรรมชาติ)	ใบตำแหน่ง 1
			ใบตำแหน่ง 3	
			ใบตำแหน่ง 8	
			แคลลัส	
ไขมัน	ออยเรดโอ (Oil red O) และ ซูดาน (Sudan IV)	สีส้ม/สีส้มแดง		ใบตำแหน่ง 1
			ใบ (เพาะเลี้ยง)	ใบตำแหน่ง 3
				ใบตำแหน่ง 8
			ใบ (ธรรมชาติ)	ใบตำแหน่ง 1
			ใบตำแหน่ง 3	
			ใบตำแหน่ง 8	

บทที่ 3

ผลการศึกษา

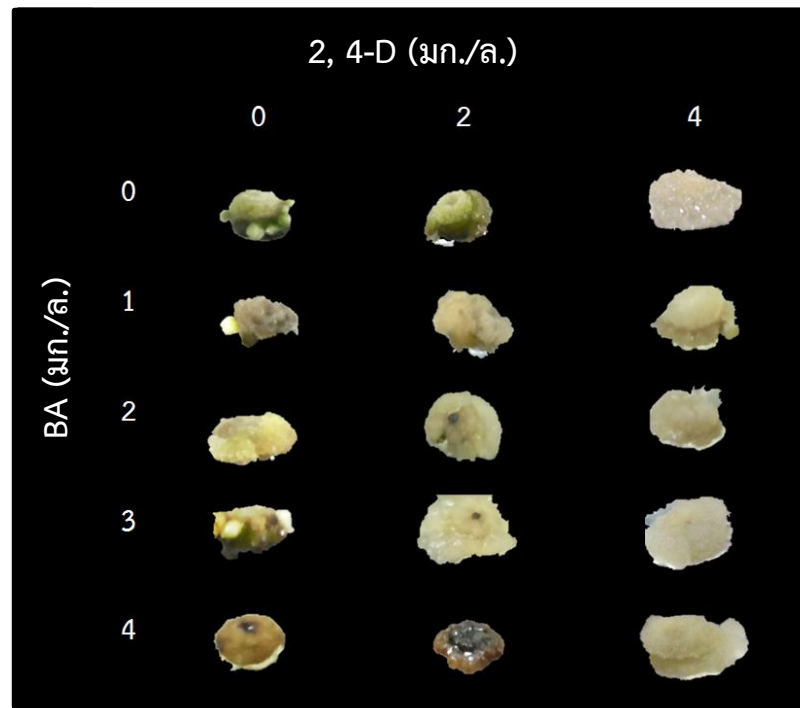
จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงสัญญาณในหลอดทดลองของส่วนไต่ใบเลี้ยงทุเรียนเทศ รวมทั้งการเปรียบเทียบการสร้างสารกลุ่มอะซิโตเจนิน และผลึกแคลเซียมออกซาเลตจากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและจากธรรมชาติ (ในตำแหน่งที่ 1, 3 และ 8) และแคลสส์ได้ผลการศึกษาดังนี้

3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลสส์และยอดรวม

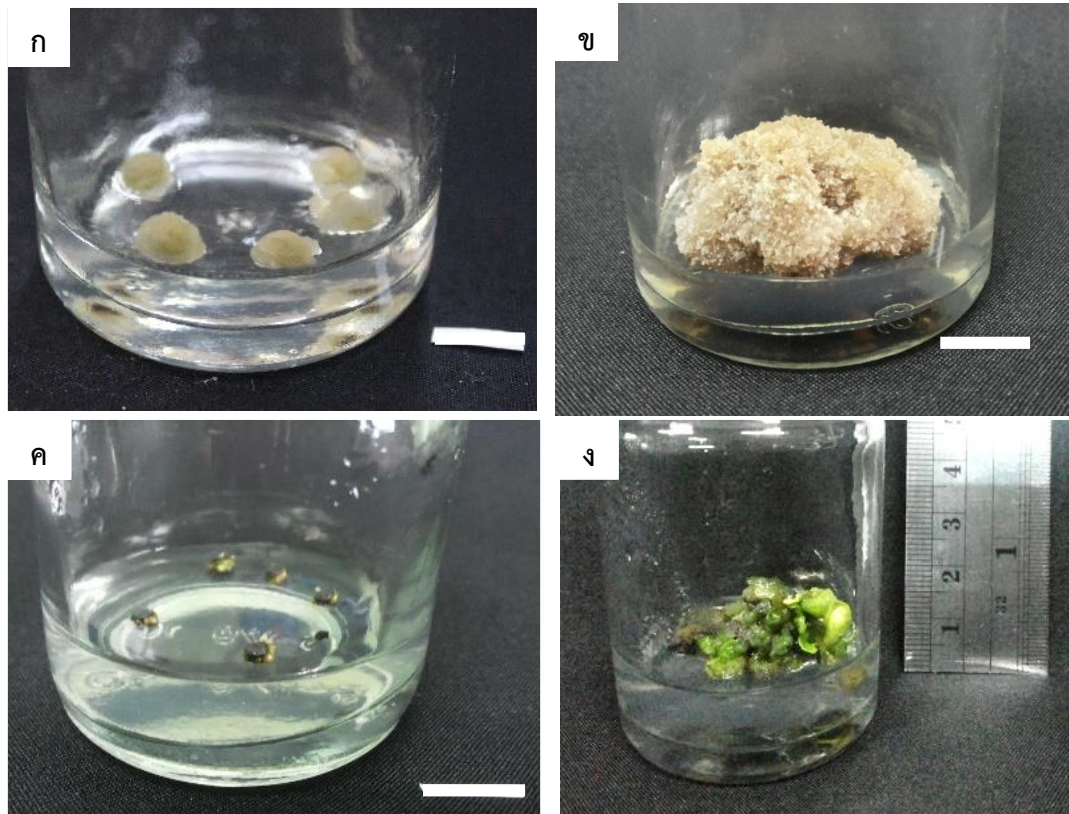
3.1.1 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ต่อการชักนำแคลสส์และยอดรวม

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นไต่ใบเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร MS ที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ BA ส่งผลให้ส่วนลำต้นไต่ใบเลี้ยงมีแนวโน้มเจริญเป็นแคลสส์ (ภาพที่ 5 และ 6 ก) โดยสูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D 4 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลสส์ ($100 \pm 0.00\%$) อีกทั้งให้แคลสส์มีลักษณะเกาะกันแบบหลวม มีสีเขียวอ่อน และไม่พบการเกิดยอด (ตารางที่ 4) เมื่อย้ายเลี้ยงแคลสส์ในอาหารสูตรเดิม โดยเปลี่ยนอาหารทุก 5 สัปดาห์ พบว่าให้แคลสส์มีลักษณะเกาะกันหลวม มีสีขาวผสมเหลืองอ่อน (ภาพที่ 6 ข) และเมื่อศึกษาน้ำหนักสดของแคลสส์ที่เพิ่มขึ้น ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ให้น้ำหนักสดแคลสส์มากที่สุด (1.25 ± 0.24 กรัม) (ตารางที่ 4) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับอาหารสูตร MS ที่มี 2, 4-D 4 มก./ล. ร่วมกับ BA 4 มก./ล.

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การชักนำยอดรวมสูงสุดพบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่างกันให้เปอร์เซ็นต์การชักนำยอด ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทุกชุดการทดลอง แต่พบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี BA 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียวให้ จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นสูงสุด (1.08 ± 0.36 ยอดต่อชิ้นส่วน) (ตารางที่ 5) เมื่อนำส่วนยอด (ภาพที่ 6 ค) มาเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิม พบว่าส่วนยอดมีลักษณะแคระแกร็น และไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 6 ง)



ภาพที่ 5 การพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์



ภาพที่ 6 การชักนำแคลลัสและยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นไต้ใบเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เต็ม 2, 4-D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ

(ก-ข) แคลลัสบนอาหารวุ้นที่มี 2, 4-D 4 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.

(ก) หลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ข) หลังการย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรเต็ม เป็นเวลา 5 สัปดาห์

(ค-ง) การเกิดยอดหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มี BA 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียว

(ค) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ง) ยอดที่แคระแกร็นและไม่สมบูรณ์ หลังการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเต็ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์

(สเกลบาร์ = 1 ซม.)

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 -D ร่วมกับ BA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ

ชุดทดลอง	ฮอร์โมน (มก./ล.)		การเกิดแคลลัส		
	2,4-D	BA	เปอร์เซนต์การชักนำ แคลลัส (ค่าเฉลี่ย \pm SE)	ลักษณะแคลลัส	น้ำหนักแคลลัสที่ เพิ่มขึ้น (กรัม \pm SE)
1	0	0	65.52 \pm 17.67 ^b	สีเขียวอ่อน, +	-
2	0	1	82.85 \pm 8.33 ^{ab}	สีเขียวอ่อน, +	-
3	0	2	100.00 \pm 0.00 ^a	น้ำตาลอ่อน, เกะกันแน่น, ++	-
4	0	3	40.00 \pm 24.49 ^c	น้ำตาลอ่อน, เกะกันแน่น, ++	-
5	0	4	96.00 \pm 4.00 ^a	สีเขียวอ่อน, เกะกันแน่น, ++	-
6	2	0	100.00 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกะกัน หลวม, ++	-
7	2	1	100.00 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกะกัน หลวม, ++	-
8	2	2	96.67 \pm 3.33 ^a	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกะกันหลวม , ++	-
9	2	3	100.000 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกะกัน หลวม, ++	-
10	2	4	96.67 \pm 3.33 ^a	น้ำตาลอ่อน, เกะกันแน่น, ++	-
11	4	0	100.00 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อน, เกะกันหลวม, ++	-
12	4	1	100.00 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อน, เกะกันหลวม, +++	0.12 \pm 0.01 ^b
13	4	2	100.00 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อน, เกะกันหลวม, +++	0.10 \pm 0.02 ^b
14	4	3	100.00 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อน, เกะกันหลวม, +++	1.25 \pm 0.24 ^a
15	4	4	100.00 \pm 0.00 ^a	สีเขียวอ่อน, เกะกันหลวม, +++	0.92 \pm 0.34 ^a

ตัวอักษรที่ต่างกันอยู่ในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

มีปริมาณแคลลัสน้อย = +, มีปริมาณแคลลัสปานกลาง = ++, มีปริมาณแคลลัสมาก = +++, แคลลัสมีสีน้ำตาล และไม่เจริญ = -

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 -D ร่วมกับ BA เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ชุดทดลอง	ฮอร์โมน (มก./ล.)		การเกิดยอด	
	2,4-D	BA	เปอร์เซ็นต์การชักนำยอด รวม ^{ns} (ค่าเฉลี่ย ± SE)	จำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วน ± SE)
1	0	0	25.71±19.37	0.84±0.38 ^{ab}
2	0	1	26.67±9.59	0.40±0.15 ^{bc}
3	0	2	3.33±3.33	0.08±0.08 ^c
4	0	3	26.19±15.53	1.08±0.36 ^a
5	0	4	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c
6	2	0	28.09±17.69	0.80±0.28 ^{ab}
7	2	1	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c
8	2	2	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c
9	2	3	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c
10	2	4	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c
11	4	0	6.67±6.67	0.08±0.05 ^c
12	4	1	6.19±3.80	0.12±0.08 ^c
13	4	2	6.67±4.08	0.08±0.05 ^c
14	4	3	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c
15	4	4	6.67±6.67	0.16±0.12 ^c

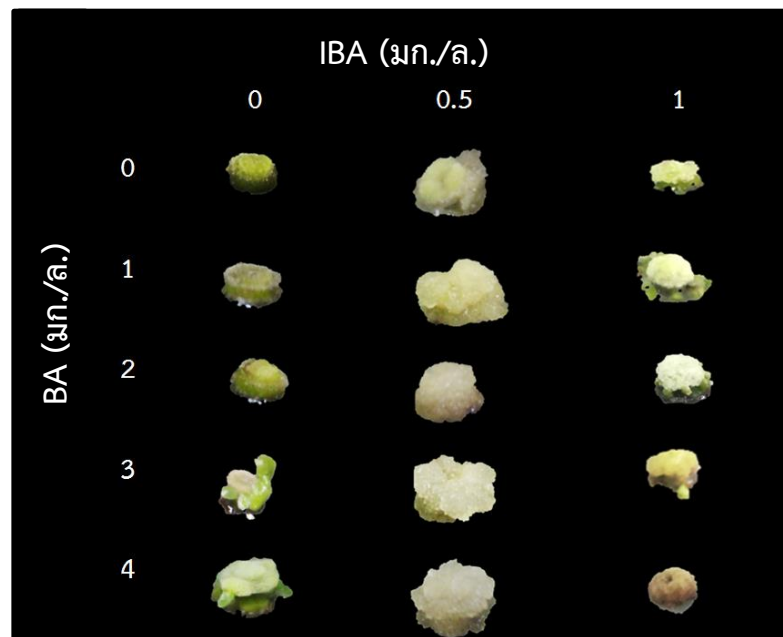
ตัวอักษรที่ต่างกันอยู่ในสคริปต์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

ns: ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วย Kruskal-Wallis test

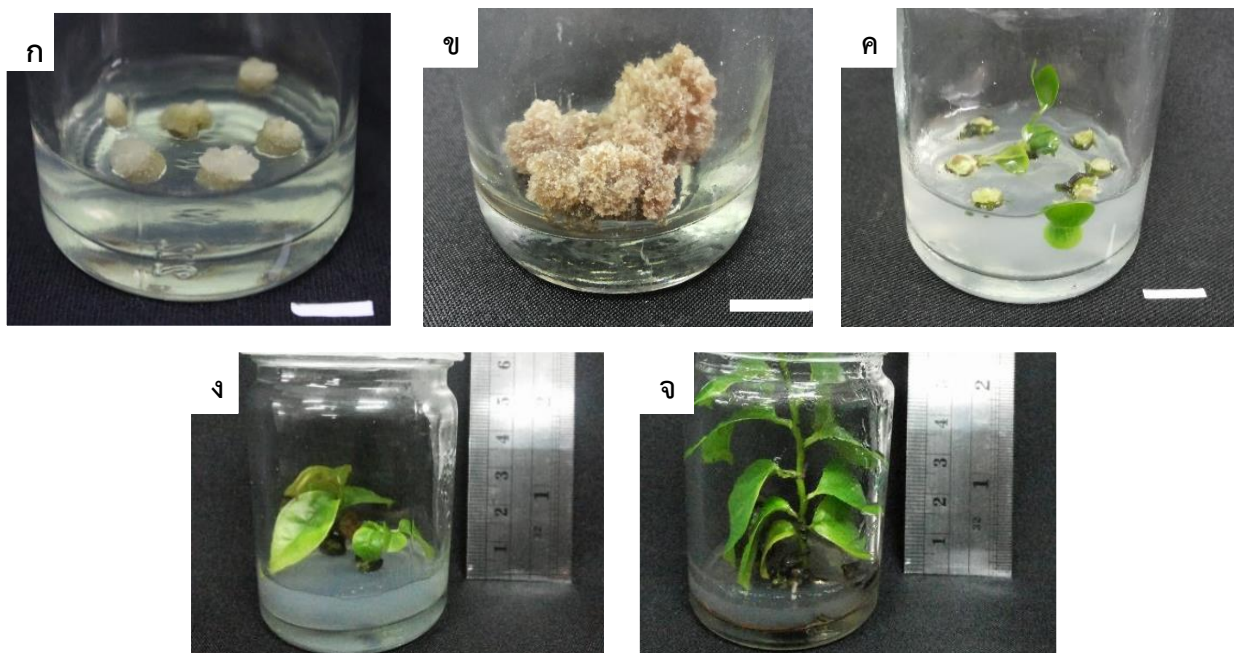
3.1.2 ผลของ IBA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำแคลลัสและยอดรวม

เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีแนวโน้มเจริญเป็นแคลลัส (ภาพที่ 7 และ 8 ก) ซึ่งไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 6) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 0.5 มก./ล ร่วมกับ BA 3 มก./ล เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส ($97.14 \pm 2.85\%$) เนื่องจากแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันหลวม มีสีเขียวอ่อนและไม่พบการเกิดยอด (ตารางที่ 6) นำ แคลลัสที่ได้จากการชักนำบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IBA 0.5 มก./ล ร่วมกับ BA 3 มก./ล มาย้าย เลี้ยงในอาหารสูตรเดิมและเปลี่ยนอาหารทุก 5 สัปดาห์ พบว่าจะให้แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวม มีสีเขียวผสมเหลืองอ่อน (ภาพที่ 8 ข) และเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม สารควบคุมการเจริญเติบโต พบการเจริญของแคลลัสปริมาณน้อย และเมื่อศึกษาน้ำหนักสดแคลลัสที่ เพิ่มขึ้นในระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA (1, 2, 3 และ 4 มก./ล.) ทุกชุดการทดลอง ให้น้ำหนักสดแคลลัสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6)

การชักนำยอดในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ร่วมกับ BA พบว่า เปอร์เซ็นต์การชักนำ ยอดสูงสุด คือสูตรอาหาร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว (60.00 ± 17.72) และให้ผลที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่มี IBA 1 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. (54.76 ± 19.66) และพบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. ดังกล่าวให้ จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุด (1.33 ± 0.25 ยอดต่อชิ้นส่วน) (ตารางที่ 7) และเมื่อย้ายเลี้ยงส่วน ยอดอายุ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 8 ค) ลงบนอาหารวุ้นสูตรเดิมเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ได้ยอดที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 8 ง) และเมื่อเลี้ยง 32 สัปดาห์ พบว่ายอดมีการพัฒนาของรากและเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 8 จ)



ภาพที่ 7 การพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 2 สัปดาห์



ภาพที่ 8 การชักนำแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนลำต้นไต่ใบเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.

(ก-ข) แคลลัสบนอาหารวุ้นที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.

(ก) หลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ข) หลังการย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตรเดิม เป็นเวลา 5 สัปดาห์

(ค-จ) การเกิดยอดหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มี IBA 1 มก./ล เพียงอย่างเดียว

(ค) หลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ง) ยอดที่สมบูรณ์ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรเดิมเป็นเวลา 12 สัปดาห์

(จ) ต้นที่มียอดและรากสมบูรณ์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 32 สัปดาห์

(สเกลบาร์ = 1 ซม.)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ

ชุดทดลอง	ฮอร์โมน (มก./ล.)		การเกิดแคลลัส		
	IBA	BA	เปอร์เซ็นต์การชักนำ แคลลัส ^{ns} (ค่าเฉลี่ย \pm SE)	ลักษณะแคลลัส	น้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ^{ns} (กรัม \pm SE)
1	0	0	73.33 \pm 19.43	สีเขียวอ่อน, +	-
2	0	1	83.33 \pm 12.91	สีเขียวอ่อน, +	-
3	0	2	96.66 \pm 3.33	สีเขียวอ่อน, +	-
4	0	3	93.14 \pm 4.29	สีเขียวอ่อน, +	-
5	0	4	100.00 \pm 0.00	สีเขียวอ่อน, +	-
6	0.5	0	70.83 \pm 18.16	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกาะกันแน่น, ++	-
7	0.5	1	65.71 \pm 21.47	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกาะกันหลวม, ++	1.47 \pm 0.27
8	0.5	2	87.50 \pm 9.68	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกาะกันหลวม, ++	2.11 \pm 0.34
9	0.5	3	97.14 \pm 2.85	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกาะกันหลวม, +++	1.90 \pm 0.15
10	0.5	4	100.00 \pm 0.00	สีเขียวอ่อนถึงขาว, เกาะกันหลวม, +++	1.48 \pm 0.15
11	1	0	73.33 \pm 19.43	สีเขียวอ่อน, เกาะกันแน่น, +	-
12	1	1	94.16 \pm 3.63	สีเขียวอ่อน, เกาะกันแน่น, +	-
13	1	2	90.00 \pm 10.00	สีเขียวอ่อน, เกาะกันแน่น, +	-
14	1	3	80.95 \pm 12.32	สีเขียวอ่อน, เกาะกันแน่น, +	-
15	1	4	100.00 \pm 0.00	น้ำตาลอ่อน, เกาะกันแน่น, +	-

ns: ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วย Kruskal-Wallis test

มีปริมาณแคลลัสน้อย = +, มีปริมาณแคลลัสปานกลาง = ++, มีปริมาณแคลลัสมาก = +++, แคลลัสมีสีน้ำตาล และไม่เจริญ = -

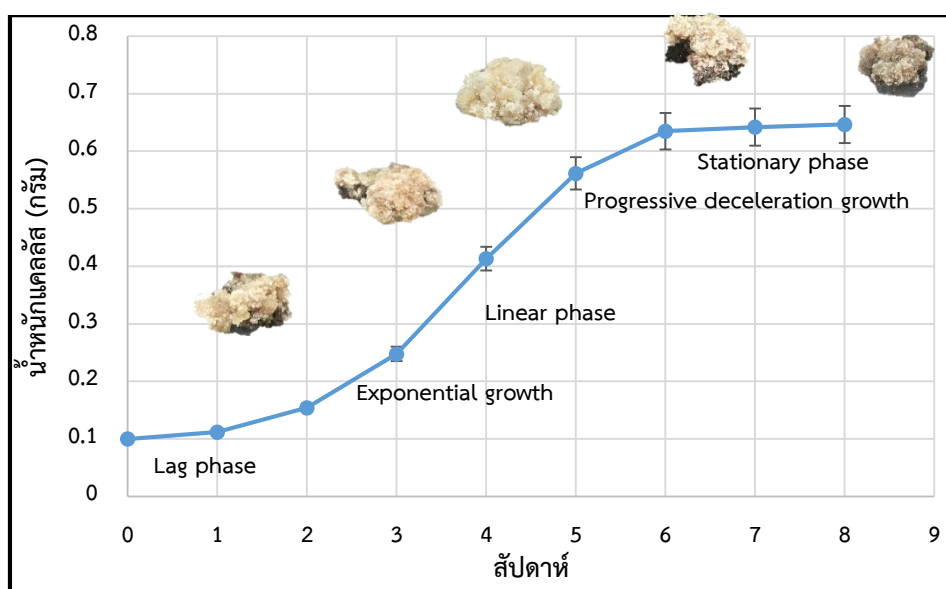
ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดรวมของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BA เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ชุดทดลอง	ฮอร์โมน (มก./ล.)		การเกิดยอด	
	IBA	BA	เปอร์เซ็นต์ การชักนำยอด (ค่าเฉลี่ย \pm SE)	จำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วน \pm SE)
1	0	0	25.00 \pm 13.94 ^{ab}	0.63 \pm 0.27 ^{bc}
2	0	1	6.66 \pm 4.08 ^b	0.06 \pm 0.046 ^d
3	0	2	6.66 \pm 4.08 ^b	0.06 \pm 0.046 ^d
4	0	3	29.14 \pm 18.30 ^{ab}	0.66 \pm 0.22 ^{bc}
5	0	4	23.32 \pm 16.32 ^{ab}	0.46 \pm 0.20 ^{cd}
6	0.5	0	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^d
7	0.5	1	20.00 \pm 20.00 ^{ab}	0.7 \pm 0.26 ^{bc}
8	0.5	2	3.33 \pm 3.33 ^b	0.03 \pm 0.03 ^d
9	0.5	3	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^d
10	0.5	4	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^d
11	1	0	60.00 \pm 17.72 ^a	1.13 \pm 0.21 ^{ab}
12	1	1	38.33 \pm 20.68 ^{ab}	0.86 \pm 0.27 ^{abc}
13	1	2	34.00 \pm 18.86 ^{ab}	0.33 \pm 0.087 ^{cd}
14	1	3	54.76 \pm 19.66 ^a	1.33 \pm 0.25 ^a
15	1	4	27.50 \pm 19.52 ^{ab}	0.36 \pm 0.12 ^{cd}

ตัวอักษรที่ต่างกันอยู่ในสมมุติเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

3.2 การเจริญของแคลลัส

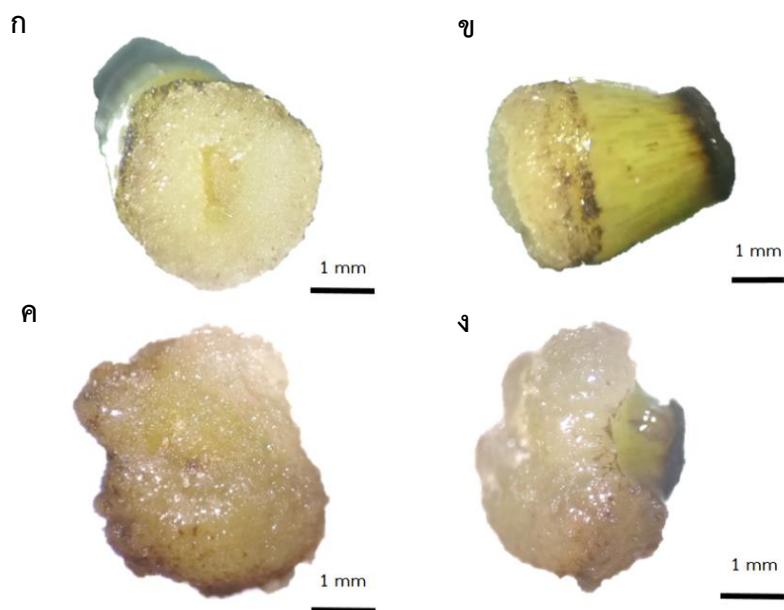
จากการศึกษารูปแบบการเจริญของแคลลัส โดยใช้แคลลัสที่ได้จากเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล ร่วมกับ BA 3 มก./ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เนื่องจากให้แคลลัสปริมาณมาก และมีลักษณะเกาะกันหลวม พบว่า มีการเจริญแบบ ซิกมอยด์ (S-shape) โดยแบ่งระยะการเจริญเป็น 5 ระยะ (ภาพที่ 9) ได้แก่ Lag phase (สัปดาห์ที่ 0-1) Exponential phase (สัปดาห์ที่ 1-3) Linear phase (สัปดาห์ที่ 3-5) Progressive deceleration phase (สัปดาห์ที่ 5-6) และ Stationary phase (สัปดาห์ที่ 6-8)



ภาพที่ 9 การเจริญของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. ระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในสภาวะมีแสงสว่าง

3.3 ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา

พัฒนาการของพืชต้นใหม่มีกระบวนการเกิดได้ 2 แบบ โดยขึ้นกับสมดุลของฮอร์โมน ออกซินและไซโตไคนิน คือ Direct organogenesis เป็นการเกิดยอดหรือรากโดยไม่ผ่านแคลลัส และ Indirect organogenesis เป็นการเกิดยอด หรือรากโดยผ่านแคลลัส โดยจากการตรวจสอบรูปแบบการเจริญจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของทุเรียนเทศที่ได้จากการชักนำ โดยการเก็บชิ้นส่วนพืชจากสูตรอาหารที่ดีที่สุด ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส (สูตรอาหาร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.) พบว่าแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแบบหลวม (ภาพที่ 10) และมีการเจริญจากผิวรอยตัดของส่วนใต้ใบเลี้ยง (ภาพที่ 11 ก-ข) และเมื่อเลี้ยงต่อมาระยะหนึ่งเริ่มพบโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (shoot apical meristem: SAM) เจริญจากแคลลัส (ภาพที่ 11 ค) ซึ่งเป็นการเจริญของยอดผ่านทาง Indirect organogenesis และสูตรอาหารที่ชักนำยอดได้ดีที่สุด (สูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว) พบการเจริญของยอดผ่านทาง Direct organogenesis (ภาพที่ 12) ซึ่งมีเนื้อเยื่อระบบลำเลียงที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนเดิม

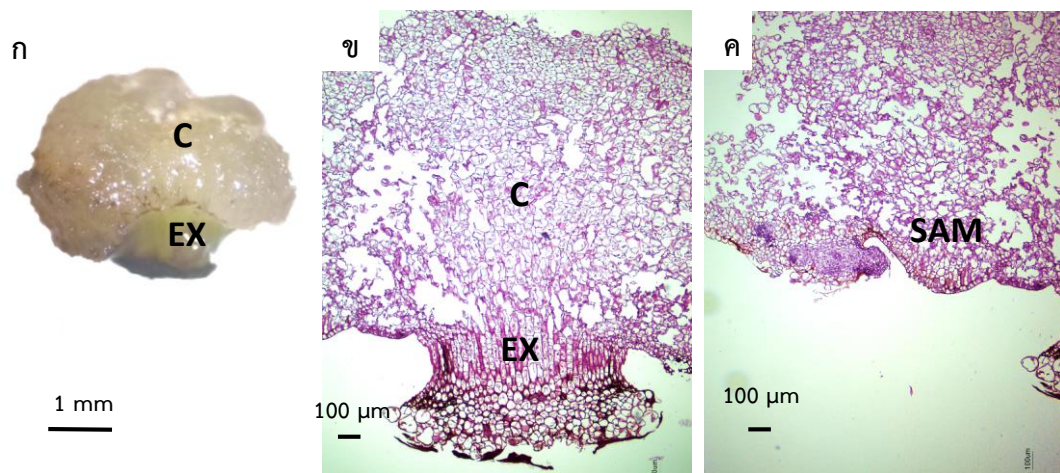


ภาพที่ 10 การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.

(ก-ข) เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

(ค-ง) เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ก และ ค ภาพถ่ายด้านบน (top view) ข และ ง ภาพถ่ายด้านข้าง (side view)



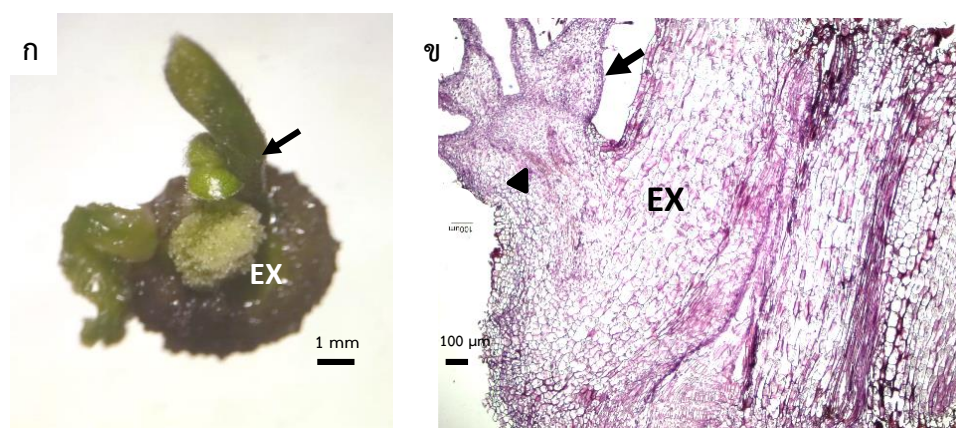
ภาพที่ 11 การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ก) แคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง

(ข) แคลลัส (C) เจริญจากผิวยอดตัดของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (EX)

(ค) เริ่มพบการสร้างส่วนของยอด (SAM) ผ่านทาง Indirect organogenesis

C: แคลลัส; EX: ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง; SAM: Shoot apical meristem



ภาพที่ 12 การเกิดยอดจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงผ่านทาง Direct organogenesis เมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เป็นเวลา 5 สัปดาห์

(ก) การเกิดเป็นยอด (ศรชี้)

(ข) ตำแหน่งที่เกิดยอด (ศรชี้) พบเนื้อเยื่อลำเลี้ยง (หัวลูกศร) เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนเดิม

3.4 การตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินและการสะสมไขมัน

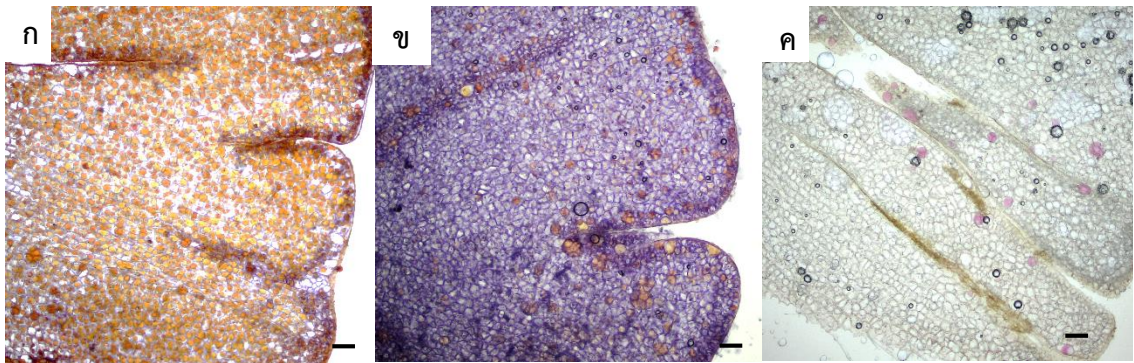
จากการตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินและไขมัน ในส่วนต่างๆ ของทุเรียนเทศโดย สารกลุ่มอะซิโตเจนินเมื่อทำปฏิกิริยากับเคดด์ รีเอเจนต์ จะให้สีชมพู หรือสีม่วงแดง ใช้เอนโดสเปิร์ม เป็นชุดควบคุม ตรวจสอบสารดังกล่าวในใบจากธรรมชาติ ใบจากการเพาะเลี้ยง (เลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว) อายุ 32 สัปดาห์ โดยใช้ใบในตำแหน่งที่ 1, 3 และ 8 และในแคลลัส (จากการชักนำในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล.) พบว่าทั้ง ใบที่ได้จากใบธรรมชาติและใบจากการเพาะเลี้ยง มีการสะสมของสารกลุ่มอะซิโตเจนิน โดยพบสาร กลุ่มอะซิโตเจนินในทุกตำแหน่งของใบจากธรรมชาติ (ตารางที่ 8) (ภาพที่ 14 ก-ค) และเมื่อพิจารณา ใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงพบว่า มีสารอะซิโตเจนินปริมาณมากในใบตำแหน่งที่ 1 และมีปริมาณ น้อยลงในใบตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 8 (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 14 ง-ฉ) (ซึ่งเบื้องต้นสังเกตได้จาก การติดสีเข้ม หรือจาง) โดยพบสารกลุ่มอะซิโตเจนินในโครงสร้าง Subspherical idioblast ของใบ แต่ไม่พบการสะสมสารอะซิโตเจนินในแคลลัส

จากการตรวจสอบไขมัน ด้วยสียอดเรดโอ และสีซูดาน IV จะให้สีส้มแดงเมื่อย้อมติด ไขมัน พบว่า มีการสะสมไขมันในใบจากธรรมชาติทั้ง 3 ตำแหน่ง (ภาพที่ 15 ก-ค และภาพที่ 16 ก-ค) และใบจากการเพาะเลี้ยงมีการสะสมไขมันในเซลล์ Subspherical idioblast ซึ่งย้อมติดสีส้มชัดเจน (ภาพที่ 15 ง-ฉ และ 16 ง-ฉ) ตำแหน่งเดียวกับที่พบสารกลุ่มอะซิโตเจนิน แต่ในแคลลัสพบไขมัน กระจายอยู่น้อยในเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 17)

ตารางที่ 8 การตรวจสอบสารกลุ่มอะซีโตเจนินและการสะสมไขมันในชิ้นส่วนของทุเรียนเทศ

สารที่ ต้องการ ทดสอบ	สารทดสอบ (reagent)	สีของ ปฏิกิริยา	ชิ้นส่วนที่ทดสอบ		การเกิดสี จาก ปฏิกิริยา	ปริมาณ ที่พบ
				แคลลัส		
อะซีโต เจนิน	เคดด์ รีเอเจนต์ (Kedd's reagent)	ชมพู/ม่วง แดง	ใบ (ชักนำยอด)	ใบตำแหน่ง 1	++	+++
				ใบตำแหน่ง 3	+	+
				ใบตำแหน่ง 8	+	+
			ใบ (ธรรมชาติ)	ใบตำแหน่ง 1	+++	+++
				ใบตำแหน่ง 3	+++	+++
				ใบตำแหน่ง 8	+++	+++
ไขมัน	ออยเรดโอ (oil red O)	ส้มแดง		ใบตำแหน่ง 1	+	+
			ใบ (ชักนำยอด)	ใบตำแหน่ง 1	+++	++
				ใบตำแหน่ง 3	+++	+
				ใบตำแหน่ง 8	+++	++
				ใบตำแหน่ง 1	+++	+++
			ใบ (ธรรมชาติ)	ใบตำแหน่ง 3	+++	++
	ใบตำแหน่ง 8	+++	++			
ไขมัน	ซูดาน IV (Sudan IV)	ส้มแดง		ใบตำแหน่ง 1	+	+
			ใบ (ชักนำยอด)	ใบตำแหน่ง 1	+++	+++
				ใบตำแหน่ง 3	+++	++
				ใบตำแหน่ง 8	+++	++
				ใบตำแหน่ง 1	+++	++
			ใบ (ธรรมชาติ)	ใบตำแหน่ง 3	+++	+++
	ใบตำแหน่ง 8	+++	+++			

- ไม่เกิดสีจากปฏิกิริยา
- + เกิดสีจากปฏิกิริยา/พบน้อย
- ++ เกิดสีจากปฏิกิริยาชัดเจน/พบปานกลาง
- +++ เกิดสีจากปฏิกิริยาชัดเจนมาก/พบมาก



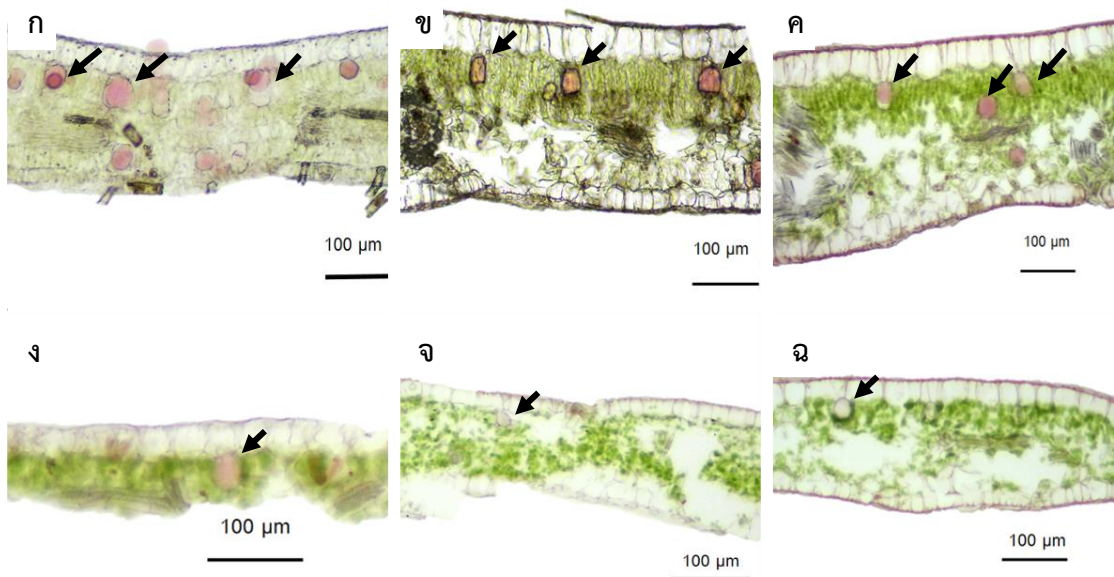
ภาพที่ 13 เอนโดสเปิร์มของทุเรียนเทศ ที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็น ที่ความหนา 25 ไมโครเมตร ใช้เป็นชุดควบคุมการตรวจสอบสารสะสมในเซลล์

(ก) ไขมันติดสีส้มหรือสีแดง เมื่อย้อมด้วยสีชูดาน IV

(ข) ไขมันติดสีส้มแดง เมื่อย้อมด้วยสีออยเรดโอ

(ค) สารกลุ่มอะซิโตเจนินติดสีชมพูหรือม่วงแดง เมื่อย้อมด้วยเคดด์ รีเอเจนต์

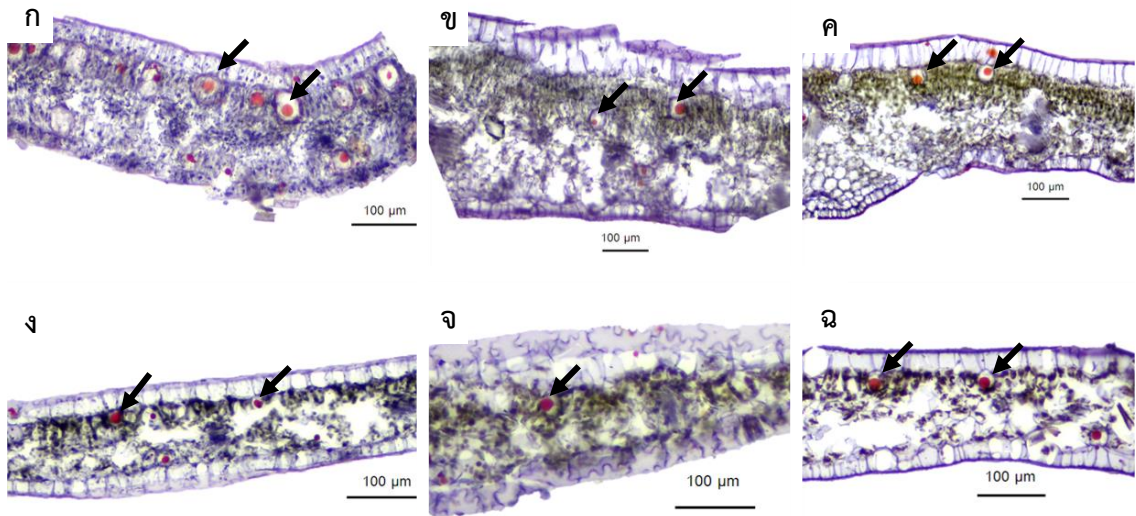
สเกลบาร์ = 100 ไมโครเมตร



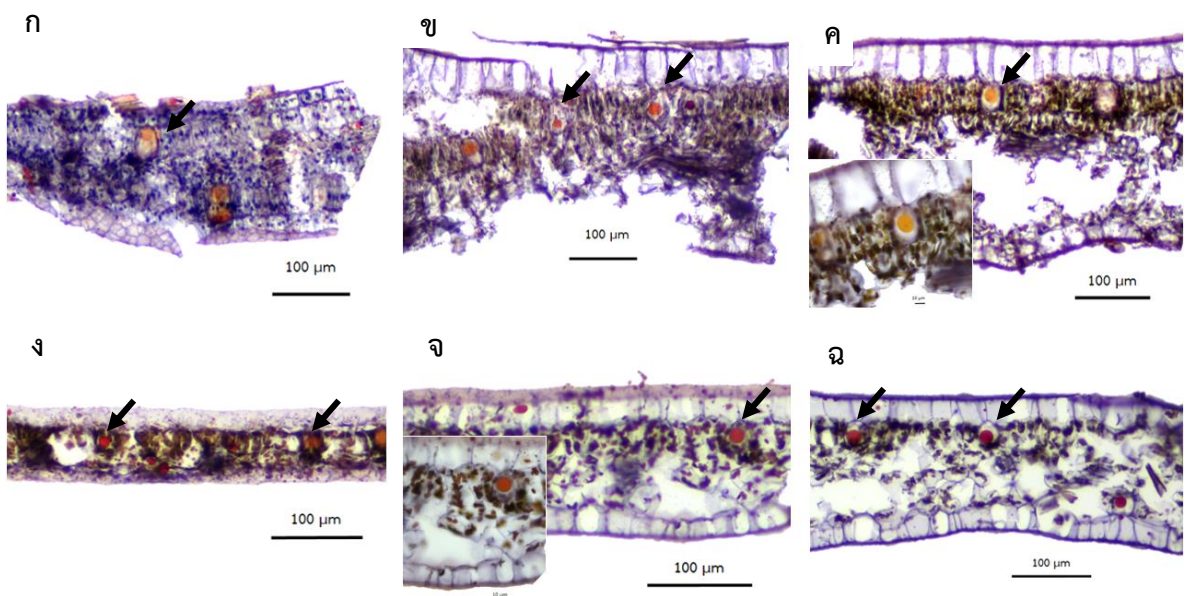
ภาพที่ 14 การตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินในใบ โดยใช้ เคดด์ รีเอเจนท์

(ก-ค) ใบจากธรรมชาติ (ก) ใบตำแหน่งที่ 1 (ข) ใบตำแหน่งที่ 3 (ค) ใบตำแหน่งที่ 8

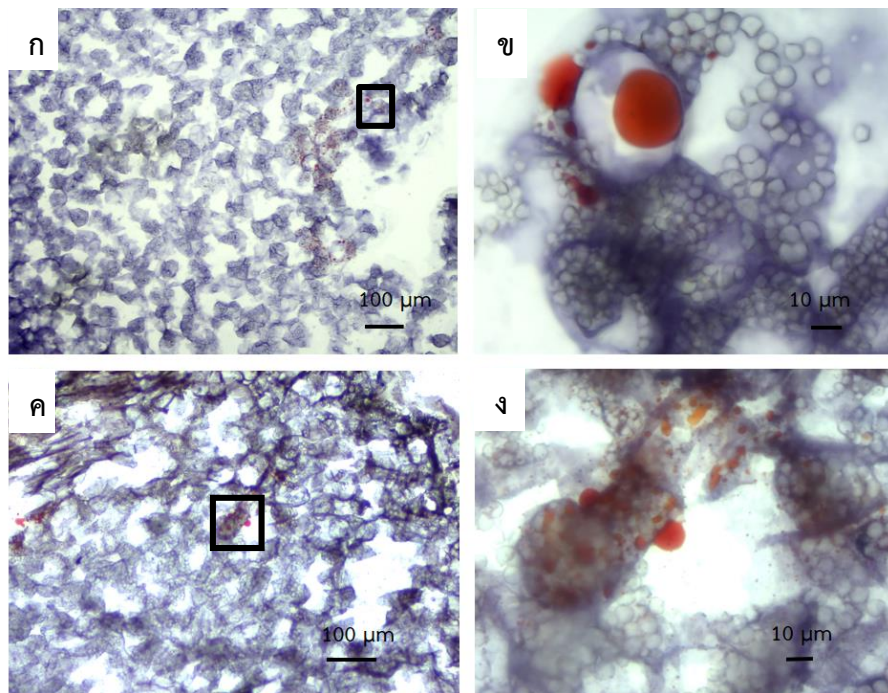
(ง-ฉ) ใบจากการเพาะเลี้ยง (ง) ใบตำแหน่งที่ 1 (จ) ใบตำแหน่งที่ 3 (ฉ) ใบตำแหน่งที่ 8 โดยตรวจพบสารกลุ่มอะซิโตเจนินที่โครงสร้าง Subspherical idioblast (ครชี้)



ภาพที่ 15 การตรวจสอบไขมันในใบ โดยใช้ ออย เรด โอ จากใบตำแหน่งต่างๆบนลำต้น
 (ก-ค) ใบจากธรรมชาติ (ก) ใบตำแหน่งที่ 1 (ข) ใบตำแหน่งที่ 3 (ค) ใบตำแหน่งที่ 8
 (ง-ฉ) ใบจากการชักนำ (ง) ใบตำแหน่งที่ 1 (จ) ใบตำแหน่งที่ 3 (ฉ) ใบตำแหน่งที่ 8 โดยตรวจพบ
 ไขมันที่โครงสร้าง Subspherical idioblast (ครชี้)



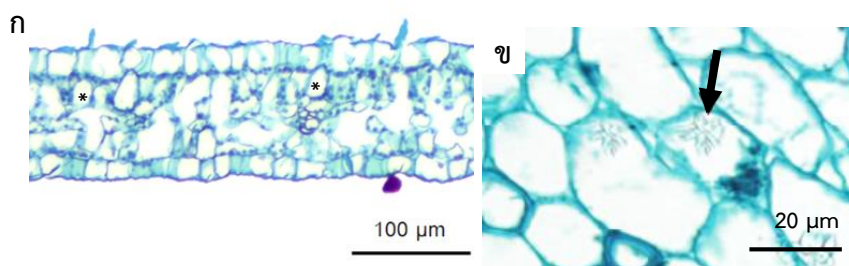
ภาพที่ 16 การตรวจสอบไขมันในใบ โดยใช้ ซูดาน IV จากใบตำแหน่งต่างๆบนลำต้น
 (ก-ค) ใบจากธรรมชาติ (ก) ใบตำแหน่งที่ 1 (ข) ใบตำแหน่งที่ 3 (ค) ใบตำแหน่งที่ 8
 (ง-ฉ) ใบจากการชักนำ (ง) ใบตำแหน่งที่ 1 (จ) ใบตำแหน่งที่ 3 (ฉ) ใบตำแหน่งที่ 8 โดยตรวจพบไขมันที่
 โครงสร้าง Subspherical idioblast (ครชี้)



ภาพที่ 17 การตรวจสอบไขมันในแคลลัสพบไขมันกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อแคลลัส
 (ก-ข) ตรวจสอบโดย สีออย เรด โอ
 (ค-ง) ตรวจสอบโดย สีซูดาน IV
 (ภาพ ข และ ง เป็นภาพส่วนขยายของภาพ ก และ ค ตามลำดับ)

3.5 โครงสร้างทางกายวิภาคของใบ และการเก็บสะสมผลึกในใบที่ได้จากการชักนำยอด

จากการศึกษาใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อายุ 32 สัปดาห์ พบโครงสร้างของ Subspherical idioblast บริเวณ Palisade mesophyll (ภาพที่ 18 ก) แต่ไม่พบโครงสร้างของ Calcium oxalate crystal-containing idioblast ซึ่งพบในใบจากธรรมชาติ (ภาพที่ 18 ข)



ภาพที่ 18 โครงสร้างตัดตามขวางของใบทุเรียนเทศ (ก) ใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบเฉพาะ Subspherical idioblast (*) บริเวณ Palisade mesophyll (ข) Calcium oxalate crystal-containing idioblast (ครั่ง) พบในใบจากธรรมชาติ

บทที่ 4

บทวิจารณ์

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงสัญญาณในหลอดทดลองของส่วนใต้ใบเลี้ยงทุเรียนเทศ รวมทั้งการเปรียบเทียบการสร้างสารกลุ่มอะซิโตเจนินและผลึกแคลเซียมออกซาเลตจากใบที่ได้จากการชักนำและจากธรรมชาติ (ในตำแหน่งที่ 1, 3 และ 8) และแคลลัสได้ผลการศึกษาดังนี้

4.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสและยอด

4.1.1 ผลของ 2, 4-D ร่วมกับ BA ต่อการชักนำแคลลัสและยอดรวม

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ส่งผลให้ชิ้นส่วนมีแนวโน้มเจริญเป็นแคลลัส โดยสูตรอาหารที่เติม 2, 4-D 4 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส ($100.00 \pm 0.00\%$) อีกทั้งให้แคลลัสมีลักษณะเกาะกันแบบหลวม มีสีเขียวอ่อน และไม่พบการเกิดยอด เนื่องจากการส่งเสริมการชักนำยอดและแคลลัส เป็นผลจากสัดส่วนของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน โดยสัดส่วนของออกซินต่ำ ต่อไซโตไคนินสูง จะส่งเสริมให้เกิดยอด และถ้าฮอร์โมนทั้งคู่มีสัดส่วนใกล้เคียงกัน มีแนวโน้มจะส่งเสริมให้เกิดแคลลัส (Skoog and Miller, 1957 อ้างโดย Ikeuchi et al., 2013) และสอดคล้องกับการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนฐานใบของ *A. muricata* ในอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1.5 มล./ล. ร่วมกับ 2,4-D 2.0 มล./ล. (Abubacker and Deepalakshmi, 2017) ซึ่งมีสัดส่วนของออกซินที่ใกล้เคียงกับไซโตไคนิน ดังนั้น จึงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี และการย้ายเลี้ยงแคลลัสที่ได้ในอาหารสูตรเดิมจะให้แคลลัสที่เจริญดี และมีลักษณะเกาะกันหลวมมีสีจาง (มีสีขาวผสมเหลืองอ่อน) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเจริญของแคลลัสขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง รวมทั้งการย้ายเลี้ยงส่งผลให้แคลลัสเจริญเติบโตได้ดี มีอัตราการเจริญที่เพิ่มขึ้นและมีมวลชีวภาพมากขึ้น (Ling et al., 2009; Nakasha et al., 2016)

สำหรับการชักนำยอดในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่าง กันให้เปอร์เซ็นต์การชักนำยอดที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกชุดการทดลอง แต่พบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี BA 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียวให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นสูงสุด (1.08 ± 0.36 ยอดต่อชิ้นส่วน) เนื่องจากฮอร์โมนไซโตไคนิน ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการเกิดยอด (Schaller et al., 2015) และเมื่อนำส่วนยอดมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิม พบว่าส่วนยอดมีลักษณะแคระแกร็น และไม่สมบูรณ์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Freitas และคณะ (2016) ซึ่งศึกษาการชักนำยอดจากส่วนข้อของ *A. emarginata* ในอาหารวันที่มี BA (0, 1, 3 และ 5 ไมโครโมลลาร์) พบว่า ที่ BA 5 ไมโครโมลลาร์ เกิดกระจุกก้อนของตาขนาดเล็ก (clump) บริเวณฐานชิ้นส่วน โดยใบและยอดที่ได้มีลักษณะไม่สมบูรณ์ และสูตรอาหาร ที่มี BA 1 ไมโครโมลลาร์ ให้ยอดมีลักษณะดีที่สุด เนื่องจากการเกิดยอดที่ช้าส่งผลให้มีจำนวนของตาและใบมาก ดังนั้นการเกิดยอดที่เป็นกระจุกและแคระแกร็น ควรย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ BA ลง และเติม GA_3 ร่วมด้วย จะทำให้ยอดมีการเจริญดียิ่งขึ้น

4.1.2 ผลของ IBA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำแคลลัสและยอดรวม

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มี IBA ร่วมกับ BA ส่งผลให้ชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยงมีแนวโน้มเจริญเป็นแคลลัส ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทุกชุดการทดลอง โดยอาหาร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสม เพราะให้แคลลัสมีสีขาวผสมเขียวอ่อน และเกาะกันหลวม ซึ่งแตกต่างจากแคลลัสที่ชักนำได้ในชุดทดลองอื่น ที่ให้แคลลัสปริมาณน้อยรวมทั้งแคลลัสมีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มแน่น มีสีเหลืองผสมน้ำตาล ซึ่งการที่ชิ้นส่วนพืชพัฒนาเป็นแคลลัสเกิดจากความสมดุลของระดับฮอร์โมนกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนินของอาหารเลี้ยงในปริมาณที่เหมาะสม (Ikeuchi et al., 2013)

สำหรับอาหารสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว และ IBA 1 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. พบการเกิดแคลลัสปริมาณน้อยแต่พบการเกิดยอด โดยสูตรอาหาร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. ให้เปอร์เซ็นต์การชักนำยอดสูงสุด (60 ± 17.72) เนื่องจากเนื้อเยื่อที่ยังอ่อน มีการสร้างควบคุมการเจริญภายในเนื้อเยื่อ (ยงศักดิ์ และอัญชลิ, 2558) และจากการศึกษาส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นลิ้นมังกร (*Antirrhinum majus* L.) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน พบว่า มีปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนิน สูงและมีปริมาณน้อยลงในส่วนใกล้ใบเลี้ยง (Okubo et al., 1991) ดังนั้นการเลี้ยงส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารที่มี IBA เพียงอย่างเดียวจึงสามารถชักนำการเกิดยอดได้ และเมื่อพิจารณาอาหารสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุด

โดยการพัฒนาของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งปริมาณไซโตไคนินที่มากกว่าส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงให้เป็นส่วนยอด (Reece et al., 2011)

4.2 การเจริญของแคลลัส

จากการศึกษาการเจริญของแคลลัสในสูตรอาหารที่ดีที่สุด (อาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล ร่วมกับ BA 3 มก./ล) เนื่องจากให้แคลลัสปริมาณมาก และมีลักษณะเกาะกันหลวม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการเจริญแบบกราฟรูปร่างตัวเอส (Sigmoid curve) ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบได้ทั่วไป โดยพืช ในวงศ์ Annonacea มีรูปแบบการเจริญเป็นกราฟรูปร่างตัวเอส แต่อาจจะใช้ระยะเวลาในแต่ละช่วงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ สภาวะเพาะเลี้ยง และชนิดพันธุ์ของพืช เช่น รูปแบบการเจริญในเซลล์แขวนลอยของ *Rollinia mucosa* พบว่า ช่วง lag phase (สัปดาห์ที่ 0-1) ช่วง exponential phase (สัปดาห์ที่ 1-3) และสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไปเข้าสู่ช่วง stationary phase (Figueiredo et al., 2000) และการเลี้ยงแคลลัสในอาหารวุ้นของ *Stelechocarpus burahol* พบว่า ช่วง lag phase (สัปดาห์ 1-8) ช่วง exponential phase (สัปดาห์ที่ 8-10) และหลังจากสัปดาห์ที่ 10 จะเข้าสู่ stationary phase (Habibah et al., 2016)

4.3 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

เพื่อตรวจสอบรูปแบบการเจริญจากชิ้นส่วนไตใบเลี้ยงของทุเรียนเทศที่ได้จากการชักนำแคลลัสในสูตรอาหารที่ดีที่สุด (สูตรอาหาร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล ร่วมกับ BA 3 มก./ล) พบว่า แคลลัสมีลักษณะเกาะกันแบบหลวม และมีการเจริญจากผิวรอยตัดของส่วนไตใบเลี้ยง สอดคล้องกับ Santana และคณะ (2011) ที่ได้ศึกษาการชักนำแคลลัสจากส่วนไตใบเลี้ยง และส่วนเหนือใบเลี้ยงของ *A. squamosa* โดยพบว่าแคลลัสเจริญจากผิวรอยตัดของชิ้นส่วนดังกล่าว เมื่อวางเลี้ยงแคลลัสระยะหนึ่งในอาหารสูตรเดิม พบการเจริญเป็นยอดผ่าน Indirect organogenesis ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hesami และ Daneshvar (2018) ซึ่งได้ศึกษาการชักนำแคลลัส และการชักนำยอดผ่าน Direct และ Indirect organogenesis จากส่วนไตลำต้นใบเลี้ยงของ *Ficus religiosa* L. โดยเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการชักนำในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มก./ล ร่วมกับ BAP 0.05 มก./ล. มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี TDZ, KN, BAP (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 มล./ล.) ร่วมกับ IBA อัตราส่วน 10:1 พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร สูตร MS ที่มี BAP 1.5 มล./ล. ร่วมกับ IBA 0.15 มล./ล. ให้การเกิดยอดผ่าน Indirect organogenesis สูงสุด (86.66 เปอร์เซ็นต์) และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนคือ 4.13

โดยสูตรอาหารเลี้ยงดังกล่าวยังสามารถชักนำการเกิดยอตผ่าน Direct organogenesis โดยเกิดยอตสูงสุด (96.66 เปอร์เซ็นต์) และจำนวนยอตต่อชิ้นส่วนคือ 6.26 อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ สูตรอาหารที่ชักนำยอตได้ดีที่สุด (สูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล เพียงอย่างเดียว) โดยพบการเจริญของยอตผ่านทาง Direct organogenesis ซึ่งต้องอาศัยระบบเนื้อเยื่อลำเลียงจากชิ้นส่วนเดิม สอดคล้องกับการเลี้ยงส่วนข้อของ *A. muricata* L. ในอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1.0 มก./ล. ไคเนติน 0.5 มก./ล. และ IBA 1.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอตได้โดยไม่ผ่านแคลลัส (Abubacker and Deepalakshmi, 2017)

4.4 การตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินและการสะสมไขมัน

จากการตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนินและไขมันในชิ้นส่วนต่างๆของทุเรียนเทศโดยตรวจสอบสารดังกล่าวในใบจากการชักนำยอต (เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล เพียงอย่างเดียว) อายุ 32 สัปดาห์ และในใบจากธรรมชาติ โดยใช้ใบในตำแหน่งใบที่ 1 3 และ 8 และในแคลลัส (จากการชักนำในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล ร่วมกับ BA 3 มก./ล) พบว่าใบทั้งที่ได้จากการชักนำยอตและใบธรรมชาติ มีการสะสมของสารกลุ่มอะซิโตเจนิน โดยพบสารกลุ่มอะซิโตเจนินในทุกตำแหน่งของใบจากธรรมชาติ และเมื่อพิจารณาใบที่ได้จากการชักนำยอตพบว่า มีสารอะซิโตเจนินปริมาณมากในใบตำแหน่งที่ 1 และมีปริมาณน้อยลงในใบตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 8 เนื่องจากการผลิตสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง มักมีปริมาณน้อยกว่าที่พบจริงในธรรมชาติ (Bunrathep, 2006) โดยอาจมีสาเหตุจากสูตรของอาหารเพาะเลี้ยงและฮอร์โมน ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) หรือการพัฒนาของเซลล์ที่ยังไม่สมบูรณ์ (Jain et al., 2012) แต่ไม่พบการสะสมสารอะซิโตเจนินในแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตสาร Saikosaponin จากพืช *Bupleurum falcatum* L. โดยไม่สามารถผลิตสารได้จากแคลลัส แต่สามารถผลิตได้เมื่อชักนำให้เป็นราก (Bunrathep, 2006) สารกลุ่มอะซิโตเจนินพบในโครงสร้าง Subspherical idioblast ของใบ ซึ่งเซลล์ดังกล่าวสามารถพบในส่วนต่างๆ เช่น เมล็ด เปลือกไม้ ผล และใบของ *A. muricata* (Mulia et al., 2013) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสะสมสารเมทาบอลิต์ต่างๆ ที่พืชสร้างขึ้น เช่น อะซิโตเจนิน และ อัลคาลอยด์ (Laguna-Hernandez et al., 2015; Brechu Franco et al., 2016; Laguna-Hernandez et al., 2017) โดยสารอะซิโตเจนินมีหน้าที่ในการปกป้องพืชจากโรคและศัตรูพืชต่างๆ (Laguna-Hernandez et al., 2015)

จากการตรวจสอบไขมัน ด้วยสียอดเรดโอ และสีชูดาน IV พบว่า มีการสะสมไขมันในใบจากธรรมชาติทั้ง 3 ตำแหน่ง และใบที่ได้จากการชักนำยอด โดยพบใน เซลล์ Subspherical idioblast ตำแหน่งเดียวกับพบสารกลุ่มอะซิโตเจนิน เนื่องจากโครงสร้างสารอะซิโตเจนินประกอบด้วย อนุพันธ์ของกรดไขมันโซ่ยาว (Yang et al., 2010) ดังนั้นจึงสามารถให้ผลเช่นเดียวกับไขมัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Laguna-Hernandez และคณะ (2015) โดยได้ตรวจสอบ สารอะซิโตเจนิน และไขมัน โดยใช้ เคคต์ รีเอเจนต์ และ ชูดาน III ตามลำดับ ในเอนโดสเปิร์มของ *A. macrophyllata* พบว่า สารอะซิโตเจนินที่ตรวจพบโดยการทดสอบของเคคต์ รีเอเจนต์ ให้ผลเป็นบวกกับการทดสอบไขมันด้วย ชูดาน III ดังนั้น สารอะซิโตเจนินมีสมบัติเป็นไขมันธรรมชาติ และในแคลลัสพบไขมันกระจายอยู่น้อยในเนื้อเยื่อ เนื่องจากไขมันเป็นสารเมทาบอลิต์ปฐมภูมิ ที่พืชสร้างขึ้น มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพ และเนื้อเยื่อแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่ยังไม่พัฒนาเป็นอวัยวะ การสร้างสารอะซิโตเจนินซึ่งเป็นสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิอาจไม่เกิดหรือเกิดน้อย (Bunrathep, 2006)

4.5 โครงสร้างทางกายวิภาคของใบ และการเก็บสะสมผลึกในใบที่ได้จากการชักนำยอด

จากการศึกษาใบที่ได้จากการชักนำยอด อายุ 32 สัปดาห์ พบโครงสร้างของ Subspherical idioblast บริเวณ Palisade mesophyll แต่ไม่พบโครงสร้างของ Calcium oxalate crystal-containing idioblast ซึ่งพบได้ในใบจากธรรมชาติ สอดคล้องกับ Pelden (2016) ได้ศึกษาโครงสร้างใบของ *A. muricata* จากธรรมชาติในตำแหน่งที่ 1 3 และ 8 ซึ่งพบ Idioblast 2 ชนิด คือ calcium oxalate crystal-containing idioblast และ Subspherical idioblast ในแผ่นใบโดย Subspherical idioblast จะพบมากในส่วนของ Mesophyll โดยเฉพาะ Palisade mesophyll ซึ่งการสะสมของแคลเซียมออกซาเลต ในพืชเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อจำนวน รูปร่าง ขนาด และยังพบว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมระดับแคลเซียมในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ การป้องกันตัวของพืช และการจำกัดสารพิษประเภทโลหะหนัก (Franceschi and Nakata, 2005) และยังพบว่า วิตามิน และ ไมโอ อินซิทอล ในอาหารเลี้ยง สามารถทำให้แคลเซียมออกซาเลตลดปริมาณลง เมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมวิตามิน ในการปลูกผักโขมระบบไฮโดรโปนิก โดยใช้ธาตุอาหารหลัก (macronutrient) และ ธาตุอาหารรอง (micronutrient) จากสูตร MS และ วิตามินจากสูตร Nitsch และ Nitsch ร่วมกับ ไมโอ อินซิทอล (เบญจพร, 2554)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานในหลอดทดลองของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงทุเรียนเทศ รวมทั้งการเปรียบเทียบการสร้างสารกลุ่มอะซิโตเจนินและผลึกแคลเซียมออกซาเลตจากใบที่ได้จากการชักนำและจากธรรมชาติ (ในตำแหน่งที่ 1, 3 และ 8) พบว่าอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3 มก./ล. เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสมากที่สุด เนื่องจากให้แคลลัสที่มีสีเขียวอ่อนและเกาะกันหลวม และมีปริมาณมาก เมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิม พบรูปแบบการเจริญของแคลลัสเป็น 5 ระยะ ได้แก่ Lag phase, Exponential phase, Linear phase, Progressive deceleration phase และ Stationary phase อาหารสูตร MS ที่มี IBA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว ให้เปอร์เซ็นต์การชักนำยอดรวมสูงสุด (60.00 ± 17.72) เมื่อนำส่วนยอดที่ได้ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มี IBA 1 มก./ล. เป็นเวลา 32 สัปดาห์ พบว่ายอดมีการพัฒนาของรากเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากการตรวจสอบสารกลุ่มอะซิโตเจนิน พบสารดังกล่าวในโครงสร้าง Subspherical idioblast ในใบจากธรรมชาติ ทุกตำแหน่งของใบ (ใบที่ 1, 3 และ 8) และในใบที่ได้จากการชักนำยอดรวมในหลอดทดลอง แต่ไม่พบในแคลลัส นอกจากนี้พบการสะสมไขมันในใบจากธรรมชาติ ใบที่ได้จากการชักนำยอดรวมและในแคลลัส สำหรับผลึกแคลเซียมออกซาเลตพบเฉพาะในใบธรรมชาติ แต่ไม่พบในใบที่ได้จากการชักนำยอดและในแคลลัส ซึ่งการพัฒนาให้แคลลัสสามารถผลิตสารอะซิโตเจนินได้ มีข้อดีคือ ในเนื้อเยื่อแคลลัสไม่พบผลึกแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งส่งเสริมการเกิดนิว และเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ดังนั้น ควรมีการปรับสภาวะต่างๆในการเลี้ยงแคลลัสให้เหมาะสมกับการกระตุ้นให้มีการสร้างสารสำคัญต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. 2558. ใบทุเรียนเทศรักษาอะไรได้จริงหรือ. เข้าถึงได้จาก:
<https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/271>
 [เข้าถึงเมื่อ 3 ธันวาคม 2561].
- นัทธมน วุฒนนท์. 2560. การป้องกันการกลับเป็นนิ่วในไตซ้ำ: คำแนะนำการพยาบาลตามสมัย.
 พยาบาลสาร. 16:192-199.
- เบญจพร ศรีสุวรรณ. 2554. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศึกษาการผลิตผักโขมที่ปราศจากสารก่อ
 นิ่ว (แคลเซียมออกซาเลต) โดยวิธีไฮโดรโปนิค เพื่อเป็นต้นแบบไปสู่ภาคธุรกิจ. สำนักวิทย
 บริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
- พัชรินทร์ ชนะพาทย์. 2554. นิ่วในไตจากแคลเซียมและออกซาเลต. สงขลานครินทร์เวชสาร.
 29: 299-308.
- ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และ อัญชลี จาละ. 2558. อิทธิพลของ BA, IAA, 2, 4-D และ kinetin ต่อการ
 ขยายพันธุ์ต้นแก้วมังกรจากไฮโปคอทิลและใบจริงในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์
 และเทคโนโลยี. 4: 147-154.
- วรรณัน บุญสนองสุภา. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสกุล *Uvaria* บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญา
 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) สาขาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วีระชัย ณ นคร. 2558. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 2. กรุงเทพฯ:
 โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์.
- อยุทธ์ นิสสภา, เสมอใจ ชื่นจิตต์, วสันต์ เพชรรัตน์, สมปอง เตชะโต, อิบรอเฮม ยีดำ และ ศรีนรา
 แมงเระ. 2550. ทุเรียนเทศ. เข้าถึงได้จาก [http://natres.psu.ac.th/projectsite/
 webpage/detail-project.htm](http://natres.psu.ac.th/projectsite/webpage/detail-project.htm) [เข้าถึงเมื่อ 25 เมษายน 2562].

- Abubacker, M. N. and Deepalakshmi, T. 2017. *In vitro* Direct Regeneration of *Annona muricata* L. from nodal explant. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 14: 123-128.
- Alali, F.Q., Liu, X. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenin: recent progress. *Journal of Natural Product* 62: 504-540.
- Badrie, N. and Schauss, A.G. 2010. Soursop (*Annona muricata* L.): composition, nutritional value, medicinal uses and toxicology. *In Bioactive Food in Promoting: fruit and vegetables*. (eds. R.R. Watson and V. R. Preedy), pp. 621-643. Oxford: Academic Press.
- Bejamin, A. and Stone, O. 2003. The flora of Guam. *Micronesica* 6:1-659.
- Bejoy, M. and Hariharan, M. 1992. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 31: 245-247.
- Brechu Franco, A. E., Laguna-Hernandez, G., De-la-Cruz-Chacon, I., Gonzalez-Esquinca, A.R. 2016. *In situ* histochemical localization of alkaloid and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Don. Sm. seed during germination. *European Journal of Histochemistry* 60: 2568.
- Brown, J.C. 1969. Proceedings of the society the chromatography and identification of dyes. *Journal of The Society of Dyers and Colourists* 85: 137-146.
- Bunrathep, S. 2006. Production of secondary metabolite by plant tissue culture and biology technology. *Thai Journal Health Research* 20: 185-195.

- Chen, Y., Xu, S., Chen, J., Wang, Y., Xu, H., Fan, N. and Li, X. 2012. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seed extract containing Annonaceous acetogenin compound. *Journal of Ethnopharmacology* 142: 462-466.
- Dayeef, A.Y.M., Karyono, S. and Sujuti, H. 2013. The influence of *Annona Muricata* leave extract in damaging kidney cell and inducing caspase-9 activity. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Science (IOSR-JPBS)* 8: 48-52
- Dos Santos, A. C. F., Andrade de Aguiar-Dias, A. C., Do Amarante, C. B. and Coelho-Ferreira, M. 2013. Secretory structures from the leaf blade of bitter amapa (*Parahancornia fasciculata*, Apocynaceae): histochemistry and assay Of flavonoids. *Acta Amazonica* 43: 407-413.
- Eckardt, N.A. 2003. A new classic of cytokinin research: cytokinin-deficient *Arabidopsis* plant Provide new insight into cytokinin biology. *The Plant Cell* 15: 2489-2492
- Franceschi. 2001. Calcium oxalate in plant. *Trend in Plant Science* 6: 331.
- Franceschi, V. R., and Nakata, P. A. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annual Review of Plant Biology* 56: 41-71.
- Freitas, R. T. de, Paiva, R., Campos, N. A., Silva, L. C., Swennen, R. and Panis, B. 2016. *In vitro* culture of *Annona emarginata*: A rootstock for commercial annonaceae species. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 12: 1-6.
- Figueiredo, S. F. L., Simose, C., Albarello, N. and Viana, V. R. C. 2000. *Rollinia mucosa* cell suspension cultures: Establishment and growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 85-92.

- Gajalakshmi S, Vijayalakshmi, S. and Rajeswari, V.D. 2012. Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: a review. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4: 3-6.
- Habibah, N. A., Moeljopawiro, S., Dewi, K. and Indrianto, A. 2016. Flavonoid production in callus cultures from mesocarp of *Stelechocarpus burahol*. Biosaintifika 8: 214-221.
- Hesami, M. and Daneshvar, M.H. 2018. *In vitro* adventitious shoot regeneration through direct and indirect organogenesis from seedling- derived hypocotyl segment of *Ficus religiosa* L. An important medicinal plant. HortScience 53: 55-61
- Howell, S.H., Lall, S. and Che, P. 2003. Cytokinin and shoot development. Trends in Plant Science 8: 453-459.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. The Plant Cell. 25: 3159-3173.
- Inwanna, O., Samala, S., Chanpradit, C., and Choosingh, N. 2014. Effect of cultural media and explant type on callus and shoot induction of *Annona muricata* L. Malaya Journal of Bioscience 1: 155-159.
- Jain, S.C., Pancholi, B. and Jain, R. 2012. *In vitro* callus propagation and secondary metabolite quantification in *Sericostoma pauciflorum*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 11: 1103-1109.
- Johansen, D.A. 1964. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill.

- Jordan, M., Iturriaga, L., Roveraro, C. and Goreux, A. 1991. Promotion of *Annona cherimoya in vitro* shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. *Gartenbauwissenschaft* 56: 224-227.
- Kim, G. S., Zeng, L., Alali, F., Rogers, L. L., Wu, F.E., Sastrodihardjo, S., and McLaughlin, J. L. 1998. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 49: 565-571.
- Krishna, R.B., Swapna, D., Vallamsetty, H., Reddy, R.R.S. and Reddy, K.J. 2011. *In vitro* multiple shoot induction from nodal explant of *Annona squamosa* L. *IUP Journal of Biotechnology* 5: 30-35.
- Laguna-Hernandez, G., Brechu Franco, A. E., De-la-Cruz-Chacon, I., and Gonzalez-Esquinca, A.R. 2015. Histochemical detection of acetogenins and storage molecules in the endosperm of *Annona macrophyllata* Donn Sm. Seed. *European Journal of Histochemistry* 59: 1-4.
- Laguna-Hernandez, G., Brechu Franco, A. E., De-la-Cruz-Chacon, I., Gonzalez-Esquinca, A.R. 2017. A histochemical technique for the detection of Annonaceous acetogenins. *Histochemistry of single molecular: method and protocols. Method in Molecular Biology*. 1560: 331-337
- Lemos, E. E. P. and Blake, J. 1996. Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa*. *Plant cell Tissue and Organ Culture*. 47: 77-79
- Ling, A.P.K., Tang, K., Gansau, J.A., Hussein, S. 2009. Induction and maintenance of callus from leaf explant of *Mirabilis jalapa* L. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 3: 42-47

- McLaughlin, J. L. 2008. Paw Paw and cancer: annonaceous Acetogenins from discovery to commercial products. *Journal of Natural Products* 71: 1311-1321.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M. and Kadir, H. A. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of It's traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 15625–15658.
- Mulia, K., Winarcahyo S. W., Krisanti, E. and Kurniasuci, D. 2013. Practical isolation of bullatacin from *Annona muricata* leave extract using an open column chromatography technique. *Advance Materials Research*. 789: 545-550.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nagori, R and Purohit, S.D. 2004. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segment. *Scientia Horticulturae* 99: 89-98.
- Nakasha, J. J., Sinniah, U. R., Kemat, N. and Mallappa, K. S. 2016. Induction, subculture cycle and regeneration of callus in Safed Musli (*Chlorophytum borivilianum*) using different types of phytohormones. *Pharmacognosy Magazine* 12: 460-464.
- Okubo, H., Wada, K. and Uemoto, S. 1991. *In vitro* morphogenetic response and distribution of endogenous plant hormone in hypocotyl segment of Snapdragon (*Antirrhinum majus* L.). *Plant Cell Report*. 10: 501-504.

- Padilla, I.M.G. and Encina, C.L. 2004. Micropropagation of adult Cherimoya (*Annona cherimoya*) cv. Fino de jete. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40: 210-214.
- Pelden, D. 2016. Anatomy and histochemistry of *Annona muricata* L. Master of Science in Botany Thesis, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Pelden, D. and Meesawat, U. 2019. Foliar idioblasts in different-aged leave of a medicinal plant (*Annona muricata* L.). *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 41: 414-420.
- Pinto, A. C de Q., Cordeiro, M. C. R, De Andrade, S. R. M., Filgueiras, H. A. C., Alves R. E. and Kinpara, D.I. 2005. *Annona* Species. International Centre for Underutilized Crops, University of Southampton, Southampton, UK
- Phonkerd, N. 2014. Acetogenins from the Annonaceae Family and their biological activity. *KKU Science Journal* 42: 700-717.
- Rasai, S., George, A.P. and Kantharajah, A.S. 1995. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop) : a review. *Scientia Horticulturae* 62: 1-14.
- Reece, J.B, L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky and R.B. Jackson. 2011. Plant response to internal and external signal. *In Campbell Biology*. (ed. B. Wilbur) pp. 867-895. San Francisco: Pearson education.
- Ruzin, S. 1991. *Plant Microtechnique and Microscopy*. New York: Oxford University Press, Inc.

- Santana, J. R. F., Paiva, R., Oliveira, L. M., Nepomuceno, C. F., Silveira, D. G. 2011. Organogenesis in three species of *Annona* (Annonaceae). *Sitientibus Serie Ciencias Biologicas* 11: 82-88.
- Santos, M. R. A., Ferreira, M. G. R., Guimaraes, M. C. M., Lima, R. A., Oliveira, C. L. L. G. 2014. Callogenesis in leave of *Kalanchoe pinnata* Lam. by 2, 4-D and BA action. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 16: 760-764.
- Schaller, G. E., Bishopp, A. and Kieber, J. J. 2015. The Yin-Yang of hormone: cytokinin and auxin interaction in plant development. *The Plant Cell* 27: 44-63.
- Solomon-Wisdom, G.O., Ugoh, S.C. and Mohammed, B. 2014. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Annona muricata* L. leaf extract. *American Journal of Biological, Chemical and Pharmaceu*tical Science 2: 1-7.
- Tulyananda, T. and Nilsen, E. T. 2017. The role of idioblasts in leaf water relations of tropical *Rhododendron*. *American Journal of Botany* 104: 1-12.
- Wang, L., Qiu, D., Chen, J., Han, Y., Zheng, J., and Guo, D. 2002. Callus culture of *Annona squamosa* for the production of annonaceous acetogenins. *Journal of Asian Natural Products Research* 4: 171-174.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. and Schmulling, T. 2001. Regulation of plant growth by Cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10487-10492.

Yang, H., Zhang, N., Zeng, Q., Yu, Q., Ke, S. and Li, X. 2010. HPLC method for the simultaneous determination of ten Annonaceous Acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. *International Journal of Biomedical Science* 6: 202-207.

Yang, C., Gundala, S.R., Mukkavilli, R., Vangala, S., Reid, M.D. and Aneja, R. 2015. Synergistic interaction among flavonoid and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leave confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis* 36: 656-665.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 องค์ประกอบสูตรอาหาร MS (Murashing and Skoog, 1962) ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สารเคมี	ปริมาณ (มก./ล.)
Macronutrient	
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrient	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Vitamin	
Glycine	2.0
Thiamin HCl	0.1
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.1
Iron	
Na_2EDTA	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
sucrose	30,000

ตารางที่ 2 สูตรน้ำยา Tertiary butyl alcohol ดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ลำดับ

ลำดับที่	ส่วนผสม	ปริมาณ	ลำดับที่	ส่วนผสม	ปริมาณ
1	water	95 มล.	7	water	15 มล.
	Ethanol 95%	5 มล.		Ethanol 95%	50 มล.
	Butyl alcohol	0 มล.		Butyl alcohol	35 มล.
2	water	90 มล.	8	water	5 มล.
	Ethanol 95%	10 มล.		Ethanol 95%	40 มล.
	Butyl alcohol	0 มล.		Butyl alcohol	55 มล.
3	water	80 มล.	9	water	0 มล.
	Ethanol 95%	20 มล.		Ethanol 95%	25 มล.
	Butyl alcohol	0 มล.		Butyl alcohol	75 มล.
4	water	70 มล.	10	Pure butyl alcohol + eosin	
	Ethanol 95%	30 มล.			
	Butyl alcohol	0 มล.			
5	water	50 มล.	11	Pure butyl alcohol	
	Ethanol 95%	40 มล.			
	Butyl alcohol	10 มล.			
6	water	30 มล.	12	Butyl alcohol	50 มล.
	Ethanol 95%	50 มล.		Paraffin	50 มล.
	Butyl alcohol	20 มล.		(อัตราส่วน 1:1)	

การเตรียมสีย้อม Kedde's reagent (Laguna-Henandez, et al., 2017)

1. เตรียม 3,5-dinitrobenzoic acid ความเข้มข้น 2% ใน ethanol
2. เตรียม NaOH ความเข้มข้น 1 N
3. ผสม ข้อ 1 และข้อ 2 ในอัตราส่วน 1:1

การเตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ FAA II

ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

- | | |
|-------------------|--------|
| 1. Ethanol 70% | 90 มล. |
| 2. Glacial acetic | 5 มล. |
| 3. Formalin | 5 มล. |

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการย้อมสีประเภทต่างๆ

การย้อมสี Hematoxylin and Safranin O

1. แช่สไลด์ตัวอย่างใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
2. แช่สไลด์ตัวอย่างใน absolute ethanol:xylene 2 นาที
3. แช่สไลด์ตัวอย่างใน absolute ethanol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
4. แช่สไลด์ตัวอย่างใน ethanol 95% 2 ครั้งๆละ 2 นาที
5. แช่สไลด์ตัวอย่างใน ethanol 70% 2 ครั้งๆละ 2 นาที
6. แช่สไลด์ตัวอย่างใน Delafield's hematoxylin 20 นาที
7. ล้างออกด้วยน้ำประปา 2 นาที
8. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยการจุ่มใน acidulate water 8 จุ่ม
9. จุ่มในน้ำประปาเพื่อหยุดการล้างสีส่วนเกิน 2 จุ่ม
10. ทำให้เป็นสีน้ำเงิน โดยการจุ่มในสารละลาย lithium carbonate 0.1% 2 นาที
11. ล้างสารละลาย lithium carbonate ด้วยน้ำประปา 2 จุ่ม
12. ย้อมไซโตพลาสซึมด้วย safranin 6 นาที
13. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา โดยแกว่งเบาๆ 1-2 ครั้ง
14. จุ่มใน acidulate water 2 จุ่ม
15. จุ่มใน lithium carbonate 0.1% 1 ครั้ง
16. ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้ alcohol 70% 95% และ 100% ตามลำดับๆละ 2 ครั้งๆ 2 นาที
17. ทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย absolute ethanol: xylene 2 นาที
18. แช่ xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
19. ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ mounting ด้วย permount

ผล : นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินอมม่วง ไซโตพลาสซึมจะติดสีชมพูอ่อน

การย้อมไขมันด้วยสียอยเรดโอ (Oil Red O)

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสดที่ตัดภายใต้ความเย็น มาแช่น้ำกลั่น 1 นาที
หยดด้วยสารละลายต่างๆ ดังนี้

- | | | |
|------------------------------|----|--------|
| 1. 100% propylene glycol | 2 | นาที |
| 2. 0.5 % Oil red O | 25 | นาที |
| 3. 85% propylene glycol | 1 | นาที |
| 4. แช่ในน้ำกลั่น | 1 | นาที |
| 5. แช่ใน Harris' hematoxylin | 30 | วินาที |
| 6. แช่ในน้ำกลั่น 2 ครั้งๆละ | 2 | นาที |
| 7. Mount ด้วย glycerin jelly | | |

ผล : ไขมันจะติดสีส้มแดง

การย้อมไขมันด้วยซูดาน IV (Sudan IV) (Ruzin, 1999; Brown, 1969)

1. นำเนื้อเยื่อที่ตัดภายใต้ความเย็นมาแช่ในน้ำกลั่น 1 นาที
2. แช่ตัวอย่างใน ethanol 50% 1 นาที
3. แช่ตัวอย่างใน ethanol 70% 1 นาที
4. แช่ในสีซูดาน IV 5-10 นาที
5. แช่ใน Harris' hematoxylin เป็นเวลา 30 วินาที
6. แช่ตัวอย่างในน้ำประปา 5 นาที
7. ล้างในน้ำกลั่น 1 นาที
8. Mount ตัวอย่างด้วย glycerine jelly

ผล : ไขมันจะย้อมติดสีส้มหรือแดง นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินหรือดำ

การเคลือบสไลด์ เพื่อใช้ติดตัวอย่างที่ตัดด้วย cryostat

1. ล้างสไลด์
2. แช่ในน้ำกลั่น (ไม่เกิน 24 ชม.)
3. แช่ใน acid alcohol (6-24 hr) (acid alcohol= conc. HCl 0.5 ml + 70% alcohol 100 ml)
4. แช่ในน้ำกลั่น (ค้ำคั้น) อบแห้ง เก็บใส่กล่อง
5. แช่ใน acetone 2 นาที (ทำในตู้ควั่น)
6. ทิ้งให้แห้ง (air dry)
7. จุ่มในสารละลายที่ผสมระหว่าง 10 ml ของสารเคลือบสไลด์ และ 500 ml acetone ประมาณ 2 นาที
8. ล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
9. อบแห้ง และเก็บใส่กล่อง

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี 2, 4-D ร่วมกับ BA

Descriptives

Percent callus induction

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	5	65.5240	39.52253	17.67501	16.4503	114.5977	14.29	100.00
T2	5	82.8560	18.62690	8.33020	59.7277	105.9843	57.14	100.00
T3	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T4	5	40.0000	54.77226	24.49490	-28.0087	108.0087	.00	100.00
T5	5	96.0000	8.94427	4.00000	84.8942	107.1058	80.00	100.00
T6	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T7	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T8	5	96.6660	7.45505	3.33400	87.4093	105.9227	83.33	100.00
T9	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T10	5	96.6660	7.45505	3.33400	87.4093	105.9227	83.33	100.00
T11	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T12	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T13	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T14	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T15	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
Total	75	91.8475	23.54395	2.71862	86.4305	97.2644	.00	100.00

ANOVA

Percent callus induction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20618.927	14	1472.781	4.332	.000
Within Groups	20400.587	60	340.010		
Total	41019.514	74			

Percent callus induction

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a				
T4	5	40.0000		
T1	5	65.5240	65.5240	
T2	5		82.8560	
T5	5		96.0000	
T8	5		96.6660	
T10	5		96.6660	
T3	5		100.0000	
T6	5		100.0000	
T7	5		100.0000	
T9	5		100.0000	
T11	5		100.0000	
T12	5		100.0000	
T13	5		100.0000	
T14	5		100.0000	
T15	5		100.0000	
Sig.		.671	.202	

Duncan ^a	Treatment	N	Mean	Lower Bound	Upper Bound
	T4	5	40.0000		
	T1	5	65.5240		
	T2	5	82.8560		82.8560
	T5	5	96.0000		96.0000
	T8	5	96.6660		96.6660
	T10	5	96.6660		96.6660
	T3	5	100.0000		100.0000
	T6	5	100.0000		100.0000
	T7	5	100.0000		100.0000
	T9	5	100.0000		100.0000
	T11	5	100.0000		100.0000
	T12	5	100.0000		100.0000
	T13	5	100.0000		100.0000
	T14	5	100.0000		100.0000
	T15	5	100.0000		100.0000
	Sig.		1.000	.142	.231

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การชักนำยอดเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี 2, 4-D ร่วมกับ BA

Descriptives

Percent shoot induction

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	5	25.7140	43.33069	19.37808	-28.0882	79.5162	.00	100.00
T2	5	26.6660	21.45309	9.59411	.0285	53.3035	.00	57.14
T3	5	3.3340	7.45505	3.33400	-5.9227	12.5907	.00	16.67
T4	5	26.1900	34.74695	15.53931	-16.9540	69.3340	.00	83.33
T5	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T6	5	28.0940	39.56799	17.69534	-21.0362	77.2242	.00	83.33
T7	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T8	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T9	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T10	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T11	5	6.6660	14.90563	6.66600	-11.8418	25.1738	.00	33.33
T12	5	6.1900	8.51802	3.80938	-4.3865	16.7665	.00	16.67
T13	5	6.6680	9.13054	4.08330	-4.6691	18.0051	.00	16.67
T14	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T15	5	6.6660	14.90563	6.66600	-11.8418	25.1738	.00	33.33
Total	75	9.0792	20.80647	2.40252	4.2921	13.8663	.00	100.00

ANOVA

Percent shoot induction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8968.806	14	640.629	1.666	.088
Within Groups	23066.468	60	384.441		
Total	32035.274	74			

3. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี 2, 4-D ร่วมกับ BA

Descriptives

Number of shoot per explant

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	25	.8400	1.92959	.38592	.0435	1.6365	.00	7.00
T2	25	.4000	.76376	.15275	.0847	.7153	.00	3.00
T3	25	.0800	.40000	.08000	-.0851	.2451	.00	2.00
T4	25	1.0800	1.82392	.36478	.3271	1.8329	.00	5.00
T5	25	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T6	25	.8000	1.41421	.28284	.2162	1.3838	.00	5.00
T7	25	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T8	25	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T9	25	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T10	25	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T11	25	.0800	.27689	.05538	-.0343	.1943	.00	1.00
T12	25	.1200	.43970	.08794	-.0615	.3015	.00	2.00
T13	25	.0800	.27689	.05538	-.0343	.1943	.00	1.00
T14	25	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T15	25	.1600	.62450	.12490	-.0978	.4178	.00	3.00
Total	375	.2427	.89400	.04617	.1519	.3334	.00	7.00

ANOVA

Number of shoot per explant

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	46.197	14	3.300	4.701	.000
Within Groups	252.720	360	.702		
Total	298.917	374			

Number of shoot per explant

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a				
T5	25	.0000		
T7	25	.0000		
T8	25	.0000		
T9	25	.0000		
T10	25	.0000		
T14	25	.0000		
T3	25	.0800	.0800	
T11	25	.0800	.0800	
T13	25	.0800	.0800	
T12	25	.1200	.1200	
T15	25	.1600	.1600	
T2	25	.4000	.4000	.4000
T6	25	.8000	.8000	.8000
T1	25	.8400	.8400	
T4	25			1.0800
Sig.		.056	.092	.216

Duncan ^a					
T5	25	.0000			
T7	25	.0000			
T8	25	.0000			
T9	25	.0000			
T10	25	.0000			
T14	25	.0000			
T3	25	.0800			
T11	25	.0800			
T13	25	.0800			
T12	25	.1200			
T15	25	.1600			
T2	25	.4000	.4000		
T6	25	.8000	.8000	.8000	
T1	25	.8400	.8400	.8400	
T4	25				1.0800
Sig.		.171	.080		.269

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 25.000.

4. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสเมื่อเลี้ยงใน
สูตรอาหาร MS ที่มี IBA ร่วมกับ BA

Descriptives

Percent callus induction

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	5	73.3340	43.46122	19.43645	19.3698	127.2982	.00	100.00
T2	5	83.3320	28.86896	12.91059	47.4865	119.1775	33.33	100.00
T3	5	96.6660	7.45505	3.33400	87.4093	105.9227	83.33	100.00
T4	5	93.1420	9.60525	4.29560	81.2155	105.0685	80.00	100.00
T5	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T6	5	70.8340	40.61053	18.16158	20.4094	121.2586	16.67	100.00
T7	5	65.7140	48.02238	21.47626	6.0863	125.3417	.00	100.00
T8	5	87.5000	21.65064	9.68246	60.6172	114.3828	50.00	100.00
T9	5	97.1420	6.39068	2.85800	89.2069	105.0771	85.71	100.00
T10	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
T11	5	73.3340	43.46122	19.43645	19.3698	127.2982	.00	100.00
T12	5	94.1660	8.12344	3.63291	84.0794	104.2526	83.33	100.00
T13	5	90.0000	22.36068	10.00000	62.2355	117.7645	50.00	100.00
T14	5	80.9500	27.56259	12.32636	46.7265	115.1735	33.33	100.00
T15	5	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
Total	75	87.0743	26.48210	3.05789	80.9813	93.1672	.00	100.00

ANOVA

Percent callus induction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9697.719	14	692.694	.985	.479
Within Groups	42198.609	60	703.310		
Total	51896.329	74			

5. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การชักนำยอดเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี IBA ร่วมกับ BA

Descriptives

Percent Shoot induction								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	5	25.0000	31.18003	13.94413	-13.7151	63.7151	.00	75.00
T2	5	6.6680	9.13054	4.08330	-4.6691	18.0051	.00	16.67
T3	5	6.6680	9.13054	4.08330	-4.6691	18.0051	.00	16.67
T4	5	29.1400	40.92307	18.30136	-21.6727	79.9527	.00	85.70
T5	5	23.3260	36.51119	16.32830	-22.0086	68.6606	.00	83.33
T6	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T7	5	20.0000	44.72136	20.00000	-35.5289	75.5289	.00	100.00
T8	5	3.3340	7.45505	3.33400	-5.9227	12.5907	.00	16.67
T9	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T10	5	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T11	5	60.0000	39.64035	17.72770	10.7800	109.2200	14.29	100.00
T12	5	38.3340	46.24773	20.68261	-19.0901	95.7581	.00	100.00
T13	5	34.0000	42.19005	18.86796	-18.3859	86.3859	.00	100.00
T14	5	54.7620	43.96577	19.86209	.1713	109.3527	.00	100.00
T15	5	27.5000	43.66062	19.52562	-26.7118	81.7118	.00	100.00
Total	75	21.9155	34.60195	3.99549	13.9543	29.8767	.00	100.00

ANOVA

Percent Shoot induction					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26472.944	14	1890.925	1.826	.055
Within Groups	62126.876	60	1035.448		
Total	88599.821	74			

Percent Shoot induction

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a			
T6	5	.0000	
T9	5	.0000	
T10	5	.0000	
T8	5	3.3340	
T2	5	6.6680	
T3	5	6.6680	
T7	5	20.0000	
T5	5	23.3260	
T1	5	25.0000	
T15	5	27.5000	
T4	5	29.1400	
T13	5	34.0000	
T12	5	38.3340	
T14	5	54.7620	
T11	5	60.0000	
Sig.		.205	

Duncan ^a				
T6	5	.0000		
T9	5	.0000		
T10	5	.0000		
T8	5	3.3340		
T2	5	6.6680		
T3	5	6.6680		
T7	5	20.0000		20.0000
T5	5	23.3260		23.3260
T1	5	25.0000		25.0000
T15	5	27.5000		27.5000
T4	5	29.1400		29.1400
T13	5	34.0000		34.0000
T12	5	38.3340		38.3340
T14	5			54.7620
T11	5			60.0000
Sig.		.125		.101

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

6. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี IBA ร่วมกับ BA

Descriptives

Number of shoot per explant

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	30	.6333	1.51960	.27744	.0659	1.2008	.00	7.00
T2	30	.0667	.25371	.04632	-.0281	.1614	.00	1.00
T3	30	.0667	.25371	.04632	-.0281	.1614	.00	1.00
T4	30	.6667	1.21296	.22145	.2137	1.1196	.00	4.00
T5	30	.4667	1.10589	.20191	.0537	.8796	.00	5.00
T6	30	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T7	30	.7000	1.44198	.26327	.1616	1.2384	.00	4.00
T8	30	.0333	.18257	.03333	-.0348	.1015	.00	1.00
T9	30	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T10	30	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
T11	30	1.1333	1.16658	.21299	.6977	1.5689	.00	3.00
T12	30	.8667	1.47936	.27009	.3143	1.4191	.00	5.00
T13	30	.3333	.47946	.08754	.1543	.5124	.00	1.00
T14	30	1.3333	1.42232	.25968	.8022	1.8644	.00	5.00
T15	30	.3667	.66868	.12208	.1170	.6164	.00	2.00
Total	450	.4444	1.02433	.04829	.3495	.5393	.00	7.00

ANOVA

Number of shoot per explant

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	79.778	14	5.698	6.334	.000
Within Groups	391.333	435	.900		
Total	471.111	449			

Number of shoot per explant

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD ^a					
T6	30	.0000			
T9	30	.0000			
T10	30	.0000			
T8	30	.0333	.0333		
T2	30	.0667	.0667		
T3	30	.0667	.0667		
T13	30	.3333	.3333	.3333	
T15	30	.3667	.3667	.3667	
T5	30	.4667	.4667	.4667	
T1	30	.6333	.6333	.6333	.6333
T4	30	.6667	.6667	.6667	.6667
T7	30	.7000	.7000	.7000	.7000
T12	30	.8667	.8667	.8667	.8667
T11	30			1.1333	1.1333
T14	30				1.3333
Sig.		.220	.051	.077	.220

Duncan ^a	T6	30	.0000			
	T9	30	.0000			
	T10	30	.0000			
	T8	30	.0333			
	T2	30	.0667			
	T3	30	.0667			
	T13	30	.3333	.3333		
	T15	30	.3667	.3667		
	T5	30	.4667	.4667		
	T1	30	.6333	.6333	.6333	
	T4	30	.6667	.6667	.6667	
	T7	30	.7000	.7000	.7000	
	T12	30	.8667	.8667	.8667	.8667
	T11	30			1.1333	1.1333
	T14	30				1.3333
	Sig.		.111	.060	.069	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

7. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (สูตร MS ที่มี 2, 4-D ร่วมกับ BA)

Descriptives

increased callus weight

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T12	4	.1178	.02819	.01410	.0729	.1626	.09	.14
T13	4	.1043	.04549	.02274	.0319	.1766	.07	.17
T14	4	1.2483	.47470	.23735	.4929	2.0036	.86	1.91
T15	4	.9203	.67202	.33601	-.1491	1.9896	.32	1.85
Total	16	.5976	.63476	.15869	.2594	.9359	.07	1.91

ANOVA

increased callus weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.004	3	1.335	7.854	.004
Within Groups	2.039	12	.170		
Total	6.044	15			

increased callus weight

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a	T13	4	.1043
	T12	4	.1178
	T15	4	.9203
	T14	4	1.2483
	Sig.		.067
Duncan ^a	T13	4	.1043
	T12	4	.1178
	T15	4	.9203
	T14	4	1.2483
	Sig.		.964

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1-11 แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และไม่เจริญ

8. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (สูตร MS ที่มี IBA ร่วมกับ BA)

Descriptives

increased callus weight

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T7	4	1.4725	.53031	.26515	.6287	2.3163	1.08	2.26
T8	4	2.1130	.67899	.33950	1.0326	3.1934	1.56	3.07
T9	4	1.9030	.30037	.15018	1.4250	2.3810	1.66	2.29
T10	4	1.4878	.29563	.14782	1.0173	1.9582	1.23	1.89
Total	16	1.7441	.51400	.12850	1.4702	2.0180	1.08	3.07

ANOVA

increased callus weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.203	3	.401	1.744	.211
Within Groups	2.760	12	.230		
Total	3.963	15			

increased callus weight

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
Tukey HSD ^a	T7	4	1.4725
	T10	4	1.4878
	T9	4	1.9030
	T8	4	2.1130
	Sig.		.283
Duncan ^a	T7	4	1.4725
	T10	4	1.4878
	T9	4	1.9030
	T8	4	2.1130
	Sig.		.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1-6 และ 11-15 แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และไม่เจริญ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวอภิญา บุญคุ้ม

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810220079

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550
ประกาศนียบัตรบัณฑิตวิชาชีพครู	มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา	2553

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

หัวหน้างานหลักสูตรและการสอน ฝ่ายวิชาการ ครูประจำการสาขาชีววิทยา กลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ โรงเรียน มอ.วิทยานุสรณ์ ถนนกาญจนวนิช ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อภิญา บุญคุ้ม, ละม้าย ทองบุญ และอุปถัมภ์ มีสวัสดิ์. 2560. การตอบสนองทางสัญญาณในหลอดทดลองของชิ้นส่วน tTCL จากส่วนใต้ใบเลี้ยงของทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.).

การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 11 มหาวิทยาลัยมหิดล (นำเสนอแบบโปสเตอร์)

อภิญา บุญคุ้ม และอุปถัมภ์ มีสวัสดิ์. 2562. การเกิดสัญญาณในหลอดทดลอง และการตรวจสอบสารสำคัญในทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.). วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 6(3)