รหัสโครงการ SUT-304-44-12-51

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์องุ่น

(The Development of Tissue Culture Techniques for Clonal Propagation of Grape)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนโครงการจากทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2544 โดยมีนางสาวครองใจ ตะสิงห์ นักศึกษาบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร เป็นผู้ดำเนินการด้วยความอุตสาหะ กระผมใคร่ขอขอบคุณทั้งมหาวิทยาลัยและนางสาวครองใจ ตะสิงห์ มา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู
(หัวหน้าโครงการ)

บทคัดย่อ

กระบวนการขยายพันธุ์องุ่น (*Vitis vinifera*) ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากยอดอ่อน ใบ ตาข้าง และเมล็ดขององุ่นพันธุ์ชีราส พบว่า เมล็ดและตาสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ และสามารถขยายต่อให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้เป็นจำนวนมาก โดยพบว่ายอดอ่อนจะให้ประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์มากที่สุด ในอาหาร IM ที่ประกอบด้วยสารอาหารเสริมชนิด micronutrient เหล็ก และวิตามินจากสูตรอาหาร MS โดยใช้ฮอร์โมนพืชชนิด NAA ความเข้มข้น 0.05 μMร่วมกับ cytokinin ชนิด BAP (ความเข้มข้น 4.4μM, 8.8μM, และ 13.2μM ตามลำดับ) ยอดองุ่นพันธุ์ชีราสที่ถูกกระตุ้นและเลี้ยงมานาน 2-3 เดือนในอาหารชนิดนี้ จะทำให้เกิดการแตกยอดอ่อนเป็นจำนวนมาก จากนั้นจึงแยกยอดอ่อนมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี ฮอร์โมนNAA ความเข้มข้น 0.5 μM และ 0.9 μM kinetin พบว่ามีการสร้างยอดและรากออกมา ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า สามารถเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์องุ่นได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถนำมาเพาะปลูกในดินกระถางได้

Abstract

A regeneration procedure was developed for *in vitro* grown grape (*Vitis vinifera*). Shoot tips, leave, lateral bud and seeds were cultured for *in vitro* propagation of grapevine cultivar: Shiraz. Seed and bud were induced for shoot and root. Shoot tip was induced for proliferating culture and an efficient regeneration protocol was developed for leaf explants derived form *in vitro* plantlets. High frequency tissue culture could be obtained on a shoot tip. IM medium and microelement, iron source and vitamin of MS stock were used for this medium with 0.05 µM NAA in combination with the synthetic cytokinin BAP (4.4 µM, 8.8 µM and 13.2 µM, respectively). Shiraz was initiated form shoot tip and subcultured monthly on this medium. After 2-3 months, multiple shoot produced for propagation. Then, they were transferred to MS medium with 0.5 µM NAA and 0.9 µM kinetin to enhance shoot and root development. Finally, a complete regenerated plantlet could be successfully transferred pots.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ค

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ง

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....จ

สารบัญเรื่อง.....ฉ-ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญรูปภาพ.....ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์.....ญ

บทที่

1. **บทนำ**.....1-2
2. **เนื้อเรื่อง**.....3-9
    1. ความหมายและประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....3-4
    2. องค์ประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....4-5
    3. การชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อ.....6
    4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นและพืชชนิดอื่น ๆ 7-9
3. **วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ**.....10
    1. วัสดุ อุปกรณ์.....10
    2. วิธีการทดลอง.....11-13
        2.1 การเพาะเมล็ดปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง.....11
        2.2 การชักนำการเกิดแคลลัส.....11
        2.3 การชักนำการเกิดยอด และ/หรือ ราก.....11-12
        2.4 การทดสอบการขยายพันธุ์.....12
        2.5 การชักนำการเกิด multiple shoot.....12-13
4. **ผลการทดลอง**.....14-15
    4.1 ผลการทดลองที่ 1 การเพาะเมล็ดปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง.....14
    4.2 ผลการทดลองที่ 2 การชักนำการเกิดแคลลัส.....14
    4.3 ผลการทดลองที่ 3 การชักนำการเกิดยอด และ/หรือ ราก.....14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลการทดลองที่ 4 การทดสอบการขยายพันธุ์.....15
4.5 ผลการทดลองที่ 5 การชักนำการเกิด multiple shoot.....15
5. **สรุปผลการทดลอง**.....16-17
บรรณานุกรม.....18-20
ภาคผนวก.....21-29
ประวัติผู้เขียน.....30

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางผนวกที่

1. ตารางผนวกที่ 1 แสดงสูตรการเตรียม Stock อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่น.....27
2. ตารางผนวกที่ 2 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นจากส่วนตา.....28
3. ตารางผนวกที่ 3 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นเพื่อชักนำการเกิดแคลลัสจากส่วนใบ.....28
4. ตารางผนวกที่ 4 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นเพื่อชักนำการเกิดยอดและราก.....28
5. ตารางผนวกที่ 5 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นเพื่อชักนำการเกิดยอดจำนวนมาก.....29

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1-3	แสดงแคลลัสที่เกิดขึ้นจากอาหารสูตรที่ 1 สูตรที่ 2 และสูตรที่ 3	22
4-6	แสดงการชักนำให้เกิดยอดของอาหารสูตรที่ 1 สูตรที่ 2 และสูตรที่ 3	23
7-8	แสดงการแตกยอดขององุ่นหลังจากเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม	24
9	แสดงการย้ายองุ่นจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปลูกในถุงเพาะชำ	25
10	แสดงการเจริญเติบโตขององุ่นหลังจากนำถุงพลาสติกที่คลุมถุงเพาะชำออก	25
11-13	แสดงการเกิดยอดจำนวนมากจากการนำปลายยอดมาเลี้ยงในอาหาร IM1, IM2 และ MM ตามลำดับ	26

คำอธิบายสัญลักษณ์

คำย่อ	คำอธิบาย
2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	2-iso-pentyl adenine
4-PU	[N-(2-chloro-4-pyridyl)-*N*'-phenylurea]
B5	Gamborg และ คณะ
BAP	Benzylaminopurine
Chlorox	Sodium hypochlorite
GA_3 หรือ GA	Gibberellic acid
IAA	Indole-3-acetic acic
IBA	Indole butyric acid
LS	Linsmaier และ Skoog
MS	Murashige และ Skoog
N6	Chu และ คณะ
NAA	Naphthaleneacetic acid
NN	Nitch และ Nitch
NOA	(2-naphthoxyacetic acid)
SH	Schenk และHildebrandt
TDZ	thidiazuron
Tween 20	Polyethylene sorbitan
WH	Vacin และ Went

บทที่ 1
บทนำ

องุ่นเป็นพืชในสกุล *Vitis vinifera* มีมากกว่า 5,000 สายพันธุ์ทั่วโลก เป็นพืชยืนต้นประเภทไม้เลื้อย มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียและได้แพร่กระจายไปทั่วโลกโดยเฉพาะแถบเมดิเตอร์เรเนียน การปลูกองุ่นเพื่อผลิตไวน์มีมานานกว่า 5-6 พันปี การปลูกจะพบมาในแถบอิตาลี ฝรั่งเศส รัสเซีย สเปน เป็นต้น (Weaver, 1976)

สำหรับประเทศไทยเชื่อว่ามีการนำเข้ามาปลูกตั้งแต่สมัยรัชกาลที่ 5 และเริ่มมีการปลูกองุ่นอย่างจริงจังในสมัยรัชกาลที่ 7 แต่ยังไม่แพร่หลาย จนกระทั่งปี พ.ศ. 2493 หลวงสมานวนกิจได้นำองุ่นมาจากแคลิฟอร์เนียมาปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ต่อมาประมาณปี พ.ศ. 2506 อาจารย์ปวิณ ปุณณศรี และคณะได้นำองุ่นยุโรปหลายสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์คาร์ดินาล พันธุ์มัสแคทฮัมเบิร์ก พันธุ์โกลเดนมัสแคท พันธุ์เอมเปอเรอ มาปลูกและให้ผลดีเป็นที่น่าพอใจจึงมีการขยายการปลูกออกไปเป็นการค้าอย่างกว้างขวาง ซึ่งต่อมาองุ่นพันธุ์ไวท์มาละกาซึ่งมีขนาดของผลใหญ่กว่าและหวานกว่าพันธุ์เอมเปอเรอก็มีบทบาทในการค้ามากกว่า โดยในปัจจุบันการปลูกองุ่นนิยมปลูกกันทั่วทุกภาคยกเว้นภาคใต้ที่มีปริมาณน้ำฝนมากเกินไปทำให้ได้ผลผลิตต่ำและเกิดโรคได้ง่ายกว่า องุ่นที่มีการปลูกในประเทศขณะนี้สามารถให้ผลผลิตได้เร็วภายใน 1 ปีและสามารถบังคับให้มีผลผลิตได้ปีละ 2 ครั้ง โดยนิยมปลูกองุ่นทานสดมากกว่าองุ่นทำไวน์ อาจเนื่องจากกฎหมายการผลิตเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์เพิ่งได้เปิดเสรีไม่กี่ปีที่ผ่านมา (นันทกร, 2543)

การขยายพันธุ์องุ่นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำกิ่งชำ การตอน การติดตา การเพาะเมล็ด ซึ่งวิธีเหล่านี้ต้องใช้เวลานานและไม่สามารถทำได้ในปริมาณมากๆ โดยเฉพาะการเพาะเมล็ดจะไม่เหมาะกับการขยายพันธุ์เพื่อการค้าเพราะอาจกลายพันธุ์และใช้เวลานานกว่าจะทราบคุณภาพของผลองุ่น ประกอบกับการขายกิ่งพันธุ์องุ่นให้เกษตรกรในปัจจุบันยังไม่มีการควบคุมคุณภาพ อาทิเช่น โรค แมลง และสายพันธุ์ที่ตรงตามความต้องการเกษตรกร ประกอบกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมีการพัฒนาการปลูกและถ่ายทอดเทคโนโลยีการปลูกองุ่น โดยมีการรวบรวมสายพันธุ์องุ่นต่างๆ ทั่วโลกเป็นจำนวนมาก จึงมีความเหมาะสมในการจะพัฒนาการขยายพันธุ์พร้อมกับการปรับปรุงให้ได้พันธุ์ใหม่ๆที่เหมาะสมกับภูมิประเทศของไทยด้วยวิธีการต่างๆ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถรักษาลักษณะทางพันธุกรรมไว้ได้ดีในระดับหนึ่ง แต่ก็สามารถทำให้การผ่าเหล่าได้ง่ายเช่นกันด้วยสารเคมีหรือรังสีต่างๆ การผ่าเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดผลดีในแง่การพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นมีการพัฒนามาตั้งแต่ปี 1944 ถึงปัจจุบัน โดยส่วนใหญ่จะทำกับองุ่นสายพันธุ์ไวน์ในยุโรป อเมริกาและออสเตรเลีย เพื่อชักนำให้มีความต้านทานโรคต่างๆ เช่น

ราน้ำค้าง (downy mildew) และความสามารถทนเค็ม เป็นต้น (Mullins, 1987) นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการถ่ายโอนยีนต่างๆ เพื่อให้เกิด GMOs ขององุ่นสายพันธุ์ใหม่ที่ทนทานต่อโรคและแมลงมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ความยอมรับ GMOs ในปัจจุบันงานวิจัยด้านนี้ยังคงดำเนินการต่อไป ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นในประเทศไทยควรได้รับการพัฒนาเป็นของเราเอง ซึ่งจะเป็นวิธีการหนึ่งที่จะมีประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์ทั้งเพื่อการค้าคล้ายกับการขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจะเป็นรากฐานการทำวิจัยต่อเนื่องอื่นๆ อีกมากในอนาคตของมหาวิทยาลัยต่อไป อาทิเช่น การเลี้ยงเซลล์องุ่นในถังหมัก การผลิตสารที่ให้สี รส กลิ่น และ metabolites การปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการถ่ายโอนยีน การหลอมเซลล์โปรโทพลาส (protoplast fusion) การทำผ่าเหล่าเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ เป็นต้น

ดังนั้นขอบเขตของการวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อสามารถทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นที่ปราศจากโรคได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ในที่นี้คือ พันธุ์ ซีราส ซึ่งเป็นองุ่นแดง สำหรับทำไวน์แดง เป็นองุ่นที่มีคุณภาพดีในการทำไวน์แดง และสามารถปลูก และเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทยอีกสายพันธุ์หนึ่ง ไม่แพ้สายพันธุ์อื่น ๆ โดยวิธีการดำเนินการวิจัยนั้น จะนำชิ้นส่วนขององุ่นสายพันธุ์นี้ ไม่ว่าจะเป็นส่วนของเมล็ด ใบ ลำต้น หรือส่วนยอดมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปสู่การผลิตพันธุ์องุ่นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์และเป็นพื้นฐานการวิจัยทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชด้านพันธุวิศวกรรม นอกจากนี้ เพื่อสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีและให้บริการวิชาการแก่ชุมชนในการขยายพันธุ์องุ่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส ยอด และรากขององุ่น
2. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ในทางการค้า
3. เพื่อให้ได้เทคนิคที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการทำวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการถ่ายโอนยีนต่างๆเข้าสู่เซลล์องุ่น การหลอมเซลล์และการทำผ่าเหล่า ในอนาคต

บทที่ 2

1. ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช รวมทั้งเซลล์เดี่ยว ๆ ในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มมีมาตั้งแต่ ค.ศ. 1838 เมื่อนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน 2 คน คือ M.J. Schieiden และ T. Schwann มีแนวความคิดว่าเซลล์พืชสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ หลังจากนั้นมาได้มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายคนทำการศึกษาต่อมา จนถึงปัจจุบัน ซึ่งผู้ที่ได้รับยกย่องว่าเป็นบิดาแห่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ชาวเยอรมัน ชื่อ Gottlei Friedrich Johann Haberlandt (1854-1945) (อารีย์, 2541)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาสั้น เป็นการนำชิ้นส่วนของพืชใด ๆ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ เช่น การขยายพันธุ์กล้วยไม้ ไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงพืชผักบางชนิด ซึ่งปัจจุบันสามารถใช้เพื่อผลิตพืชในเชิงการค้าอย่างกว้างขวาง
2. การผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อโรค การผลิตพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราและแบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้ว จะแสดงอาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรียและเชื้อราเจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหาที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถขจัดทิ้งได้ ส่วนไวรัส จะทำการนำชิ้นส่วนพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อผลิตท่อนพันธุ์พืชที่ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อโรค ซึ่งไวรัสจะแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ โดยทางระบบท่อน้ำท่ออาหาร แต่การใช้ meristem ซึ่งยังไม่มีท่อน้ำท่ออาหารจะปลอดจากไวรัส เช่นในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อส่วนคัพภะ (embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด
3. การปรับปรุงพันธุ์ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน (tolerant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (resistant plants) ได้จากการจัดการเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือชักนำการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสี หรือสารเคมี เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพกรด การคัดเลือกสายพันธุ์ทนร้อน โดยเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง นอกจากนี้ จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอนเอ (DNA recombination) และการถ่าย

ยีน (gene transformation) ยังเปิดโอกาสในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชแต่ละชนิด

4. การผลิตยาและสารเคมีบางชนิด พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม ในบางกรณี เนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณน้อยมาก จึงต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น
5. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ
6. การเก็บรักษาพันธุ์พืช เป็นกระบวนการหนึ่งที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในระยะยาว โดยการเก็บเนื้อเยื่อแช่เย็นจัดในไนโตรเจนเหลว เพื่อหยุดยั้งกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชนั้น ๆ

2. องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารต่าง ๆ มักตั้งชื่อตามชื่อผู้คิดค้น เช่นสูตร Murashige และ Skoog (MS), White (WH), Vacin และ Went (VW), และ Knudson (K) เป็นต้น ซึ่งในแต่ละสูตรอาหารจะประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆไม่เท่ากัน ดังนั้นในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประกอบไปด้วยสิ่งต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ธาตุอาหาร มีทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์

สารอนินทรีย์ ประกอบไปด้วย แมคโครนิวเทรียนต์ (macronutrients) เป็นแร่ธาตุที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ N, P, K, Ca, Mg และ S ส่วนไมโครนิวเทรียนต์ (micronutrients) เป็นแร่ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ Fe, Zn, B, Mn, Cu, Co, Ni, Al, Mo และ I ซึ่งสารอนินทรีย์เหล่านี้มีความบริสุทธิ์มาก หากมีสิ่งอื่นเจือปนจะทำให้การอ่านผลการทดลองคลาดเคลื่อน หรืออาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อได้

สารอินทรีย์ ประกอบไปด้วยคาร์บอน กรดอะมิโน และวิตามิน ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่สำคัญคือ น้ำตาลซูโครส กรดอะมิโน ได้แก่ glutamine, asparagine, adenine, glycine และ casein hydrolysae เป็นต้น ส่วนวิตามิน เช่น thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, inositol, panthotheic acid, biotin เป็นต้น มีหน้าที่ในการเป็นตัวเร่งในการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เซลล์พืชเจริญเติบโตดีขึ้น

2.2 **ฮอร์โมน** หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตในพืช แบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มของ auxins, cytokinins, gibberellic acid, ethylenes, และ abscisic acid ดังนี้

auxins เป็นสารที่กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ทั้งในส่วนลำต้นและราก สารในกลุ่มนี้ได้แก่ IAA, NAA และ 2,4-D, 2,4,5-T, IBA, BAP ดังนั้นหน้าที่ของสารกลุ่มนี้คือ ช่วยในการยืดตัวของเซลล์ ส่งเสริมหรือชักนำการแบ่งเซลล์ ช่วยในเรื่องของการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ เพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงโดยเพิ่มการสังเคราะห์ mRNA ในนิวเคลียส นอกจากนี้ ออกซินบริเวณปลายยอดยังควบคุมการแตกออกของตาข้าง

cytokinins เป็นสารที่มีสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ 2ip, kinetin, และ zeatin สารในกลุ่มนี้หน้าที่ดังนี้ คือ เร่งการแบ่งเซลล์ ช่วยในกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ ช่วยชะลอการแก่ในใบ ช่วยการขยายตัวของเซลล์ และชักนำการสังเคราะห์รงควัตถุ

Gibberellic acid ใช้สารเหล่านี้ในการชักนำให้เกิดการยืดตัวของลำต้น การเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญหรือตา ช่วยทำลายการพักตัวของเมล็ด นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิด เป็นต้น

abscisic acid มีคุณสมบัติในการร่วงของใบและผล กระตุ้นการพักตัวของพืช และควบคุมการเปิดปิดของปากใบ เป็นต้น

ethylene เป็นแก๊สที่เกิดจากการเผาไหม้ของถ่านหิน น้ำมัน และสารพวกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสารนี้มีหน้าที่ ในการเร่งการสุกของผลไม้ กระตุ้นการเกิดรากฝอยและรากแขนง กระตุ้นการงอกของเมล็ด เป็นต้น

2.3 **อื่น ๆ** ในสูตรอาหารบางสูตรปรากฏว่าอาหารเสริมอื่นมีผลต่อการเติบโตของเนื้อเยื่อ เช่น น้ำผลไม้ น้ำมะพร้าว ผงถ่าน (activated charcoal) และ yeast extract การใช้ผงถ่าน ช่วยดูดซับสารพิษของรงควัตถุสีดำและสีน้ำตาล ซึ่งส่วนมากคือ สารประกอบพวก ฟีนอล และเมลานิน นอกจากนี้ยังดูดพวกสารพิษที่ไม่มีสีอีกด้วย ทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

3. การชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อ

การนำชิ้นส่วนใด ๆ ของพืช (explant) มาเลี้ยงในอาหารจะเกิดเนื้อเยื่อ (tissue) ขึ้นหลายแบบจากเนื้อเยื่อปกติของพืชที่เป็น organized tissue เช่น ราก ลำต้น ใบ หรืออวัยวะอื่นๆ สามารถถูกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น unorganized tissue เช่น แคลลัส ซึ่งเป็น undifferentiated mass ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีฮอร์โมนต่าง ๆ เป็นสารกระตุ้นได้ ดังนั้น ในการชักนำเนื้อเยื่อสามารถแบ่งได้ ดังนี้

1. callus แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์ ที่มีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดยั้ง ความต้องการฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัสของพืช ขึ้นกับแหล่งหรือชนิดของเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อบางอย่างหรือพืชบางชนิดที่มีชั้นเซลล์ที่เป็น cambium สามารถเกิดแคลลัสได้โดยไม่ต้องการฮอร์โมนใด ๆ ในอาหารเลย แต่ส่วนใหญ่ต้องการหนึ่งชนิดหรือมากกว่า ชิ้นส่วนของพืชที่เหมาะสมกับการนำมาเพาะเลี้ยง คือ ส่วนที่ยังอ่อน เพราะว่าเซลล์ยังอยู่ในระยะกำลังเจริญมีธาตุอาหารบริบูรณ์และมีฮอร์โมนมาก เช่น ใบอ่อน ยอดเนื้อเยื่อเจริญ และใบเลี้ยงในเมล็ด หัวพืชพวกมันฝรั่ง มันเทศ และแครอท ซึ่งเป็นที่สะสมอาหารเหมาะแก่การชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี

2. Embryogenesis หรือ somatic embryogenesis คือ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกาย เป็นคำตรงกันข้ามกับคำว่า zygotic embryogenesis ที่ได้จากการปฏิสนธิของเซลล์ไข่ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารที่เหมาะสมจะได้เนื้อเยื่อที่เป็นแคลลัสและบางส่วนจะพัฒนามีรูปร่างคล้าย ๆ embryo คือ มีส่วน ที่จะกลายเป็นรากและยอด โดยมีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ จากเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นรูปกลม (globular-shaped) รูปหัวใจ (heart-shaped) รูปตอร์ปิโด (torpedo-shaped) และต้นกล้า ตามลำดับ เช่น แคลลัสของแครอท หรือข้าวโพดที่จะกลายเป็นต้นพืชปกติได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม กระบวนการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดเนื้อเยื่อที่เหมือน embryo (embryo-like structure) นี้จึงเรียกว่า embryogenesis

3. Organogenesis คือ กระบวนการ การเกิดส่วนใด ๆ ของต้นพืช เช่น ยอด หรือราก ซึ่งการเกิดยอดหรือรากนี้เกิดจากจุดกำเนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่จาก shoot bud เช่น การเลี้ยงใบแอฟริกันไวโอเลต บนอาหาร MS ที่ใส่ 0.1 mg/L NAA ร่วมกับ 5.0 mg/l BAP และ 125 mg/L adenine sulfate ได้ยอดขนาดเล็ก ๆ จำนวนมากเกิดขึ้นบนแผ่นใบ (อารีย์ , 2541)

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อนและพืชอื่นๆ

พืชแต่ละชนิดสามารถถูกชักนำการเกิดเนื้อเยื่อในแต่ละรูปแบบได้แตกต่างกัน ไปตามวัตถุประสงค์ ของงาน ทั้งการชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น และการชักนำให้เกิดราก เพื่อการขยายพันธุ์ในเชิงการค้า การปรับปรุงสายพันธุ์ การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์พืช เป็นต้น บุญเทือง ในปี 2522 และ กรึก และคณะในปี 2536 ได้ชักนำให้อ้อยเกิดยอดจากตาข้าง หรือตายอดโดยตรงไม่ต้องผ่านแคลลัส ซึ่งสูตรอาหารที่ใช้คือ อาหารแข็ง MS ที่มี IAA 1-2 mg/l และ kinetin 0.1-0.2 mg/l และ NAA 0.02 mg/l จะได้หน่ออ้อยภายในเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อถึง 50 วันก็แบ่งออกเลี้ยงขยายจำนวน และนำออกมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี IBA 1 mg/l เพื่อการชักนำให้เกิดราก

ข้าวโพด สามารถชักนำให้เกิดต้นได้โดยการย้ายลงอาหาร N6 ที่มี BAP 3.5mg/l หรือ MS ที่มี BAP 3 mg/l และ NAA 0.4 mg/l เกิดเป็นต้น หลังจากเลี้ยงแคลลัสบนอาหาชักนำประมาณ 5 วัน ก็ย้ายลงอาหารชนิดเดียวกันแต่ไม่มีฮอร์โมน เมื่อวางไว้ให้ได้แสงประมาณ 2-3 สัปดาห์ ก็สามารถแยกต้นปลูกได้ (Duncan และ Widholm, 1988 และ Laursen et al, 1994อ้างถึงใน อารีย์ วรัญญูวัฒก์, หน้า 58)

มะละกอ ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้ส่วนของรากมะละกอในอาหาร MS ครึ่งสูตรที่มี IBA 2.0 mg และ BAP 0.5 mg/l จะได้แคลลัสภายใน 5 วัน ส่วนอื่น ๆ เช่น ใบ ก้านดอก และลำต้นอ่อน จะเกิดแคลลัสภายใน 10-15 วัน เมื่อย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน (MS + SH vitamin + 800 mg/ l CH + 500 mg/ l malt extract + 50.0 mg/l adenine sulphate + 100 mg/l inositol + 3 % sucrose) แต่มี IBA 0.5 mg/l และ kinetin 1 mg/l จะให้ยอดมากถึง 10 ยอดต่อชิ้นของแคลลัส ย้ายยอดลงอาหารที่มี IBA 2.0mg/l เป็นเวลา 12 วัน เพื่อให้เกิดราก ซึ่งสามารถย้ายลงปลูกในดินได้ (Mondal et al, 1994 อ้างถึงใน อารีย์ วรัญญูวัฒก์, หน้า 60)

จารุวรรณ จาติเสถียร สุภาพ สุนทรานนท์ และ หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ (2544) ได้ศึกษาการชักนำ embryogenic callus ในทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ปรากฏว่า อายุที่เหมาะสมในการนำ ovule มาเพาะเลี้ยงคือ ระยะดอกบานประมาณ 8-20 วัน หรือ 1-3 สัปดาห์ ส่วนระยะอื่นไม่สามารถเกิด embryogenic callus ได้ ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมหลังจากเปรียบเทียบจาก 5 สูตร พบว่า สูตรอาหารพื้นฐาน MT ใส่ malt extract 500mg/l, IAA 0.1 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l ส่วนอีกสูตรคือ MS ที่มี NAA 1.0 mg/l และนอกจากนี้ยังพบว่า การถ่ายอาหารยังมีผลต่อการเจริญของ embryogenic callus ได้ พบว่าการถ่ายอาหารที่เหมาะสมคือ ทุก 3 สัปดาห์ จะรักษาสภาพของ embryogenic callus ได้ดี หากใช้ระยะเวลานานกว่านี้ embryogenic callus จะปล่อยสารสีน้ำตาลซึ่งเป็นสารพวก phenolic compound และแพร่ไปในอาหาร และยับยั้งการเจริญของ embryogenic callus ด้วย

คำนูญ กาญจนภูมิ นงนารถ ชะนะแดง และ ศศิธร ทองมา (2544) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลีกล้วยพันธุ์หอมทองและปลายยอดของกล้วยพันธุ์น้ำหว้า ในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มี BAP 22.0 μM กับน้ำมะพร้าว 15 % พบว่าสามารถชักนำการเกิดการสร้างกิ่งแขนงบนสูตรอาหารดังกล่าว เมื่อตัดแยกกิ่งแขนงเดี่ยว ๆ แล้วย้ายบนอาหารสูตรเดิม พบว่าสามารถชักนำให้เกิดราก และสามารถย้ายต้นที่สมบูรณ์ลงในดิน

วิชาดา สุ่นปุ่ย และ คำนูญ กาญจนภูมิ (2545) ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นแอฟริกันไวโอเลต จากส่วนของใบ ก้านใบ ในอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐาน MS พบว่าชิ้นส่วนใบและก้านใบให้ความถี่ในการเกิดยอดสูง จากชิ้นส่วนก้านใบคือสูตร MS ที่มี BAP 3.0 mg/l เพียงอย่างเดียว หรือ NAA 1.0 mg/l ร่วมกับ BAP 3.0mg/l ส่วนใบที่ความเข้มข้นของ TDZ 0.5 mg/l สามารถเกิดยอดรวมมากที่สุด แล้วนำยอดที่ได้มาชักนำการสร้างรากบนอาหารสูตร 1/2 MS หรือบนอาหารสูตา MS ที่มี IBA 3.0 mg/l สามารถชักนำการเกิดรากได้ดี และต้นแอฟริกันที่สมบูรณ์สามารถเจริญได้ดี เมื่อนำไปปลูกในเรือนกระจก

สมปอง เตชะโต สมัชชา นาคสมบัติ และ จารุวรรณ บุญศิริ (2545) ได้ศึกษาเกี่ยวกับพันธุ์และชิ้นส่วนของหน้าวัวในการสร้างแคลลัสและยอด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม BAP ร่วมด้วย TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 mg/l ผลปรากฏว่า พันธุ์ ทรอปิกานา ให้การสร้างแคลลัสโดยเฉลี่ยในทุกชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด 82 % รองลงมาเป็นพันธุ์แชมเปญ และพันธุ์ควงสมรตามลำดับ ชิ้นส่วนก้านใบให้การสร้างแคลลัสสูงสุด (82%) รองลงมาแผ่นใบ (57%) ปลีดอก (55%) และจานรองดอก (18%) แคลลัสจากชิ้นส่วนแผ่นใบให้การสร้างยอดได้ดี เมื่อใช้ BAP เข้มข้น 0.25-0.5 mg/l สำหรับชิ้นส่วนก้านใบตอบสนองต่อ BAP ความเข้มข้น 0.5-0.75 mg/l ในขณะที่ชิ้นส่วนจานรองดอกและปลีดอกไม่สามารถชักนำยอดได้ สำหรับการขยายพันธุ์หน้าวัวโดยใช้แคลลัสนั้น ใช้แคลลัสจากใบ ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำยอด ตัดแยกไปชักนำรากในอาหารสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต แล้วสามารถย้ายลงปลูกในกระถางได้

M. Nakano, Y. Hoshino และ M. Mii (1994) ทำการเพาะเลี้ยงส่วนใบขององุ่นพันธุ์ Koshusanjaku เพื่อการถ่ายยีน โดยใช้สูตรอาหาร Nitsch's medium ซึ่งประกอบด้วย 5.0 μM 2,4-D และ 5.0 μM 4-PU สำหรับการชักนำ embryogenic callus และ 30 g/l ของ Sucrose และ 2.0 g/l ของ gellan gum หลังจากนั้น 40 วันจากการที่เพาะเลี้ยงในที่มืด ใบองุ่นจะเริ่มเกิด callus ก็ทำการย้าย callus ไปในอาหารสูตร Nitsch's medium ที่ปราศจาก vitamins, inositol และ glycine แต่ใช้ 1.0 μM 2,4-D, 30 g/l sucrose และ 2.0 g/l gellan gum โดยใช้เวลา 4-5 เดือน และจะเจริญไปเป็น somatic embryo และเจริญไปเป็นต้นต่อไป

Margit Harst (1995) ได้เพาะเลี้ยงองุ่นจากใบ โดยใช้สายพันธุ์ seyval blanc ในการชักนำ somatic embryo โดยใช้สูตรอาหาร NN69 ร่วมด้วย 20.0 μM NOA และ 4.0 μM TDZ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการชักนำการเกิด somatic embryo

Z.N. Yang, I.L. Ingelbrecht, E. Louzada, M. Skaria และT.E. Mirkov (2000) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดองุ่นพันธุ์ Rio Red เพื่อการถ่ายยีน โดยใช้สูตรอาหาร 1/2 MS, B5 vitamin, 2%sucrose หลังจากนั้น 3-4 สัปดาห์ เมล็ดจะงอกเพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีน

J.R. Kikkert, G.S. Ali, P.G. Wallace และB. Reisch (2000) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นจาก anther สำหรับพันธุ์ Merlot และ จากส่วนของ ovaries สำหรับพันธุ์ Chardonnay เพื่อชักนำการเกิด embryogenic cell พบว่าพันธุ์ Merlot เลี้ยงบนอาหารสูตร NN ร่วมกับ 5.0 μM 2,4-D และ1.0 μM BAP หรือ 2.5 μM 2,4-D, 2.5μM NOA (β-naphthozyacetic acid) ร่วมกับ 5.0 μM 4-PU สำหรับพันธุ์ Chardonay สามารถชักนำการเกิด embryogenic cell

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1 องุ่นพันธุ์ ชีราส (shiraz) จากแปลงปลูกฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา

1.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ คือ MS (Murashige and Skoog, 1962) และ NN (Nisch and Nisch, 1969) ดังตารางภาคผนวกที่ 1

1.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับฟอกทำความสะอาดเนื้อเยื่อก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่ เอธิทแอลกอฮอล์ 95 % คลอรอกซ์ 6% และสารจับใบ ทวีน-20

1.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นต่อการชักนำการเกิดแคลลัส ยอด และราก คือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole butylic acid (BAP), naphthaleneacetic acid (NAA), [N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea] (4-PU), kinetin, Gibberellic acid (GA_3)

1.5 เครื่องมือสำหรับการเตรียมอาหารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ เช่น เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างหยาบ 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ช้อนตักสารเคมี เครื่องคน (magnetic stirrer) ขวดแก้วสำหรับใส่ stock สารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) เครื่องไมโครเวฟ หม้อนึ่งความดัน (autoclave) เตาอบความร้อน (hot oven) ตู้เย็น เยื่อกรอง (Millipore filter) และเครื่องแก้วสำหรับชั่ง-ตวงสารเคมี

1.6 เครื่องมือสำหรับตัดและถ่ายย้ายเนื้อเยื่อ เช่น ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet) มีดผ่าตัดแบบต่าง ๆ ตะเกียง ปากคีบ (forcep) ขนาดและแบบต่าง ๆ จานแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

1.7 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ 25±3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน และชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ

1.8 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ เช่น กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ถ่ายรูปได้ และกล้องดิจิตอล

2. วิธีการทดลอง แบ่งเป็น 5 วิธี

1. การเพาะเมล็ดปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง

นำเมล็ดอ่อนที่ได้จากผลอ่อนที่สุกแล้ว มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย ใน 2% sodium hyperchloride หรือ คลอร็อก พร้อมด้วย Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 รอบ เสร็จแล้วย้ายเมล็ดอ่อนใส่ 1.5 % H_2O_2 นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเหมือนกัน แล้วนำไปวางบนกระดาษทิชชู ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับให้แห้ง หลังจากนั้นย้ายเมล็ดอ่อนไปใส่ใน 1000 ppm GA_3 นาน 24 ชั่วโมงเช่นกัน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบที่นึ่งฆ่าเชื้อ เสร็จแล้วนำไปวางบนกระดาษทิชชู ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อซับให้แห้ง หลังจากนั้นย้ายเมล็ดอ่อนไปวางบนกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อและมีความชื้น นำไปวางในที่มืด อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง

2. การชักนำการเกิดแคลลัส (callus induction)

นำใบอ่อนพันธุ์ชีราส (shiraz) จากแปลงปลูกที่ไม่อ่อนและไม่แก่จนเกินไป นำมาล้างฆ่าเชื้อด้วย 70% แอลกอฮอล์ นาน 10 วินาที เสร็จแล้วนำไปแช่ใน 1% sodium hyper chloride พร้อมด้วย Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเบา ๆ นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 รอบ แล้วนำไปวางบนกระดาษทิชชู ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน เพื่อซับให้แห้ง เมื่อซับน้ำจากใบอ่อนออกแล้ว ทำการตัดใบอ่อนให้มีขนาด 1 cm^2 แล้วนำไปวางบนอาหารเพื่อชักนำ callus นั่นคือ สูตรอาหาร MS และ สูตรอาหาร NN เพื่อเปรียบเทียบกัน ดังนี้ สูตรที่ 1 คือ MS ตามด้วยความเข้มข้นของฮอร์โมน 2.5 µM 2,4-D และ 5.0 µM BAP สูตรที่ 2 คือ MS ตามด้วยความเข้มข้นของฮอร์โมนดังนี้ คือ 4.5 µM 2,4-D และ 0.4 µM BAP (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2540) และสูตรที่ 3 NN ตามด้วยความเข้มข้นของฮอร์โมนดังนี้ คือ 5.0 µM 2,4-D และ 5 µM 4- PU (Nakano, 1994) และใช้ 1.5 % agar gel, 3 % sucrose และ pH 5.8 เสร็จแล้วนำไปวางไว้ที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการณ์เกิดแคลลัสของแต่ละสูตรอาหารเปรียบเทียบกัน พร้อมกับบันทึกผลการทดลอง

3. การชักนำการเกิดยอด และ/หรือ ราก (regeneration)

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด นำมาชักนำให้เกิดยอด และ/หรือ ราก โดยหาความเข้มข้นของฮอร์โมนต่าง ๆ คือ BAP และ NAA สูตรอาหารที่ใช้คือ MS, 1.5 % agar gel, 3 % sucrose และ pH 5.8 สูตรอาหารที่ใช้ชักนำยอดมีดังนี้ สูตรที่ 1 คือ 0.1µM NAA

และ 2.5μM BAP (Yamamoto et al., 2000) สูตรที่ 2 คือ 5.37 μM NAA และ 22.19 μM BAP(Marchenko, 1991) สูตรที่ 3 คือ 5.0 μM BAP สูตรที่ 4 คือ NN, 10.7 mM NAA และ 0.9 mM BAP (Chieng, 1996) 1.5 % agar gel, 3 % sucrose และ pH 5.8 และฮอร์โมนที่ใช้คือ 10.7 mM NAA และ 0.9 mM BAP เมื่อทำการย้ายแคลลัสใส่อาหารแต่ละสูตรแล้ว นำไปวางไว้ที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสแต่ละสูตรอาหาร

4. การทดสอบการขยายพันธุ์

นำกิ่งอ่อนที่ยังไม่แก่และไม่อ่อนจนเกินไป นำมาล้างฆ่าเชื้อด้วย 70% แอลกอฮอล์ นาน 20 วินาที เสร็จแล้วนำไปแช่ใน 1% sodium hyper chloride พร้อมด้วย Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที และ 5 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 รอบ แล้วนำไปวางบนกระดาษทิชชู ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน เพื่อซับให้แห้ง หลังจากนั้น ทำการตัดให้เหลือ 1 ตา แล้วนำไปวางบนอาหารสูตร MS 1.5 % agar gel, 3 % sucrose และ pH 5.8 และฮอร์โมนที่ใช้มีดังต่อไปนี้ 0.5 μM NAA และ 0.9 μM kinetin เสร็จแล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการณ์การแตกยอดและราก

เมื่อมีการเกิดยอดและรากแล้ว จะทำการตัดยอดองุ่น หรือส่วนลำต้นให้มีตาติดมาประมาณ 2-3 ตา นำมาวางในอาหารสูตรเดิม หลังจากนั้น สังเกตุดูว่าองุ่นจะสามารถเจริญเติบโตได้หรือไม่ พร้อมกันนี้ก็ทำการย้ายลงไปปลูกในถุงเพาะชำ เพื่อสังเกตการณ์เจริญเติบโตขององุ่นเช่นกัน

5. การชักนำการเกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot)

นำยอดองุ่นมาทำการล้างฆ่าเชื้อด้วย 70% แอลกอฮอล์ นาน 10 วินาที เสร็จแล้วนำไปแช่ใน 1% sodium hyper chloride พร้อมด้วย Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเบา ๆ นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 รอบ แล้วนำไปวางบนกระดาษทิชชู ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน เพื่อซับให้แห้ง ตัดเฉพาะส่วนปลายยอดขององุ่นไปวางบนอาหาร ซึ่งประกอบด้วย KNO_3 (1050 mg/l), NH_4NO_3 (400 mg/l), KH_2PO_4 (200 mg/l), $MgSO_47H_2O$ (400 mg/l), $CaNO_3$ (750 mg/l), NaH_2PO_4 (200 mg/l), microelement และ vitamins ใช้จากสูตร MS และ 3% sucrose, 0.7% agar gel, pH 5.8 (Mezzetti et al., 2002) สูตรอาหารที่ 1 (เรียกว่า IM1) จะประกอบด้วย

ฮอร์โมน 0.05 μM NAA และ 4.4 μM BAP เมื่อครบ 30 วัน ก็ทำการย้ายใส่อาหารสูตรเดิม แต่เพิ่มปริมาณ BAP เป็น 8.8 μM (เรียกว่า IM2)หลังจากนั้นอีก 30 วัน ก็ทำการย้ายใส่อาหารสูตรเดิม แต่เพิ่มปริมาณ BAP เป็น 13.2 μM (เรียกว่า MM) หลังจากนั้นทุกเดือนก็จะทำการ subculture ใส่อาหารสูตร MM นี้ ทุกเดือน โดยทำการตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ $1cm^2$ ทั้งหมดนี้นำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การทดลองที่ 1: การเพาะเมล็ดปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง

หลังจากฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดองุ่นแล้ว นำเมล็ดองุ่นซึ่งได้มาจากต่างประเทศ ไปไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25-28 องศา นาน 3-4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมาก และมีการปนเปื้อนของเชื้อราสูงมาก

2. การทดลองที่ 2: การชักนำการเกิดแคลลัส (callus induction)

จากการนำใบองุ่นมาชักนำการเกิดแคลลัส จากการทดลอง 3 สูตรอาหาร ปรากฏว่าแคลลัสจะเริ่มปรากฏให้เห็นตั้งแต่อาทิตย์ที่ 2-3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขององุ่น และพบว่า อาหารสูตรที่ 3 นั่นคือ จากสูตรอาหาร NN ตามด้วยความเข้มข้นของฮอร์โมนดังนี้ คือ 5.0 μM 2,4-D และ 5.0 μM 4- PU มีการเกิดของแคลลัสดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจาก 3 สูตรนี้ ดังรูปที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นการเกิดแคลลัสจากอาหารชักนำในแต่ละสูตร จากสูตรที่ 1 สูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 ตามลำดับ การชักนำแคลลัสจากสูตรที่ 1 และ 2 ลักษณะของแคลลัสจะเป็นกลุ่มก้อนเล็ก ๆ ส่วนสูตรที่ 3 ลักษณะของแคลลัสจะเป็นกลุ่มก้อนสีขาวขนาดใหญ่

3. การทดลองที่ 3: การชักนำการเกิดยอด และ/หรือ ราก (regeneration)

หลังจากที่ได้แคลลัสแล้ว จากสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นสูตรที่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสดีที่สุด ก็จะนำแคลลัสจากสูตรนี้ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 เดือน นำมาย้ายใส่สูตรอาหารเพื่อชักนำยอดในแต่ละสูตรอาหาร ปรากฏว่า หลังจากที่ย้ายมาประมาณ 20 วัน การเจริญของแคลลัสมีลักษณะแตกต่างกัน ดังนี้ สูตรอาหารที่ 1และ3 แคลลัสมีการแตกเพิ่มบ้างเล็กน้อย และแคลลัสเริ่มมีสีดำ และเห็นความแตกต่างกันชัดเจนเมื่อแคลลัสมีอายุได้ 52 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5 และสูตรอาหารที่ 4 แคลลัสตายหมด ส่วนสูตรอาหารที่ 2 คือ 5.37 μM NAA และ 22.19 μM BAP มีการแตกของแคลลัสเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และลักษณะของแคลลัสเริ่มมีสีเขียว มีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อมีอายุ 52 วัน ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเพื่อจะกลายไปเป็นยอดองุ่นต่อไป

4. การทดลองที่ 4: การทดสอบการขยายพันธุ์

หลังจากที่นำตาอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS 1.5 %, agar gel, 3 % sucrose และ pH 5.8 และฮอร์โมนที่ใช้มีดังต่อไปนี้ 0.5 μM NAA และ 0.9 μM kinetin ประมาณ 2- 3 อาทิตย์ ก็จะเริ่มแตกยอด และในสัปดาห์ที่ 3-4 ก็จะเริ่มออกรากเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8 เมื่อต้นอ่อนเจริญเติบโตจนเต็มขวด มีการเกิดยอดและรากแล้ว ก็จะทำการตัดยอดอ่อน หรือส่วนลำต้นให้มีตาติดมา ประมาณ 2-3 ตา นำมาวางในอาหารสูตรเดิม ปรากฏว่า อ่อนสามารถเจริญเติบโตได้ และสามารถออกรากได้เช่นเดียวกัน หลังจากนั้น ได้นำต้นอ่อนจากขวดมาเพาะเลี้ยงในถุงเพาะชำ โดยทำการคลุมด้วยถุงพลาสติก เพื่อให้อ่อนมีความชื้นอยู่ เหมือนกับอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พร้อมกันนี้ก็ทำการเจาะรูในส่วนของถุงพลาสติก เพื่อให้อ่อนค่อยปรับสภาพกับสภาพอากาศภายนอกได้ ปรากฏว่า อ่อนสามารถเจริญเติบได้ ดังรูปที่ 9 เมื่ออ่อนเริ่มปรับสภาพได้แล้ว ประมาณ 14 วัน ก็ทำการเปิดปากถุงพลาสติกออก เพื่อให้อากาศจากภายนอกเข้าได้ ประมาณ 3-4 วัน ก็นำถุงพลาสติกออก ปรากฏว่า อ่อนยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดีเหมือนต้นที่ปลูกจากการเพาะชำจากแปลงปลูกที่ทำการขยายพันธุ์ ดังรูปที่ 10

5. การทดลองที่ 5: การชักนำการเกิดจำนวนมาก (multiple shoots)

เมื่อตัดปลายยอดอ่อนมาลงในอาหารสูตร IM1 ยอดอ่อนก็จะเจริญเติบโต ดังรูปที่ 11 หลังจากนั้น 1 เดือน เมื่อย้ายลงสูตรอาหาร IM2 ก็จะเกิดยอดจำนวนมากขึ้น ดังรูปที่ 12 หลังจากนั้นอีก 30 วัน เมื่อย้ายยอดอ่อนนี้ไปบนสูตรอาหาร MM ปริมาณยอดอ่อนก็จะเพิ่มมากขึ้นอีก ดังรูปที่ 13 ซึ่งจากทั้ง 3 สูตรอาหารนี้ เพื่อชักนำการเกิด กลุ่มก้อนของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic bulk) หลังจากนั้นอีก 30 วัน ก็จะทำการ subculture ลงในอาหารสูตร MM นี้ เพื่อเป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ และเพื่อการขยายพันธุ์ โดยนำยอดอ่อนจำนวนหลายยอดนี้ นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS 1.5 % agar gel, 3 % sucrose และ pH 5.8 และฮอร์โมนที่ใช้มีดังต่อไปนี้ 0.5 μM NAA และ 0.9 μM kinetin ปรากฏว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง สามารถเจริญเติบโตได้เหมือนต้นที่เลี้ยงจากส่วนตาของอ่อน

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองทำการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อองุ่นสายพันธุ์ซีราส (shiraz) เพื่อการขยายพันธุ์จาก 5 วิธี พบว่า วิธีที่นำส่วนปลายยอด เพื่อชักนำการเกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot) นั้น เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้สูตรอาหาร IM และใช้ส่วนของ micro element, Iron source และ vitamin จากสูตรอาหาร MS และใช้ฮอร์โมน 0.05 μM NAA และ BAP เพิ่มขึ้นเป็น 4.4 μM, 8.8 μM และ 13.2 μM ตามลำดับ ทำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 2-3 เดือน ก็จะได้ยอดจำนวนมาก หลังจากนั้น จาก 1 ยอด แล้วทำการย้ายยอดองุ่นที่ได้นี้ ไปลงในสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการชักนำต้นและราก พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มี 0.5 μM NAA และ 0.9 μM kinetin, 1.5% agar gel, 3% sucrose และ pH 5.8 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ แล้วมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการขยายพันธุ์ขององุ่นโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนการนำส่วนตาขององุ่นมาชักนำให้เกิดต้น ใช้ระยะเวลา 1 เดือนถึงจะสามารถเพิ่มปริมาณได้อีก ประมาณ 2-3 ต้น จาก 1 ต้นที่ได้ และการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของใบ เพื่อชักนำให้เกิดยอดหรือรากนั้น แคลลัสมีการพัฒนาเป็นรูปร่างที่กลมใหญ่ ที่เรียกว่า embryoid และ embryoid จะพัฒนาต่อ โดยสร้างคลอโรฟิลล์ ทำให้ embryoid เกิดสีเขียว แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นหรือรากได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสูตรอาหารที่ใช้ยังไม่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดหรือราก หรืออาจจะต้องใช้ระยะเวลาที่มากกว่านี้ เพื่อที่จะให้พัฒนาไปเป็นยอดหรือราก หรืออาจจะต้องทดสอบกับสายพันธุ์อื่น ๆ เพราะการเกิดเป็นยอดหรือรากขององุ่นแต่ละสายพันธุ์จะใช้สูตรอาหารที่ไม่เหมือนกัน หรือบางสายพันธุ์อาจจะไม่สามารถชักนำการเกิดยอดหรือรากที่มาจากส่วนของแคลลัสได้ ส่วนการชักนำให้เกิดต้นจากส่วนของเมล็ดนั้น เมล็ดองุ่นเป็นสายพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศ เมล็ดมีการงอกน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเมล็ดที่ได้นั้นอาจมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำ เนื่องจากไม่ได้นำมาจากต้นแล้วทำการเพาะเลี้ยงทันที หรือเมล็ดอาจอยู่ในระยะพักตัว นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อราสูงมาก อาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ใช้ในการทำความสะอาดเมล็ดก่อนที่จะนำไปเพาะนั้นมีปริมาณต่ำเกินไป ทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อราได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไป ควรที่จะนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงทันทีหลังจากที่นำมาจากต้น และใช้ความเข้มข้นของสารคลอร็อกมากขึ้น เพื่อให้ปริมาณของเชื้อราลดลง

ดังนั้น วิธีที่ดีที่สุดสำหรับการขยายพันธุ์อุ่นสายพันธุ์ชีราสในเชิงพาณิชย์ และเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชทางด้านพันธุวิศวกรรมนั้น คือ การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

ภาคผนวก

กรึก นฤทุม และคณะ. (2536). ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 27: 286-291.

คำนูณ กาญจนภูมิ. (2542). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

คำนูณ กาญจนภูมิ นงนารถ ชะนะแดง และ ศศิธร ทองมา. (2544). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยจากปลีและปลายยอด. สงขลานครินทร์ วทท. 23(1): 1-6.

จารุวรรณ จาติเสถียร สุภาพ สุนทรานนท์ และ หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. (2544). การชักนำให้เกิด embryogenic callus ในทุเรียนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. วิชาการเกษตร 19(1) : 32-43.

นันทกร บุญเกิด. (2543). คู่มือการสร้างสวนองุ่น. เทคโนธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

บุญเทือง โพธิเจริญ. (2522). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ม. เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2538). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

รังสฎษดิ์ อินต๊ะ. (2540). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สมปอง เตชะโต สมัชชา นาคสมบัติ และ จารุวรรณ บุญศิริ. (2545). ผลของพันธุ์และชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัส และการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีกรไมโครพรอพาเกชัน. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 24(4): 569-578.

วิชาดา สินปุ่ย และ คำนูณ กาญจนภูมิ. (2545). การเกิดพืชจากการเพาะเลี้ยงก้านใบและใบของต้นแอฟริกันไวโอเล็ต (Saintpaulia ionantha Wendl.) ในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 24(3): 357-364.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2541).การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา.

Chang M.M. (1996). Genetic engineering of grape for disease resistance. Viticulture [http://www.nysaes.cornell.edu/pubs/wine_grape_found/viticulture1.html].

Duncan D.R. and Widholm J.M. (1998). Plant Cell Rep. 7: 452-455 อ้างถึงใน อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา. หน้า 58.

Harsh M. (1995). Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevine (*Vitis* spp.). Vitis 34(1) : 27-29.

Kikkert J.R., Ali G.S., Wallace P.G. and Reisch B. (2000). Expression of a fungal chitinase in *Vitis vinifera* L. 'Merlot' and 'Chardonay' plants produced by biolistic transformation. Acta Hort 528 : 297-303.

Laursen C.M. et al. (1994). Plant Mol. Biol. 24: 51-61 อ้างถึงใน อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา. หน้า 58.

Marchenko A.O. (1991). Induction of embryogenesis in primary calluses from grape stem and leaves. Plenum Publishing Corporation. 428-436.

Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O. and Landi L. (2002). Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. BMC Biotechnology 2:18 [http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/18].

Mondal M. et al. (1994). Plant Cell Rep. 13: 390-393. อ้างถึงใน อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา. หน้า 60.

Mullins, M.G. 1987. Propagation and genetic improvement of temperate fruits: the role of tissue culture. Plant tissue and cell culture. Alan R. Leiss., p407-418.

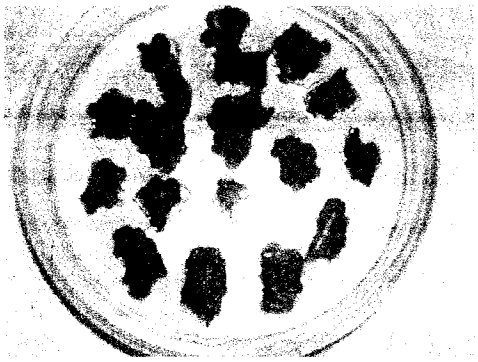
Nakano M., Hoshino Y. and Mii M. (1994). Regeneration of transgenic plants of grapevine (*vitis vinifera* L.) via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of embryogenic calli. J. of Experimental Botany 45(274) : 649-656.

Yamamoto T., Iketani H., Leki H., Nishizawa Y., Notsuka K., Hibi T., Hayashi T. and Matsuta N. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. Plant Cell Rep 19 : 639-646.

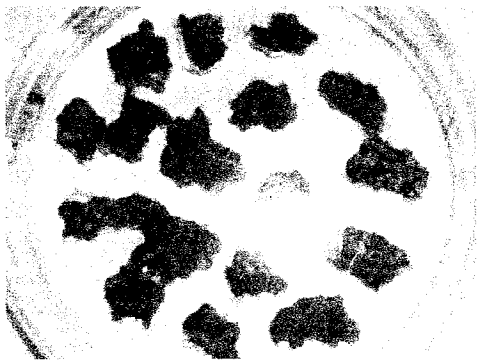
Yang Z.N., Ingelbrecht I.L., Louzada E., Skaria M. and Mirkov T.E. (2000). Plant Cell Rep 19 : 1203-1211.

Weaver, R. 1976. Grape growing. John Wiley & Sons. New York.

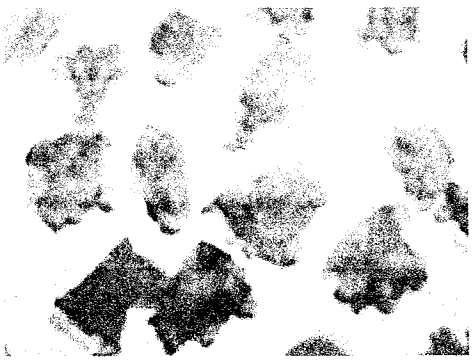
บรรณานุกรม



รูปที่1

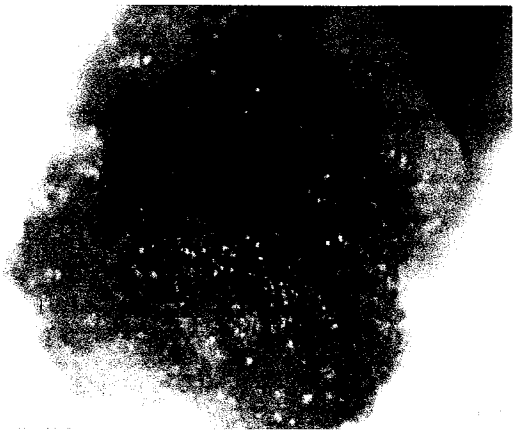


รูปที่2



รูปที่3

รูปที่1-3 แสดงแคลลัสที่เกิดขึ้นจากอาหารสูตรที่1 สูตรที่2 และสูตรที่ 3 ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน



รูปที่ 4

รูปที่5

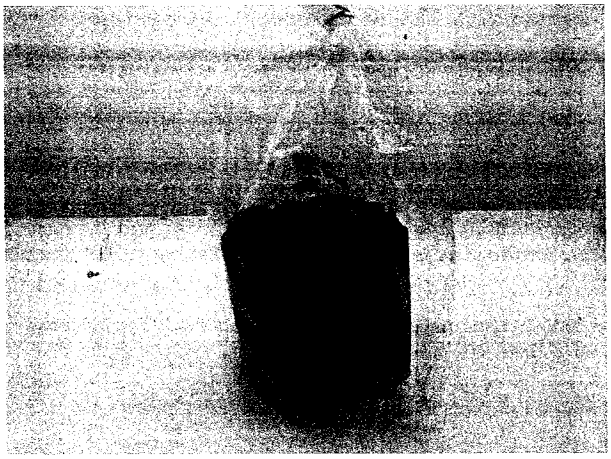
รูปที่6

รูปที่4-6 แสดงการชักนำให้เกิดยอดของอาหารสูตรที่ 1 สูตรที่2 และสูตรที่3 ตามลำดับ

รูปที่ 7

รูปที่8

รูปที่ 7-8 แสดงการแตกยอดขององุ่นหลังจากเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม อายุ 14 วัน และ 25 วัน ตามลำดับ

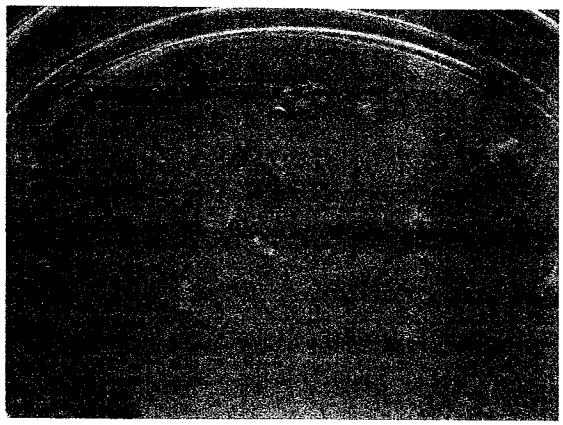


รูปที่ 9

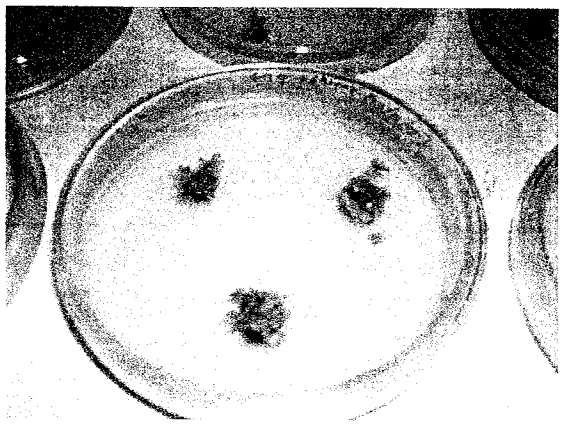
รูปที่10

รูปที่ 9 แสดงการย้ายอุ่นออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปลูกในถุงเพาะชำ อายุ 12 วัน

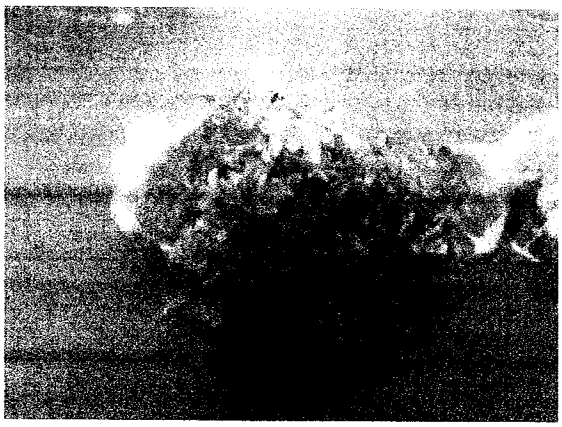
รูปที่ 10 แสดงการเจริญเติบโตของอุ่นหลังจากนำถุงพลาสติกที่คลุมถุงเพาะชำออก อายุ 30 วัน



รูปที่ 11



รูปที่ 12



รูปที่ 13

รูปที่11-13 แสดงการเกิดยอดจำนวนมากจากการนำปลายยอดมาเลี้ยงในอาหาร IM, IM2 และ MM ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 1 แสดงสูตรการเตรียม Stock อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อน

1. Macronutrient (ปริมาณเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร)

	MS	**NN**
NH_4NO_3	1650	720
KNO_3	1900	950
$CaCl_2\ 2H_2O$	440	166
$MgSO_4\ 7H_2O$	370	185
KH_2PO_4	170	68

2. Micronutrient (ปริมาณเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร)

	MS	**NN**
KI	0.83	-
H_3BO_3	6.2	10
$MnSO_4\ 4H_2O$	22.3	19
$ZnSO_4\ 7H_2O$	8.6	10
$Na_2MoO_4\ 2H_2O$	0.25	0.25
$CuSO_4\ 5H_2O$	0.025	0.025
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.025	0.025
Na_2 EDTA	37.3	37.3
$FeSO_4\ 7H_2O$	27.3	27.8

3. Vitamin and organics(ปริมาณเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร)

	MS	**NN**
Myo-Inositol	100	100
Nicotinic acid	0.5	5.0
Pyridoxine HCl	0.5	0.5
Thiamine HCl	0.1	0.5
Glycine	2.0	5.0

ตารางผนวกที่ 2 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นจากส่วนตาขององุ่น โดยใช้สูตรอาหาร MS และปริมาณของสารอื่น ๆ ดังนี้

Sucrose	30g/l
Agar	15g/l
Kinetin	0.9 μM
NAA	0.5 μM
pH	5.8

ตารางผนวกที่ 3 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นเพื่อชักนำการเกิดแคลลัสจากส่วนใบขององุ่น โดยใช้สูตรอาหาร MS และ NN และปริมาณของสารอื่น ๆ ดังนี้

	สูตรที่1	**สูตรที่2**	**สูตรที่3**
สูตรอาหาร	MS	MS	NN
Sucrose	30g/l	30g/l	30g/l
Agar	15g/l	15g/l	15g/l
2, 4-D	2.5μM	4.5μM	5.0μM
BAP	5.0μM	0.4μM	-
4-PU	-	-	5.0μM
pH	5.8	5.8	5.8

ตารางผนวกที่ 4 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นเพื่อชักนำการเกิดยอดและรากขององุ่น โดยใช้สูตรอาหาร MS และ NN และปริมาณของสารอื่น ๆ ดังนี้

	สูตรที่1	**สูตรที่2**	**สูตรที่3**	**สูตรที่4**
สูตรอาหาร	MS	MS	MS	NN
Sucrose	30g/l	30g/l	30g/l	30g/l
Agar	15g/l	15g/l	15g/l	15g/l
BAP	2.5μM	22.19μM	5.0μM	0.9mM
NAA	0.1μM	5.37μM	-	10.7mM
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

ตารางผนวกที่ 5 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อนเพื่อชักนำการเกิดยอดจำนวนมาก โดยใช้สูตรอาหาร MS และปริมาณของสารอื่น ๆ ดังนี้

	IM (ปริมาณเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร)
KNO_3	1050
NH_4NO_3	400
KH_2PO_4	200
$MgSO_4 7H_2O$	400
$CaNO_3$	750
NaH_2PO_4	200

	IM1	**IM2**	**MM**
Macronutrient	IM	IM	IM
Micronutrient	MS	MS	MS
Vitamins	MS	MS	MS
Sucrose	20-30g/l	20-30g/l	20-30g/l
Agar	7g/l	7g/l	7g/l
NAA	0.05μM	0.05μM	0.05μM
BAP	4.4μM	8.8μM	13.2μM
pH	5.8	5.8	5.8

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ ดร. โชคชัย วนภู เกิดเมื่อวันที่ 15 กันยายน 2502 ปัจจุบันดำรงตำแหน่ง ผู้จัดการฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และตำแหน่งทางวิชาการคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สำหรับประวัติการศึกษา จบการศึกษาในระดับปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในสาขาวิชา Engineering in Biotechnology และระดับปริญญาโทจากมหาวิทยาลัยมหิดล ในสาขาวิชา Biochemistry และระดับปริญญาเอกในสาขาวิชา Chemistry จากมหาวิทยาลัย Osaka ประเทศญี่ปุ่น ส่วนประสบการณ์ทำงาน เริ่มในปี 2539-3540 ดำรงตำแหน่งหัวหน้าภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต่อมาในปี 2540-2542 เป็นผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และเป็นผู้อำนวยการเทคโนธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และตั้งแต่ปี 2545 จนถึงปัจจุบัน ดำรงตำแหน่งเป็นผู้จัดการฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี