

การศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะลิลา

Study on Control of Contamination for Tissue Culture  
of Jasmine (*Jasminum sambac* (L.) Ait.)



เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 51333.....  
วัน,เดือน,ปี- 8 ก.ค. 2547.....

.b.....
.i.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาพืชสวน

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ การศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะลิลา  
ชื่อนักศึกษา นางสาวสรัญญา สมุทรานุกภาพ  
รหัสประจำตัว 44066211  
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
สาขา พืชสวน  
พ.ศ. 2545  
อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ผศ.ดร.สุเม อรัญนารถ

### บทคัดย่อ

ศึกษาการใช้สูตรฟอกฆ่าเชื้อเพื่อจัดการปนเปื้อน ในการเพาะเลี้ยงดอกมะลิลาในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนกลีบดอกมาฟอกฆ่าเชื้อ จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ ทั้ง 15 วิธีการ คือ วิธีการที่ 1 ใช้Ethanol70% 10วินาที Clorox20 % + tween-20 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที, วิธีการที่ 2 ใช้Ethanol70% 1 นาที Clorox10 % + tween-20 15 นาที ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที, วิธีการที่ 3-5 ใช้Ethanol70% 1 นาที Clorox20 % +tween-20 10, 15, 20 นาที ตามลำดับและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที, วิธีการที่ 6-8 ใช้Ethanol70% 1 นาที Clorox30 % +tween-20 10, 15, 20 นาที ตามลำดับ ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที, วิธีการที่ 9-10 แช่ว Rifampicin 30 นาที จุ่ม Clorox10% 5 วินาที, จุ่ม Ethanol70% 1 นาที ตามลำดับ, วิธีการที่ 11-12 แช่ว Rifampicin 45 นาที จุ่ม Clorox10% 5 วินาที, จุ่ม Ethanol70% 1 นาที ตามลำดับ, วิธีการที่ 13-14 แช่ว Rifampicin 60 นาที จุ่ม Clorox10% 5 วินาที, จุ่ม Ethanol70% 1 นาที ตามลำดับ, วิธีการที่ 15 ใช้Ethanol 70% 1นาที Haiter100% +tween-20 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5นาที นำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการข้างต้นไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog(MS)(1962) ที่มี 2,4-D และ kinetin พบว่าการใช้ Ethanol 70% 1 นาที Haiter100% +tween-20 3 นาที และล้างด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำให้ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อดีที่สุดคือ 96% และวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70% 1 นาที Clorox 10 % + tween-20 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ชิ้นส่วนมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด มีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดคือ 4.2 คะแนน และชิ้นส่วนมีน้ำหนักมากที่สุดคือ 2.71 กรัม สำหรับชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70% 10 วินาที Clorox 20 % + tween-20 10 นาทีและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้มากที่สุดคือ 84%และชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการแช่ว Rifampicin 60 นาที แล้วจุ่ม Clorox10% 5 วินาที และแช่ว Rifampicin 60 นาที แล้วจุ่ม Ethanol 70% 1 นาที ชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้น

Title : Study on Control of Contamination for Tissue Culture of Jasmine  
(*Jasminum sambac* (L.) Ait.)

By : Saranya Samuttranuphap

Major : Horticulture

Department : Horticulture

Faculty : Agricultural Technology

Advisor : Assist Prof.Dr.Sumay Arunyanart

### Abstract

Methods of surface sterilization for tissue culture of Jasmine (*Jasminum sambac* (L.) Ait.) were studied. The flowers were sterilized with 15 treatments of the following methods: Treatment(Tr.)1.soaked in 70%ethanol for 10 seconds, shaken in 20%clorox + tween-20 for 10 minutes. rinsed three times in sterile distilled water, Tr. 2.soaked in 70%ethanol for 1 minute, shaken in 10%clorox + tween-20 for 15 minutes. rinsed three times in sterile distilled water, Tr. 3-5.soaked in 70%ethanol for 1 minute, shaken in 20%clorox + tween-20 for 10, 15 and 20 minutes respectively and then rinsed three times in sterile distilled water, Tr. 6-8.soaked in 70%ethanol for 1 minute, shaken in 30%clorox + tween-20 for 10, 15 and 20 minutes respectively and then rinsed three times in sterile distilled water, Tr. 9-10.to immersed in rifampicin for 30 minutes, soaked in 10%clorox 10 seconds, soaked in 70%ethanol 1 minute respectively , Tr. 11-12.to immersed in rifampicin for 45 minutes, soaked in 10%clorox 10 seconds, soaked in 70%ethanol 1 minute respectively , Tr. 13-14.to immersed in rifampicin for 60 minutes, soaked in 10%clorox 10 seconds, soaked in 70%ethanol 1 minute respectively , Tr. 15.soaked in 70% ethanol for 1 minute, shaken in 100% Haiter + tween-20 for 3 minutes and rinsed three times in sterile distilled water. Excised flowers were cultured in Murashige and Skoog (MS)(1962) medium supplemented with 2,4-D and kinetin. The highest percentage (96%) of non – contaminated explant was obtained from treatment which soaked in 70% ethanol for 1 minute, shaken in 100% Haiter + tween-20 for 3 minutes and rinsed three times in sterile distilled water. The best score of growth (4.2) and highest weigh (2.71 g) were obtained from treatment which sterilized with 70% ethanol for 1 minute and 10% clorox + tween-20 15 minutes, followed by three washes in sterile water. The highest percentage (84%) of explants formed achieved from treatment which callus was disinfected with 70% ethanol 10 s and 20%clorox + tween-20 10

## II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

minutes before rinsing three times with sterile water. However, explants immersed in rifampicin for 60 minutes, soaked in 10%clorox 10 seconds and immersed in rifampicin for 60 minutes, soaked in 70%ethanol 1 minute gave no callus.



### III

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนิยม

ปัญหาพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการแนะนำเป็นอย่างดี จากศ.ดร.สุเม อรัญนารถ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ได้ให้คำปรึกษา แนวทาง การแก้ไข ปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนการทดลอง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ที่ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือทั้งร่างกายและแรงใจ การทดลองครั้งนี้จึงสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชา พืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การศึกษา และสถานที่ในการปฏิบัติงาน

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ คุณอา ที่ให้กำลังใจและการสนับสนุน การทำงานทดลองครั้งนี้ด้วยดีมาตลอด

สร้อยญา สมุทธานุภาพ



# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
คำนิยม	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูปภาพ	VII
สารบัญตารางภาคผนวก	IX
คำย่อและสัญลักษณ์	X
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินงาน	9
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	25
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	29

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่ไม่มีการปนเปื้อน	16
ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสในวิธีการต่าง ๆ	18
ตารางที่ 3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนในแต่ละสัปดาห์	21
ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักชิ้นส่วนในแต่ละวิธีการ	22



## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนกลีบดอกมะลิลา

14



## VII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางที่ 1 สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog )(1962)	30
ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 1 สัปดาห์	31
ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 2 สัปดาห์	31
ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 3 สัปดาห์	32
ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์	32
ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์	33
ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์	33
ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์	34
ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 10 สัปดาห์	34
ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 12 สัปดาห์	35
ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญเติบโตของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 2 สัปดาห์	35
ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญเติบโตของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 3 สัปดาห์	36
ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญเติบโตของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์	36
ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญเติบโตของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์	37

## VIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญเติบโตของกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 12 สัปดาห์	37
ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติน้ำหนักชิ้นส่วนกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์	38
ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติน้ำหนักชิ้นส่วนกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 12 สัปดาห์	38



## IX

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร
MS	Murashige and Skoog (1962)



การศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะลิลา  
Study on Control of Contamination for Tissue Culture  
of Jasmine (*Jasminum sambac* (L.) Ait.)

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คนทั่วไปมักจะหลงเสน่ห์ในกลิ่นหอมและรสชาติ กลิ่นเป็นสิ่งที่ยากในการอธิบาย เป็นเสมือนสัญลักษณ์และความลึกลับ มีความเชื่อเกี่ยวกับคุณสมบัติของกลิ่นในการบำบัดรักษาและการสร้างสายใยเชื่อมโยงกับบรรพบุรุษและพระผู้เป็นเจ้า กลิ่นมีผลต่อความหิวตั้งนั้นจึงมีผลโดยตรงต่อการรับประทานอาหารและยังมีผลต่อความรู้สึกนึกคิดและความทรงจำ

สารที่ให้ความหอมมีบทบาทสำคัญและหลากหลายในชีวิตมนุษย์มากเกินกว่าที่ตระหนัก โดยทั่วไปมีการจัดรูปเพื่อการบูชาในพิธีกรรมทางศาสนาทั่วโลก น้ำมันหอมที่ใช้เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำหอมมีผลโดยตรงต่อความพึงใจของผู้ใช้และผู้ที่อยู่ใกล้ชิด สารที่ให้ความหอมมีบทบาทสองประการในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการดูแลรักษาร่างกาย ยกตัวอย่างเช่นในน้ำหอมที่ใช้หลังโกนหนวดและในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ระงับเหงื่อซึ่งตามความเป็นจริงเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องหอมชนิดหนึ่งในอีกส่วนหนึ่งได้แก่ผลิตภัณฑ์จำพวกครีม แชมพูและสารกำจัดกลิ่นตัว มีการผสมน้ำมันหอมเพื่อให้ความรื่นรมย์ในการใช้ มีการใช้ประโยชน์เป็น functional perfumery ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย นับตั้งแต่ในสบู่ ผงซักฟอก ไปจนถึงผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำความสะอาดในครัวเรือน ในด้านการตลาดมุ่งเน้นในส่วนที่เกี่ยวกับความเพลิดเพลินใจในการใช้ตัดเทียมกับประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่ากลิ่นเป็นองค์ประกอบสำคัญในกลยุทธ์ด้านการตลาด (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2544)

มะลิลา(Jasmine) เป็นไม้ดอกที่นิยมปลูกกันมาก เพื่อใช้ประโยชน์จากส่วนของดอก โดยนำมาเป็นไม้ดอกกระถาง และไม้ปลูกประดับแปลง ประเทศไทยนิยมปลูกมะลิลาตามบ้าน ใช้ประโยชน์ในการปลูกประดับสวนเพื่อความสวยงาม สามารถนำดอกมาใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นอาหารและขนม ร้อยมาลัยบูชาพระ ลอยดอกมะลิลาในน้ำคั้นเพื่อเพิ่มกลิ่นหอม นอกจากนี้ใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค และเป็นสัญลักษณ์ของวันแม่ ที่สำคัญทั้งต่างประเทศและในประเทศนิยมนำดอกมะลิมาใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหย เพื่อปรุงแต่งกลิ่นน้ำหอม ซึ่งน้ำหอมกลิ่นมะลิลาเป็นน้ำหอมที่มีราคาแพงที่สุดในโลก เพราะเป็นกลิ่นที่ไม่มีสารเคมีชนิดใด สามารถผลิตเลียนแบบได้ นอกจากนี้ยังใช้ปรุงแต่งกลิ่นแป้งทาตัว ผสมกลิ่นสบู่ และอื่น ๆ (สัมฤทธิ์, 2537) ดังนั้นความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการดอกมะลิในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันหอมระเหย จึงเพิ่มมากขึ้น และมะลิเป็นพืชที่มีการปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวดอกจัดเป็นกรณีพิเศษ การเก็บดอกมะลิต้องใช้แรงงานมาก ต้องใช้เวลาประมาณ 2.5 ชั่วโมง ในการเก็บดอกมะลิหนัก 1 กิโลกรัม นอกจากนี้จะต้องเก็บดอกในตอนเช้าตรู่ ก่อนที่อุณหภูมิจะสูงเกินไป และต้องใช้ดอกหนัก 1,000 กิโลกรัม ในการผลิตน้ำมันหอม 0.5 กิโลกรัม เป็นผลให้ราคาของน้ำมันหอมมีราคาสูงมาก(สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2544) ดังนั้นเพื่อเป็นการใช้ทรัพยากรอย่างรู้คุณค่า และเพื่อเพิ่มทางเลือกในการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการผลิตสารการผลิตสารในสภาพปลอดเชื้อนี้ทำได้รวดเร็วมมาก เนื่องจาก

1. มีการกระตุ้นการเจริญและการผลิตสารของเซลล์ที่ขอยู่เรื่อย ๆ
2. สามารถทำให้พืชมีการเจริญได้ดีโดยการเปลี่ยนอาหาร และปรับสภาพแวดล้อมทางกายภาพให้เหมาะสม
3. อาจจะใช้ตรึงเซลล์ไว้ในเจล (Gel) ไม่ให้เซลล์เคลื่อนที่ เมื่อเซลล์ผลิตสารออกสู่อาหาร แล้วสามารถเปลี่ยนอาหารใหม่ได้
4. สามารถเลือกเทคนิคที่เหมาะสมในการผลิตสารให้ได้มากที่สุดได้
5. อาจจะใช้เอนไซม์ที่ช่วยในการผลิตลงไปในอาหารด้วยก็ได้

ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชเพื่อทำการเพาะเลี้ยงก็เป็นสิ่งสำคัญเบื้องต้นที่จะนำไปสู่ความสำเร็จ หากได้มีการเตรียมที่ดีและถูกต้องก็จะทำให้งานได้ผลตามจุดประสงค์(บุญยืน,2544) ดังนั้นการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการทดลองนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ ที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น และศึกษาการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนกลีบดอกมะลิหลังจากที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อใช้เป็นแนวทางผลิตเซลล์สเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างสารในสภาพปลอดเชื้อต่อไป

## 1.2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลีบดอกมะลิ

### 1.3. ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการขจัดการปนเปื้อนขึ้นส่วนเริ่มต้น (กลีบดอกมะลิ) และศึกษาถึงผลการปนเปื้อนและการเจริญเติบโตของขึ้นส่วนกลีบดอกมะลิ หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อ

### 1.4. ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1. ตรวจสอบเอกสาร

1.4.2. เตรียมอุปกรณ์

1.4.3. ทำการทดลอง

1.4.4. วิเคราะห์ผล

1.4.5. จัดทำรูปเล่ม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1. ความรู้เกี่ยวกับมะลิลา

#### 2.1.1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

**ชื่อไทย** มะลิลา ข้าวแตก (แม่ฮ่องสอน) มะลิขี้ไก่ (เชียงใหม่) มะลิป้อม (เหนือ)

**ชื่อสามัญ** Arabian Jasmine

**ชื่อวิทยาศาสตร์** *Jasminum sambac* (L.) Ait.

**ชื่อวงศ์** OLEACEAE

**ถิ่นกำเนิด** อาระเบียและอินเดีย

**ลักษณะทั่วไป** ไม้พุ่มกึ่งเลื้อย สูง 1-2 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก ต้นที่มีอายุหลายปี จะเลื้อย ปลายกิ่งมักขนานกับพื้น กิ่งเปราะ

- ต้น ไม้พุ่มกึ่งเลื้อย สูง 1-2 เมตร

- ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามเป็นคู่ใบรูปไข่แกมรูปรี กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ด้านท้องใบเห็นเส้นใบชัดเจน

- ดอก ช่อดอกสีขาว ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง โคนกลีบดอกจะเชื่อมกันเป็นหลอด ยาว 1.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 5-8 กลีบ เมื่อดอกย่อยบานมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 เซนติเมตร ดอกที่อยู่ตรงกลางจะบานก่อน มีกลิ่นหอมแรง ดอกเริ่มบานและส่งกลิ่นหอมในช่วงกลางคืน ดอกบานวันเดียวแล้วจะโรยในช่วงบ่าย (วชิรพงศ์, 2542)

**2.1.2. การขยายพันธุ์** : ขยายพันธุ์โดยทับกิ่ง ปักชำ และตอนกิ่ง กิ่งชำออกรากง่าย การปักชำควรใช้ส่วนปลายของกิ่ง ยาว 10-15 เซนติเมตร และมีข้อ 2-3 ข้อ ปักชำในทรายผสมขี้เถ้าและวางกระบะชำในกระโจมจะมีเปอร์เซ็นต์การออกรากดีขึ้น

**2.1.3. สภาพที่เหมาะสม** : เหมาะที่จะปลูกเป็นไม้กระถาง หรือปลูกลงแปลงกลางแจ้ง ชอบดินชื้น แสงแดดจัด ต้นที่มีใบจำนวนมากและทรงพุ่มแน่นที่พบว่าไม่ค่อยออกดอก จึงควรลิดใบทิ้งบ้างหรือตัดแต่งกิ่งให้ทรงพุ่มโปร่ง (วชิรพงศ์, 2542)

มะลิลาเป็นพืชที่ให้ดอกตลอดปีแต่ปริมาณและคุณภาพของดอกจะแตกต่างกันไปตามสภาพอากาศ โดยจะให้ดอกมากในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน เพราะมีอุณหภูมิสูงกว่าในช่วงฤดูหนาว ส่วนในฤดูหนาวเป็นช่วงที่ให้ดอกน้อยที่สุดและดอกยังมีขนาดเล็กด้วย ส่งผลให้ราคาดอกมะลิในช่วงนี้มีราคาสูงมาก

### 2.1.4. พันธุ์มะลิลา

2.1.4.1. พันธุ์แม่กลอง เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะทรงต้นและพุ่มต้นใหญ่ หนาดกและทึบ เจริญเติบโตเร็ว ใบมีขนาดใหญ่และหนา ใบมีสีเขียวเข้มเกือบดำ รูปทรงใบค่อนข้างกลม ปลายใบมน ช่วงข้อใบห่าง ดอกใหญ่และกลม ลักษณะช่อดอกมักมี 1 ชูด ๆ ละ 3 ดอก พันธุ์แม่กลองจะให้ปริมาณดอกน้อยกว่าพันธุ์ราชฎ์บุรณะและพันธุ์ชุมพร

2.1.4.2. พันธุ์ราชฎ์บุรณะ ลักษณะทรงพุ่มเล็กกว่าพันธุ์แม่กลองแต่พุ่มค่อนข้างทึบ ใบมีขนาดเล็กบาง มีสีเขียวไม่เข้ม รูปใบเรียวยาว ช่วงใบค่อนข้างถี่ ดอกมีขนาดเล็ก เรียวแหลม ลักษณะช่อดอกมักมี 1-2 ชูด ๆ ละ 3 ดอก เป็นพันธุ์ที่ให้ดอกคด โดยจะทยอยให้ดอกเรื่อย ๆ

2.1.4.3. พันธุ์ชุมพร มีลักษณะทรงต้นคล้ายพันธุ์ราชฎ์บุรณะ แต่ดูโปร่งกว่าเล็กน้อย ใบมีลักษณะคล้ายพันธุ์ราชฎ์บุรณะ แต่เรียวยาว ลี้อ่อนกว่าและบางกว่า มีช่วงข้อใบถี่ ลักษณะดอกคล้ายพันธุ์ราชฎ์บุรณะคือมีขนาดเล็กเรียวแหลม ลักษณะช่อดอกมักมีมากกว่า 2 ชูด ๆ ละ 3 ดอก เป็นพันธุ์ที่ให้ดอกคดมาก แต่จะทิ้งระยะห่างเป็นช่วง ๆ (สายขล, 2541)

### 2.2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมายถึง การเลี้ยงชิ้นส่วนใดๆของพืช เนื้อเยื่อ รวมทั้งเซลล์เดี่ยวๆในอาหารสังเคราะห์(synthetic media) ซึ่งประกอบด้วย เกลือ แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ(aseptic condition) ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสง(อรติ, 2539; อารีย์, 2541)

### 2.3. การกำจัดสิ่งปนเปื้อน(Disinfection หรือ Disinfestation)

ในการแยกเนื้อเยื่อพืชมาเลี้ยง กระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญและขาดไม่ได้ คือ การกำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยเทคนิค disinfection หรือ disinfestation เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกและเชื้อจุลินทรีย์ออกจากผิวของเนื้อเยื่อ(รังสฤษดิ์, 2545) เนื่องจากในสภาพธรรมชาติ ส่วนต่างๆของพืชมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆติดอยู่ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อรา หรือแบคทีเรีย อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน(contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยง เพราะเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และจะทำให้อาหารเน่าเสียอย่างรวดเร็ว ชิ้นส่วนพืชก็จะเน่าตายไปด้วย(ประศาสตร์, 2536) สำหรับการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจติดมากับชิ้นส่วนพืชมีจุดมุ่งหมายสำคัญ 2 ประการคือ

1. จัดหรือลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ไม่ให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงได้

2. เพื่อลดผลของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อความเป็นกรดและด่าง(pH) การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตจากอาหารที่

ใช้เพาะเลี้ยง และการปลดปล่อยสารต่างๆ ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต (metabolic by products) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อน (รังสฤษฎ์, 2545)

โดยทั่วไปแล้วการขจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากผิว (surface sterilization หรือ disinfection) ทำได้ยากในชิ้นส่วนที่มีขน หรือผิวขรุขระไม่เรียบ จึงควรใช้สารฟอกกำจัดเชื้อ (sterilization agents หรือ disinfectant) หลากๆ ชนิด (รังสฤษฎ์, 2545) ปัจจุบันมีสารเคมีหลายชนิดและวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อของตัวอย่างพืช ให้มีความปลอดเชื้อ ซึ่งผู้ทำการเพาะเลี้ยงต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้ให้เกิดความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืช และประสิทธิภาพที่จะได้รับ

สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ มีดังนี้

1. แอลกอฮอล์ (alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 70-95 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-5 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2. คลอโรกซ์ (clorox) เป็นน้ำยาที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน ที่จริงแล้วก็คือสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5.25 w/w ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

3. เมอคิวริกคลอไรด์ ( $HgCl_2$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีพอสมควร

4. แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ( $Ca(OCl)_2$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก (ประศาสตร์, 2536)

5. ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวบางครั้งก็ใช้ยาปฏิชีวนะเข้าช่วย ถ้าเนื้อเยื่อนั้นกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกได้ยาก โดยเฉพาะแบคทีเรีย การเติมยาปฏิชีวนะลงในอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (บุญยืน, 2544)

Rifampicin เป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่ม rifamycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นโดย *Sterptomyces mediterranei* สารกลุ่มนี้จะมีผลต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก (Gram +) และ *Mycobacterium tuberculosis* แต่มีผลน้อยกับแบคทีเรียแกรมลบ (Gram -) สำหรับ rifampicin เป็นสารในกลุ่มกึ่งสังเคราะห์จากธรรมชาติ สำหรับผลที่มีต่อแบคทีเรียนั้น เกี่ยวข้องเฉพาะกับการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โดยจะจับและยับยั้งเอนไซม์ DNA dependent RNA Polymerase ของแบคทีเรียที่ไวต่อสารนี้ (สายสมร, 2524) ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น 15  $\mu g/ml$  จะเป็นอันตรายต่อพวก microbes และจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชที่ระดับความเข้มข้น 25  $\mu g/ml$  (Anonymous, 1994) Phillips *et al.* (1981) พบว่าการเพาะเลี้ยง *Helianthus tuberosus* (ทานตะวัน) ในอาหารที่มี rifampicin ที่ความเข้มข้น 50  $\mu g/ml$  เพียงชนิดเดียว มีประสิทธิภาพเพียงพอในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อการแบ่งเซลล์และการสังเคราะห์ DNA Young *et al.* (1984)

ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของไม้เนื้อแข็ง 13 พันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่ามีการติดเชื้อจากแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิดในแต่ละปลายยอด และยังพบว่าสารปฏิชีวนะบางตัวมีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียครอบคลุมกว่าชนิดอื่นๆ คือ rifampicin และ tetracyclin ซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงปลายยอดของแอปเปิ้ลและ rhododendron สามารถกำจัดแบคทีเรียให้หมดไปได้ โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อยอดที่เพาะเลี้ยง

ประสิทธิภาพของสารฟอกกำจัดเชื้อเหล่านี้เป็นผลมาจากการตอบสนองต่อเวลาและปริมาณของสารที่ใช้ (time-dose response) โดยปกติประสิทธิภาพจะสูงขึ้นถ้าใช้เวลาและความเข้มข้นของสารมากขึ้น แต่ถ้าใช้มากเกินไปอาจทำอันตรายต่อความมีชีวิตของเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของพืชได้ จึงต้องทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมก่อน (บุญขึ้น, 2544; ริงสฤษดิ์, 2545)

#### 2.4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุหลาบ (2539) ศึกษาการเพาะเลี้ยงรักเร่ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อส่วนดอกรักเร่ด้วย Clorox 0.5 % นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง 3 ครั้ง และฟอกฆ่าเชื้อส่วนใบด้วยการฉีดพ่นด้วย เอทานอล 70% แล้วฟอกฆ่าเชื้อใน Clorox 5% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งแล้ว 3 ครั้ง และนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ชิ้นส่วนดอกและใบมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดี

ปิยะฉัตร (2538) ศึกษาการเพาะเลี้ยงสะเดาไทยในสภาพปลอดเชื้อ นำก้านใบอ่อนตั้งแต่ข้อที่ 2-4 นับจากปลายยอดลงมา ล้างด้วยน้ำผสม Tween-20 2-3 หยด ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 10 % นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งแล้ว 3 ครั้ง และ นำชิ้นส่วนใบอ่อนล้างด้วยน้ำผสม Tween-20 2-3 หยด ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 8 % นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง 3 ครั้ง นำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ชิ้นส่วนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

ศาลักษณ์ (2526) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของว่านสี่ทิศ โดยนำส่วนก้านช่อดอกอ่อน ก้านช่อดอกย่อย และดอกอ่อน มาล้างด้วยผงซักฟอกและล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 10% เติม Teepol 2-3 หยด นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง 2-3 ครั้ง นำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี NAA ร่วมกับ kinetin พบว่าเนื้อเยื่อส่วนกลีบดอกมีการสร้างแคลลัสได้ใน 7 วัน ซึ่งแคลลัสที่ได้มีลักษณะละเอียดสีขาวใส และ เนื้อเยื่อส่วนก้านช่อดอกและก้านช่อดอกย่อย เกิดการสร้างแคลลัสใน 1-2 สัปดาห์ ได้แคลลัสที่มีลักษณะละเอียด และแน่นมาก มีสีขาวขุ่น

Fujii (1991) ทำการฟอกฆ่าเชื้อลำต้น *Podophyllum* spp. เป็นผลสำเร็จด้วย เอทานอล 70% นาน 10 วินาที และ Sodium hypochlorite 5% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง และนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS, B5 ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ร่วมกับ 2,4-D สามารถชักนำให้ใบและลำต้นสร้างแคลลัสได้

Furuya and Yoshikawa (1991) ได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อตาดอกคำฝอย โดยใช้ แอลกอฮอล์ (alcohol) 70% นาน 1 นาทีและใช้ solution of bleaching power นาน 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง ได้เป็นผลสำเร็จและสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

Goleniowski and Silva(1993) ได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อใบของ *Altamisa* ด้วยเอทานอล 70% นาน 3 นาที และ Sodium hypochlorite 1% นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง และนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 2,4-D และ Ascorbic acid และ Cysteine เก็บในที่มืด เป็นเวลา 2 เดือน สามารถชักนำไปให้เกิดแคลลัสได้

Kawaguchi *et al* (1993) ฟอกชิ้นส่วนลำต้น ตาดอก ใบ ของ *Strophanthus Species* (เข็มปีนัง) โดยใช้ แอลกอฮอล์(alcohol) 70% นาน 1 นาทีและใช้ saturated solution of bleaching power นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง นำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ ในที่มืดสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

Mahady *et al* (1993) ฟอกลำต้น *Sanguinaria canadensis L.* ด้วย เอทานอล 70% นาน 5 นาที และ Clorox 20% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง และนำไปเลี้ยงบนอาหาร B5 ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ลำต้นเกิดแคลลัสได้

Yamamoto (1991)ใช้เอทานอล 70% นาน 30 วินาที และ Sodium hypochlorite 0.5% นาน 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อลำต้นของ *Scutellaria baicalensis* และนำไปเลี้ยงบนอาหาร LS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin และ IAA สามารถชักนำให้ลำต้นเกิดแคลลัส

Tomada *et al.* (1976) ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนกลีบดอก ใบ และลำต้นของ *Jasminum sambac Ait.* (มะลิลา) ได้สำเร็จ ด้วย 10 g/140 ml bleaching power solution เป็นเวลา 3 นาทีและล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง 3 ครั้ง นำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ yeast-extract สามารถชักนำให้กลีบดอกพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

Tomé *et al*(1997) ใช้ Sodium hypochlorite 10% ร่วมด้วย tween-80 เป็นเวลานาน 15 นาที ในการฟอกกลีบดอก *Araujia sericifera* ที่มีขนาด 1- 1.5 เซนติเมตร ได้เป็นผลสำเร็จและนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA สามารถชักนำให้กลีบดอกสร้าง Embryo ได้

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงาน

### 3.1. อุปกรณ์

3.1.1. ฟิชชทดลอง คือ คอกมะลิลาพันธุ์ราษฎร์บูรณะ โดยใช้ดอกอ่อนที่มีกลีบดอกสีขาว เกือบเต็ม มีขนาดระหว่าง 1.5 – 2.0 เซนติเมตร

3.1.2. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย กระจกบด (silender) บีกเกอร์ (Beakers) ปิเปต (Pipette) เครื่องชั่งไฟฟ้า (Analysis balance) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ข้อนัดสาร แท่งแก้วคนสาร ทัพพีตักสารละลาย กระดาษไข นาฬิกาจับเวลา ตะกร้าพลาสติก หนั่งยาง ถังพลาสติก

3.1.3. เครื่องมือในห้องถ่ายขึ้นส่วน ประกอบด้วย ตู้ปลอดเชื้อ มีผ้าคัดเล็กพร้อมผ้าคลุม ปากคืบ งานแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ ผ้าขาวบาง บีกเกอร์ กระจกบด ไฟแช็ค แอลกอฮอล์ 70% และ 95%

3.1.4. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ

ethanol 70%

clorox (NaOCl 5.25% w/w)

haiter (NaOCl 6% w/w)

tween 20

3.1.5. สารปฏิชีวนะ

rifampicin ความเข้มข้น 60 mg/l

3.1.6. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร MS (ดูภาคผนวก)

3.1.7. สารควบคุมการเจริญเติบโต

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

kinetin

3.1.8. อุปกรณ์ในการบันทึกผล

เครื่องชั่งน้ำหนัก กล้องถ่ายรูป

### 3.2. วิธีการ

#### 3.2.1. การเตรียมอาหาร

การเตรียมอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) เตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock Solution) โดยเตรียม Macroelement ให้มีความเข้มข้นของ เตรียมสารละลายเข้มข้นเป็น 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ Microelement และ Organic compound ให้มีความเข้มข้นของ เติรียมสารละลายเข้มข้นเป็น 100 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ

**การเตรียมสารละลายความเข้มข้นที่ใช้จริง**

คำนวณปริมาณ Stock solution ที่จะใช้เตรียมจริงด้วยสูตร

$$N_1V_1=N_2V_2$$

$N_1$  = ความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้น

$V_1$  = ปริมาตรของสารละลายเริ่มต้น

$N_2$  = ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้จริง

$V_2$  = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้จริง

#### การเตรียมอาหาร 1 ลิตร

- 1.ตวงน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่กระบอบตวงปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
- 2.เติม Stock solution ของ Macro element Micro element และ Organic compound
- 3.เติมสารละลายน้ำตาลจากน้ำตาล 30 กรัม
- 4.ปรับปริมาตรให้ได้ 800 มิลลิลิตร
- 5.เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้น 3 mg/l ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันหลังจากนั้นปรับ pH ด้วย NaOH 1N หรือ HCl 1N ให้ได้ pH 5.5-5.7.เติมผงวุ้น 8 กรัม
- 6.นำไปต้มจนวุ้นละลายดี.
- 7.นำมารอกใส่ขวด ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อความดัน(Autoclave) ใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที.เก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

#### 3.2.2.การเตรียมชิ้นส่วน

เลือกดอกมะลิลาลักษณะตูมใกล้แย้ม มีกลีบดอกสีขาว โดยตัดจากต้นเป็นช่อ ๆ และเด็ดดอกมะลิลาออกจากช่อดอก นำมาฟอกด้วยสูตรต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง

#### 3.2.3.สภาพห้องเนื้อเยื่อ

นำไปเก็บไว้ในที่มืดแสง อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน

### 3.2.4. วิธีการทดลอง

การศึกษาวิธีการฟอกที่เหมาะสมต่อกลีบดอกมะลิลา

นำดอกมะลิมาฟอกด้วยวิธีการต่าง ๆ วางแผนการทดลองแบบ Randomized

Complete Block Design มี 15 treatment จำนวน 5 ซ้ำ ดังนี้

วิธีการที่ 1	Ethanol 70%	10	วินาที
	Clorox 20 % + tween-20	10	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 2	Ethanol 70%	1	นาที
	Clorox 10 % + tween-20	15	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 3	Ethanol 70%	1	นาที
	Clorox 20 % + tween-20	10	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 4	Ethanol 70%	1	นาที
	Clorox 20 % + tween-20	15	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 5	Ethanol 70%	1	นาที
	Clorox 20 % + tween-20	20	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 6	Ethanol 70%	1	นาที
	Clorox 30 % + tween-20	10	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 7	Ethanol 70%	1	นาที
	Clorox 30 % + tween-20	15	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 8	Ethanol 70%	1	นาที
	Clorox 30 % + tween-20	20	นาที
	น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครึ่งละ	5	นาที
วิธีการที่ 9	แช่ Rifampicin	30	นาที
	จุ่ม Clorox 10%	5	วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการที่ 10	แช่ Rifampicin	30	นาที
	จุ่ม Ethanol 70%	1	นาที
วิธีการที่ 11	แช่ Rifampicin	45	นาที
	จุ่ม Clorox10%	5	วินาที
วิธีการที่ 12	แช่ Rifampicin	45	นาที
	จุ่ม Ethanol 70%	1	นาที
วิธีการที่ 13	แช่ Rifampicin	60	นาที
	จุ่ม Clorox10%	5	วินาที
วิธีการที่ 14	แช่ Rifampicin	60	นาที
	จุ่ม Ethanol 70%	1	นาที
วิธีการที่ 15	Ethanol 70%	1	นาที
	Haiter100% +tween-20	3	นาที
	น้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ	5	นาที

ตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร วางในอาหารที่เตรียมไว้ นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 15 treatment จำนวน 5 ซ้ำ

#### การบันทึกผล

ทำการบันทึกจำนวนชิ้นส่วนดอกมะลิลาที่มีชีวิตอยู่ และไม่มีการปนเปื้อน ทำการเก็บผลทุกๆ 1 สัปดาห์ โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

- 1.เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ
- 2.เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อน
3. เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดการตาย
- 4.เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการเกิดแคลลัส

5.บันทึกผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนทุกสัปดาห์โดยการให้คะแนน ซึ่งมีหลักเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

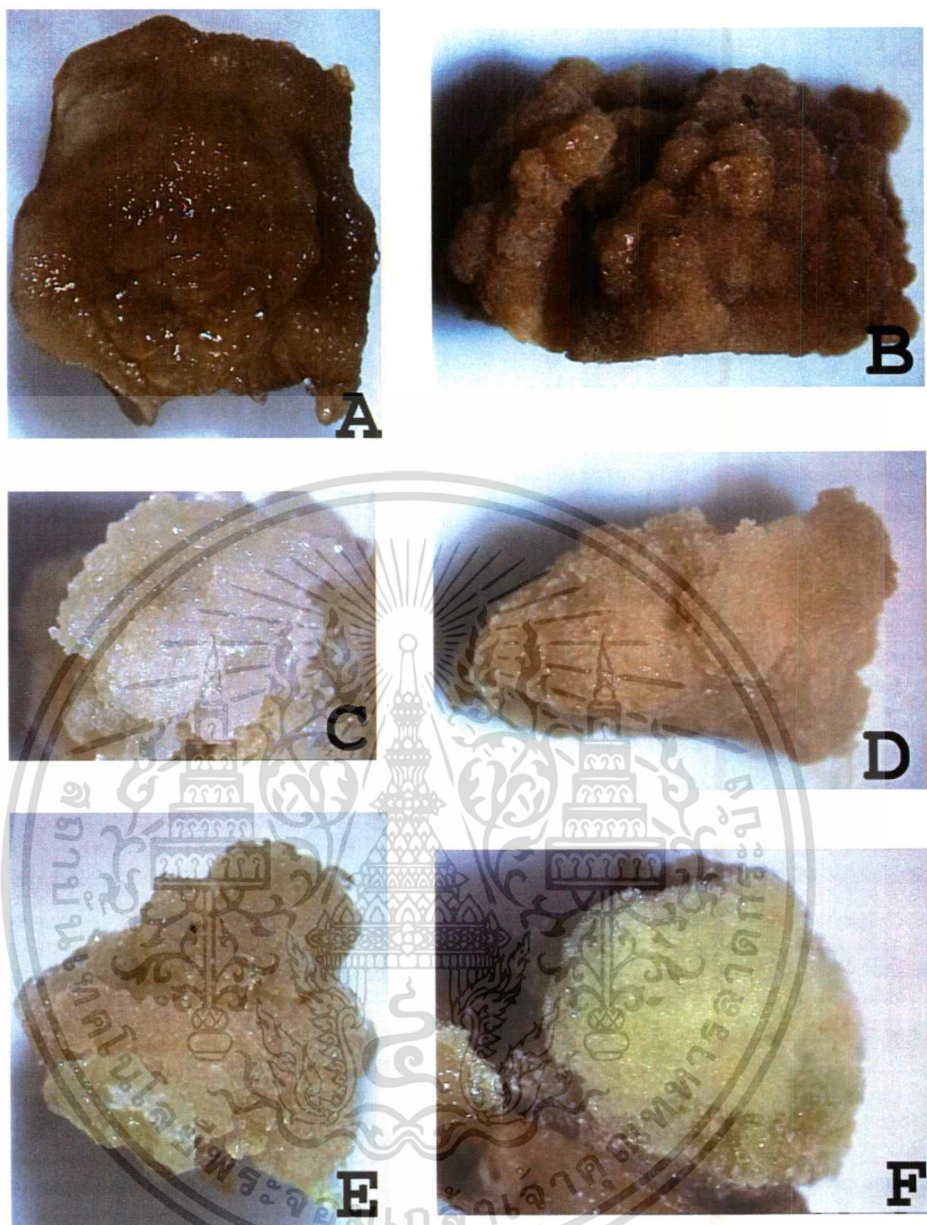
คะแนน 1 : ชิ้นส่วนไม่มีการเจริญเติบโตหรือเปลี่ยนแปลงใดๆ เป็นสีดำหรือสีน้ำตาล (ภาพที่ 1A)

คะแนน 2 : ชิ้นส่วนเกิด callus สีน้ำตาล หรือ สีดำ (ภาพที่ 1B)

คะแนน 3 : ชิ้นส่วนเกิด callus สีขาว (ภาพที่ 1C)

คะแนน 4 : ชิ้นส่วนเกิด friable callus สีเหลือง (ภาพที่ 1D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนก๊ีบดอกมะลิลา

A : แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน (กำลังขยาย 5.12X)

B : แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน (กำลังขยาย 4.28X)

C : แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน (กำลังขยาย 3.46X)

D : แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน (กำลังขยาย 3.93X)

E : แสดงการให้คะแนน 5 คะแนน (กำลังขยาย 3.41X)

F : แสดงการให้คะแนน 6 คะแนน (กำลังขยาย 6.00X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1. ผลการทดลอง

##### 1. เปอเซ็นต์ชันส่วนที่ไม่มีการปนเปื้อน

เมื่อชันส่วนอายุ 1 สัปดาห์พบว่าผลของการฟอกฆ่าเชื้อชันส่วนด้วยวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 1) โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 1 11 และ 12 มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อมากที่สุด คือ 100 % และในวิธีการที่ 10 มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื่อน้อยที่สุด คือ 56.00% พบการปนเปื้อนเกิดจากเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเชื้อราจะเกิดบนชันส่วนและแผ่ไปบนอาหารเป็นบริเวณโดยรอบ ในวิธีการที่ 5 พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย โดยเกิดจากด้านล่างของชันส่วนที่ติดกับอาหารและกระจายเป็นวงกว้างสี่เทา

เมื่อชันส่วนอายุ 2 สัปดาห์พบว่าผลของการฟอกฆ่าเชื้อชันส่วนด้วยวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 1) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 1 โดยไม่มีชันส่วนเกิดการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นในทุกวิธีการ

เมื่อชันส่วนอายุ 3 สัปดาห์พบว่าผลของการฟอกฆ่าเชื้อชันส่วนด้วยวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 1) โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 1 และ 12 มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อมากที่สุดคือ 100 % และในวิธีการที่ 10 มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื่อน้อยที่สุด คือ 56.00% พบว่าชันส่วนมีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นจากเชื้อรา โดยเชื้อราเกิดบนชันส่วนเป็นอันดับแรกและค่อยๆ กระจายไปยังผิวของอาหารที่มีการสัมผัสอยู่กับชันส่วน

เมื่อชันส่วนอายุ 4 สัปดาห์ พบว่าผลของการฟอกฆ่าเชื้อชันส่วนด้วยวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 1) โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 15 มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อมากที่สุด คือ 98.00% และในวิธีการที่ 10 มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื่อน้อยที่สุดคือ 56.00% พบว่ามีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นจากเชื้อรา โดยเชื้อราเกิดขึ้นบนชันส่วนและค่อย ๆ กระจายไปที่ผิวของอาหารในลักษณะเช่นเดียวกันกับเมื่อชันส่วนมีอายุ 3 สัปดาห์

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์จีนส่วนที่ไม่มีการปนเปื้อน

วิธีการ	ลำดับที่1 (%)(±SE)	ลำดับที่2 (%)(±SE)	ลำดับที่3 (%)(±SE)	ลำดับที่4 (%)(±SE)
1	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	96.00 ± 5.48a
2	86.00 ± 11.40a	86.00 ± 11.40a	86.00 ± 11.40a	86.00 ± 11.40a
3	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a	92.00 ± 10.95a
4	92.00 ± 17.89a	92.00 ± 17.89a	92.00 ± 18.79a	88.00 ± 17.89a
5	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a	92.00 ± 17.89a
6	92.00 ± 10.95a	92.00 ± 10.95a	92.00 ± 10.95a	92.00 ± 10.95a
7	92.00 ± 17.89a	92.00 ± 17.89a	92.00 ± 17.89a	92.00 ± 17.89a
8	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a
9	76.00 ± 16.73ab	76.00 ± 16.73ab	76.00 ± 16.73ab	76.00 ± 16.73ab
10	56.00 ± 26.08b	56.00 ± 26.08b	56.00 ± 26.08b	56.00 ± 26.08b
11	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	96.00 ± 8.94a	96.00 ± 8.94a
12	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	96.00 ± 8.94a
13	84.00 ± 16.73a	84.00 ± 16.73a	84.00 ± 16.73a	84.00 ± 16.73a
14	88.00 ± 10.95a	88.00 ± 10.95a	84.00 ± 8.94a	80.00 ± 0.00a
15	98.00 ± 4.47a	98.00 ± 4.47a	98.00 ± 4.47a	98.00 ± 4.47a
F-test	**	**	**	**
CV(%)	14.26	14.26	14.25	15.35

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%  
 \*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

2.เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการเกิดแคลลัส

ชิ้นส่วนเริ่มสร้างแคลลัสเมื่อชิ้นส่วนมีอายุ 2 สัปดาห์ และเกิดในวิธีการที่ 12 เท่านั้น และมีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นในบางวิธีการเมื่อชิ้นส่วนมีอายุ 3 สัปดาห์ เมื่อชิ้นส่วนอายุ 4 สัปดาห์ มีการสร้างแคลลัสเพิ่มมากขึ้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 2) ในวิธีการที่ 1 ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 56.00 % รองลงมา 44.00 % ในวิธีการที่ 2 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยต่ำสุด 0.00% ในวิธีการที่ 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14 โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัส

เมื่อชิ้นส่วนอายุ 6 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 2) ในวิธีการที่ 1 ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 82.00 % รองลงมา 70.00 % ในวิธีการที่ 2 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยต่ำสุด 0.00% ในวิธีการที่ 13, 14 ชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัส ในวิธีการที่ 6, 7, 8, 9, 10 ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 20, 2, 4, 4, 4 % ตามลำดับ

เมื่อชิ้นส่วนอายุ 8 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 2) ในวิธีการที่ 1 ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 82.00 % ซึ่งไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 6 โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 6 รองลงมา 72.00 % ในวิธีการที่ 2 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยต่ำสุด 0.00% ชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัส ในวิธีการที่ 13, 14 ไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 6

เมื่อชิ้นส่วนอายุ 10 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 2) ในวิธีการที่ 1 ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 84.00 % รองลงมา 72.00 % ในวิธีการที่ 2 ซึ่งไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 6 โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 6 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยต่ำสุด 0.00% ชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัส ในวิธีการที่ 13, 14 เช่นเดียวกับสัปดาห์ที่ 8

เมื่อชิ้นส่วนอายุ 12 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 2) ในวิธีการที่ 1 ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 84.00 % รองลงมา 72.00 % ในวิธีการที่ 2 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยต่ำสุด 0.00% ชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัส ในวิธีการที่ 13, 14 ซึ่งไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 10 โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ส่วนเกิดแคลลัสในวิธีการต่างๆ

วิธีการ	สัปดาห์ที่ 4 (%)	สัปดาห์ที่ 6 (%)	สัปดาห์ที่ 8 (%)	สัปดาห์ที่ 10 (%)	สัปดาห์ที่ 12 (%)
1	56.00 ± 15.17a	82.00 ± 8.37a	82.00 ± 8.37a	84.00 ± 8.94a	84.00 ± 8.94a
2	44.00 ± 15.17a	70.00 ± 0.00a	72.00 ± 8.37a	72.00 ± 8.37ab	72.00 ± 8.37ab
3	6.00 ± 5.48bc	14.00 ± 5.48bcd	14.00 ± 5.48cde	20.00 ± 14.14cdefg	30.00 ± 14.14cd
4	0.00 ± 0.00cd	6.00 ± 5.48cde	12.00 ± 13.04cde	16.00 ± 11.40cdefg	20.00 ± 12.25cde
5	4.00 ± 8.49cd	18.00 ± 17.89bcd	24.00 ± 23.02bcde	30.00 ± 30.00cde	32.00 ± 32.71cde
6	0.00 ± 0.00bc	20.00 ± 7.07bc	20.00 ± 7.07bcd	26.00 ± 15.17cdef	30.0 ± 12.25cd
7	0.00 ± 0.00d	2.00 ± 4.47de	2.00 ± 4.47ef	16.00 ± 11.40gh	20.00 ± 15.25cde
8	0.00 ± 0.00d	4.00 ± 8.94de	4.00 ± 8.94ef	20.00 ± 15.81fgh	20.00 ± 15.81cde
9	0.00 ± 0.00d	4.00 ± 5.48cde	8.00 ± 10.95cdef	10.00 ± 10.00defgh	10.00 ± 10.00def
10	0.00 ± 0.00d	4.00 ± 8.94cde	6.00 ± 8.94def	6.00 ± 8.94efgh	6.00 ± 8.94ef
11	2.00 ± 4.74bc	12.00 ± 4.47bcde	12.00 ± 4.47cdef	12.00 ± 4.47defgh	14.00 ± 5.48def
12	22.00 ± 19.24b	38.00 ± 20.49b	40.00 ± 27.39b	44.00 ± 13.02bc	48.00 ± 21.68bc
13	0.00 ± 0.00d	0.00 ± 0.00e	0.00 ± 0.00f	0.00 ± 0.00h	0.00 ± 0.00f
14	0.00 ± 0.00d	0.00 ± 0.00e	0.00 ± 0.00f	0.00 ± 0.00h	0.00 ± 0.00f
15	14.00 ± 13.42bc	20.00 ± 12.25b	26.00 ± 15.17bc	30.00 ± 20.00cd	30.00 ± 20.00cd
F-test	**	**	**	**	**
CV(%)	41.89	43.26	41.97	43.55	39.90

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละช่วง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%  
 \*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 3. การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน

เมื่อชิ้นส่วนอายุ 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วน มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น โดยชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนสีจากสีขาวไปเป็นสีเหลืองนวล ยกเว้นในวิธีการที่ 9, 10 และ 13 ชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนสีจากสีขาวไปเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้ในวิธีการที่ 9 และ 10 พบลักษณะน้ำน้ำเกิดขึ้นและในวิธีการที่ 3, 4 และ 5 ชิ้นส่วนมีสีม่วงเกิดขึ้นประปรายบริเวณกลางชิ้นส่วน และในทุกวิธีการชิ้นส่วนมีลักษณะบางใสและโค้งงอเข้าหากัน

ชิ้นส่วนอายุ 2 สัปดาห์ พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 3) โดยชิ้นส่วนในวิธีการที่ 12 มีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.2 คะแนน ชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสที่บริเวณโคนของชิ้นส่วน มีลักษณะเป็นก้อนกลม สีเขียวขนาดเล็ก ๆ หลายก้อน ชิ้นส่วนในทุกวิธีการทดลอง ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาลเข้มขึ้นและเกิดลักษณะเหี่ยวขุ่น ยกเว้นในวิธีการที่ 13, 14 ชิ้นส่วนมีลักษณะสด กว้าง แข็ง ขุ่น และมีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่ำสุด 1 คะแนน ในทุกวิธีการยกเว้นวิธีการที่ 12 โดยชิ้นส่วนในวิธีการดังกล่าวไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้น ชิ้นส่วนอายุ 3 สัปดาห์ คะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการทดลองต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 3) ชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 มีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุดคือ 2.5 คะแนน ชิ้นส่วนในทุกวิธีการส่วนใหญ่มีแคลลัสเกิดขึ้น โดยชิ้นส่วนมีการสร้าง friable callus ที่บริเวณโคนและส่วนกลางของชิ้นส่วน ซึ่งแคลลัสที่สร้างขึ้นนี้มีสีเขียว สีเหลือง สีขาวและสีน้ำตาล มีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดเล็กหลายก้อนติดกัน และมีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่ำสุด 1 คะแนน ในวิธีการที่ 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14 ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้น และไม่มีการสร้างแคลลัส

ชิ้นส่วนอายุ 4 สัปดาห์ พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 3) โดยชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 มีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุดคือ 4.08 คะแนน และวิธีการที่ 7, 8, 13 และ 14 มีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่ำสุดคือ 1 คะแนน โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นและชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น

ชิ้นส่วนอายุ 8 สัปดาห์ พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 3) โดยชิ้นส่วนในวิธีการที่ 1 มีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุดคือ 4.32 คะแนน แคลลัสมีการพัฒนาเกิดขึ้นโดยแคลลัสสีเหลืองมีการเปลี่ยนสีไปเป็นสีเขียวเพิ่มมากขึ้น วิธีการที่ 13 และ 14 มีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่ำสุดคือ 1 คะแนน โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้น และพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 4) วิธีการที่ 3 มีน้ำหนักชิ้นส่วนเฉลี่ยมากที่สุด 1.03 กรัม แต่มีคะแนนการเจริญเติบโตเพียง 2.22 คะแนน เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสมีการเจริญลดลง โดยแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวสด ไปเป็นสีเขียวซีมัว เริ่มจากบริเวณกลางของก้อนแคลลัส แล้วค่อย ๆ กระจายออกไปยังด้านนอกของก้อนแคลลัส และมีการพัฒนาของแคลลัสสีเหลืองไปเป็นแคลลัสสีเขียวเพียงบางชิ้นส่วนเท่านั้น แคลลัสสีเหลืองเกือบทั้งหมดไม่มีการพัฒนาทางด้านสีเกิดขึ้น แต่มีการเพิ่มขนาดในปริมาณมากขึ้นแทน และรองลงมา 0.95 กรัมในวิธีการที่ 2 และวิธีการที่ 14 มีน้ำหนักชิ้นส่วนเฉลี่ยน้อยที่สุดเพียง 0.05 กรัม

ชิ้นส่วนอายุ 12 สัปดาห์ พบว่าคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 3) โดยชิ้นส่วนในวิธีการที่ 2 มีคะแนนการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุดคือ 4.2 คะแนน แคลลัสมีการพัฒนาจากสีเหลืองไปเป็นสีเขียวเพิ่มมากขึ้น รองลงมาคือ 4.1 คะแนนในวิธีการที่ 1 ซึ่งมีคะแนนลดลง เนื่องจากแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวสด ไปเป็นสีเขียวซีมัว เพิ่มมากขึ้นจึงทำให้มีคะแนนการเจริญเติบโตลดลง และวิธีการที่ 13 และ 14 มีคะแนนการเจริญเติบโตต่ำสุดคือ 1 คะแนน โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นเช่นเดียวกับสัปดาห์ที่ 8 และพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นส่วนในวิธีการต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (ตารางที่ 4) วิธีการที่ 2 มีน้ำหนักชิ้นส่วนเฉลี่ยมากที่สุด 2.71 กรัม และมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 8 มากที่สุด และรองลงมา 2.20 กรัม ในวิธีการที่ 3 แคลลัสมีการเพิ่มขนาดขึ้นอีก รวมทั้งชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสใหม่เพิ่มขึ้นอีกจำนวนหนึ่งด้วย และมีคะแนนการเจริญเติบโตเพียง 2.42 คะแนน เพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 8 เพียงเล็กน้อย เนื่องจากแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวสด ไปเป็นสีเขียวคล้ำเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งแคลลัสที่เพิ่มจำนวนขึ้นนี้ มีทั้งแคลลัสที่เป็นสีน้ำตาล สีขาวและสีเขียว และวิธีการที่ 14 มีน้ำหนักชิ้นส่วนเฉลี่ยน้อยที่สุดเพียง 0.03 กรัม ซึ่งในวิธีการที่ 13 และ 14 มีน้ำหนักชิ้นส่วนเฉลี่ยลดลงจากสัปดาห์ที่ 8 เล็กน้อย

ตารางที่ 3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของจีนส่วนในแต่ละสัปดาห์

วิธีการ ที่	สัปดาห์ที่ 2 (±SE)	สัปดาห์ที่ 3 (±SE)	สัปดาห์ที่ 4 (±SE)	สัปดาห์ที่ 8 (±SE)	สัปดาห์ที่ 12 (±SE)
1	1.00±0.00a	2.26±0.25a	4.08± 0.31a	4.32 ±0.41a	4.10 ±0.38a
2	1.00±0.00a	2.50±0.61a	4.02 ±0.51a	4.06±0.32a	4.20 ±0.37a
3	1.00±0.00a	1.30±0.27bc	1.74 ±0.44bc	2.22±0.45bc	2.42 ±0.58bc
4	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.12 ±0.22cd	1.44±0.34cde	1.52 ±0.41cdef
5	1.00±0.00a	1.20±0.45bc	1.42 ±0.40bcd	2.11±.01bcd	2.22 ±1.13bcde
6	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.36 ±0.21bcd	2.04±0.23cd	2.30 ±0.32bcd
7	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.00 ±0.00d	1.10±0.22e	1.32 ±0.29ef
8	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.00 ±0.00d	1.12±0.27e	1.40 ±0.37def
9	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.14± 0.19cd	1.26±0.31de	1.26 ±0.31ef
10	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.26 ±0.49bcd	1.26±0.31de	1.26 ±0.58ef
11	1.00±0.00a	1.10±0.22bc	1.50±0.00bcd	1.86±0.22cde	1.88 ±0.24cdef
12	1.20±0.45a	1.52±0.54b	1.90 ±0.47b	2.90±0.69b	3.04 ±0.82b
13	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.00 ±0.00d	1.00±0.00e	1.00 ±0.00f
14	1.00±0.00a	1.00±0.00c	1.00 ±0.00d	1.00±0.00e	1.00 ±0.00f
15	1.00±0.00a	1.20±0.27bc	1.90±0.74b	2.06±0.72cd	2.18 ±0.72bcde
F-test	ns	**	**	**	**
CV (%)	11.40	21.19	20.17	23.16	24.97

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%  
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักชิ้นส่วนในแต่ละวิธีการ

วิธีการที่	สัปดาห์ที่ 8 (g) ( $\pm$ SE)	สัปดาห์ที่ 12 (g) ( $\pm$ SE)
1	0.59 $\pm$ 0.16bc	0.87 $\pm$ 0.19b
2	0.95 $\pm$ 0.51ab	2.71 $\pm$ 1.27a
3	1.03 $\pm$ 0.41a	2.20 $\pm$ 0.88a
4	0.24 $\pm$ 0.19de	0.30 $\pm$ 0.21bc
5	0.16 $\pm$ 0.12de	0.28 $\pm$ 0.29c
6	0.34 $\pm$ 0.20cde	0.40 $\pm$ 0.23bc
7	0.08 $\pm$ 0.09de	0.08 $\pm$ 0.10c
8	0.06 $\pm$ 0.06e	0.07 $\pm$ 0.08c
9	0.11 $\pm$ 0.09de	0.13 $\pm$ 0.09c
10	0.12 $\pm$ 0.20de	0.18 $\pm$ 0.20c
11	0.26 $\pm$ 0.11cde	0.31 $\pm$ 0.14bc
12	0.41 $\pm$ 0.15cd	0.56 $\pm$ 0.21bc
13	0.12 $\pm$ 0.04de	0.08 $\pm$ 0.03c
14	0.05 $\pm$ 0.01e	0.03 $\pm$ 0.00c
15	0.19 $\pm$ 0.05de	0.52 $\pm$ 0.18bc
F-test	**	**
CV(%)	6.96	10.18

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

#### 4.2. วิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำดอกมะลิมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ (ตารางที่ 1) พบว่าวิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อจากการทดลองคือวิธีการที่ 15 ที่ใช้ Ethanol 70% 1 นาที Haiter 100% + tween-20 3 นาที และล้างด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อดีที่สุดคือ 98% สอดคล้องกับการทดลองของ Fujii (1991) ที่ทำการศึกษากการสร้างและการผลิตสาร Podophyllotoxins ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของใบและลำต้นของ *Podophyllum* spp. ด้วย 5% hypochlorite เลี้ยงในอาหาร MS ที่มี BA และ 2,4-D ชิ้นส่วนมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ ซึ่งใกล้เคียงกันกับใน Haiter ที่มี sodium hypochlorite เป็นสารออกฤทธิ์อยู่ 6 % ซึ่งอาจเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการฟอกชิ้นส่วนให้ปลอดเชื้อก็เป็นได้ แต่ปริมาณของ sodium hypochlorite ที่มีถึง 6 % อาจเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อได้ เพราะชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการดังกล่าว ชิ้นส่วนมีพัฒนาการที่ช้า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำ และน้ำหนักชิ้นส่วนที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย

จากตารางที่ 2 ชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70% 10 วินาที Clorox 20 % + tween-20 10 นาทีและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที พบว่าชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้มากที่สุดคือ 84 % และในวิธีการที่ 2 เมื่อใช้สารฟอกเหมือนกัน แตกต่างกันที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนมีค่าลดลง 12 % อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ อาจไม่เหมาะสม ถึงแม้ว่าจะใช้สารฟอกฆ่าเชื้อในความเข้มข้นที่น้อยกว่าก็ตาม แต่ระยะเวลาที่ใช้ยาวนานเกินไป จึงเป็นผลให้เนื้อเยื่อได้รับอันตรายได้

จากตารางที่ 3, 4 และ ภาพที่ 2 พบว่าวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70% 1 นาที Clorox 10 % + tween-20 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของของชิ้นส่วนกลีบดอกมะลิ (ตารางที่ 3) โดยชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสซึ่งแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นสีเขียวสดได้ดีที่สุด และชิ้นส่วนมีน้ำหนักมากที่สุด (ตารางที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของปิยะฉัตร (2538) ที่รายงาน ว่า ก้านใบอ่อนของสะเดาไทยที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเดียวกัน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และ ศาลักษณ์ (2526) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของว่านสีทิส พบว่าชิ้นส่วนก้านช่อดอกอ่อน ก้านช่อดอกย่อย และดอกอ่อน ที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเช่นเดียวกันนี้ ชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสได้ใน 1-2 สัปดาห์ และในชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70% 1 นาที Clorox 20 % + tween-20 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีกับชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70% 1 นาที Clorox 30 % + tween-20 15 นาที น้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อเหมือนกัน และระยะเวลาที่เท่ากัน แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส แคลลัสมีการ

เจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย โดยแคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่มีสีดำ รวมถึงน้ำหนักชิ้นส่วนที่น้อยกว่าด้วย อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ใช้มากเกินไป ประสิทธิภาพของสารฟอกฆ่าเชื้อจะสูงขึ้น ถ้าใช้เวลาและความเข้มข้นของสารมากขึ้น แต่ถ้าใช้มากและนานเกินไปอาจทำอันตรายต่อความมีชีวิตของเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะของพืชได้ ซึ่งการใช้ Clorox 20% และ 30% อาจมีความเข้มข้นที่มากเกินไปสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อกลีบดอกมะลิลา

จากตารางที่ 2 ชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการแช่ Rifampicin 60 นาที แล้วจุ่ม Clorox 10% 5 วินาที และแช่ Rifampicin 60 นาที แล้วจุ่ม Ethanol 70% 1 นาที ชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัส (ตารางที่ 2) ไม่มีการเจริญเติบโต (ตารางที่ 3) และชิ้นส่วนมีน้ำหนักลดลง (ตารางที่ 4) อาจเนื่องมาจากเนื้อเยื่อได้รับอันตราย และเกิดการตาย เพราะการแช่ Rifampicin เป็นระยะเวลาที่นานเกินไป ชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการแช่ Rifampicin 30 นาที แล้วจุ่ม Clorox 10% 5 วินาที และแช่ Rifampicin 30 นาที แล้วจุ่ม Ethanol 70% 1 นาที และชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการแช่ Rifampicin 45 นาที แล้วจุ่ม Clorox 10% 5 วินาที และแช่ Rifampicin 45 นาที แล้วจุ่ม Ethanol 70% 1 นาที ชิ้นส่วนสามารถสร้างแคลลัสได้ แต่แคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ มีสีน้ำตาลหรือสีดำ มีขนาดเล็กน้ำหนักชิ้นส่วนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการแช่ Rifampicin เป็นระยะเวลา 30 นาที และ 45 นาที มีผลต่อเนื้อเยื่อของดอกมะลิลา เนื้อเยื่อได้รับอันตรายจากการใช้ Rifampicin แต่เนื้อเยื่อไม่ถึงกับตาย มีการเจริญเติบโตได้แต่ค่อนข้างผิดปกติ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการแช่ Rifampicin มีผลต่อการมีชีวิตของเนื้อเยื่อพืช และจากวิธีการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อข้างต้น ชิ้นส่วนไม่มีการล้างด้วยน้ำกลั่น จึงมีสารฟอกฆ่าเชื้อติดค้างอยู่บนชิ้นส่วนนี้ และเป็นผลให้เกิดความเป็นพิษ ทุกชิ้นส่วนแสดงอาการผิดปกติ บางชิ้นส่วนไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตายในที่สุด ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้เป็นผลสำเร็จ ถ้าเนื้อเยื่อนั้นกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกได้ยากโดยเฉพาะแบคทีเรีย แต่บางทีก็ไปยับยั้งการเจริญและพัฒนารวมของเนื้อเยื่อพืช(บุญยืน,2544) และอาจทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงได้(คำบุญ,2544)

อย่างไรก็ตามการเลือกชิ้นส่วนเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงควรคำนึงถึงความเหมาะสมของระยะเวลา ฤดูกาลและ พัฒนาการของพืช ในการเก็บเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีผลต่อการเจริญ และการพัฒนาของพืชภายหลังจากการเพาะเลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปในพืชและเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนกลีบดอกมะลิลาด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าวิธีที่ดีที่สุดคือการใช้ Ethanal 70% 1 นาที Haiter100% +tween-20 3 นาที และล้างด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อดีที่สุดคือ 96% วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanal 70% 1 นาที Clorox 10 % + tween-20 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของของชิ้นส่วนกลีบดอกมะลิลา มีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุดคือ 4.2 คะแนน โดยชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัสแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นสีเขียวสดได้ดีที่สุดและชิ้นส่วนมีน้ำหนักมากที่สุดคือ 2.71 กรัม สำหรับชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanal 70% 10 วินาที Clorox 20 % + tween-20 10 นาทีและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที พบว่าชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้มากที่สุดคือ 84 %และชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการแช่ Rifampicin 60 นาที แล้วจุ่ม Clorox10% 5 วินาที และแช่ Rifampicin 60 นาที แล้วจุ่ม Ethanol70% 1 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำที่สุดคือ 0 % โดยชิ้นส่วนไม่มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้น

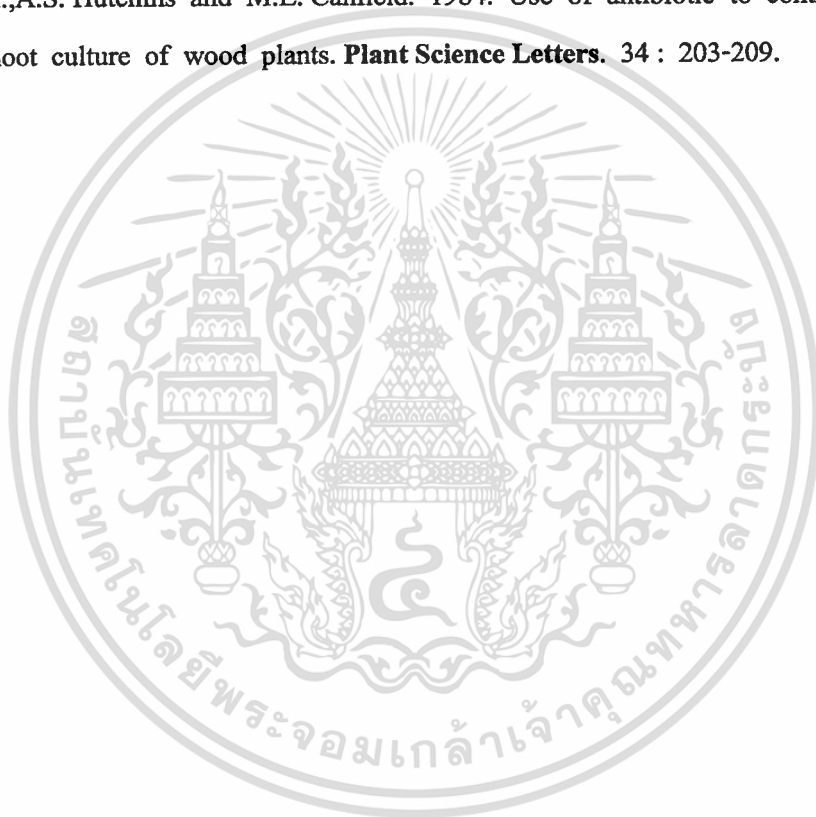
## บรรณานุกรม

- กุหลาบ กงทอง. 2539. “การเพาะเลี้ยงร็กรเไว้ในสภาพปลอดเชื้อ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหา  
บัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- คำคุณ กาญจนภูมิ. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย.
- วชิรพงศ์ หวลนุดตา. 2542. ไม้ดอกหอมสีขาว. กรุงเทพฯ : บ้านและสวน
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ขอนแก่น : ภาควิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- ปิยะฉัตร จะโนภาย. 2538. “การเพาะเลี้ยงสะเคาไทยในสภาพปลอดเชื้อ.” วิทยานิพนธ์วิทยา  
ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์. บัณฑิตวิทยาลัย,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.  
กรุงเทพฯ.
- รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ:หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา  
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สายชล มาลัยแก้ว. 2541. การปลูกมะลิ. กรุงเทพฯ : อักษรสยามการพิมพ์.
- สายสมร ถ่ายอง. 2524. สารปฏิชีวนะและปฏิกิริยาการต่อต้านจุลินทรีย์. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีว  
วิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2544. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชีย  
ตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 19 พืชที่ให้น้ำมันหอม. นนทบุรี : สหมิตรพรินต์ติ้ง.
- สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2537. สรีรวิทยาพืชสวน. พิมพ์ครั้งที่1. ขอนแก่น : ศิริภรณ์ออฟเซ็ท.
- ศาลักษณ์ พรรณศิริ. 2526. “การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของว่านสี่ทิศ.” วิทยานิพนธ์วิทยา  
ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.  
กรุงเทพฯ.
- อรดี สหวัชรินทร์. 2539. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- อารีย์ วรรณวุฒิก. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อดิ  
สรร์.
- Anonymous. 1994. Detection of payhogens and contaminations of plants and plant cell  
culture. *PhySource*. 5(1): 1-5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fujii, Y. 1991. *Podophyllum* spp.: *In Vitro* regeneration and the production of Podophyllotoxins, pp 362-375. In Y.P.S.Bajaj (eds.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.15, Medicinal and Aromatic Plants III**. Springer –Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Furuya, T. and T.Yoshikawa. 1991. *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) Production of Vitamin E in cell culture, pp 142-155. In Y.P.S.Bajaj (eds.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.15, Medicinal and Aromatic Plants III**. Springer – Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Goleniowski, M.E. and G.L.Silva. 1993. *Ambrosia tenuifolia* Spreng(Altamisa) *In Vitro* culture and the production of psilostachyinoides, pp 41-53. In Y.P.S.Bajaj (eds.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.24, Medicinal and Aromatic Plants V**. Springer –Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Kawaguchi, K., M.Hirotsu and T.Furuya. 1993. *Strophanthus* species (Member of the Dogbane family) *In Vitro* culture and the production of cardenolides, pp 371-386. In Y.P.S.Bajaj (eds.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.21, Medicinal and Aromatic Plants IV**. Springer –Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Mahady, G.B., A.B. Schilling and C.W.W. Beecher. 1993. *Sanguinaria canadensis* L. (Sanguiharius) :*In Vitro* culture and the production of benzophenanthridine alkaloids, pp 313-327. In Y.P.S.Bajaj (eds.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.24, Medicinal and Aromatic Plants V**. Springer –Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physio.Plant.** 15 : 473-497.
- Phillips, R., S.M. Arnott and S.E. Kaplan. 1981. Antibiotic in plant tissue culture : Rifampicin effectively controls bacterial contaminations without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. **Plant Science Letters.** 21 : 235-240.
- Tomada, G., J.Matsuyama and H.Ikubo. 1976. Tissue culture of fragrant plants. **Bull Fac Agric Tamagawa-Univ Jpn.** 16 : 16-22.

- Torné,J.M., P.Rodriguez., A.Manich., I.Claparola and M.A.Santos. 1997. Embryogenesis induction in petals of *Araujia sericifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 51 : 95-102.
- Yamamoto,H. 1991. *Scutellaria baicalensis* Georgi: **In Vitro** culture and the production of flavonoids, pp 398-418. In Y.P.S.Bajaj (eds.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.15, Medicinal and Aromatic Plants III**. Springer –Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Young, P.M.,A.S. Hutchins and M.L. Canfield. 1984. Use of antibiotic to control bacteria in shoot culture of wood plants. **Plant Science Letters**. 34 : 203-209.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 สูตรอาหารMS (Murashige and Skoog )(1962)

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (mg/l)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650.00
$\text{KNO}_3$	1900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.00
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
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
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.30
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30000.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของกลีบดอกมะลิลาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 1 สัปดาห์ (Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	792.000	198.000	1.199 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	9458.667	675.619	4.091 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	9248.000	165.143			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>19498.667</b>	<b>263.495</b>			

Grand Meam = 90.13

CV = 14.26 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของกลีบดอกมะลิลาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆเมื่ออายุ 2 สัปดาห์(Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	792.000	198.000	1.199 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	9458.667	675.619	4.091 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	9248.000	165.143			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>19498.667</b>	<b>263.495</b>			

Grand Meam = 90.13

CV =14.26 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของก๊ิบคอกมะลิลาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 3 สัปดาห์ (Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	1074.667	268.667	1.649 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	9288.000	663.429	4.071 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	9125.333	162.952			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>19488.000</b>	<b>263.351</b>			

Grand Meam = 89.60

CV = 14.25 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อของก๊ิบคอกมะลิลาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ (Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	1226.667	306.667	1.681 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	8360.000	597.143	3.274 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	10213.333	182.381			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>19800.00</b>	<b>267.568</b>			

Grand Meam = 88

CV = 15.35 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบดอกมะลิลา  
เมื่ออายุ 4 สัปดาห์(Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	145.119	36.280	0.637 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	20934.388	1495.313	26.248 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	3190.275	56.969			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>24269.781</b>	<b>327.970</b>			

Grand Meam = 18.017

CV = 41.89 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบดอกมะลิลาเมื่ออายุ  
6 สัปดาห์(Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	378.137	94.534	1.036 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	25009.391	1786.385	19.570 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	5111.653	91.280			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>30499.182</b>	<b>412.151</b>			

Grand Meam = 22.082

CV = 43.26 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลัสของกัลีบคอกมะลิลาเมื่ออายุ 8 สัปดาห์(Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	480.997	120.249	1.235 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	26238.871	1874.205	19.254 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	5451.213	97.343			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>32171.082</b>	<b>434.744</b>			

Grand Meam = 23.505

CV = 41.97 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลัสของกัลีบคอกมะลิลา เมื่ออายุ 10 สัปดาห์(Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	708.693	177.173	1.560 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	26133.366	1866.669	16.432 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	6361.694	113.602			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>33203.754</b>	<b>448.699</b>			

Grand Meam = 24.472

CV = 43.55 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของกลีบคอกมะลิลา  
เมื่ออายุ 12 สัปดาห์(Arcsine Transformation)

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	694.757	173.689	1.372 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	22965.099	1640.364	12.959 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	7088.516	126.581			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>30748.372</b>	<b>415.519</b>			

Grand Meam = 28.198

CV = 39.90 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญเติบโตของกลีบคอกมะลิลาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย วิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 2 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	0.053	0.013	1.000 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	0.187	0.013	1.000 <sup>ns</sup>	1.84	2.34
Error	56	0.747	0.013			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>0.987</b>	<b>0.013</b>			

Grand Meam = 1.013

CV = 11.40 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญเติบโตของกลีบดอกมะลิลาที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อด้วย วิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 3 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	0.470	0.117	1.616 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	15.891	1.135	15.617 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	4.070	0.073			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>20.431</b>	<b>0.276</b>			

Grand Meam = 1.272

CV = 21.19 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญของกลีบดอกมะลิลาที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อด้วย วิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	0.347	0.087	0.742 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	70.829	5.059	43.238 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	6.553	0.117			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>77.729</b>	<b>1.050</b>			

Grand Meam = 1.696

CV = 20.17 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญของกลีบดอกมะลิลาที่ผ่านการฟอกหมักด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	0.883	0.221	1.048 <sup>ns</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	77.539	5.539	26.274 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	11.805	0.211			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>90.227</b>	<b>1.219</b>			

Grand Meam = 1.982

CV = 23.16 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ผลทางสถิติคะแนนการเจริญของกลีบดอกมะลิลาที่ผ่านการฟอกหมักด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 12 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	1.280	0.320	1.194	2.53	3.65
Treatment	14	73.803	5.272	19.675	1.84	2.34
Error	56	15.004	0.268			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>90.087</b>	<b>1.217</b>			

Grand Meam = 2.073

CV = 24.97 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติน้ำหนักขึ้นส่วนกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่า  
เชื้อด้วย วิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	0.026	0.006	1.022 <sup>ms</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	1.087	0.078	12.376 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	0.351	0.006			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>1.464</b>	<b>0.020</b>			

Grand Meam = 1.137

CV = 6.96 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติน้ำหนักขึ้นส่วนกลีบดอกมะลิลา ที่ผ่านการฟอกฆ่า  
เชื้อด้วย วิธีการต่าง ๆ เมื่ออายุ 12 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	4	0.056	0.014	0.902 <sup>ms</sup>	2.53	3.65
Treatment	14	5.051	0.361	23.234 <sup>**</sup>	1.84	2.34
Error	56	0.870	0.016			
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>5.976</b>	<b>0.081</b>			

Grand Meam = 1.223

CV = 10.18 %

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้