การผลิตเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รี

ARTIFICIAL STRAWBERRY (*Fragaria* spp.) SEEDS PRODUCTION

ปราการ ชมบูรณ์
PRAKARN CHOMBOON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2564
KMITL-2021-SC-M-020-034

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ARTIFICIAL STRAWBERRY (*Fragaria* spp.) SEEDS PRODUCTION

PRAKARN CHOMBOON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY
SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2021

KMITL-2021-SC-M-020-034

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2021
SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รี
ชื่อนักศึกษา นายปราการ ชมบูรณ์
รหัสประจำตัว 60605048
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
พ.ศ. 2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

ศึกษาการพัฒนาการขยายพันธุ์ของสตรอว์เบอร์รี (*Fragaria x ananassa* Duch.) โดยการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการชักนำให้เกิดแคลลัส 2 สัปดาห์ นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดขนาดเล็ก 5.08 ยอดต่อชิ้นแคลลัส โดยใช้เวลาในการชักนำ 49-56 วัน ยอดขนาดเล็กที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการยืด โดยต้นจะมีความสูงเฉลี่ย 1.89 เซนติเมตร ทำการเพิ่มปริมาณต้นด้วยการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm จะสามารถเพิ่มจำนวนต้นจาก 15.3 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง เป็น 43.6 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง ภายใน 2 สัปดาห์ แต่ต้นที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะมีอาการฉ่ำน้ำ จึงนำต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เพื่อรักษาอาการฉ่ำน้ำ ต้นพืชจะกลับเป็นต้นปกติภายในระยะเวลา 1 เดือน นำต้นปกติไปชักนำให้เกิดรากบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้เวลา 2 สัปดาห์ในการชักนำให้เกิดราก

ศึกษาการพัฒนาการผลิตเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รีโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดในการผลิตเมล็ดเทียม ชักนำให้เกิดยอดหลายยอดของสตรอว์เบอร์รีโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้ 11.8 ยอด จากนั้นทำการผลิตเมล็ดเทียมโดยการห่อหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยโซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และ 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ นำเมล็ดเทียมไปชักนำให้เกิดการงอกบนอาหาร 1/4MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกได้แก่ ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และรวมถึงสารอาหารที่อยู่ภายในเมล็ดเทียม โดยเมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในเมล็ดเพียงอย่างเดียว จะสูญเสียความมีชีวิตเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 เดือน แต่เมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมจะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 เดือน อย่างไรก็ตามเมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมจะสูญเสียความมีชีวิตเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 เดือน

ศึกษาการพัฒนาการออกปลูกของต้นสตรอว์เบอร์รีในหลอดทดลองและเมล็ดเทียมของต้นสตรอว์เบอร์รี ขนาดของต้นสตรอว์เบอร์รีในขวดเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการออกปลูก จากการทดลอง พบว่า ต้นสตรอว์เบอร์รีขนาด 2 เซนติเมตร สามารถปรับตัวได้ดีกว่าต้นที่มีขนาดน้อยกว่า 2 เซนติเมตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ การนำเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รีออกปลูก วัสดุปลูกกับเอนโดสเปิร์มเทียมมีความสำคัญต่อการงอกของเมล็ดเทียม จากการทดลอง พบว่าการใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูกและอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมจะทำให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดที่ 40 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 2 สัปดาห์

คำสำคัญ : การยืด เมล็ดเทียม ยอดขนาดเล็ก วัสดุปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Artificial Strawberry (*Fragaria* spp.) Seeds Production
Student Name	Mr. Prakarn Chomboon
Student ID	60605048
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2021
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Pana Lohasupthawee

Abstract

Plant tissue culture of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) was developed in this study. Green compact calli was induced in semi-solid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA within 2 weeks. After subculture these calli to semi-solid MS medium supplemented with 1 mg/l TDZ and 0.2 mg/l 2,4-D, 5.08 microshoots per callus were produced within 49-56 days. The microshoots cultured in semi-solid MS medium with 0.1 mg/l GA_3, gave the highest elongation of shoot (1.89cm) within 30 days of inoculation. In mass propagation, the microshoots were cultured in MS liquid medium with 0.1 mg/l GA_3 and shaken at 120 rpm. The number of shoots was increased from 15.3 shoots to 43.6 shoots per culture (100 ml) within 2 weeks, but all were hyperhydric shoots. Hyperhydric shoots recovered to normal shoots within 1 month after cultured on semi-solid MS medium with 8 g/l agar. Shoots formed roots on semi-solid MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA within 2 weeks.

Artificial seed of strawberry was developed in this study. Shoot tips were used as an explant source for artificial seed production. Shoot multiplication from shoot tips of strawberry occurred best in semi-solid MS medium with 0.5 mg/l TDZ (11.2 shoots per explant). Artificial seed were formed from shoot tips with trimmed leaves using 3% sodium alginate prepared in Murashige and Skoog (MS) liquid medium as the gel matrix and 0.1 M calcium chloride for complexation. The conversion of encapsulated shoot tips on semi-solid 1/4MS medium without growth regulators was affected by the storage duration at 4 ℃ and the presence or absence of MS nutrients and sucrose in calcium alginate beads. The encapsulated shoot tips with MS medium without sucrose lost viability completely after storage at 4 ℃ for 5 months but those encapsulated in MS medium with 3% sucrose were vital (26%) after 5 months of storage at 4 ℃. However, encapsulated shoot tips in MS medium with 3% sucrose completely lost viability within 7 months of storage at 4 ℃.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acclimatization of *in vitro* strawberry and artificial seeds of strawberry was developed in this study. The size of *in vitro* plantlets was important for acclimatization. The result showed that 2 cm of strawberry plantlets had 100 percent survival rate but strawberry plantlets less than 2 cm size had percent survival rate less than 100 percent. In the study of germination of artificial seeds, planting material and artificial endosperm are important for seed germination. The use of vermiculite as plant material and MS medium with 3% sucrose as artificial endosperm showed the highest germination percentage at 40 percent in 2 weeks.

Keywords : Elongation, Artificial seed, Microshoots, Planting material

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “การผลิตเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รี” สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง รวมทั้งเป็นผู้ตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ด้วยความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอน จึงทำให้วิทยานิพนธ์ออกมาเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหาและช่วยตรวจสอบความถูกต้องเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอบกราบขอบพระคุณ บริษัท เบนดิโต้ ฟาร์ม จำกัด อำเภอปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอนที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์สตรอว์เบอร์รีเพื่อใช้ในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมบุคลากรด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรมจากมหาวิทยาลัยและสถาบันวิจัยของภาครัฐไปปฏิบัติงานเพื่อเพิ่มขีดความสามารถการแข่งขันในภาคเอกชน (Talent Mobility)

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี - พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนส่งเสริมการศึกษาในทุกด้านเสมอมา รวมถึงพี่ เพื่อน และน้อง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นายปราการ ชมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลพื้นฐานของสตรอว์เบอร์รี	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสตรอว์เบอร์รี	4
2.1.2 ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจายของสตรอว์เบอร์รีในแต่ละภูมิภาค	5
2.1.3 การจำแนกสตรอว์เบอร์รีและพันธุสตรอว์เบอร์รี	6
2.2 เมล็ดเทียม	9
2.2.1 ประวัติความเป็นมา	9
2.2.2 ประเภทเมล็ดเทียม	10
2.2.3 ประเภทของชิ้นส่วนพืชสำหรับการผลิตเมล็ดเทียม	16
2.2.4 วิธีการประยุกต์ใช้เมล็ดเทียมในด้านต่างๆ	18
2.2.5 ปัญหา ข้อจำกัดและความเป็นไปได้ในอนาคต	19
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
2.3.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส	20
2.3.2 การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัส	21
2.3.3 การชักนำให้เกิดการยืดและการเพิ่มปริมาณยอดขนาดเล็ก	22
2.3.4 การชักนำให้ต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำกลับเป็นต้นปกติ	23
2.3.5 การชักนำให้เกิดราก	23
2.3.6 การชักนำให้เกิดยอดหลายยอด	24
2.3.7 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนต	25
2.3.8 การชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม	25
2.3.9 เอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืช	26
2.3.10 ขนาดของต้นพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	28
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	28
3.1.1 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา	28
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร	28
3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในเตรียมเมล็ดเทียม	28
3.1.4 อุปกรณ์	28
3.2 วิธีการดำเนินงาน	29
3.2.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	29
3.2.2 การเพาะเลี้ยงเมล็ดสตรอว์เบอร์รีในหลอดทดลอง	29
3.2.3 ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนใบ	29
3.2.4 การผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนยอด	33
3.2.5 การออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง	35
3.2.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	37
4.1 ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนใบ	37
4.1.1 การศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนใบ	37
4.1.2 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบของต้นสตรอว์เบอร์รี	42
4.1.3 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่เหมาะสมต่อการเจริญของยอดขนาดเล็ก (micro shoot)	47
4.1.4 ศึกษาความเข้มข้นของผงวุ้นและน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการรักษาอาการฉ่ำน้ำของต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว	51
4.1.5 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก	54
4.2 การผลิตเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนยอด	57
4.2.1 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด	57
4.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตเมล็ดเทียม	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม..... 65
4.2.4 ศึกษาองค์ประกอบของเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด..... 67
4.3. การออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง..... 78
4.3.1 ศึกษาขนาดของต้นสตรอว์เบอร์รีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเมื่อทำการออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง..... 78
4.3.2 ศึกษาวัสดุปลูกและเอโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียมในสภาวะไม่ปลอดเชื้อภายนอกหลอดทดลอง.... 81
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 87
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 90
เอกสารอ้างอิง..... 91
ภาคผนวก..... 100
ภาคผนวก ก..... 101
ประวัติผู้เขียน..... 103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกของสตรอว์เบอร์รีในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554-2563	2
4.1	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	38
4.2	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	39
4.3	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	43
4.4	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	44
4.5	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ต่อการเจริญเติบโตของยอดขนาดเล็กบนอาหารแข็ง MS เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	48
4.6	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ต่อการเจริญเติบโตของยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	50
4.7	อิทธิพลของความเข้มข้นของผงวุ้นและน้ำตาลต่อการรักษาอาการฉ่ำน้ำของปลายยอดสตรอว์เบอร์รี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	52
4.8	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดรากของชิ้นส่วนปลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์	55
4.9	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	**58**
4.10	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.11	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่อความกลมและความแข็งของเมล็ดเทียม	63
4.12	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	63
4.13	อิทธิพลของความเข้มข้นของอาหาร MS ต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	66
4.14	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 0 วัน	69
4.15	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน	70
4.16	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 เดือน	71
4.17	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 เดือน	72
4.18	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 4 เดือน	73
4.19	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 5 เดือน	74
4.20	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 6 เดือน	75
4.21	ขนาดของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี เมื่อออกปลูกในพีทมอสเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	79
4.22	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อทำการออกปลูกโดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	83
4.23	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อทำการออกปลูกโดยใช้สแฟกนั่มมอสเป็นวัสดุปลูก เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	84
4.24	ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อทำการออกปลูกโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูก เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของต้น ดอก และผลของสตรอว์เบอร์รี	5
2.2	ขั้นตอนที่ใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมหรือเมล็ดสังเคราะห์.....	12
2.3	ขั้นตอนการฟอร์มตัวของเมล็ดเทียมแบบชั้นเดียว.....	14
2.4	โครงสร้างของอัลจีเนต.....	15
2.5	ขั้นตอนการฟอร์มตัวของเมล็ดเทียมแบบกลวง.....	16
4.1	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และลักษณะของใบที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	40
4.2	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และลักษณะของใบที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	41
4.3	ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA และลักษณะของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เพาะเลียงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	45
4.4	ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและลักษณะของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เพาะเลียงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	46
4.5	ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงออร์แกโนเจนิกแคลลัสบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รูป a-e ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	48
4.6	ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร รูป a-e ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	50
4.7	ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำบนอาหาร MS ที่มีประกอบด้วยน้ำตาล ร่วมกับ ผงวุ้น ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	ลักษณะของรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและลักษณะของรากที่ได้จากชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์.....	56
4.9	ลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	60
4.10	ลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ IBA หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	61
4.11	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่อลักษณะของเมล็ดเทียมและการงอกของเมล็ดเทียม รูป a ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป b ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป c ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป d ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป e การงอกของเมล็ดเทียมที่มีโซเดียมอัลจีเนต 3 เปอร์เซ็นต์ รูป f การงอกของเมล็ดเทียมที่มีโซเดียมอัลจีเนต 4 เปอร์เซ็นต์.....	64
4.12	ค่าความแข็งที่วัดโดยใช้เครื่อง Texture Analyzer ของเมล็ดเทียมที่ใช้โซเดียมอัลจีเนต 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในการผลิตเมล็ดเทียม รูป a และ b ตามลำดับ.....	64
4.13	ความเข้มข้นของอาหาร MS ต่อการงอกของเมล็ดเทียม รูป a อาหาร MS รูป b อาหาร 1/2MS รูป c อาหาร 1/4MS รูป d อาหาร 1/8MS รูป e ลักษณะของรากที่เกิดขึ้นจากเมล็ดเทียมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS 1/2MS 1/4MS และ 1/8MS ตามลำดับจากซ้ายไปขวา	66
4.14	อิทธิพลของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดเทียมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด ณ เวลาต่างๆ.....	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.15	การทดสอบความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยเอนโดสปิร์มเทียมชนิดต่างๆก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด รูป a ชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนต รูป b ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป c ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MS เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป d ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม.....	76
4.16	การทดสอบความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยเอนโดสปิร์มเทียมชนิดต่างๆหลังทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 6 เดือน รูป a ชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนต รูป b ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป c ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MSเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป d ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม.....	77
4.17	ลักษณะของต้นสตรอว์เบอร์รีขนาดต่างๆ ก่อนการออกปลูกและหลังจากออกปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์	80
4.18	ชนิดของวัสดุปลูกและชนิดของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการความมีชีวิตของเมล็ดเทียมหลังจากทำการออกปลูกเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยที่ NS คือ ปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้ม DW คือ ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MSS คือ ปลายยอดที่มีอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM.....	86
4.19	การงอกของเมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม หลังจากทำการออกปลูกในเวอร์มิคูไลท์เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์.....	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BAP	6-Benzylamminopurine
GA_3	Gibberellic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
MS	อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
TDZ	Thidiazuron

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สตรอว์เบอร์รีเป็นพืชในวงศ์กุหลาบ (Rosaceae) ผลมีสีแดงสดและฉ่ำน้ำ สามารถรับประทานสดได้ กลิ่นของสตรอว์เบอร์รียังนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร สตรอว์เบอร์รีเป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยสารประกอบประเภทโพลีฟีนอลซึ่งประกอบไปด้วยวิตามินซี ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน กรดฟีโนลิก กรดเอลลาจิก ซึ่งสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งบางประเภทได้ (Amatori *et al,* 2016) สตรอว์เบอร์รีเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ มากกว่า 75 ประเทศทั่วโลกมีสตรอว์เบอร์รีเป็นผลไม้ส่งออก มีผลผลิตทั่วโลกประมาณ 4 พันล้านตันต่อปี โดยในปัจจุบันสตรอว์เบอร์รีที่ใช้ทางการค้าเป็นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ผสม (*Fragaria x ananassa Duchesne ex Rozier*) (Hummer and Handcock, 2009)

การปลูกสตรอว์เบอร์รีในประเทศไทยนั้นเริ่มต้นในปี พ.ศ. 2512 จากโครงการพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวรัชกาลที่ 9 มีจุดประสงค์เพื่อหาพืชมาปลูกทดแทนการปลูกฝิ่นและการทำไร่เลื่อนลอยของชาวไทยภูเขา โดยมีการนำสตรอว์เบอร์รีหลากหลายสายพันธุ์จากต่างประเทศมาทดลองปลูกพบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้มากกว่าพันธุ์อื่น ได้แก่ พันธุ์พระราชทาน 13 (Cambridge Favorite) พันธุ์พระราชทาน 16 (Tioga) และพันธุ์พระราชทาน 20 (Sequoia) ปัจจุบันสตรอว์เบอร์รีจัดเป็นหนึ่งในพืชที่มีความสำคัญต่อการส่งออกของหลายประเทศทั่วโลก มีมูลค่าทางเศรษฐกิจในแต่ละปีมากกว่า 6 พันล้านบาท จากข้อมูลของศูนย์บริการข้อมูลทางการเกษตรพบว่าในประเทศไทยมีการนำเข้าสตรอว์เบอร์รีเพิ่มมากขึ้นทุกปี ตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีการนำเข้าสตรอว์เบอร์รีจากต่างประเทศเพิ่มขึ้นทุกปีและมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นอีกในอนาคต ดังแสดงในตารางที่ 1.1

จากตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกของสตรอว์เบอร์รีในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554-2563 แสดงให้เห็นถึงความต้องการสตรอว์เบอร์รีของตลาดในประเทศไทยที่มีเพิ่มมากขึ้น แต่ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการ มีสาเหตุหลายประการได้แก่ มีพื้นที่ในการเพาะปลูกที่จำกัด เนื่องจากสตรอว์เบอร์รีเป็นพืชเมืองหนาวทำให้ปลูกได้เพียงบางพื้นที่ของประเทศเท่านั้น, การขาดความรู้และความเข้าใจในการควบคุมป้องกันการเข้าทำลายจากโรคพืชของเกษตรกร, ผลผลิตของสตรอว์เบอร์รีที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีดั้งเดิมไม่ได้คุณภาพตามเกณฑ์ที่กำหนด จึงมีการนำเทคโนโลยีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์สตรอว์เบอร์รี ซึ่งผลผลิตที่ได้จะมีลักษณะที่ดีกว่าการปลูกปกติ ไม่ว่าจะเป็น เวลาในการออกดอกเร็วกว่า ขนาดของต้นและผลที่ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัด (Karhu and Hakala, 2002) แต่การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังคงมีข้อจำกัดในบางเรื่อง เช่น ต้องใช้เวลาในการปรับสภาพพืชก่อนจะนำไปออกปลูกและพืชบางชนิดไม่สามารถปรับสภาพได้ทำให้ตายลงในที่สุด การจัดเก็บหรือขนส่งต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดความเสียหายและเสื่อมสภาพได้มากกว่าการขนส่งพืชที่เกิดจากเมล็ดตามธรรมชาติ จากข้อจำกัดดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีการนำเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมและการปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ เข้ามาประยุกต์ใช้ร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์สตรอว์เบอร์รี เนื่องจากเมล็ดเทียมมีขนาดเล็ก ทำให้เกิดความสะดวกในการขนส่งมากกว่าต้นพืชในภาชนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงและช่วยลดพื้นที่ที่ใช้ในการจัดเก็บ อีกทั้งยังมีสารเคลือบผิวที่คอยป้องกันการกระทบกระเทือนชิ้นส่วนพืชจากสิ่งภายนอก นอกเหนือจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาที่ต้นพืชต้องใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพ

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกของสตรอว์เบอร์รีในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2554-2563

ปี	นำเข้า		ส่งออก	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (บาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (บาท)
2554	697	106,553,089	48	1,361,063
2555	762	121,996,533	65	2,431,400
2556	936	143,369,647	88	7,484,254
2557	1065	162,996,916	66	4,624,512
2558	1332	250,142,062	57	3,591,968
2559	1607	336,080,453	4	377,821
2560	1850	394,681,369	3	397,675
2561	1913	435,277,336	6	407,285
2562	2248	502,525,218	1	137,944
2563	1984	523,729,844	6	2,073,634

ที่มา: ศูนย์บริการข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร (2564)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อขยายพันธุ์สตรอว์เบอร์รีและเก็บรักษาสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด โดยอาศัยเทคนิคการทำเมล็ดเทียม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ของสตรอว์เบอร์รี (*Fragaria x ananassa*) ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสของชิ้นส่วนใบ ศึกษาการชักนำให้เกิดการยืดของต้น ศึกษาการเพิ่มปริมาณของต้นในอาหารเหลว ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นปกติในต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำ ศึกษาการชักนำให้เกิดราก

1.3.2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รี โดยศึกษาการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด ศึกษาความเข้มข้นของสารเคลือบผิวที่เหมาะสมต่อการผลิตเมล็ดเทียม ศึกษาความเข้มข้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดเทียมและศึกษาเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืช

1.3.3 ศึกษาการพัฒนาการออกปลูกของต้นสตรอว์เบอร์รีในหลอดทดลองและเมล็ดเทียมของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยนำต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาออกปลูกในดิน เพื่อศึกษาขนาดของต้นสตรอว์เบอร์รีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทำการออกปลูกเมล็ดเทียมโดยใช้วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาวัสดุปลูกและเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียมในสภาวะไม่ปลอดเชื้อภายนอกหลอดทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ทราบข้อมูลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของสตรอว์เบอร์รีในหลอดทดลอง

1.4.2 ได้ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาต้นพันธุ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยอาศัยเทคนิคการทำเมล็ดเทียมและสามารถนำเมล็ดเทียมไปใช้ในการขยายพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลพื้นฐานของสตรอว์เบอร์รี

สตรอว์เบอร์รี เป็นพืชในวงศ์กุหลาบ มีสกุลใกล้เคียงคือ *Potentilla* สตรอว์เบอร์รีจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั่วโลก สามารถพบได้แทบจะทุกประเทศ ตั้งแต่แถบขั้วโลกไปจนถึงเขตร้อน มีประเทศมากกว่า 75 ประเทศ มีสตรอว์เบอร์รีเป็นผลไม้ส่งออกที่สำคัญ ดังนั้นสายพันธุ์ของสตรอว์เบอร์รีจึงถูกบรรจุอยู่ในสนธิสัญญาระหว่างประเทศว่าด้วยทรัพยากรพันธุกรรมพืชเพื่ออาหารและการเกษตร ในปัจจุบันสตรอว์เบอร์รีที่ใช้ทางการค้าเป็นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ผสม (*Fragaria x ananassa Duchesne ex Rozier*)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสตรอว์เบอร์รี (Emeritus, 1997)

ลำต้น : ลำต้นของสตรอว์เบอร์รีมีลักษณะสั้นและหนาเรียกว่า คราวน์ (crown) โดยส่วนปลายสุดด้านบนของคราวน์จะเป็นจุดเจริญ (growing point) ของยอด ซึ่งเป็นจุดที่จะให้กำเนิดใบ ดอกและลำต้นแขนง (branch crown) ส่วนโคนของคราวน์จะเป็นจุดที่ให้กำเนิดราก (รูปที่ 2.1) ลำต้นแขนงของสตรอว์เบอร์รีสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่ต้นหลักได้ เนื่องจากลำต้นแขนงมีโครงสร้างที่เหมือนกับคราวน์ทำให้สามารถออกดอกและพัฒนาไปเป็นผลได้ คราวน์จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะส่งผลต่อการออกดอกของคราวน์และการเจริญของลำต้นแขนง การควบคุมจำนวนลำต้นแขนงให้มีจำนวนที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญในการปลูกสตรอว์เบอร์รี โดยลำต้นแขนงควรมีประมาณ 3-4 ต้น หากมีมากเกินไปจะส่งผลให้ขนาดของผลสตรอว์เบอร์รีมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้การปลูกสตรอว์เบอร์รีในดินควรให้จุดกึ่งกลางของคราวน์ครึ่งหนึ่งอยู่เหนือผิวดินและอีกครึ่งอยู่ใต้ดิน ถ้าหากคราวน์อยู่ลึกจากผิวดินมากเกินไปจะทำให้ต้นพืชตาย แต่หากคราวน์อยู่ตื้นเกินไประบบรากจะไม่แข็งแรงเนื่องจากรากที่เกิดใหม่จะไม่แทงลงในดิน

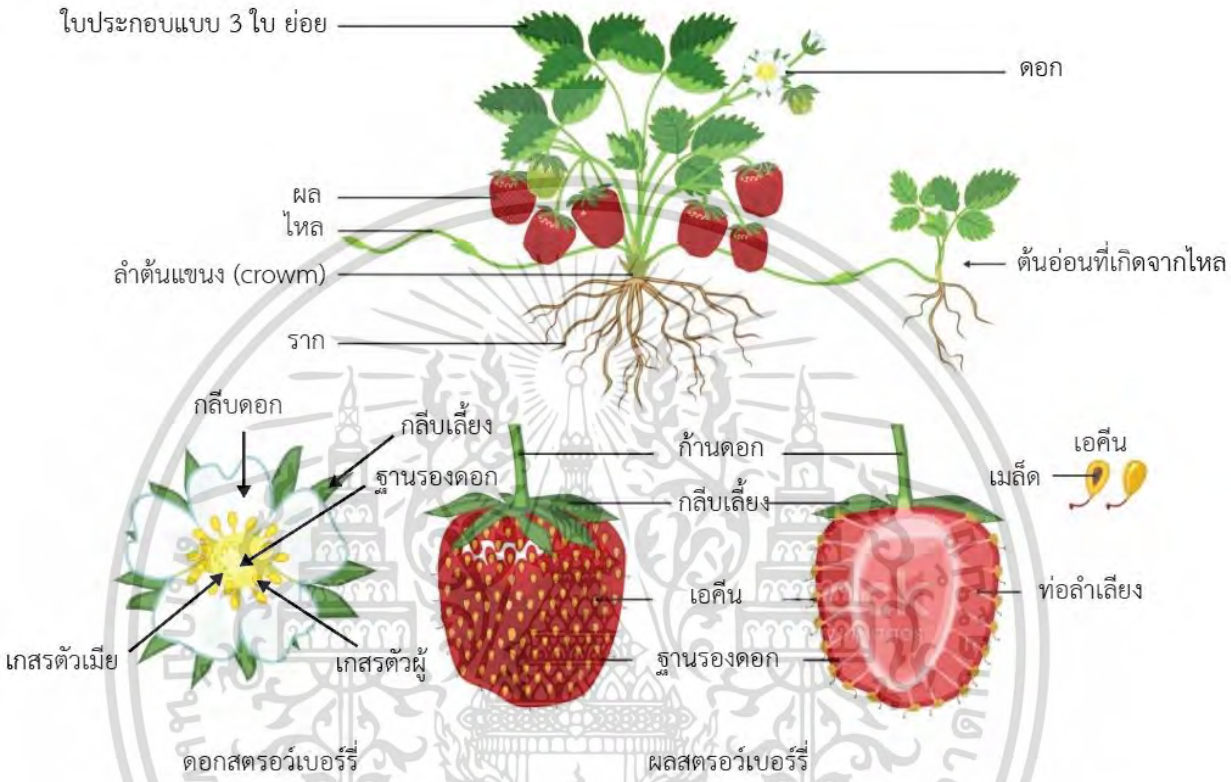
ใบ : ใบของสตรอว์เบอร์รีจัดเป็นใบประกอบแบบ 3 ใบย่อย (trifoliate) จัดเรียงตัวแบบสลับรอบๆคราวน์ ลักษณะของใบย่อยเป็นรูปไข่ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย (dentate) ใบมีสีเขียวเข้ม เส้นใบมีร่องชัดเจน ด้านล่างแผ่นใบมีขนสั้นๆสีขาวปกคลุมอยู่ ใบมีอายุตั้งแต่ 1-3 เดือน หรืออาจจะมีอายุได้น้อยกว่านั้น เมื่อขาดธาตุอาหารหรือเกิดโรคพืช

ดอก : สตรอว์เบอร์รีออกดอกเป็นช่อ ช่อดอกเป็นแบบกระจุก (cyme) กลีบดอกมีสีขาวจำนวน 5-10 กลีบ และมีกลีบเลี้ยงสีเขียวขนาดเล็กจำนวน 5 กลีบ อยู่ด้านใต้ของกลีบดอกสีขาว ซึ่งอยู่ติดกับตาดอก (flower bud) ดอกส่วนใหญ่เป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียจะมีสีเหลืองเข้มและเริ่มซีดลงเมื่อดอกเริ่มแก่และหมดสภาพ เกสรตัวเมียส่วนมากจะเกิดอยู่บนฐานรองดอก (receptacle) ยอดเกสรตัวเมียจะมีลักษณะหยาบและเหนียว (รูปที่ 2.1)

ผล : ผลของสตรอว์เบอร์รีจัดเป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) เนื้อของสตรอว์เบอร์รีคือส่วนที่เจริญมาจากฐานรองดอก เมล็ดที่อยู่รอบนอกผิวของสตรอว์เบอร์รีคือผลที่แท้จริง เรียกว่า อะคีน (achene) (รูปที่ 2.1) โดยแต่ละผลอาจจะมีผลย่อยตั้งแต่ 20-500 ผล ซึ่งผลย่อยจะเจริญมากจากรังไข่ที่อยู่บนฐานรองดอก ผลของสตรอว์เบอร์รีมีตั้งแต่รูปทรงกลมจนถึงรูปทรงลิ่มขึ้นอยู่กับสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ ผลจะมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเกิดจากช่อดอกแรกของต้นและมีขนาดเล็กลงมาตามลำดับ เมื่อเกิดจากช่อดอกถัดไปบนต้นเดียวกัน ในระยะแรกผลจะมีสีเขียว แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสีขาวและเป็นสีแดง เมื่อผลสุกมีรสชาติเปรี้ยวอมหวาน ระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่ดอกบานจนถึงผลสุกอย่างเร็วที่สุดต้องใช้เวลาประมาณ 20-30 วัน ขึ้นอยู่กับสภาวะของอากาศ



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของต้น ดอก และผลของสตรอว์เบอร์รี
ที่มา : Mariaflaya 2019

2.1.2 ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจายของสตรอว์เบอร์รีในแต่ละภูมิภาค

สตรอว์เบอร์รีเป็นพืชในวงศ์ Rosaceae สกุล *Fragaria* มีโครโมโซมพื้นฐาน n = 7 ตามธรรมชาติอยู่ในกลุ่ม polyploid ซึ่งพบตั้งแต่ diploid ตลอดจนถึง decaploid สตรอว์เบอร์รีในกลุ่ม diploid หลายชนิดมีถิ่นกำเนิดที่บริเวณหมู่เกาะฮอกไกโด เกาะคูริล ในประเทศญี่ปุ่น เกาะ Sakhalin ในประเทศรัสเซีย และมีเพียงบางชนิดที่พบเฉพาะทางตอนเหนือของทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ เช่น *Fragaria vesca* มีถิ่นกำเนิดทางตะวันตกของเทือกเขาอูราล ทางตอนเหนือของทวีปยุโรปและทวีปอเมริกาเหนือ สตรอว์เบอร์รีในกลุ่ม diploid และ tetraploid บางชนิดพบในประเทศจีน ไซบีเรีย และทางตะวันออกไกลของระเทศรัสเซีย กลุ่ม pentaploid (2n = 5x = 35) มีถิ่นกำเนิดในแคลิฟอร์เนียและประเทศจีน กลุ่ม hexaploid (2n = 6x = 42) มีถิ่นกำเนิดที่ทางตะวันออกของทะเลสาบไบคาล ทวีปยุโรป เช่น *F.moschata* หรือที่รู้จักในชื่อ musk strawberry กลุ่ม octoploid มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่หมู่เกาะอะลูเซียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับประเทศไทยนั้น มีการนำเข้าสตรอว์เบอร์รีมาปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2477 แต่ไม่ได้รับความสนใจมากนัก ต่อมาในปี พ.ศ. 2516 พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 9 ทรงโปรดเกล้าฯ ให้ตั้งโครงการปลูกพืชทดแทนการปลูกฝิ่นของชาวเขา จึงทำให้มีการส่งเสริมการปลูกสตรอว์เบอร์รีขึ้นและกลายเป็นพืชที่นิยมปลูกกันมาจนถึงปัจจุบัน โดยในช่วงแรกนั้นมีสตรอว์เบอร์รีเพียง 3 สายพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพอากาศของประเทศไทยได้แก่ พันธุ์พระราชทานเบอร์ 13 (Cambridge Favorite) พันธุ์พระราชทานเบอร์ 16 (Tioga) และพันธุ์พระราชทานเบอร์ 20 (Sequoia) ปัจจุบันแหล่งปลูกสตรอว์เบอร์รีที่มีขนาดใหญ่ที่สุดอยู่ที่จังหวัดเชียงใหม่และสายพันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุดได้แก่ พันธุ์พระราชทานเบอร์ 80 (นพมณี, 2562)

2.1.3 การจำแนกสตรอว์เบอร์รีและพันธุสตรอว์เบอร์รี (Hummer *et al,* 2011)

Duchesne (1766) ได้จัดทำอนุกรมวิธานของสตรอว์เบอร์รีขึ้นซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นอนุกรมวิธานที่ดีที่สุดของสตรอว์เบอร์รี โดยทำการเก็บสะสมและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสตรอว์เบอร์รีจากประเทศต่างๆในทวีปยุโรปและอเมริกา หลังจากการรวบรวมข้อมูลทำให้สามารถจำแนกสตรอว์เบอร์รีได้มากกว่า 20 ชนิด มีพันธุ์ผสมที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ 3 ชนิด และพันธุ์ผสมที่เกิดจากฝีมือมนุษย์ 2 ชนิด สตรอว์เบอร์รีที่พบส่วนใหญ่อยู่ในเขตอบอุ่น สามารถแบ่งกลุ่มสตรอว์เบอร์รีตามจำนวนโครโมโซมได้ดังนี้

2.1.3.1 กลุ่มดิพลอยด์ (diploids) (2n = 2x = 14)

2.1.3.1.1 ***Fragaria vesca*** สตรอว์เบอร์รีชนิดนี้สามารถผสมตัวเองได้ แตกไหลได้ มีผลทรงกลม เนื้อผลโปร่งและนิ่ม มีถิ่นกำเนิดที่หลากหลายกว่าสายพันธุ์อื่นในสกุลเดียวกัน เป็นสตรอว์เบอร์รีในกลุ่มดิพลอยด์สายพันธุ์เดียวที่มีถิ่นกำเนิดในอเมริกา *Fragaria vesca* มี 4 สายพันธุ์ย่อย คือ *F. vesca* subsp. *Vesca* พบในทวีปยุโรป *F. vesca* subsp. *Americana*, *Fragaria vesca* subsp. *bracteata* และ *F. vesca* subsp. *californica*

2.1.3.1.2 ***Fragaria mandschurica*** สตรอว์เบอร์รีชนิดนี้มีดอกสมบูรณ์เพศ แตกไหลได้ มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตะวันออกของทะเลสาบไบคาลและยังพบในประเทศเกาหลีใต้ มองโกเลีย และทางตอนเหนือของประเทศจีน

2.1.3.1.3 ***Fragaria nilgerrensis*** สตรอว์เบอร์รีชนิดนี้สามารถผสมตัวเองได้ มี 2 สายพันธุ์ย่อย คือ สายพันธุ์ *nilgerrensis* มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย พม่า เวียดนาม จีน และบริเวณเทือกเขาหิมาลัย ลักษณะผลมีสีขาวไปจนถึงสีครีม และสายพันธุ์ *hayatae* ผลมีสีชมพูไปจนถึงสีแดงและมีสารแอนโทไซยานินสูง มีลักษณะใบคล้ายกับสตรอว์เบอร์รีในกลุ่มเททระพลอยด์ พบในเสฉวนประเทศจีน ไต้หวัน และทิเบต

2.1.3.1.4 ***Fragaria daltoniana* J. Gay** สตรอว์เบอร์รีชนิดนี้สามารถผสมตัวเองได้ ไหลมีขนาดเล็กและสามารถแตกไหลได้ ผลทรงกลมยาว มีสีแดงสด มีถิ่นกำเนิดบริเวณเทือกเขาหิมาลัยในประเทศอินเดียและพม่า

2.1.3.1.5 ***Fragaria bucharica*** มีถิ่นกำเนิดบริเวณเทือกหิมาลัย ผสมตัวเองไม่ได้ สามารถแตกไหลได้ มี 2 สายพันธุ์ย่อย คือ *F. bucharica* subsp. *bucharica* และ subsp. *Darvasica* สามารถจำแนกโดยการเปรียบเทียบจาก ขนาดของกลีบประดับ (Bractlet) โดยที่กลีบประดับของ *bucharica* จะมีขนาดใหญ่กว่า *Darvasica* มีถิ่นกำเนิดในประเทศ ปากีสถาน ทาจิกิสถาน อัฟกานิสถาน แคว้น Himachal Pradesh ประเทศอินเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.1.6 ***Fragaria nubicola*** สตรอว์เบอร์รีชนิดนี้ผสมตัวเองไม่ได้ ไหลบอบบางและไม่สามารถแตกไหลได้ มีถิ่นกำเนิดบริเวณทางตอนใต้ของเทือกเขาหิมาลัย ทิเบต และทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศจีน

2.1.3.1.7 ***Fragaria pentaphylla*** สตรอว์เบอร์รีชนิดนี้ผสมตัวเองไม่ได้ ผลมีสีขาว ไม่สามารถแตกไหลได้ มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน ทิเบต *F. pentaphylla* มีลักษณะที่คล้ายกับ *F. tibetica* ซึ่งเป็นสตรอว์เบอร์รีในกลุ่มเททระพลอยด์ ที่มีผลสีขาวเหมือนกันและพบในบริเวณเดียวกัน สามารถจำแนกได้ด้วยขนาดของผลและละอองเรณู โดย *F. tibetica* จะมีขนาดของผลและละอองเรณูที่ใหญ่กว่า

2.1.3.1.8 ***Fragaria iinumae*** มีลักษณะเฉพาะที่ไม่พบในกลุ่มดิพลอยด์สายพันธุ์อื่นคือ มีผิวใบนวล ดอกมี 6-9 กลีบ แต่ในสตรอว์เบอร์รีปกติจะพบเพียง 5 กลีบเท่านั้น ลักษณะต้นเป็นพุ่ม

2.1.3.1.9 ***Fragaria nipponica*** สตรอว์เบอร์รีชนิดนี้ผสมตัวเองไม่ได้ มีถิ่นกำเนิดที่เกาะฮอนชูและฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น เกาะคูริล ประเทศรัสเซีย เกาะเชจู ประเทศเกาหลี

2.1.3.2 กลุ่มเททระพลอยด์ (tetraploids) (2n = 4x = 28)

2.1.3.2.1 ***Fragaria corymbosa*** มีถิ่นกำเนิดในประเทศรัสเซีย ต้นมีขนาดเล็ก ไหลยาวและบาง ผลนิ่ม ลักษณะผลมีรูปร่างตั้งแต่ทรงกรวยจนถึงทรงกลม ดอกมีขนาดใหญ่ มีทั้งดอกสมบูรณ์เพศและดอกไม่สมบูรณ์

2.1.3.2.2 ***Fragaria moupinensis*** มีถิ่นกำเนิดในทิเบตและมณฑลยูนาน ประเทศจีน มีลักษณะคล้ายกับ *F. nilgerrensis* มีไหลสั้น แต่ละช่อดอกจะมีดอกอยู่ 2- 4 ดอก ผลมีขนาดเล็ก

2.1.3.3 กลุ่มเฮกซาพลอยด์ (hexaploids) (2n = 6x = 42)

2.1.3.3.1 ***Fragaria moschata*** คล้ายกับ *F. vesca* และ *F. viridis* ซึ่งอยู่ในกลุ่มดิพลอยด์ มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตอนเหนือและตอนกลางของทวีปยุโรป เป็นสตรอว์เบอร์รีที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในทวีปยุโรปโดยเฉพาะประเทศฝรั่งเศสและเยอรมัน มีดอกสมบูรณ์เพศ ผลนิ่มมีสีขาวอมเหลือง เนื้อผลมีสีแดง ผลมีทรงกลม มีกลิ่นหอมคล้ายองุ่น

2.1.3.4 กลุ่มอ็อกโตพลอยด์ (octoploids) (2n = 8x = 56)

2.1.3.4.1 ***Fragaria chiloensis*** หรือที่หลายคนรู้จักกันในชื่อ beach strawberry มี 4 สายพันธุ์ย่อย คือ *F. chiloensis* subsp. *pacifica* และ subsp. *lucida* ซึ่งพบบริเวณริมฝั่งชายหาดในอลาสก้าจนถึงแคลิฟอร์เนีย ผลสีแดงและมีขนาดเล็ก *Fragaria chiloensis* subsp. *sandwicensis* พบบริเวณเกาะเมาอิและฮาวาย *Fragaria chiloensis* subsp. *chiloensis* มีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ของเทือกเขาแอนดิสในประเทศชิลีและอาร์เจนตินา ปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศชิลี เปรู เอกวาดอร์ มีดอกและผลที่ใหญ่กว่า *Fragaria chiloensis* สายพันธุ์อื่น มีการแตกไหลมาก ไหลยาวมีขนปกคลุม มีทั้งดอกแยกเพศและดอกสมบูรณ์ ผลมีสีน้ำตาลแดง เนื้อผลมีสีขาว รสชาติจืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.4.2 *Fragaria virginiana* หรือที่หลายคนรู้จักกันในชื่อ scarlet strawberry ไหลมีจำนวนมาก ต้นเป็นแบบแยกเพศ ผลสีแดงจนถึงแดงเข้มเนื้อผลมีสีขาว มีดอกไม่สมบูรณ์เพศ มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ มี 4 สายพันธุ์ย่อย คือ *Fragaria virginiana* subsp. *virginiana* พบที่ฝั่งตะวันออกของทวีปอเมริกาเหนือ *Fragaria virginiana* subsp. *grayana* พบที่รัฐเท็กซัส อิลลินอยด์ นิวยอร์ค เวอร์จีเนียร์ *F. virginiana* subsp. *glauca* พบในประเทศโคลัมเบียและตามแนวชายฝั่งของทวีปอเมริกาเหนือ ลักษณะใบต่างจากสายพันธุ์อื่นคือ ที่ผิวใบมีคราบสีขาวนวลคลุมอยู่ *F. virginiana* subsp. *platypetala* พบในประเทศโคลัมเบีย รัฐวอชิงตัน แคลิฟอร์เนียร์ โอเรกอน สหรัฐอเมริกา ใบมีสีเขียวจนถึงสีเขียวเข้ม

2.1.3.4.3 *Fragaria* x *ananassa* สตรอว์เบอร์รีที่ใช้ในการค้าเกือบทุกสายพันธุ์จะเป็นชนิดนี้ สตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์นี้เป็นลูกผสมระหว่าง *F. chiloensis* subsp. *pacifica* หรือ subsp. *lucida* กับ *F. virginiana* subsp. *platypetala* มีไหลยาวบาง ผลขนาดใหญ่ รสชาติดี

2.1.3.5 กลุ่มเดกะพลอยด์ (decaploids) (2n = 10x = 70)

2.1.3.5.1 *Fragaria iturupensis* มีถิ่นกำเนิดบนเกาะคูริล ประเทศรัสเซีย ในปี ค.ศ. 1973 มีการตรวจนับและวิเคราะห์โครโมโซมของ *F. iturupensis* ได้อ็อกโตพลอยด์ แต่ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 นำตัวอย่างสายพันธุ์นี้มาตรวจอีกครั้งพบว่าเป็นเดกะพลอยด์ *F. iturupensis* มีลักษณะคล้ายกับสายพันธุ์ *F. virginiana* subsp. *glauca* หลายประการทั้งสีและใบที่เหมือนกัน Staudt (1999) ได้ทำการวิเคราะห์ทางโมเลกุลและพบว่าสายพันธุ์ *turupensis* เป็นบรรพบุรุษของสายพันธุ์ *F. virginiana* subsp. *glauca*

2.1.3.6 กลุ่ม Unusual Ploidy

2.1.3.6.1 *Fragaria* x *bringhurstii* เป็นสายพันธุ์ผสมระหว่าง *F. chiloensis* และ *F. vesca* subsp. *californica* มีถิ่นกำเนิดในแคลิฟอร์เนีย มีรูปร่างหลายแบบ แต่ส่วนมากมีลักษณะคล้ายกับ *F. chiloensis* and *F. vesca* จีโนไทป์ของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์นี้มีหลายแบบตั้งแต่ เพนตะพลอยด์ (2n = 5x = 35) เฮกซาพลอยด์ (2n = 6x = 42) และเอ็นเนียพลอยด์ (2n = 9x = 63)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เมล็ดเทียม

ในปัจจุบันตามเรือนเพาะชำนิยมขยายพันธุ์พืชด้วยวิธี vegetative propagation ซึ่งเป็นการใช้ส่วนต่างๆของพืชในการขยายพันธุ์ ทำให้เกิดผลผลิตที่มีคุณภาพสูงในระบบของตลาด แต่เนื่องด้วยความต้องการที่มีเพิ่มมากขึ้นทุกปีของผู้บริโภค ทำให้ผู้ผลิตตามเรือนเพาะชำต้องมองหากลยุทธ์ใหม่ๆ มาใช้ในการผลิตและขยายพันธุ์พืชให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้นนอกเหนือจากการใช้เทคนิคการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิม เช่น การตัดชำ การต่อกิ่ง และการตอนกิ่ง การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ก็เป็นหนึ่งในวิธีที่ประสบความสำเร็จอย่างสูง ทั้งในเรื่องของจำนวนผลผลิตที่ได้และความปลอดโรคของต้นพืช อย่างไรก็ตามการนำเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปปรับใช้กับภาคอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ยังคงพบปัญหา เนื่องจากต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อนำไปออกปลูกจะต้องเผชิญกับศัตรูพืชและเชื้อโรคเหมือนกับการขยายพันธุ์แบบปกติ ทำให้สูญเสียข้อได้เปรียบในเรื่องของความปลอดโรคไป นอกจากนี้การจัดเก็บหรือขนส่งต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความเสี่ยงต่อการก่อให้เกิดความเสียหายและเสื่อมสภาพได้มากกว่าการขนส่งพืชที่เกิดจากเมล็ด ดังนั้นจึงมีการนำเอาเทคโนโลยีที่สามารถดึงข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและคุณสมบัติของเมล็ดมารวมกัน เกิดเป็นเทคนิคการทำเมล็ดเทียมหรือเมล็ดสังเคราะห์ขึ้นมา เพื่อนำมาใช้ห่อหุ้มต้นพืชทั้งที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชิ้นส่วนของต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีแบบดั้งเดิม

เมล็ดเทียมเป็นการใช้กระบวนการทางวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยในการสร้างสิ่งที่มีลักษณะคล้ายเมล็ด โดยการนำสารเคมีที่มีลักษณะเป็นเจล มาทำเป็นเปลือกหุ้มเทียมเพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับชิ้นส่วนพืชที่เราใช้ เช่น โซมาติกเอ็มบริโอ ต้นอ่อน กลุ่มเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่นๆที่สามารถเจริญไปเป็นต้นได้ สมัยก่อนการทำเมล็ดเทียมจะใช้เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตและเพื่อความสะดวกในการขนส่ง โดยใช้เพียงโซมาติกเอ็มบริโอเท่านั้น แต่ ณ ปัจจุบันมีการนำชิ้นส่วนอื่นๆของพืชมาทำเมล็ดเทียมด้วย เช่น ยอด ตา ต้นอ่อน แคลลัส เป็นต้น ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากการทำเมล็ดเทียมในปัจจุบันจึงไม่ได้หยุดอยู่แค่การเพิ่มปริมาณผลผลิตและความสะดวกในการขนย้าย แต่ใช้เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทคนิคการทำเมล็ดเทียมจะใช้ชิ้นส่วนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยที่ชิ้นส่วนของพืชนั้นจะต้องเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ เช่น โซมาติกเอ็มบริโอ ปลายยอด ปลายราก ตาหรือกิ่งอ่อน หลังจากนั้นจะทำการห่อหุ้มชิ้นส่วนของพืชด้วยเทคนิคเอนแคปซูเลชั่น เพื่อป้องกันการคายน้ำของชิ้นส่วนพืชและการปนเปื้อนจากเชื้อโรคที่อยู่ภายในดิน เทคโนโลยีการทำเมล็ดเทียมเป็นการนำเอาประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดมารวมกัน แม้ว่าการผลิตเมล็ดเทียมจะมีประโยชน์หลายด้านแต่ก็ยังคงมีข้อจำกัดอยู่

2.2.1 ประวัติความเป็นมา

Murashige เป็นผู้ให้กำเนิดคำว่า "เมล็ดเทียม" โดยคำจำกัดความดั้งเดิมของเมล็ดเทียมตามที่ Murashige (1978) ให้คำนิยามไว้คือ เอมบริโอที่ถูกห่อหุ้ม ซึ่งสามารถจัดการและนำไปใช้แทนเมล็ดจริงสำหรับการเก็บรักษา การปลูก และสามารถเจริญเติบโตกลายเป็นต้นใหม่ได้ทั้งในหลอดทดลองหรือภายนอกหลอดทดลอง (conversion) ดังนั้นในช่วงแรกการผลิตเมล็ดเทียมจึงจำกัดเฉพาะพืชที่มีการเกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส ซึ่งพืชหลายพันธุ์ยังคงมีความยากที่จะทำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส ต่อมาเริ่มมีการใช้ส่วนอื่นๆของพืช เช่น ปลายยอด ตาข้าง โปรโตคอร์มออร์แกโนเจนนิค หรือ เอมบริโอเจนนิคแคลลัส จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนคำจำกัดความของเมล็ดเทียมขึ้นใหม่เป็น การห่อหุ้มโซมาติกเอมบริโอ, ปลายยอด หรือเนื้อเยื่อเจริญอื่นๆ ที่นำมาใช้ในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดเทียมและมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ภายใต้สภาวะภายในหลอดทดลองหรือภายนอกหลอดทดลองและสามารถเก็บไว้ได้ (Ara. *et al*., 2000; Capuan. *et al*., 1998) และเพื่อให้คำจำกัดความนี้สมบูรณ์ควรเน้นว่าชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ทำเมล็ดเทียมนั้นต้องสามารถเติบโตเป็นต้นอ่อนหลังการออกปลูกได้ (Piccioni, 1997) ความสำเร็จในการผลิตเมล็ดเทียมเกิดขึ้นครั้งแรกโดย Kitto and Janick (1982) ได้นำโซมาติกเอ็มบริโอของแครอทมาเคลือบเป็นแคปซูล หลังจากนั้นจึงนำไปทำให้อยู่ในสภาพที่แห้งโดยการวางผึ่งไว้ใน sterile hood เป็นเวลาหลายชั่วโมง หลังจากนั้นก็มีการทดสอบเคลือบโซมาติกเอ็มบริโอด้วยสารเคมีอีกหลากหลายชนิด จึงพบว่า polyoxyethylene มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเคลือบเมล็ด เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้และเมื่อแห้งจะเกิดชั้นฟิล์มบางๆ ไม่เป็นพิษต่อโซมาติกเอ็มบริโอ นอกจากนี้จุลลินทรีย์ยังไม่สามารถเจริญบน polyoxyethylene ได้อีกด้วย ต่อมา Redenbaugh. *et al*. (1993) ได้พัฒนาเทคนิคการทำเมล็ดเทียมโดยการนำไฮโดรเจลมาใช้ในขั้นตอนการเคลือบเมล็ด ต่อมาวิธีนี้จึงกลายเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตเมล็ดเทียม ไฮโดรเจลที่นำมาใช้ในการเคลือบเมล็ดมีหลายชนิดเช่น โพแทสเซียมอัลจีเนต โซเดียมอัลจีเนต คาร์เรจีแนน วุ้น โซเดียมแพคเตท เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้กันคือ โซเดียมอัลจีเนต

ในการศึกษาเมล็ดเทียมส่วนใหญ่ มักจะใช้ชิ้นส่วนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายในหลอดทดลอง แต่ชิ้นส่วนจากต้นพืชที่โตเต็มวัยแล้วตามธรรมชาติก็สามารถนำมาใช้ทำการทดลองได้ ตัวอย่างเช่น Pattnaik. *et al*. (1995) ประสบความสำเร็จในการใช้ตาข้างของต้นหม่อนที่มีอายุ 3 ปี ในธรรมชาติ มาใช้เป็นชิ้นส่วนในการทำเมล็ดเทียม Banerjee. *et al*. (2012) ผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้ยอดอ่อนที่นำมาจากเหง้าที่ปลูกในธรรมชาติของ *Curcuma amada* และทำการเก็บบรรจุในถุงพลาสติก เทคโนโลยีการทำเมล็ดเทียมมีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้ในการอนุรักษ์และการขยายพันธุ์พืชที่เป็นพืชหายากหรือพืชดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งไม่สามารถงอกออกจากเมล็ดเองได้ นอกจากนี้เทคโนโลยีการทำเมล็ดเทียมยังถูกนำมาใช้ในการขนส่งเชื้อพันธุ์ของพืชเพื่อใช้ในการแลกเปลี่ยนสายพันธุ์ระหว่างประเทศ ซึ่งสามารถทำได้ไวมากขึ้นเนื่องจากการกักกันพืชลดลง เพราะสภาวะที่ปลอดเชื้อของชิ้นส่วนพืชในเมล็ดเทียม

2.2.2 ประเภทเมล็ดเทียม

ตั้งแต่เกิดแนวคิดเมล็ดเทียมโดย Murashige (1977) อุปสรรคพื้นฐานของเทคโนโลยีการทำเมล็ดเทียม คือ การขาดเอ็นโดสเปิร์มตามธรรมชาติและเปลือกหุ้มเมล็ดเทียมที่คอยป้องกันโซมาติกเอมบริโอ ที่ทำให้ไม่สะดวกในการจัดเก็บและจัดการ นอกจากนี้ยังมีอุปสรรคในเรื่องของ การขาดสภาวะพักตัวและข้อจำกัดในการขาดความสามารถในการคายน้ำออกของโซมาติกเอมบริโอ ดังนั้น จุดประสงค์หลักของงานวิจัยด้านเมล็ดเทียม คือ สามารถผลิตโซมาติกเอ็มบริโอหรือชิ้นส่วนพืชที่มีความสามารถใกล้เคียงกับเอ็มบริโอที่อยู่ภายในเมล็ด ในปัจจุบันมีพืชหลากหลายชนิดที่ใช้เทคโนโลยีการทำเมล็ดเทียมในการขยายพันธุ์รวมถึงธัญพืช ผลไม้ ผัก พืชสมุนไพร ต้นไม้ป่า กล้วยไม้ และไม้ประดับอื่นๆ เมล็ดเทียมแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.2.2.1 เมล็ดเทียมแบบแห้ง (Desiccated synthetic seeds)

ชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาผลิตเมล็ดเทียมด้วยวิธีนี้ได้ต้องมีคุณสมบัติที่ทนต่อการขาดน้ำได้ (desiccation tolerance) เนื่องจากจะถูกนำไปชักนำให้เกิดการสูญเสียน้ำก่อนการห่อหุ้ม ซึ่งการทำเช่นนี้จะทำให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ในสภาวะเงียบและทำให้เกิดความยืดหยุ่นในการจัดการมากขึ้นในระบบการผลิตขนาดใหญ่ ดังนั้นชิ้นส่วนพืชจึงจำเป็นต้องมีความสามารถในการทนต่อการขาดน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเก็บรักษาและมีบทบาทสำคัญในการเจริญและเปลี่ยนไปเป็นต้นอ่อนของเมล็ดเทียม การชักนำให้เกิดการสูญเสียน้ำในชิ้นส่วนพืชสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งการทำให้สูญเสียน้ำโดยใช้อากาศ ซึ่งสามารถทำได้ทั้งแบบช้าและแบบเร็ว โดยแบบช้าจะทำได้โดยการนำชิ้นส่วนพืชไปใส่ใน chamber หลังจากนั้นรอให้ความชื้นในชิ้นส่วนพืชลดลงช้าๆ ใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ส่วนแบบเร็วทำได้โดยการใส่ในจานแก้วจากนั้นวางผึ่งให้แห้งในตู้ลามินาร์เป็นเวลาหลายชั่วโมง นอกจากนี้สามารถชักนำให้เกิดการสูญเสียน้ำได้ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีศักยภาพในการออสโมติกสูง โดยการเพิ่มปริมาณของ permeating osmoticants (เช่นซูโครส, แมนนิทอล) หรือ non-permeating osmoticants (เช่น Polyethylene glycol หรือ PEG) หรืออาหารที่ประกอบด้วยเจลความเข้มข้นสูง

ปัจจัยอื่นๆ ที่อาจจะทำให้พืชตายได้ เช่น อุณหภูมิที่ต่ำและการขาดสารอาหาร ก็มีผลทำให้พืชตายได้เหมือนกับผลของการขาดน้ำ (Pond and Cameron, 2003) จึงมีการนำชิ้นส่วนพืชไปปรับสภาพให้เหมาะสมก่อนที่จะนำมาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียม โดยนำไปทำให้แห้งอย่างรวดเร็วจนมีความชื้นน้อยกว่า 10-15% หรือปรับสภาพโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วยกรดแอบไซซิก (ABA) ซึ่งจะช่วยให้ชิ้นส่วนพืชมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงขึ้นทั้งในระบบการทำเมล็ดเทียมแบบแห้งและแบบชื้น (Nieves *et al*, 2001; Pond and Cameron, 2003)

หลังจากทำให้แห้งแล้ว ชิ้นส่วนพืชจะถูกเคลือบด้วยสารเคลือบผิวที่ประกอบด้วยสารอาหารเพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการขนย้ายและใช้เป็นสารอาหารสำหรับชิ้นส่วนพืช สารเคลือบผิวจะต้องไม่เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชและป้องกันการคายน้ำของชิ้นส่วนพืชได้ นอกจากนี้สามารถละลายได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชไม่ได้รับความเสียหายจากความร้อนในระหว่างการเคลือบ และจะต้องเกาะตัวกับชิ้นส่วนพืชได้ดี ยิ่งไปกว่านั้นสารเคลือบผิวควรจะอ่อนพอที่จะทำให้ยอดและรากสามารถงอกออกมาได้ ในช่วงแรกมีการนำโพลีเอทีลีนไกลคอลมาใช้เป็นสารเคลือบผิวในการผลิตเมล็ดเทียม แต่ต่อมาพบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดเทียมขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ใช้ในกระบวนการห่อหุ้มและความเร็วในการคายน้ำ ไฮโดรเจลบางตัวสามารถชะลอการคายน้ำและกักเก็บปริมาณน้ำในชิ้นส่วนพืชไว้ได้ ซึ่งอัลจิเนตกับเจแลนกัมเป็นไฮโดรเจลที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการรักษาค่า water activity รอบชิ้นส่วนพืชให้สูงได้ (Timbert. *et al*., 1996)

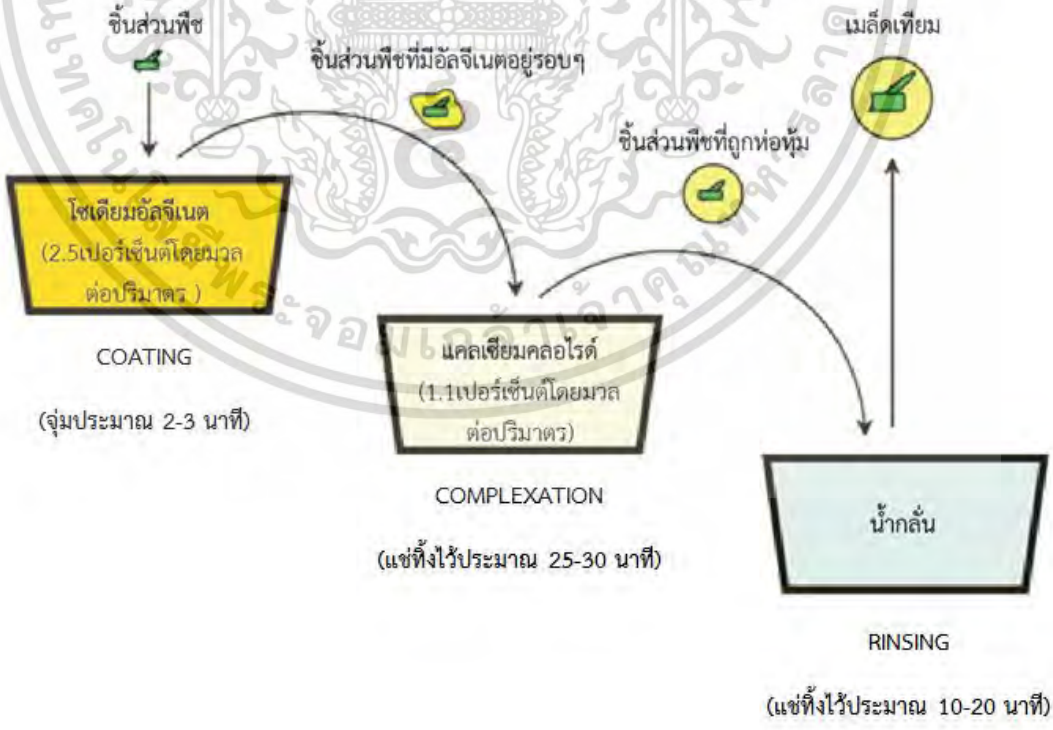
2.2.2.2 เมล็ดเทียมแบบชื้น (Hydrated synthetic seeds)

Redenbaugh. *et al*. (1993) ได้พัฒนาเทคนิคการทำเมล็ดเทียมโดยการนำไฮโดรเจลมาใช้ในขั้นตอนการผลิตเมล็ดเทียมของอัลฟาฟา *(Medicago sativa)* และทำการจดสิทธิบัตรในปี 1988 ตั้งแต่นั้นมาจึงมีการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมเพิ่มมากขึ้น โดยมีสารหลายชนิดถูกนำมาทดสอบเพื่อใช้เป็นไฮโดรเจล เช่น วุ้น อัลจิเนตโซเดียม โพแทสเซียมอัลจิเนต โซเดียมเพคเตท คาราจีแนน โซเดียมอัลจิเนตกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เจลาติน เจลไลท์ กัวกัม กัมทรากาแคนต์ ฯลฯ ในบรรดาที่กล่าวมาทั้งหมด ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ โซเดียมอัลจิเนต เนื่องจากมีความหนืดปานกลาง ไม่เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช ต้นทุนต่ำ และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Saiprasad, 2001) จากการวิจัยพบว่า โซเดียมอัลจิเนตและเกลือแคลเซียมเป็นส่วนผสมที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในกระบวนการห่อหุ้มเมล็ดเทียม เนื่องจากไอออนของโซเดียมและแคลเซียมไม่สร้างความเสียหาย มีราคาต่ำ ใช้งานง่าย และมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูง แคปซูลเจลอาจทำหน้าที่เป็นแหล่งกักเก็บสารอาหารที่ช่วยในการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (Redenbaugh. *et al*., 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทำเมล็ดเทียมแบบชิ้นด้วยโซเดียมอัลจิเนตมี 3 ขั้นตอนดังนี้ (รูปที่ 2.2)

1. Coating เป็นการนำชิ้นส่วนของพืชที่เราต้องการใส่ลงในสารละลายที่เราจะนำมาใช้เคลือบผิวเป็นเวลา 2-3 นาที โดยสารที่นิยมนำมาใช้เคลือบผิวได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต เนื่องจากมีความหนืดปานกลาง ไม่เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช ต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามยังมีสารอีกหลายตัวที่สามารถนำมาใช้เคลือบผิวแทนโซเดียมอัลจีเนตได้ เช่น โพแทสเซียมอัลจีเนต เซลลูโลสคาร์บอกซีเมธิล คาร์ราจีแนน โซเดียมเพคเตท
2. Complexation เป็นขั้นตอนที่จะทำให้เมล็ดมีความแข็ง โดยสารเคลือบผิวที่มีชิ้นส่วนของพืชจะถูกดูดและหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 25-30 นาที จะเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนกันขึ้นระหว่างไอออนของโซเดียมและแคลเซียมเพื่อสร้างแคลเซียมอัลจีเนต ดังนั้นการเคลือบผิวสามารถป้องกันการขาดน้ำของชิ้นส่วนพืชได้ ความแข็งของแคลเซียมอัลจีเนตขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดเทียม นอกจากนี้ความแข็งของเมล็ดเทียมอาจจะขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยปกติแล้วความแข็งของเมล็ดเทียมจะช่วยป้องกันไม่ให้ชิ้นส่วนพืชเสียหายแต่ในการกลับกันหากเมล็ดเทียมแข็งจนเกินไปจะเป็นอุปสรรคต่อการงอกออกนอกเมล็ดของต้นอ่อนที่จะเกิดขึ้นด้วย
3. Rinsing เป็นการล้างเมล็ดเทียมที่ได้ด้วยน้ำกลั่นเป็นจำนวนหลายครั้ง เพื่อกำจัดไอออนที่เป็นพิษของคลอไรด์และโซเดียมออก เมื่อทำการล้างเสร็จแล้ว จึงนำเมล็ดเทียมไปทำการเก็บรักษาหรือนำไปเพาะเลี้ยงในดินหรืออาหารสังเคราะห์ เพื่อให้เจริญเป็นต้นใหม่ต่อไป



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนที่ใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมหรือเมล็ดสังเคราะห์
ที่มา: Standardi and Micheli (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันการห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลเป็นวิธีที่การผลิตเมล็ดเทียมที่ประสบความสำเร็จและยอมรับกันอย่างกว้างขวาง สามารถแบ่งประเภทของเมล็ดเทียมได้ 3 ประเภท ตามวิธีการห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจล

2.2.2.2.1 เมล็ดเทียมแบบห่อหุ้มชั้นเดียว (Single layered synthetic seed)

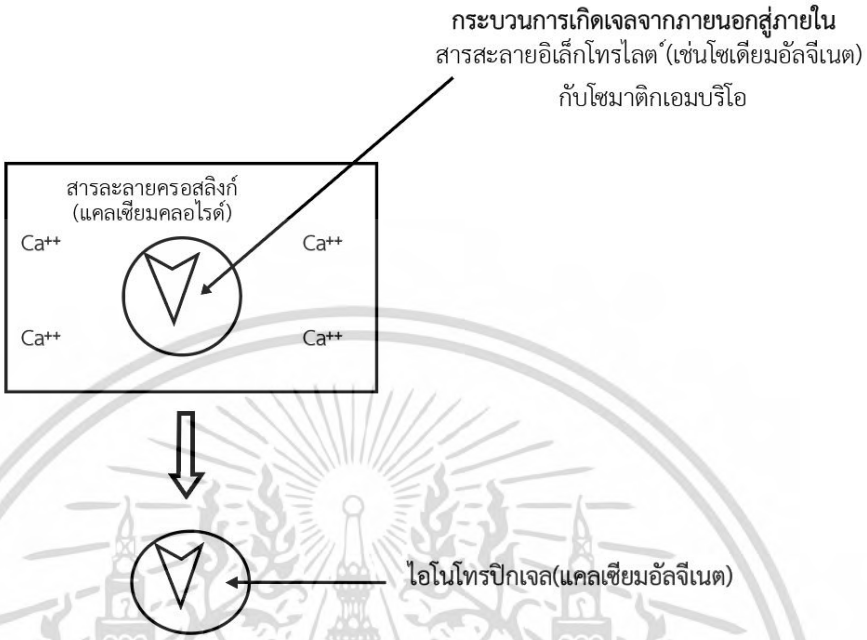
วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมีโอกาสสำเร็จมากที่สุดในบรรดาการห่อหุ้มแบบต่างๆ ในการทำเมล็ดเทียมแบบชั้นเดียวชิ้นส่วนของพืชจะถูกนำมาผสมกับไฮโดรเจล เช่น โซเดียมอัลจิเนต (0.5–5.0%, มวลต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นไฮโดรฟิลิกคอลลอยด์แบบสายตรงที่ประกอบด้วยกรด hydro-β-D-mannuronic โดยเตรียมสารละลายอัลจิเนตในน้ำกลั่นหรือในอาหารเหลวที่ปราศจากแคลเซียม และทำการใส่ชิ้นส่วนพืชลงไป จากนั้นชิ้นส่วนพืชถูกนำไปหยดลงในสารผสม เช่น แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl2 · 2H2O) หรือแคลเซียมไนเตรต [Ca (NO3) 2] (ความเข้มข้น 30–150 มิลลิโมลาร์) ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอัลจีเนตให้มีค่าเท่ากับ 5.8 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนจะนำมาใช้ (Kavyashree. *et al*., 2006; Sharma. *et al*., 2009) หลักการสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการห่อหุ้มของอัลจิเนต คือ การฟอร์มตัวกันเป็นเม็ดกลม เนื่องจากกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนโซเดียม (Na +) และแคลเซียม (Ca ++) (รูปที่ 2.3) ความแข็งของเมล็ดเทียมและความสำเร็จในการห่อหุ้มขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้และระยะเวลาในการฟอร์มเมล็ด ซึ่งอาจแตกต่างกันไปตามชิ้นส่วนพืชหรือสายพันธุ์ของพืชที่ใช้ในการทำเมล็ดเทียม ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายและเวลาที่ใช้ในการจับตัวที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการทำเมล็ดเทียม (Saiprasad, 2001)

โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ที่พบได้ตามธรรมชาติ บางครั้งจะถูกเรียกว่า กรดอัลจีนิกหรือเกลือของกรดอัลจีนิก (Szekalska. *et al*., 2016) อัลจีเนตเป็นพอลีเมอร์สายตรงที่ประกอบด้วยประกอบด้วยกรดกูลูโรนิกและกรดแมนนูโรนิก ซึ่งอาจจะเป็นสายยาวของกรดกูลูโรนิกหรือกรดแมนนูโรนิกก็ได้หรืออาจจะมีทั้งกรดกูลูโรนิกและกรดแมนนูโรนิกบนสายยาว (รูปที่ 2.4) อัลจีเนตสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) เช่น *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* กระบวนการสกัดอัลจีเนตจากสาหร่ายทะเลนั้นไม่ซับซ้อน แต่มีหลายขั้นตอนซึ่งมักจะเริ่มจากการสกัดด้วยกรดอนินทรีย์เพื่อทำให้ได้กรดอัลจีนิกที่บริสุทธิ์ จากนั้นจะทำให้กรดอัลจีนิกเปลี่ยนเป็นเกลือโซเดียมที่สามารถละลายน้ำได้ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต โซเดียมอัลจีเนตมีคุณสมบัติทำให้สารเกิดความข้นและหนืดขึ้นจนถึงเป็นเจล หรือคงรูปร่างได้เมื่อเจอกับแคลเซียม เรียกอีกอย่างว่า สารก่อเจล (gelling agent) ซึ่งเจลที่เกิดขึ้นจะทนต่อความร้อน (thermoirreversible gel) หรือไม่เปลี่ยนรูปร่างเมื่อได้รับความร้อน อัลจิเนตที่นำมาใช้มักจะอยู่ในรูปของสารประกอบผสมของเกลือโซเดียม ซึ่งผ่านการทำแห้งและอยู่ในลักษณะเป็นผง

อุปกรณ์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมนั้นได้แก่ ปั๊ม peristaltic และปิเปต การกวนหรือเขย่าอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เกิดการก่อตัวกันเป็นเม็ดทรงกลมในระหว่างการเกิดพอลิเมอไลเซชันและยังช่วยหลีกเลี่ยงการเกาะติดกันของเมล็ดเทียม ขนาดของเมล็ดเทียมจะเปลี่ยนแปลงตามขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางด้านในของหัวฉีดปิเปต เมื่อเมล็ดเทียมเสร็จสิ้นกระบวนการฟอร์มตัวแล้วจะถูกนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อล้างสารเคมีออกและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

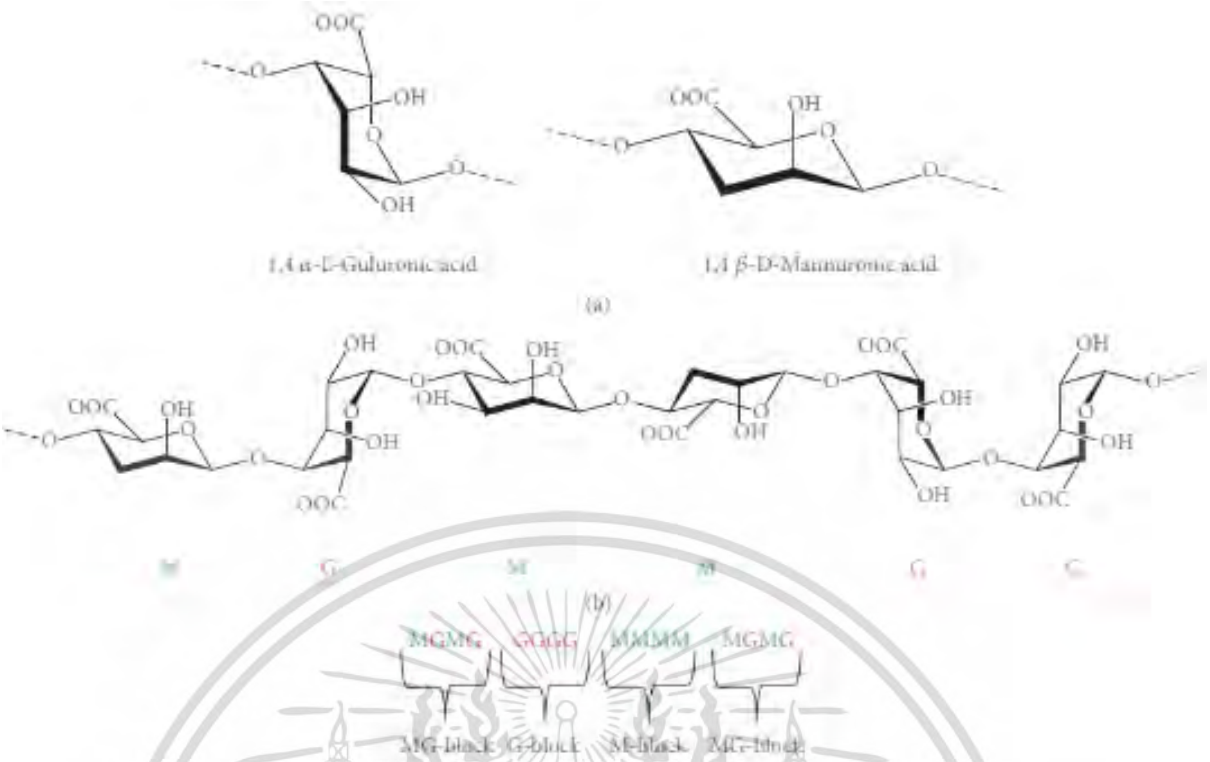
ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารหรือนำไปหว่านลงในวัสดุปลูกต่างๆ เช่น กระดาษกรอง, ฝ้าย หรือดินปลอดเชื้อที่รดด้วยอาหารเหลวหรือน้ำกลั่น



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการฟอร์มตัวของเมล็ดเทียมแบบชั้นเดียว
ที่มา : patel. *et al*. 2000

องค์ประกอบของเจลที่ใช้ในการจับตัวกันเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการงอกของชิ้นส่วนพืชที่ถูกห่อหุ้ม เพื่อให้การเจริญเติบโตและการงอกของชิ้นส่วนพืชเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ การเพิ่มส่วนผสมต่างๆ ลงไปในไฮโดรเจลจึงเป็นไปอย่างจำเพาะ เช่น มีการนำสารอาหารมาผสมในเจลเมทริกซ์ เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่ถูกห่อหุ้ม, การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในเจลเมทริกซ์เพื่อช่วยในการงอกของเมล็ดเทียม, การเติมสารต้านจุลชีพต่างๆลงไปในเจลเมทริกซ์ของเมล็ดเทียมที่จะทำการออกปลูกในดิน เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามสารเคมีดังกล่าวทำให้ความสามารถในการงอกของเมล็ดเทียมลดลง ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปในเมทริกซ์เจล การผลิตเมล็ดเทียมแบบชั้นยากที่จะนำไปผลิตในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เนื่องจากมีความยากในการจัดการและเมล็ดเทียมจะแห้งอย่างรวดเร็วในที่ที่มีอากาศถ่ายเท สามารถแก้ปัญหานี้ด้วยการเคลือบเมล็ดเทียมด้วย Elvax 4260 (กรดเอทิลีนไวนิลอะซิเตทอะคริลิก) (Redenbaugh and Walker, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของอัลจีเนต
ที่มา : Szekalska. *et al*. 2016

2.2.2.2.2 เมล็ดเทียมแบบห่อหุ้มสองชั้น (Double layered synthetic seed)

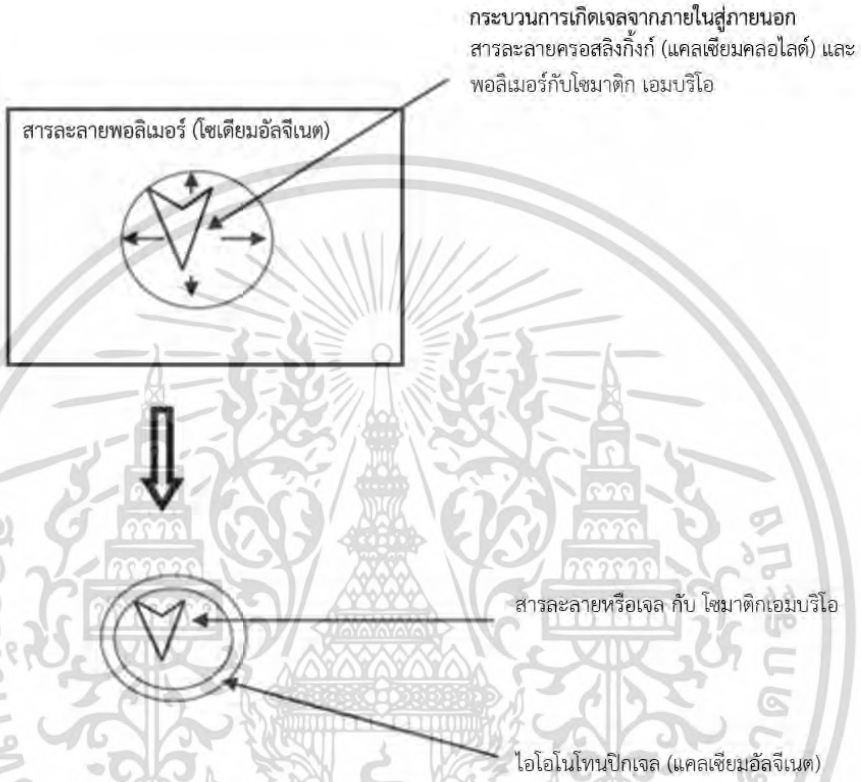
การทำเมล็ดเทียมแบบสองชั้นทำได้โดยการนำเมล็ดเทียมแบบชั้นเดียวไปเคลือบเพิ่มด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกันและหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ข้อดีของเมล็ดเทียมที่มีการห่อหุ้มสองครั้ง คือ มีความสามารถในการป้องกันชิ้นส่วนพืชได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ถ้าภายในเมล็ดเทียมชั้นที่สองประกอบด้วยอาหารสังเคราะห์ จะทำให้การปนเปื้อนจุลินทรีย์สูงขึ้น ในขณะที่ถ้าชั้นที่สองประกอบด้วยแคลเซียมอัลจิเนต หรือ แมนนิทอล การปนเปื้อนจุลินทรีย์จะลดลงอย่างมาก (Pinker and Abdel-Rahman, 2005)

2.2.2.2.3 เมล็ดกลวง (Hollow beads)

การผลิตเมล็ดเทียมแบบ Hollow beads จะเป็นการนำชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ไปใส่ในสารละลายที่มีคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (CMC) และแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นจะถูกดูดและหยดลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ทำให้กระบวนการฟอร์มตัวของเจลจะเกิดจากภายในสู่ภายนอก (Ionotropic Gelation) (รูปที่ 2.5) การผลิตเมล็ดเทียมแบบ Hollow beads นั้นถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดเทียม เนื่องจากในเมล็ดเทียมแบบชั้นเดียวชิ้นส่วนพืชจะอยู่ติดกับผิวของเมล็ดเทียมทำให้ไม่สามารถรับประกันได้ว่าชิ้นส่วนพืชจะได้รับการป้องกันที่ดีพอ ซึ่งตรงกันข้ามกับเปลือกหุ้มเมล็ดของเมล็ดพันธุ์ตามธรรมชาติที่มีความสามารถในการป้องกันที่ดีกว่า ถึงแม้ว่าเมล็ดเทียมแบบ Hollow beads นั้นจะมีข้อดีมากกว่าเมล็ดเทียมแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้น แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับใช้กับพืชบางจำพวก โดยมีสาเหตุดังต่อไปนี้ 1) สารคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่อยู่รอบๆชิ้นส่วนพืชมีความหนืดสูง ทำให้พืชไม่สามารถนำสารอาหารจากภายนอกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ในการเจริญเติบโตได้ แต่สามารถแก้ไขได้โดยการนำ tweezer (ปากคีบ) มาบีบให้เมล็ดเทียมเกิดรอยแตกขึ้น 2) เมล็ดเทียมแบบ Hollow beads จะมีการดูดซึมน้ำในระหว่างการเก็บรักษาที่มากกว่าเมล็ดเทียมแบบอื่น ซึ่งเป็นผลมาจากคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสที่อยู่ภายในเมล็ดเทียมมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้สูง อาจจะทำให้เมล็ดเทียมเปลี่ยนรูปทรงและเกิดความเสียหายบริเวณสารเคลือบผิวได้ สุดท้ายอาจจะทำให้เมล็ดเทียมเกิดรูพรุนขนาดใหญ่และสูญเสียความสามารถในการป้องกันชิ้นส่วนพืช



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการฟอร์มตัวของเมล็ดเทียมแบบกลวง
ที่มา : patel. *et al*. 2000

2.2.3 ประเภทของชิ้นส่วนพืชสำหรับการผลิตเมล็ดเทียม

เมล็ดเทียมทำหน้าที่เป็นทางเลือกในการขยายพันธุ์สำหรับพืชที่ไม่สามารถสร้างเมล็ดเองตามธรรมชาติหรือเมล็ดที่สูญเสียความสามารถในการขยายพันธุ์ จึงมีการนำชิ้นส่วนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียม ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้นั้นแบ่งได้ 2 ประเภทดังนี้

2.2.3.1 ชิ้นส่วนพืชที่มีโครงสร้างสองขั้ว (Bipolar propagules)

ในบรรดาชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมพบว่า โซมาติกเอมบริโอมีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากโซมาติกเอมบริโอมีโครงสร้างที่คล้ายกับไซโกติกเอมบริโอและมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์มากมายรวมถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่เรียกว่า embling แต่ถ้าเป็นต้นที่เกิดจากไซโกติกเอมบริโอจะเรียกว่า seedling (Saiprasad, 2001) อย่างไรก็ตามสิ่งที่โซมาติกเอมบริโอแตกต่างจากไซโกติกเอมบริโอคือ ไซโกติกเอมบริโอเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของพืช ทำให้ลูกหลานที่ได้มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่ได้เหมือนกับต้นพ่อต้นแม่ทั้งหมด แต่โซมาติกเอมบริโอพัฒนามาจากเซลล์ร่างกาย ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของต้นพืชที่ได้เหมือนกับต้นพ่อต้นแม่ทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประการ นอกจากนี้โซมาติกเอมบริโอเป็นชิ้นส่วนพืชที่มีโครงสร้างแบบสองขั้วคือ มีทั้งขั้วยอดและขั้วราก ทำให้พืชสามารถพัฒนารากและยอดได้ในขั้นตอนเดียว ด้วยเหตุนี้จึงทำให้โซมาติกเอมบริโอมีข้อดีกว่าชิ้นส่วนพืชอื่นๆ โซมาติกเอมบริโอถูกนำไปใช้ทั้งการผลิตเมล็ดเทียมแบบแห้งและแบบชื้น ปัญหาพื้นฐานที่พบในการใช้โซมาติกเอมบริโอในการผลิตเมล็ดเทียม มีดังนี้ คือ การเจริญเติบโตของยอดและรากไม่ได้เกิดขึ้นพร้อมกัน การชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอทำได้ยากและใช้เวลานาน (Castellanos. *et al.*, 2004) โซมาติกเอมบริโอของไม้เนื้อแข็งหลายชนิดไม่สามารถเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้และโซมาติกเอมบริโอไม่มีระยะพัก จากปัญหาที่กล่าวข้างต้น ทำให้ ณ ปัจจุบันมีพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่ประสบความสำเร็จในการผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้โซมาติกเอมบริโอ

2.2.3.2 ชิ้นส่วนพืชที่มีโครงสร้างขั้วเดียว (Unipolar propagules)

จากปัญหาที่เกิดขึ้นของการใช้โซมาติกเอมบริโอในการผลิตเมล็ดเทียม จึงทำให้เริ่มมีการใช้ชิ้นส่วนอื่นของพืชนอกเหนือจากโซมาติกเอมบริโอในการผลิตเมล็ดเทียม โดยข้อดีของการใช้ชิ้นส่วนพืชที่เป็น unipolar propagules คือ สามารถนำชิ้นส่วนของพืชมาใช้ได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ ซึ่งพืชบางชนิดการชักนำให้เกิดโซมาติกเอบริโอนั้นทำได้ยากและใช้เวลานาน การใช้ unipolar propagules มาผลิตเมล็ดเทียมจึงทำได้ง่ายกว่านอกจากนี้การใช้ unipolar propagules ยังช่วยลดการเกิด somaclonal variation เมื่อเทียบกับโซมาติกเอมบริโอ (Standardi and Piccioni, 1998) จำแนกประเภทของ unipolar propagule ได้ 3 ประเภท ดังนี้

2.2.3.2.1 ตาข้างและยอดอ่อน

นิยมนำชิ้นส่วนพืชประเภทนี้มาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียม เพราะว่าชิ้นส่วนพืชเหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้ง่ายจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ชิ้นส่วนตาข้างมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมมากกว่าชิ้นส่วนพืชที่เป็น unipolar propagules ชนิดอื่น เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติลักษณะเป็นหน่ออ่อนบริเวณง่ามไม้ ส่วนมากจะพบหน่ออ่อน 2 หน่อต่อ 1 ยอด ปลายยอดหรือตาข้างที่นำมาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมจะถูกตัดแต่งให้มีความยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการผลิตเมล็ดเทียมด้วยชิ้นส่วนตาข้างหรือยอดอ่อน คือ ปัญหาของการขาดความสามารถในการงอกรากของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ ทำให้ต้องมีกระบวนการในการชักนำให้เกิดรากขึ้น ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การชักนำให้เกิดปุ่มราก (root primordia) ก่อนที่จะนำชิ้นส่วนพืชมาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียม, การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ช่วยชักนำให้เกิดรากลงในอาหารสำหรับห่อหุ้มเมล็ดเทียม หรือ การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียม เพื่อเป็นการรวมขั้นตอนของการชักนำให้เกิดรากและการปรับสภาพให้อยู่ในขั้นตอนเดียวกัน ซึ่งเป็นการลดเวลาในการผลิตเมล็ดเทียมให้สั้นลง

2.2.3.2.2 กระเปาะ เหง้า หัว

โดยทั่วไป ในชิ้นส่วนพืชประเภทนี้ ต้นอ่อนจะงอกออกมาจากหัวหรือเหง้าได้เองตามธรรมชาติ ชิ้นส่วนพืชชนิดนี้จะแตกต่างจากชิ้นส่วนพืชชนิดอื่น เนื่องจากชิ้นส่วนพืชประเภทนี้สามารถขยายพันธุ์ได้แบบทวีคูณ รวมถึงการสะสมอาหารไว้ในกระเปาะหรือหัวได้ พบพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่ใช้ชิ้นส่วนประเภทหัวหรือเหง้าในการผลิตเมล็ดเทียม เช่น กล้วยไม้ หรือ กระเทียม แต่การผลิตเมล็ดเทียมในกล้วยไม้มีความพิเศษกว่าพืชชนิดอื่น เนื่องจากชิ้นส่วนที่นำมาใช้มีขนาดเล็กและกล้วยไม้เป็นพืชที่มีเมล็ดเป็นแบบ non-endospemic seeds โดยนิยมใช้โปรโตคอร์มในการผลิตเมล็ดเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2.3 เนื้อเยื่อเจริญ กลุ่มของเซลล์และไพรมอเดีย (primordia)

ชิ้นส่วนประเภทนี้จะมีความซับซ้อนสามารถตรวจสอบได้ยาก ต่างจากชิ้นส่วนพืชที่ได้จากการตัดออกจากต้นพืช ที่กลุ่มเซลล์ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งกลุ่มเซลล์จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือหน่อในท้ายที่สุด (Yoshida, 1996) โดยในธรรมชาติชิ้นส่วนที่มีลักษณะอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ คอร์ม คุณลักษณะเฉพาะอีกอย่างของชิ้นส่วนพืชที่อยู่ในกลุ่มนี้คือ ต้องห่อหุ้มชิ้นส่วนพืชก่อนที่จะจบระยะ differentiation phase เช่น proliferating callus ซึ่ง proliferating callus เป็นกระจุกของเอมบริโอเจนนิคแคลลัส โดยแคลลัสกลุ่มนี้จะสามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ง่าย เมื่อนำไปผลิตเมล็ดเทียมแล้ว มีแนวโน้มที่จะประสบผลสำเร็จ

2.2.4 วิธีการประยุกต์ใช้เมล็ดเทียมในด้านต่างๆ

2.2.4.1 ด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีการ Encapsulation เป็นวิธีที่สะดวกและมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้กับพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมล็ดเทียมสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนอาหารสังเคราะห์ในสภาวะภายในหลอดทดลองหรือในวัสดุปลูก เช่น ดิน ทราย เพอร์ไลท์ เวอร์มิคูไลท์ โดยทั่วไปเมล็ดเทียมที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในวัสดุปลูก เนื่องจากในอาหารสังเคราะห์อุดมไปด้วยแร่ธาตุและอาหารมากกว่าวัสดุปลูกชนิดอื่น นอกจากนี้ยังสามารถเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยในการเจริญ แต่สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้จะแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของพืชนั้นๆ

2.2.4.2 ด้านการออกปลูก

ถึงแม้ว่าพืชส่วนใหญ่จะสามารถผลิตได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอมบริโอเจเนซิสหรือออร์แกโนเจเนซิส แต่บางครั้งก็เกิดความยากลำบากในการขนส่ง การนำวิธีการผลิตเมล็ดเทียมมาประยุกต์ใช้ ทำให้การขนส่งสามารถทำได้สะดวกและมีความยืดหยุ่นกว่าเมื่อเทียบการขนย้ายต้นกล้าหรือต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นการนำเมล็ดเทียมออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลองนั้น จึงเป็นวิธีที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ โดยวิธีนี้จะใช้กับการผลิตพืชทางเศรษฐกิจขนาดใหญ่ เพื่อลดค่าใช้จ่ายที่ใช้ในขั้นตอนของการผลิต การนำเมล็ดเทียมลงปลูกในดินหรือวัสดุปลูกอื่นๆ จะช่วยลดขั้นตอนในการปรับสภาพของต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้การจัดการและการขนส่งเมล็ดเทียมสามารถทำได้สะดวกและมีความยืดหยุ่นกว่าเมื่อเทียบกับการขนย้ายต้นกล้าหรือต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญที่พบในการออกปลูกเมล็ดเทียมเชิงพาณิชย์ โดยสารอาหารรวมถึงสารอินทรีย์ที่อยู่รอบๆเมล็ดเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน จึงมีการเติมสารกำจัดเชื้อรา เช่น คาเบนดาซิม บาวิสตินเบโนมิล ลงไปในสารผสมของอัลจีเนตเพื่อลดการปนเปื้อน แต่ในบางครั้งการเติมสารกำจัดเชื้อราลงในเมล็ดเทียมอาจจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่ถูกห่อหุ้มอยู่และทำให้เมล็ดเทียมไม่เกิดการงอก ดังนั้นเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์โดยไม่ส่งผลกระทบต่อชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดเทียม จึงเกิดเป็นการทำเมล็ดเทียมแบบ double-layered โดยการเคลือบชั้นที่สองของเมล็ดเทียมด้วยสารกำจัดเชื้อรา งานวิจัยเกี่ยวกับการออกปลูกเมล็ดเทียมส่วนใหญ่ประสบความสำเร็จได้โดยการใช้วัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว (autoclaved) แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว จึงมีการนำเมล็ดเทียมไปปรับสภาพก่อนการออกปลูก โดยเพาะเลี้ยงในจานแก้ว เพื่อชักนำให้ต้นพืชเกิดรากก่อน หลังจากนั้นจึงนำไปปลูกในวัสดุปลูกที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ การปรับสภาพเมล็ดเทียมก่อนการออกปลูกช่วยให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดเทียมสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีขึ้น เนื่องจากสองปัจจัย คือ 1) การปนเปื้อนจุลินทรีย์ลดลงเนื่องจากการลดสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมลง 2) ต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตในวัสดุปลูกได้ เนื่องจากมีการปรับสภาพเมล็ดเทียมก่อนการออกปลูก

2.2.4.3 การเก็บรักษาระยะสั้น

เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศและเพื่อจุดประสงค์ดังกล่าว วิธีการเก็บรักษาเมล็ดเทียมจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดเทียมหลังจากทำการขนย้าย ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาและระยะเวลาในการจัดเก็บที่แน่นอนเป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อรักษาความมีชีวิตของเมล็ดเทียมในระหว่างการขนส่งนำไปสู่ความสำเร็จในการผลิตเมล็ดเทียมเชิงพาณิชย์ โดยทั่วไปพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการจัดเก็บเมล็ดเทียม คือ 4 องศาเซลเซียส (Singh. *et al*., 2007; Tabassum. *et al*., 2010) นอกจากปัจจัยของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาแล้ว อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดเทียม ความเข้มของแสง (Kaminska. *et al*., 2018) ต่างก็เป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาศักยภาพของต้นอ่อนที่อยู่ภายในเมล็ด

2.2.4.4 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในระยะยาว (Cryopreservation)

การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชภายใต้อุณหภูมิต่ำยิ่งยวดเป็นเวลานานเรียกว่า cryopreservation การเก็บรักษาชิ้นเนื้อเยื่อด้วยวิธีนี้ จะมีประโยชน์ก็ต่อเมื่อสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ในปัจจุบันมีการใช้วิธีอื่นร่วมกับการทำ cryopreservation ในการเก็บรักษาพันธุ์พืชที่แตกต่างกัน เช่น การทำเมล็ดเทียมให้แห้งก่อนโดยอาศัยหลักการออสโมซิส โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดลงบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ซึ่งจะทำให้น้ำจากภายในเมล็ดเทียมซึมออกมารอบๆเมล็ดอย่างช้าๆ หลังจากถึงจุดอิ่มตัวจึงทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสด้วยไนโตเจนเหลว และเพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้น จึงมีการนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำก่อนจะมาทำการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ข้อดีของวิธีนี้ คือ จะมีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าการใช้ตู้ลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (programable freezer)

2.2.5 ปัญหา ข้อจำกัดและความเป็นไปได้ในอนาคต

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชและในด้านการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ แม้จะประสบความสำเร็จมากมายในการผลิตเมล็ดเทียม แต่ยังคงมีปัญหาหลายประการที่จะต้องแก้ไข หากจะทำการผลิตเมล็ดเทียมเชิงพาณิชย์ ปัญหาแรกคือ การลดต้นทุนที่เกิดขึ้นจากการผลิตชิ้นส่วนพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระดับอุตสาหกรรม

แม้ว่าโซมาติกเอมบริโอจะเป็นชิ้นส่วนพืชที่ดีที่สุดในการนำมาผลิตเมล็ดเทียม แต่ในขั้นตอนของการผลิตก็ยังพบปัญหา เช่น การสูญเสียความสามารถของเอมบริโอเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่ง ยอดและรากมีการเจริญเติบโตไม่พร้อมกัน การขาดระยะพักในเมล็ดเทียม ความผิดปกติของรูปร่าง รวมถึงความทนทานของพืชต่อการสูญเสียน้ำ (Ara. *et al*., 2000) ส่วนปัญหาสำคัญของการใช้ชิ้นส่วนพืชประเภท non embryogenic ในการผลิตเมล็ดเทียมนั้น คือ ชักนำให้เกิดรากได้ยากและใช้ระยะเวลานาน นอกเหนือจากนี้การเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมภายนอกหลอดทดลองหรือการลงปลูกในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อยังคงมีข้อจำกัดในหลายๆปัจจัย เช่น มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ต่ำ สารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและสุดท้ายการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในดิน การปรับวิธีการที่ใช้และเพิ่มสารที่จำเป็นต่อการเจริญลงในเมล็ดเทียมจะช่วยให้เมล็ดเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงขึ้น ซึ่งพืชแต่ละสายพันธุ์ต่างก็มีความจำเพาะและสภาวะในการเจริญที่ต่างกันจึงต้องมีการแก้ไขและปรับเปลี่ยนวิธีการที่ใช้เป็นกรณีๆไป การสูญเสียความมีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาทั้งการเก็บรักษาระยะสั้นและระยะยาว รวมถึงการเกิด somaclonal variation เป็นข้อจำกัดปลีกย่อยที่พบในการผลิตเมล็ดเทียม เช่นเดียวกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอื่นๆ กระบวนการห่อหุ้มอัลจีเนตในขั้นตอนการผลิตเมล็ดเทียมเป็นกระบวนการที่ต้องใช้แรงงานจำนวนมาก เนื่องจากมีขั้นตอนจำนวนมากในการผลิตเมล็ดเทียมตั้งแต่การตัดชิ้นส่วนพืชตัดแต่งให้มีขนาดที่ต้องการ เคลือบด้วยโซเดียมอัลจีเนต นำไปหยดในแคลเซียมคลอไรด์ ล้างด้วยน้ำ สุดท้ายนำไปทำเพาะเลี้ยงหรือจัดเก็บ จากขั้นตอนต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีการใช้การผลิตเมล็ดเทียมแบบ bulk encapsulation โดยเป็นการนำชิ้นส่วนพืชที่จะใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมหลายๆชิ้น ใส่ลงไปในขวดเพาะเลี้ยงที่มีโซเดียมอัลจีเนตที่ละลายอยู่กับสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงค่อยๆ เทแคลเซียมคลอไรด์ลงไป จะทำให้เกิดการฟอร์มตัวของเจลในขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นค่อยๆเทแคลเซียมคลอไรด์ออก แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปในขวดเพาะเลี้ยงเพื่อล้างไอออนของแคลเซียมคลอไรด์หลังจากนั้นเทเอาน้ำกลั่นออก แล้วจึงนำขวดเพาะเลี้ยงไปทำการเก็บรักษาในสภาวะที่ต้องการ ซึ่งจากวิธีที่กล่าวไปข้างต้นจะทำให้สามารถผลิตเมล็ดเทียมได้ทีละมากๆ ทำให้สามารถลดจำนวนแรงงานที่จะต้องใช้ในกระบวนการผลิตเมล็ดเทียม แต่เนื่องจากการผลิตเมล็ดเทียมด้วยวิธีนี้จะใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้นสูงกว่าการผลิตเมล็ดเทียมปกติ ทำให้ยอดและรากของต้นพืชมีการเจริญเติบโตที่ลดลง ซึ่งถือเป็นปัญหาที่สำคัญของการผลิตเมล็ดเทียมด้วยวิธีนี้ ในอนาคตปัญหานี้จำเป็นต้องมีการแก้ไขหากจะใช้เทคนิคนี้ในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมในระยะยาว (West and Preece, 2009) นอกเหนือจากการพัฒนาวิธีที่ใช้ในขั้นตอนการห่อหุ้มแล้ว การพัฒนาวิธีและเครื่องมือในการผลิตและออกปลูกก็มีความจำเป็นเช่นกัน แม้จะเกิดความคืบหน้าในการผลิตเมล็ดเทียม แต่การนำไปประยุกต์ใช้ยังสามารถทำได้น้อย ในขณะที่การผลิตเมล็ดเทียมเชิงพาณิชย์ยังได้แค่เป็นเพียงแนวคิดเท่านั้น

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.3.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

Karim. *et al*. (2011) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของสตรอว์เบอร์รีโดยใช้ชิ้นส่วนใบ พบว่า อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 93.33 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีสีครีม จับกันแน่น เช่นเดียวกันกับชิ้นส่วนใบที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดที่ 93.33 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน แต่ลักษณะของแคลลัสจะเป็นสีขาวและน้ำตาล

Ara. *et al.* (2012) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสในสตรอว์เบอร์รี พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของสตรอว์เบอร์รีที่โตเต็มวัยบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยเกิดแคลลัส 75 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น คือ แคลลัสเป็นก้อนใหญ่สีเขียว จับกันแน่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rahman. *et al.* (2015) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้ชิ้นส่วนใบของต้นสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดย 4 สัปดาห์แรกจะทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยเกิดแคลลัส 93 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการชักนำให้เกิดแคลลัสประมาณ 46 วัน

Palei. *et al.* (2017) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Chandler พบว่า อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัส 90 เปอร์เซ็นต์ และได้แคลลัสที่มีน้ำหนักมากที่สุดที่ 170.6 มิลลิกรัม แคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเขียว ลักษณะจับกันแน่น

2.3.2 การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัส

Biswas. *et al*. (2007) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส ทำการทดลองโดยใช้ชิ้นส่วนใบและข้อของต้นสตรอว์เบอร์รี พบว่า อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดอะมิโนโพรลีนที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสได้ดีที่สุด และการเพาะเลี้ยงในที่มืด หรือการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 6 ชั่วโมงต่อวัน จะทำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส 90-95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้ไปลงปลูกในดิน ลักษณะของต้นและผลที่ได้ไม่เกิดความผิดปกติใดๆ

Gerdakaneh. *et al.* (2009) ทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอในสตรอว์เบอร์รี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Kurdistan, Paros และ Camarosa โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต 3 ชนิด คือ ซูโครส, กลูโคส และฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 1.5 3 6 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร พบว่า ซูโครสที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร จะสามารถชักนำให้เอมบริโอรูปทรงกลมพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดในสตรอว์เบอร์รีทั้ง 3 สายพันธุ์ และซูโครสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร จะสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ของชิ้นเนื้อเยื่อได้ดีกว่าคาร์โบไฮเดรตอีกสองชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน

Gerdakaneh. *et al.* (2011) ทำการศึกษาประเภทและความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอของสตรอว์เบอร์รี ทำการทดลองโดยใช้ชิ้นส่วนใบจากต้นสตรอว์เบอร์รี 3 สายพันธุ์ คือ Camarosa Paros และ Kurdistan โดยนำแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนของใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคู่กับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการเสริมด้วย โพรลีน, อะลานีน และ กลูตามีน ที่ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารที่มีการเสริมด้วยโพรลีนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่า อะลานีน และ กลูตามีน นอกจากนี้อาหารที่ไม่มีการเสริมด้วยกรดอะมิโนจะมีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยกว่าอาหารที่มีกรดอะมิโนและความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่สูงหรือต่ำเกินไปจะไม่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

Zobayer. *et al*. (2011) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของสตรอว์เบอร์รี พบว่า จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่สูงสุดที่ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนไหลบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นที่ได้จะมีความยาวประมาณ 6 เซนติเมตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

Omar. *et al.* (2013) ทำการศึกษาโครงสร้างที่คล้ายกับโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบและก้านใบของสตรอว์เบอร์รีสองสายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA และน้ำตาลกลูโคส เพื่อตรวจสอบโครงสร้างที่เกิดขึ้นของโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในช่วงความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ช่วงความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสได้ดีที่สุด

Cappelletti. *et al*. (2016) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสของสตรอว์เบอร์รี พบว่า การเพาะเลี้ยงใบของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Calypso บนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุด แต่สายพันธุ์ Sveva จะสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.3 การชักนำให้เกิดการยืดและการเพิ่มปริมาณยอดขนาดเล็ก

Litwinczuk *et. al*. (2009) ทำการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนยอดสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Senga Sengana และ Elsanta พบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 1.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนต้นของสตรอว์เบอร์รีได้อย่างมีนัยยะสำคัญ ในทางกลับกันการใช้ สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 5.0-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกระตุ้นให้ต้นเกิดการยืดได้ดีกว่า GA_3 ที่ความเข้มข้นต่ำๆ

Ghasemi. *et al.* (2015) ทำการศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการยืดของต้นสตรอว์เบอร์รีป่า (*F. viridis* Duch.) พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.58 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดการยืดของต้นได้ดีที่สุด โดยต้นจะมีความสูงเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตร

Mohamed. *et al.* (2016) ทำการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ต่อการเพิ่มปริมาณต้นของสตรอว์เบอร์รี (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) พบว่า การนำชิ้นส่วนไหลของสตรอว์เบอร์รีไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากที่สุด 5.15 ต้นต่อชิ้นส่วนพืช และมีจำนวนใบมากที่สุด 4.65 ใบต่อต้น ในขณะที่การใช้ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดการยืดของต้นได้ดีที่สุด โดยต้นจะมีความสูงมากที่สุด 2.15 เซนติเมตร

Waghmare. *et al.* (2017) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Camarosa พบว่า การนำโซมาติกเอมบริโอไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้พัฒนาและงอกเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด

2.3.4 การชักนำให้ต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำกลับเป็นต้นปกติ

Perez-Tonero. *et al*. (2000) ทำการศึกษาการควบคุมต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเอพริคอต 2 สายพันธุ์ได้แก่ Helena และ Lorna พบว่า อาหาร WPM ที่ใช้ผงวุ้นความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถชักนำให้ต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำกลับมาเป็นต้นปกติได้สูงที่สุดทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยในสายพันธุ์ Helena และ Lorna ต้นฉ่ำน้ำจะกลายเป็นต้นปกติ 85.6 และ 78.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Saher. *et al*. (2005) ทำการศึกษาการป้องกันการเกิดต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาร์เนชั่น 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Alister Killer และ Oslo พบว่า การใช้ผงวุ้นที่ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และทำการเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมความเย็นที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส จะทำให้คาร์เนชั่นทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถป้องกันการเกิดต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Casanova. *et al*. (2008) ทำการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของผงวุ้นต่อต้นคาร์เนชั่นที่มีอาการฉ่ำน้ำ พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วยผงวุ้นความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำกลับมาเป็นต้นปกติได้ดีที่สุด

Bahmani. *et al*. (2009) ทำการศึกษาผลของแหล่งของคาร์บอนและความเข้มข้นต่ออาการฉ่ำน้ำของแอปเปิ้ล พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 4.43 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ จะสามารถรักษาต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำให้กลับเป็นต้นปกติได้สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์

Ayub. *et al*. (2019) ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเหลวที่มีผลต่อการป้องกันไม่ให้เกิดอาการฉ่ำน้ำในแบล็คเบอร์รีสายพันธุ์ Tupy พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอิโนซิทอลความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรจะทำให้สามารถป้องกันการเกิดต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำได้ 100 เปอร์เซ็นต์

2.3.5 การชักนำให้เกิดราก

Hasan. *et al*. (2010) ทำการศึกษาหาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นสตรอว์เบอร์รีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การเพาะเลี้ยงสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 16.5 รากต่อต้น และมีความยาวเฉลี่ย 3.4 เซนติเมตร

Ara. *et al*. (2012) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดรากในแคลลัสของสตรอว์เบอร์รี พบว่า อาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดรากมากที่สุด โดยมีระยะเวลาในการเกิดราก 7-8 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 24.5 รากต่อก้อนแคลลัส และรากมีความยาวเฉลี่ย 5.3 เซนติเมตร

Ashrafuzzaman. *et al*. (2013) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดรากของต้นสตรอว์เบอร์รี พบว่า การเพาะเลี้ยงสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการเกิดราก 8-10 วัน มีจำนวนรากเฉลี่ย 6 รากต่อต้น และรากมีความยาวเฉลี่ย 3.05 เซนติเมตร

Ghasemi. *et al.* (2015) ทำการศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากในสตรอว์เบอร์รีป่า (*F. viridis* Duch.) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหาร 1/2MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยเกิดรากเฉลี่ย 9.6 รากต่อยอด และมีความยาวเฉลี่ย 6.7 เซนติเมตร

Palei. *et al.* (2017) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดรากของยอดขนาดเล็ก (micro shoot) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส พบว่า การเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการชักนำให้เกิดราก 20 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 73.3 เปอร์เซ็นต์ เกิดรากเฉลี่ย 4.5 รากต่อต้น

2.3.6 การชักนำให้เกิดยอดหลายยอด

Sakila. *et al.* (2007) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดรากและยอดหลายยอดของต้นสตรอว์เบอร์รีจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ชิ้นส่วนพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KIN ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีที่สุด และการชักนำให้เกิดรากบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ IAA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

Haddani and Kamaladini (2010) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Camarosa พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ จะสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้เร็วที่สุด โดยใช้เวลา 1 สัปดาห์ ในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ และเมื่อครบ 4 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง จะสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดที่ 15 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช

Moradi. *et al*. (2011) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสตรอว์เบอร์รี พบว่า อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KIN ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีที่สุด

Ashrafuzzaman. *et al*. (2013) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดใหม่ของสตรอว์เบอร์รี พบว่า การเพาะเลี้ยงสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7 ยอด จำนวนใบเฉลี่ย 5 ใบต่อต้นและยอดมีความยาวเฉลี่ย 3.34 เซนติเมตร

Diengngan and Murthy. (2014) ทำการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Festival พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดสูงที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเติม TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้มากที่สุดที่ 6.4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช

2.3.7 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนต

Sarmah. *et al*. (2010) ทำการศึกษาการทำเมล็ดเทียมจากโปรโตคอร์มที่ได้จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ (*Vanda coerulea* Grifft. ex. Lindl.) พบว่า การใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และ แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การงอกมากที่สุดที่ 94.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 100 วัน

Asmah. *et al*. (2011) ทำการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเมล็ดเทียมของกระถินลูกผสม (Acacia Hybrid) พบว่า การใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และ แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 75-100 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เมล็ดเทียมที่ได้มีทรงกลมมากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเทียมตั้งแต่ 73.3-100 เปอร์เซ็นต์

Adhikari. *et al*. (2014) ทำการศึกษาการทำเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนปลายยอดของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) พบว่า ในขั้นตอนการทำเมล็ดเทียมการใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และ แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การงอกมากที่สุด เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Jadan. *et al.* (2015) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสเพื่อนำไปใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมในแบล็คเบอร์รี (*Rubus glaucus* Bemth) พบว่า ความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในการทำเมล็ดเทียมคือ โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งจะทำให้เมล็ดเทียมมีความแข็งที่มีเหมาะสมต่อการงอกของยอดที่ถูกห่อหุ้ม

Sanchez. *et al.* (2018) ทำการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่อการมีชีวิตรอดของเมล็ดเทียมของอ้อย (*Saccharum officinarum* L. cv. Mex 69-290) พบว่า การผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จะทำให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์

2.3.8 การชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม

Pradhan. *et al*. (2014) ทำการศึกษาการงอกของเมล็ดเทียมกล้วยไม้ (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมในอาหารเหลว MS ความเข้มข้น 0.25 เท่า จะสามารถชักนำให้เมล็ดเทียมเกิดการงอกยอดได้เร็วที่สุด โดยใช้เวลาในการงอกยอด 8 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง

Huh. *et al.* (2016) ทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของอาหารต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ (*Cypripedium macranthos* Sw.) พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหาร 1/4MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดการงอกได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 68.1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Koene. *et al.* (2019) ทำการศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นของเมล็ดกล้วยไม้ (*Acianthera prolifera*) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหาร 1/2MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เต็มสูตร โดยจะเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 74 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นเวลา 12 สัปดาห์

Abbasi. *et al*. (2020) ทำการศึกษาการเจริญของเมล็ดเทียมที่เกิดจากการห่อหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดและโซมาติกเอมบริโอของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหาร MS จะสามารถชักนำให้เมล็ดเทียมเกิดการงอกยอดได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2MS

2.3.9 เอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืช

Lisek and Orlikowska (2004) ทำการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า การเก็บรักษาเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Senga Sengana ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 6 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเพิ่มเวลาการเก็บรักษาเป็น 9 เดือน เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเทียมเพิ่มเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

Ikhalaq. *et al*. (2010) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดเทียมมะกอก พบว่า การเก็บรักษาเมล็ดเทียมของมะกอกที่อุณหภูมิ 4 องสาเซลเซียส จะสามารถรักษาความมีชีวิตของชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดเทียมได้ดีกว่าการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส โดยเมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การงอก 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน แต่การเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เมล็ดเทียมจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 47.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน

Hegazi (2011) ทำการศึกษาความมีชีวิตรอดของชิ้นส่วนปลายยอดของฟลินเดอร์ (*Capparis orientalis* Duh.) ที่ถูกห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนตที่มีองค์ประกอบภายในเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน พบว่า การห่อหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยโซเดียมอัลจีเนตที่ภายในอัลจีเนตเมทริกซ์ประกอบด้วยอาหาร MS และน้ำตาลซูโครส จะทำให้ชิ้นส่วนปลายยอดมีการเจริญที่ดีที่สุด หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวยอดเฉลี่ย 2.18 เซนติเมตร

Das. *et al.* (2016) ทำการศึกษาการงอกและการเจริญของต้นอ่อนจากเมล็ดเทียมของลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหาร 1/4B5 (Gamborg. et al., 1968) จะสามารถชักนำให้เกิดการงอกยอดได้ดีที่สุดที่ 69.1 เปอร์เซ็นต์

Kaminska. *et al*. (2018) ทำการศึกษาการเก็บรักษาระยะยาวของเมล็ดเทียมเดซี่ (*Taraxacum pieninicum*) โดยใช้สภาวะ Slow growth พบว่า การผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้อาหาร MS เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นาน 12 เดือน

2.3.10 ขนาดของต้นพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญในสภาวะภายนกหลอดทดลอง

Garcia-Ramirez. *et al.* (2015) การใช้ต้นไผ่เหลือง (*Bambusa vulgaris*) ขนาด 4 เซนติเมตร ในการออกปลูกจะทำให้ต้นพืชมีอัตราการเจริญเติบโต พื้นที่ใบ การเกิดรากที่ดีกว่าการใช้ต้นขนาด 3 เซนติเมตร ในการออกปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gomes. *et al.* (2015) ทำการศึกษาความเหมาะสมของขนาดต้นปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) และความยาวของรากต่ออัตราการรอดชีวิต พบว่า การใช้ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดมากกว่า 10 เซนติเมตร จะมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดที่ 94.1 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ต้นที่มีขนาดเล็กกว่า 2.5 เซนติเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุดเพียง 22.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นที่มีความรากมากกว่า 1.5 เซนติเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดที่ 94.2 เปอร์เซ็นต์

Almeida do Vale. *et al*. (2019) ทำการศึกษาความสูงที่เหมาะสมต่อการออกปลูกของต้นไผ่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ความสูงของต้นพืชก่อนการนำไปออกปลูกจะมีผลต่ออัตราการรอดชีวิต โดยต้นไผ่ที่มีความสูง 5-15 เซนติเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 97 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา

เมล็ดสตรอว์เบอร์รี สายพันธุ์ *Fragaria* x *ananassa* Duch.) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เบนดิโต้ ฟาร์ม จำกัด

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

3.1.2.1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง

1. อาหารสูตร MS (Murashige and skoog, 1992) สำเร็จรูปชนิดผง
2. ผงวุ้น (agar Powder)
3. น้ำตาลซูโครส (sucrose)

3.1.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

1. 2, 4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D)
2. 6 benzylaminopurine (BA)
3. Gibberellic acid (GA_3)
4. Indole-3-Butyric Acid (IBA)
5. Naphthylacetic acid (NAA)
6. Thidiazuron (TDZ)

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเมล็ดเทียม

3.1.3.1 สารเคมี

1. โซเดียมอัลจีเนต (sodium alginate)
2. แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride)

3.1.4 อุปกรณ์

3.1.4.1 อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการเตรียมอาหาร**และ**สารเคลือบเมล็ดเทียม

1. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและแบบหยาบ
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
4. ไมโครเวฟ (microwave)
5. เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)
6. ช้อนตักสารเคมี
7. บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
8. แท่งแก้วหรือช้อนคนสารเคมี
9. กระบอกตวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ถ้วยตวงสารเคมี
11. ออโต้ปิเปตต์ (auto pipette)
12. ขวดเพาะเลี้ยง

3.1.4.3 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับการตัดถ่ายเนื้อเยื่อและทำเมล็ดเทียมในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

(laminar air- flow)

1. ตะเกียงแอลกอฮอล์
2. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
3. เครื่องแก้ว: จานเพาะเลี้ยง, ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. เครื่องมือผ่าตัด: มีดผ่าตัด, ปากคีบ
5. กระดาษทิชชู่
6. แอลกอฮอล์ 70%
7. ปิเปตปลายตัด (เส้นผ่าศูนย์กลางของปลายตัด 6 มิลลิเมตร)

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) จากอาหารสำเร็จรูปของบริษัท Phytotech ความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับให้ค่า pH อยู่ในช่วง 5.6–5.8 เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 15 มิลลิลิตร นำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเมล็ดสตรอว์เบอร์รีในหลอดทดลอง

นำเมล็ดสตรอว์เบอร์รีล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ผึ่งเมล็ดให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำเมล็ดวางบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 เดือน

3.2.3 ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนใบ

3.2.3.1 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

นำใบของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจาก 3.2.2 มาตัดแต่งให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ลักษณะและสีของแคลลัส ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดแคลลัส จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.3.2 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสของชิ้นส่วนใบของต้นสตรอว์เบอร์รี

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.3.1 มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทำการบันทึกลักษณะของแคลลัส ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส และจำนวนต้นที่เกิดขึ้น คำนวณหาจำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดออร์แกโนเจเนซิส จากสูตร

$$\text{จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนต้นใหม่ที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การออร์แกโนเจเนซิส} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่เกิดต้นใหม่}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.3.3 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่เหมาะสมต่อการยืดของยอดขนาดเล็ก (micro shoot)

นำยอดขนาดเล็ก (micro shoot) ที่ได้จากการทดลอง 3.2.3.2 มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนต้นและจำนวนรากที่เกิดขึ้นในแต่ละขวดเพาะเลี้ยง วัดความยาวของก้านใบสตรอว์เบอร์รี เนื่องจากความสูงของต้นจะขึ้นอยู่กับความยาวของก้านใบ (El-Shabas. *et al*., 2009) คำนวณหาความสูงเฉลี่ยต่อต้น, จำนวนต้นเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยงและเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จากสูตร

$$\text{ความสูงเฉลี่ยต่อต้น} = \frac{\text{ผลรวมความยาวของก้านใบที่ยาวที่สุดในแต่ละต้น}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมดในขวดเพาะเลี้ยง}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{จำนวนต้นเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนขวดเพาะเลี้ยง}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิดราก}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \text{ X } 100$$

3.2.3.4 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของยอดขนาดเล็ก (micro shoot) ในอาหารเหลว

นำยอดขนาดเล็ก (micro shoot) น้ำหนักประมาณ 3 กรัม ที่ได้จากการทดลอง 3.2.3.2 มาเพาะเลี้ยงต่อในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว MS ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนต้นในแต่ละขวดเพาะเลี้ยง วัดความยาวของก้านใบสตรอว์เบอร์รี คำนวณหาความสูงเฉลี่ยต่อต้นและจำนวนต้นเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง จากสูตร

$$\text{ความสูงเฉลี่ยต่อต้น} = \frac{\text{ผลรวมความยาวของก้านใบที่ยาวที่สุดในแต่ละต้น}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมดในขวดเพาะเลี้ยง}}$$

$$\text{จำนวนต้นเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนขวดเพาะเลี้ยง}}$$

หลังจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสด และนำไปอบแห้งต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีของ Ciurzynska. et al. (2015) เพื่อหาน้ำหนักแห้ง คำนวณหาดัชนีการเจริญของน้ำหนักแห้ง จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโต} = \frac{DW_2 - DW_1}{DW_1}$$

โดยที่ DW_1 คือ น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของยอดขนาดเล็ก

DW_2 คือ น้ำหนักแห้งของยอดขนาดเล็กหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.2.3.5 ศึกษาความเข้มข้นของผงวุ้นและน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการบรรเทาอาการฉ่ำน้ำของต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

นำต้นสตรอว์เบอร์รีที่มีอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ที่ได้จากการทดลอง 3.2.3.4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ประกอบด้วยผงวุ้นความเข้มข้น 8 10 12 และ 14 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 60 90 และ 120 กรัมตอลิตร โดยเพาะเลี้ยงต้นฉ่ำน้ำ 1 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนต้นที่มีชีวิตและจำนวนต้นที่เกิดรากในแต่ละขวดเพาะเลี้ยง เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \text{ X } 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิดราก}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \text{ X } 100$$

นำต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไปชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง คำนวณหาปริมาณความชื้นในต้นพืช (water content) จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \text{ X } 100$$

โดยที่ m_1 คือ น้ำหนักสดของต้นพืชก่อนอบ
m_2 คือ น้ำหนักแห้งของต้นพืชหลังอบ

3.2.3.6 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำปลายยอดให้เกิดราก

นำปลายยอดสตรอว์เบอร์รีที่รักษาอาการฉ่ำน้ำแล้วขนาด 3-4 เซนติเมตร มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับ อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกลักษณะและจำนวนของรากที่เกิดขึ้น คำนวณหาจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดราก จากสูตร

$$\text{จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น} = \frac{\text{จำนวนรากที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิดราก}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \text{ X } 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนยอด

3.2.4.1 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด

นำชิ้นส่วนปลายยอดของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 3-4 เซนติเมตร มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะและจำนวนของยอดที่เกิดขึ้น คำนวณหาจำนวนยอดเฉลี่ย คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดยอดหลายยอด จากสูตร

$$\text{จำนวนยอดเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนขวดเพาะเลี้ยง}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดหลายยอด} = \frac{\text{จำนวนปลายยอดที่เกิดยอดหลายยอด}}{\text{จำนวนขวดเพาะเลี้ยง}} \times 100$$

3.2.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตเมล็ดเทียม

ทำการเตรียมอาหารเหลว MS ปราศจากแคลเซียมจากสต๊อกเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เพื่อใช้เป็นสารก่อเจล (Gelling agent) และเตรียมแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Complexing agent) ทำการปรับค่า pH ของสารทั้งสองตัวให้อยู่ในช่วง 5.6–5.8 หลังจากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำชิ้นส่วนปลายยอดที่มีขนาด 0.5-1 เซนติเมตร ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.4.1 มาดำเนินการในขั้นตอนการห่อหุ้มด้วยเจล (encapsulation) เพื่อทำการผลิตเมล็ดเทียมในตู้ปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนพืชใส่ลงในอาหาร MS ปราศจากแคลเซียมที่มีโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นทำการดูดชิ้นส่วนปลายยอดพร้อมกับโซเดียมอัลจิเนตด้วยปลายหลอดปิเปตที่ทำการตัดปลายแหลมออกและมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วจึงหยดลงในแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แช่ทิ้งไว้ 30 นาที จนเกิดเป็นเมล็ดเทียม หลังจากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 20 นาที นำเมล็ดเทียมส่วนหนึ่งไปทำการวัดขนาดและความแข็ง อีกส่วนหนึ่งไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของเมล็ดเทียม ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกยอดของเมล็ดเทียมและเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่มียอดงอกออกมา}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่เกิดราก}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

ทำการวัดขนาดและความแข็งของเมล็ดเทียม โดยนำเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนตแต่ละความเข้มข้นมา 5 เมล็ด ทำการวัดขนาดด้านสั้นและยาวของเมล็ดเทียมโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ เพื่อคำนวณหาความกลมและความกลมเฉลี่ยของเมล็ดเทียม จากสูตร

$$\text{ความกลมของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{ด้านยาวของเมล็ดเทียม}}{\text{ด้านสั้นของเมล็ดเทียม}}$$

$$\text{ความกลมเฉลี่ยของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{ผลรวมความกลมของเมล็ดเทียม}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}}$$

หลังจากนั้นนำเมล็ดเทียมไปวัดค่าความแข็งโดยดัดแปลงจากวิธีของพัชรีและสุธีรา (2561) นำเมล็ดเทียมมาวัดค่าความแข็งด้วยเครื่อง texture analyzer โดยใช้ Loadcell ขนาด 1 กิโลนิวตัน Cylinder Probe ขนาด 1 เซนติเมตร ความเร็ว 1 มิลลิเมตรต่อวินาที ระยะกดร้อยละ 95 ทำซ้ำตัวอย่างละ 10 ครั้ง

3.2.4.3 ศึกษาความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม

ทำการผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำเมล็ดเทียมมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS 1/2MS 1/4MS และ 1/8MS ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทำการบันทึกลักษณะของต้นที่เกิดขึ้น ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอดของเมล็ดเทียม ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดราก จำนวนรากในแต่ละขวดเพาะเลี้ยง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกยอดของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่เกิดการงอกยอด}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่เกิดราก}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น} = \frac{\text{จำนวนรากที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}}$$

3.2.4.4 ศึกษาองค์ประกอบของเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

นำชิ้นส่วนปลายยอดที่มีขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่ได้จากชักนำให้เกิดยอดหลายยอด มาทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำกลั่น, อาหาร MS หรืออาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นเอนโด-สเปิร์มเทียมและมีชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนตเป็นตัวควบคุม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน เมื่อครบเวลาในการเก็บรักษา ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหาร 1/4MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองจำนวน 15 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดเทียม ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอด ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดราก ความสูงของต้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดเทียม โดยกำหนดให้ความมีชีวิตของเมล็ดเทียม คือ ชิ้นส่วนพืชที่ถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเมล็ดเทียมยังมีสีเขียวแต่ไม่มีการงอกยอดหรือราก คำนวณเปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ความสูงเฉลี่ยต่อต้น จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่ชิ้นส่วนพืชเป็นสีเขียว}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่เกิดการงอก}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ความสูงเฉลี่ยต่อต้น} = \frac{\text{ผลรวมของก้านใบที่ยาวที่สุดในแต่ละต้น}}{\text{ขวดเพาะเลี้ยงทั้งหมด}}$$

3.2.5 การออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง

3.2.5.1 ศึกษาขนาดของต้นสตรอว์เบอร์รีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเมื่อทำการออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง

นำต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดประมาณ 0.5 1.0 และ 2.0 เซนติเมตร มาทำการออกปลูกในกระถาง 4 นิ้ว โดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติก รดด้วยน้ำประปาทุกๆ 2 วัน หลังจากนั้น 2 สัปดาห์จึงค่อยๆ เปิดถุงพลาสติกออก ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 6 สัปดาห์ ทำการบันทึกลักษณะของต้นสตรอว์เบอร์รี วัดความสูงของต้น จำนวนใบ และพื้นที่ใบ ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และพื้นที่ใบเฉลี่ย จากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นพืชที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ความสูงเฉลี่ยต่อต้น} = \frac{\text{ผลรวมของความยาวก้านใบที่ยาวที่สุด}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}}$$

$$\text{จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนใบ}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด}}$$

$$\text{พื้นที่ใบเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของพื้นที่ใบ}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}}$$

3.2.5.2 ศึกษาวัสดุปลูกและเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียมในสภาวะไม่ปลอดเชื้อภายนอกหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนปลายยอดมาตัดแต่งให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร และตัดแต่งรากให้มีความยาวประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร มาทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำกลั่น หรืออาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์และมีชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนตเป็นตัวควบคุม ทำการออกปลูกในกระถาง 4 นิ้ว โดยใช้พีทมอส เวอร์มิคูไลท์ สแฟกนั่มมอส เป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติก รดด้วยอาหาร 1/8MS ทุกๆ 2 วัน ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดเทียม เปอร์เซ็นต์การงอกยอดของเมล็ดเทียม จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่ชิ้นส่วนพืชเป็นสีเขียว}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกยอดของเมล็ดเทียม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดเทียมที่เกิดการงอกยอด}}{\text{จำนวนเมล็ดเทียมทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistics Package for the Social Sciences) เวอร์ชั่น 26 (IBM SPSS Statistics 26) โดยในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะเปรียบเทียบโดยใช้วิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนใบ

4.1.1 การศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนใบ

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นสตรอว์เบอร์รีโดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D หรือ NAA ร่วมกับ BA จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยแคลลัสมีลักษณะจับกันแน่น (compact callus) มีสีเขียวอ่อนและมีปริมาณแคลลัสมาก (รูปที่ 4.1) ส่วนสูตรอาหารที่ดีที่สุดของการชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA คือ อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยแคลลัสมีลักษณะจับกันแน่น (compact callus) มีสีเขียวอ่อนและมีปริมาณแคลลัสน้อย (รูปที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินที่ใช้ในการทดลอง พบว่า อาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าอาหารที่ประกอบด้วย NAA ร่วมกับ BA โดยใบที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ส่วนใหญ่จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอยู่ในช่วง 90-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่า NAA ที่ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 60-90 เปอร์เซ็นต์ และในอาหาร MS ที่มีเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะใช้เวลาในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้เร็วที่สุด (1-2 สัปดาห์) และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารที่ประกอบด้วยออกซินเพียงอย่างเดียว (2,4-D หรือ NAA) แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะจับกันไม่แน่น (friable callus)

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Palei. *et al*. (2017) ที่พบว่า อาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยแคลลัสที่ได้มีสีเขียวอ่อนลักษณะจับกันแน่น นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารที่ประกอบด้วยออกซินเพียงอย่างเดียว (2,4-D หรือ NAA) แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะจับกันไม่แน่น (friable callus) เนื่องจากออกซินมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการยืดตัวของเซลล์ โดยในการยืดตัวของเซลล์จะประกอบด้วยสองกระบวนการที่สัมพันธ์กัน คือ การดูดซึมน้ำและขยายตัวของผนังเซลล์ (Cleland, 2010) ในทางตรงข้ามกันเมื่อมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน (BA) ร่วมด้วยจะทำให้มีสีเขียวปรากฏขึ้นบนแคลลัสและแคลลัสมีลักษณะจับกันแน่น เนื่องจากไซโตไคนินมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสะสมคลอโรฟิลด์ในเซลล์พืชและการรวมตัวกันของเซลล์ (George. *et al.*, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

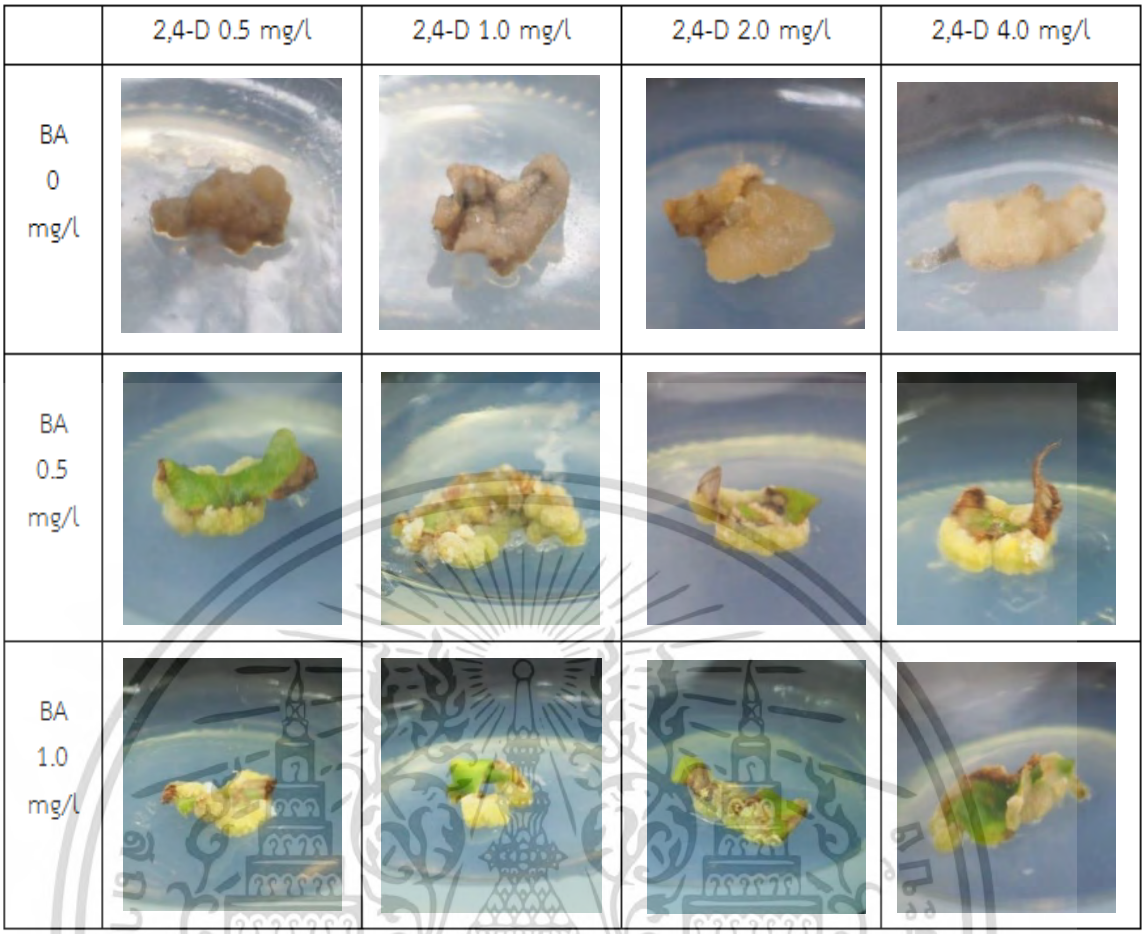
อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (วัน)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (%)	ลักษณะของแคลลัส
2,4-D	BA			
-	-	-	0	ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
0.5	-	7-14	80	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณน้อย
1.0	-	7-14	93	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณปานกลาง
2.0	-	7-14	93	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณมาก
4.0	-	14-21	80	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณปานกลาง
0.5	0.5	7-14	100	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณปานกลาง
1.0	0.5	7-14	100	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณมาก
2.0	0.5	7-14	100	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณปานกลาง
4.0	0.5	7-14	100	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณปานกลาง
0.5	1.0	14-21	93	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณปานกลาง
1.0	1.0	14-21	93	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณน้อย
2.0	1.0	14-21	93	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณน้อย
4.0	1.0	14-21	73	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณน้อย

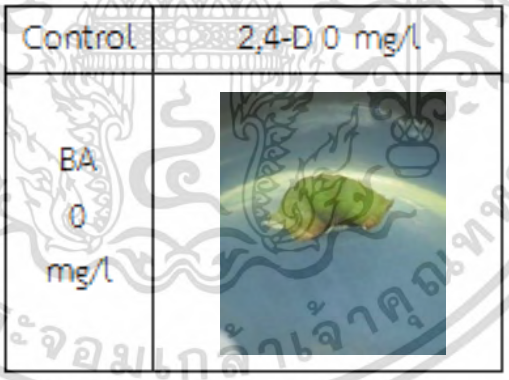
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (วัน)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (%)	ลักษณะของแคลลัส
NAA	BA			
-	-	-	0	ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
0.5	-	7-14	100	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณน้อย
1.0	-	7-14	53	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณปานกลาง
2.0	-	14-21	73	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณปานกลาง
4.0	-	14-21	80	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันไม่แน่น ปริมาณน้อย
0.5	0.5	14-21	73	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันแน่น ปริมาณน้อย
1.0	0.5	14-21	100	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณน้อย
2.0	0.5	14-21	93	เกิดแคลลัสสีครีม จับกันแน่น ปริมาณปานกลาง
4.0	0.5	14-21	60	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณปานกลาง
0.5	1.0	21-28	80	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณปานกลาง
1.0	1.0	21-28	73	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณน้อย
2.0	1.0	21-28	100	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมานปานกลาง
4.0	1.0	21-28	100	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน จับกันแน่น ปริมาณน้อย

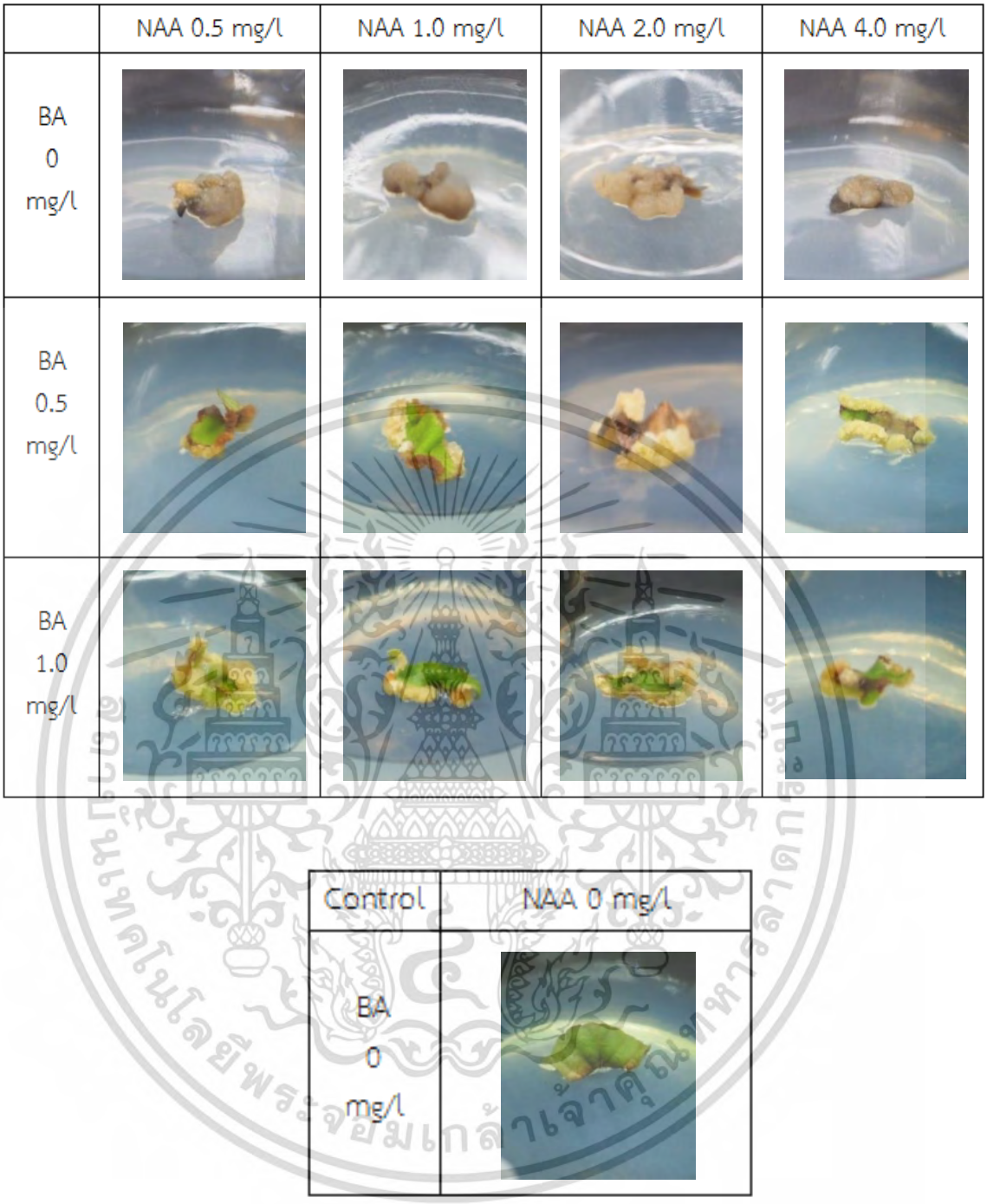
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





รูปที่ 4.1 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและลักษณะของใบที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และลักษณะของใบที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบของต้นสตรอว์เบอร์รี

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยนำแคลลัสมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.02 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสของชิ้นส่วนใบลงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส 49-56 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดออร์แกโนเจเนซิส 73 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสมีสีเขียวอ่อน มีจำนวนต้นใหม่ที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 5.08 ต้นต่อชิ้นแคลลัส (รูปที่ 4.4) ซึ่งการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินร่วมกับไซโตไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสมเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้ออร์แกโนเจเนซิสของแคลลัส (George. *et al.,* 2008) นอกจากนี้พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA แคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่จะมีสีครีมไปจนถึงสีน้ำตาล (รูปที่ 4.3) ซึ่งตรงข้ามกับอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่แคลลัสส่วนใหญ่จะเป็นสีเขียวหรือสีครีมและมีสีแดงเกิดขึ้นแทรกบ้างเล็กน้อย โดยสีแดงของแอนโธไซยานินที่พบในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับความเครียดของพืช (Chalker-Scott, 1999) และจากการทดลองยังพบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีกว่า BA โดยในสูตรอาหารที่ดีที่สุดของการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจาก TDZ จะสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้เฉลี่ย 5.08 ต้นต่อชิ้นแคลลัส แต่ในสูตรอาการที่ดีที่สุดจาก BA จะสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่เฉลี่ยได้น้อยกว่าโดยเกิดเพียง 2.50 ต้นต่อชิ้นแคลลัส

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cappelletti. *et al*. (2016) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Sveva และ Calypso ลงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ที่ 67 และ 78 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Diengngan and Murthy (2014) ที่พบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA Thomas (2003) กล่าวว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินตัวอื่น เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เป็นอนุพันธ์ของฟีนิลยูเรีย ที่มีบทบาทในการทำหน้าที่แทนไซโตไคนินควบคู่กับการออกฤทธิ์เหมือนออกซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)			**เวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส (วัน)**	**เปอร์เซ็นต์การเกิดออร์แกโนเจเนซิส (%)**	**จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส (ค่าเฉลี่ย ± SD)**	**ลักษณะของแคลลัส**
BA	**2,4-D**	**NAA**				
-	-	-	-	0	0c	แคลลัสมีสีน้ำตาล
1.0	0.02	-	-	0	0c	แคลลัสมีสีน้ำตาล
2.0	0.02	-	-	0	0c	แคลลัสมีสีน้ำตาล
3.0	0.02	-	-	0	0c	แคลลัสมีสีน้ำตาล
1.0	0.2	-	49-56	33	1.60±0.54ab	แคลลัสมีสีครีม
2.0	0.2	-	49-56	20	2.00±0.81ab	แคลลัสมีสีครีม
3.0	0.2	-	49-56	20	2.50±0.57a	แคลลัสมีสีน้ำตาล
1.0	-	0.1	49-56	13	1.00b	แคลลัสมีครีมและสีแดง
2.0	-	0.1	-	0	0c	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน
3.0	-	0.1	49-56	20	2.00±0.81ab	แคลลัสมีสีครีม
1.0	-	0.5	49-56	40	1.83±0.75ab	แคลลัสมีสีครีม
2.0	-	0.5	49-56	53	1.87±0.83ab	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน
3.0	-	0.5	49-56	40	2.33±0.81a	แคลลัสมีสีครีม

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

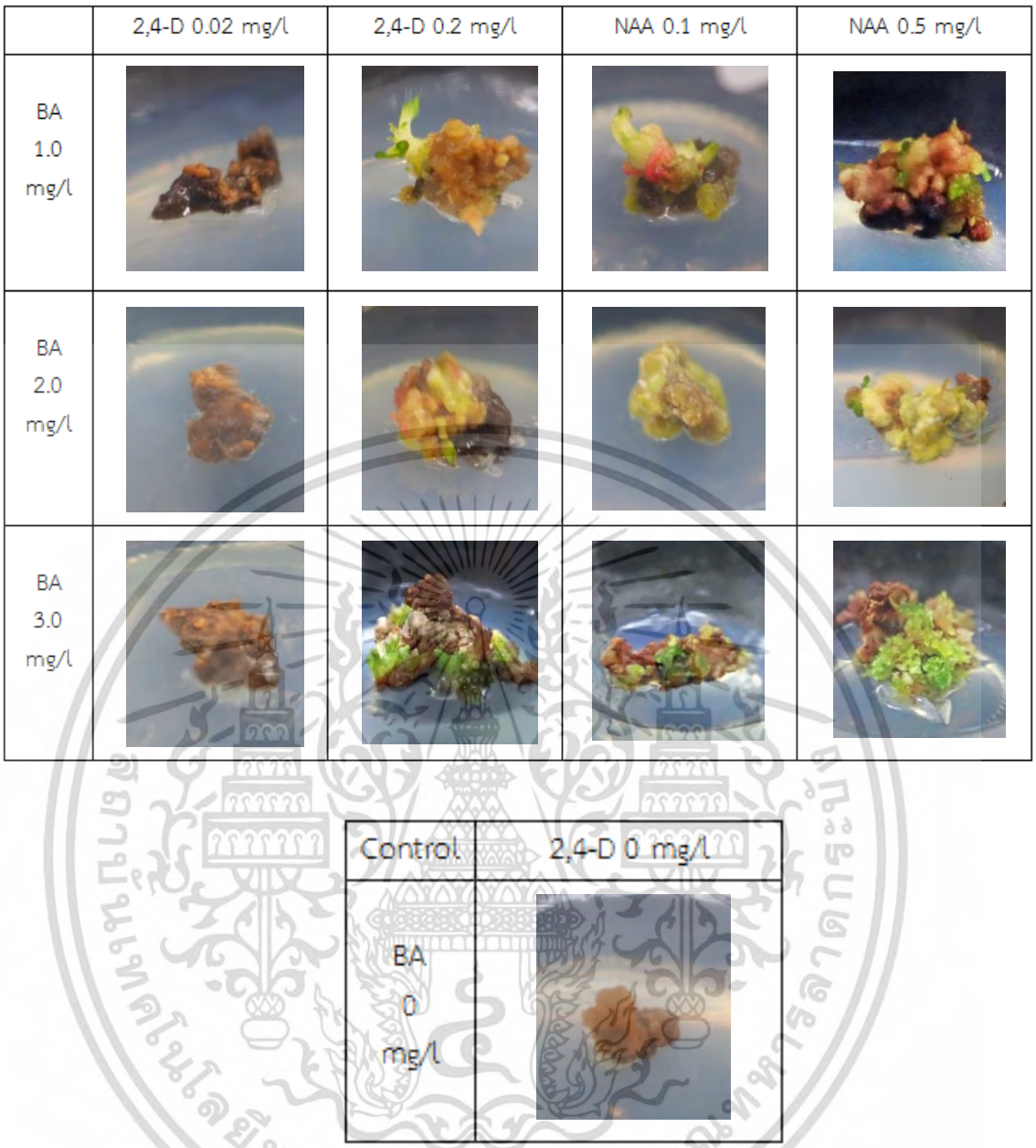
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)			เวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส (วัน)	เปอร์เซ็นต์การเกิดออร์แกโนเจเนซิส (%)	จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของแคลลัส
TDZ	2,4-D	NAA				
-	-	-	-	0	0e	แคลลัสมีสีน้ำตาล
0.5	0.02	-	49-56	13	4.50±0.70ab	แคลลัสมีสีน้ำตาล
1.0	0.02	-	49-56	53	3.75±0.46bc	แคลลัสมีสีครีมและสีแดง
1.5	0.02	-	49-56	40	3.66±0.81c	แคลลัสมีสีน้ำตาล
0.5	0.2	-	49-56	40	3.83±0.75abc	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน
1.0	0.2	-	49-56	73	5.08±0.66a	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน
1.5	0.2	-	49-56	33	4.20±2.04abc	แคลลัสมีสีเขียวอ่อนและสีแดง
0.5	-	0.1	-	0	0e	แคลลัสมีสีครีม
1.0	-	0.1	49-56	13	2.50±0.70cd	แคลลัสมีสีเขียวอ่อนและสีแดง
1.5	-	0.1	-	0	0e	แคลลัสมีสีครีมและสีแดง
0.5	-	0.5	49-56	13	1.50±0.70d	แคลลัสมีสีเขียวอ่อนและสีแดง
1.0	-	0.5	49-56	20	1.33±0.57d	แคลลัสมีสีเขียวอ่อนและสีแดง
1.5	-	0.5	49-56	20	1.66±0.57d	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน

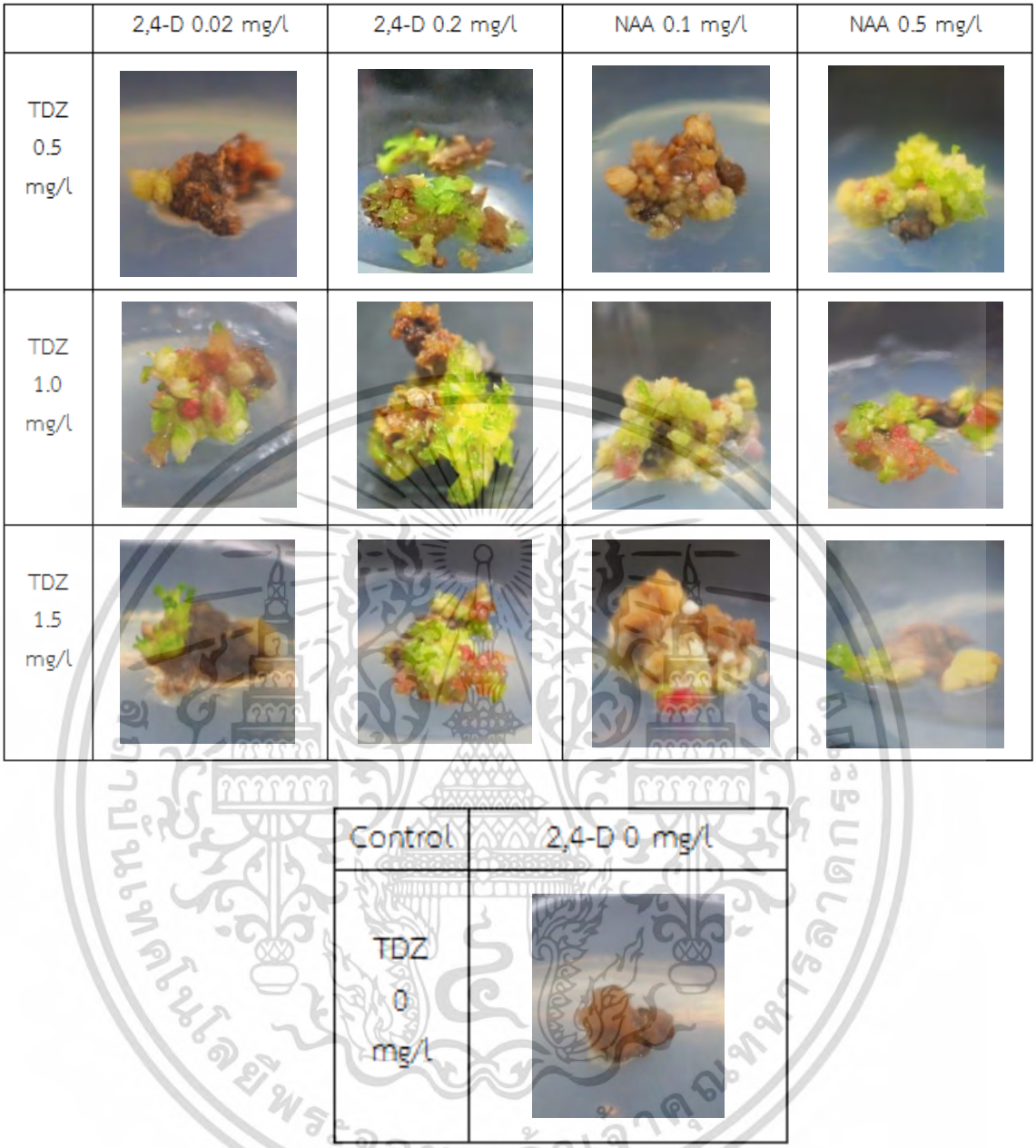
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA และลักษณะของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและลักษณะของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เพาะเลียงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่เหมาะสมต่อการเจริญของยอดขนาดเล็ก (micro shoot)

4.1.3.1 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่เหมาะสมต่อการยืดของยอดขนาดเล็กบนอาหารแข็ง MS

นำยอดขนาดเล็ก (micro shoot) มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า ยอดขนาดเล็กเกิดการยืดได้ดีที่สุดบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยต้นจะมีความสูงเฉลี่ย 1.89 เซนติเมตร ได้จำนวนต้นเฉลี่ย 8.33 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยต้นจะมีความสูงเฉลี่ย 0.96 เซนติเมตร ได้จำนวนต้นเฉลี่ย 8.33 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 30 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5) และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ในอาหารเพิ่มมากขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากลดลง โดยยอดขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเพียง 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่มีรากเกิดขึ้นทุกการทดลอง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และลักษณะต้นที่เกิดขึ้นมีอาการฉ่ำน้ำ (Hyperhydricity) ในทุกซ้ำของการทดลอง

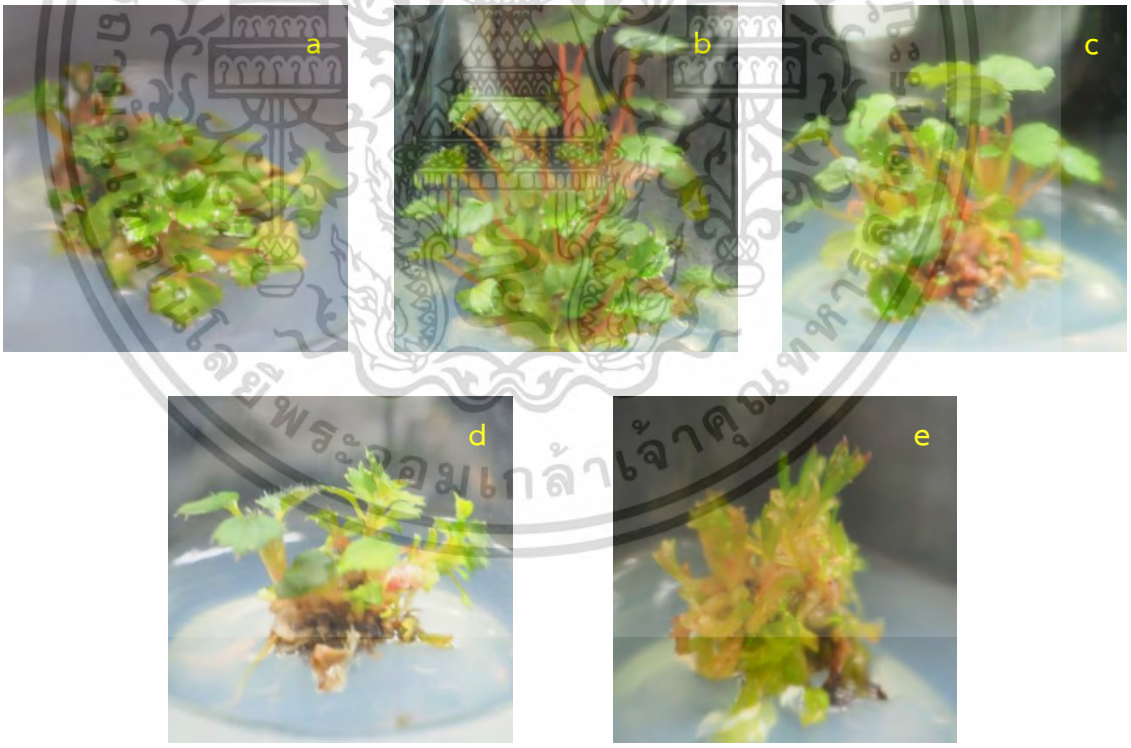
จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohamed. *et al.* (2016) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนไหลบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้มากที่สุด คือ 5.15 ต้นต่อชิ้นส่วนพืช เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Litwinczuk. *et al*. (2009) ที่พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของสตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์ Elsanta ลงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดจำนวนต้นใหม่เฉลี่ยมากที่สุด คือ 4.5 ต้นต่อชิ้นส่วนพืช และในอาหารที่มี GA_3 ความเข้มข้นสูงจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากลดลงจนเกือบจะไม่เกิดรากเนื่องจาก GA_3 มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดรากของพืช งานวิจัยของ Brian (1959) พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ในช่วง 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถป้องกันการเกิดรากของชิ้นส่วนพืชที่ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารที่ประกอบด้วยออกซิน นอกจากความสามารถในการยับยั้งการเกิดรากแล้ว มีรายงานว่า GA_3 ที่ความเข้มข้นสูงยังสามารถกระตุ้นให้ต้นพืชเกิดอาการฉ่ำน้ำได้ (Hiti Bandaralage. *et al.,* 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ต่อการเจริญเติบโตของยอดขนาดเล็กบนอาหารแข็ง MS เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความสูงต่อต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	จำนวนต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง (ค่าเฉลี่ย ± SD)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก (%)
0	0.62±0.04c	5.33±1.52b	40
0.1	1.89±0.07a	8.33±1.52a	40
0.5	0.96±0.08b	8.33±1.52a	30
1.0	0.64±0.03c	2.66±0.57c	20
2.0	0.66±0.05c	5.66±1.15b	0

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test



รูปที่ 4.5 ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงออร์แกโนเจนิกแคลลัสบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รูป a-e ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3.2 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS

นำยอดขนาดเล็กมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า ยอดขนาดเล็กที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถเกิดต้นใหม่ได้มากที่สุด 43.6 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.6) แต่ต้นที่ได้จะมีขนาดเล็กที่สุด (0.59 เซนติเมตร) และดัชนีการเจริญเติบโตเฉลี่ยน้อยที่สุด (14.06) ส่วนการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดต้นที่สูงที่สุดคือ 1.23 เซนติเมตร และมีดัชนีการเจริญเติบโตมากที่สุดที่ 25.62

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Valles and Boxus (1987) ที่พบว่า การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ในช่วงความเข้มข้นต่ำ (0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบ (*Rosa hybrida* L.) ได้ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Litwinczuk and Zubel (2005) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนต้น แต่หากมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้นสูงจนเกินไปในอาหารเพาะเลี้ยง จะกลายเป็นการกระตุ้นให้เกิดการยืดของต้นแทน (Zatyko. *et al*., 1989) นอกจากนี้ มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารเหลวสามารถเพิ่มอัตราการเกิดต้นใหม่ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหลายเท่าและต้นที่ได้จะมีขนาดสม่ำเสมอ (Preil, 2005) ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะให้อัตราการเกิดต้นใหม่ที่สูงกว่า แต่ก็ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีความเสี่ยงต่อการเกิดต้นที่มีภาวะฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ซึ่งต้นที่ได้ในการทดลองนี้เกิดภาวะฉ่ำน้ำทุกต้น จึงต้องนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งเพื่อทำการรักษาอาการฉ่ำน้ำ

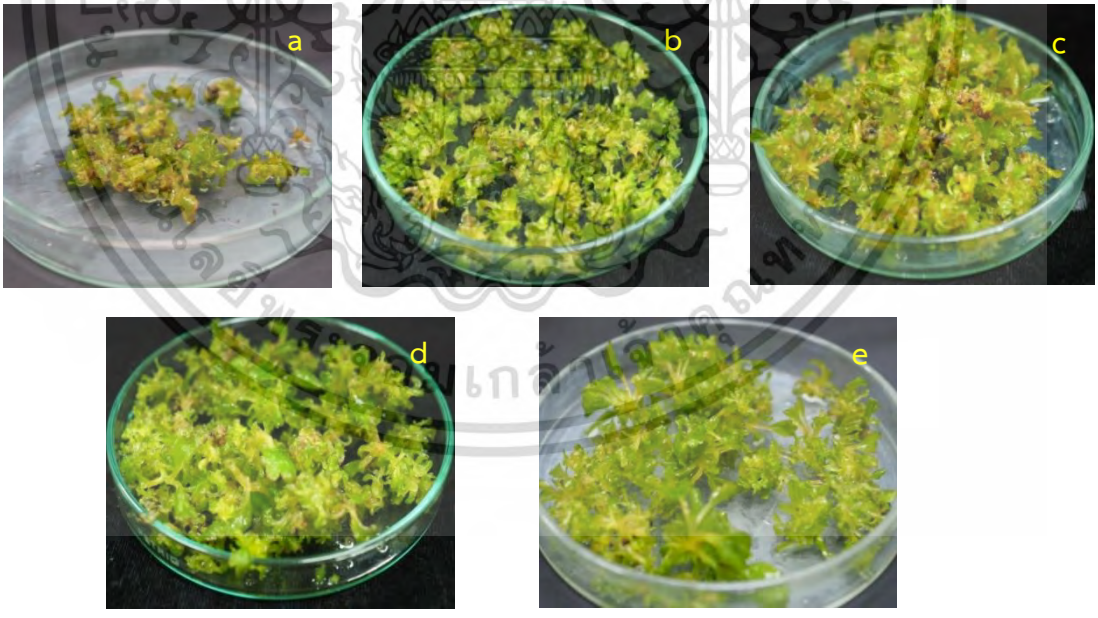
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ต่อการเจริญเติบโตของยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความสูงต่อต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	จำนวนต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ดัชนีการเจริญเติบโต (ค่าเฉลี่ย ± SD)
0	0.47±0.03d	15.33±1.52d	6.58±0.80c
0.1	0.59±0.08cd	43.66±1.15a	14.06±1.61b
0.5	0.73±0.07bc	32.66±1.52c	15.29±1.62b
1.0	0.81±0.09b	34.33±3.05c	23.67±2.44a
2.0	1.23±0.08a	38.00±3.00b	25.62±2.28a

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

2. ดัชนีการเจริญเติบโต $= \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$



รูปที่ 4.6 ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร รูป a-e ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ศึกษาความเข้มข้นของผงวุ้นและน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการรักษาอาการฉ่ำน้ำของปลายยอดสตรอว์เบอร์รีที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

นำปลายยอดของสตรอว์เบอร์รีที่มีอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ที่ได้จากการทดลอง 4.1.3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ประกอบด้วยผงวุ้นความเข้มข้น 8 10 12 และ 14 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 60 90 และ 120 กรัมตอลิตร จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าอาหาร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้นความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร สามารถรักษาอาการฉ่ำน้ำในต้นพืชได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ปริมาณความชื้นต่อต้น 90 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 53 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.7) และเมื่อทำการเปรียบเทียบอาหารที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส พบว่า จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงและในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพียง 0-13 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์ปริมาณความชื้นของต้นพืชที่จะลดลง เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของผงวุ้นและน้ำตาลซูโครสในอาหาร นอกจากนี้พบว่าอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดรากที่สูงที่สุด เมื่อทำการเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นอื่นๆ

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Casanova. *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของผงวุ้นต่อต้นที่มีการอาการฉ่ำน้ำของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาร์เนชั่น พบว่า การใช้ผงวุ้นที่ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร จะสามารถรักษาต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำให้กลับมาเป็นต้นปกติได้ดีที่สุด และงานวิจัยของ Ayub. *et al*. (2019) ที่ทำการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของแบล็คเบอร์รี พบว่า เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสลงในอาหารจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากลดลงและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดจากน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงในอาหาร จะทำให้ค่าชลศักย์ (water potential) ลดลง ซึ่งจะทำให้ต้นพืชดูดซึมน้ำและธาตุอาหารลดลงจนต้นพืชตายใน นอกจากการเพิ่มผงวุ้นเข้าไปในอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว Bahmani. *et al*. 2009 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงก็สามารถช่วยลดอาการฉ่ำน้ำของต้นพืชได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 อิทธิพลของความเข้มข้นของผงวุ้นและน้ำตาลต่อการรักษาอาการฉ่ำน้ำของปลายยอดสตรอว์เบอร์รี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

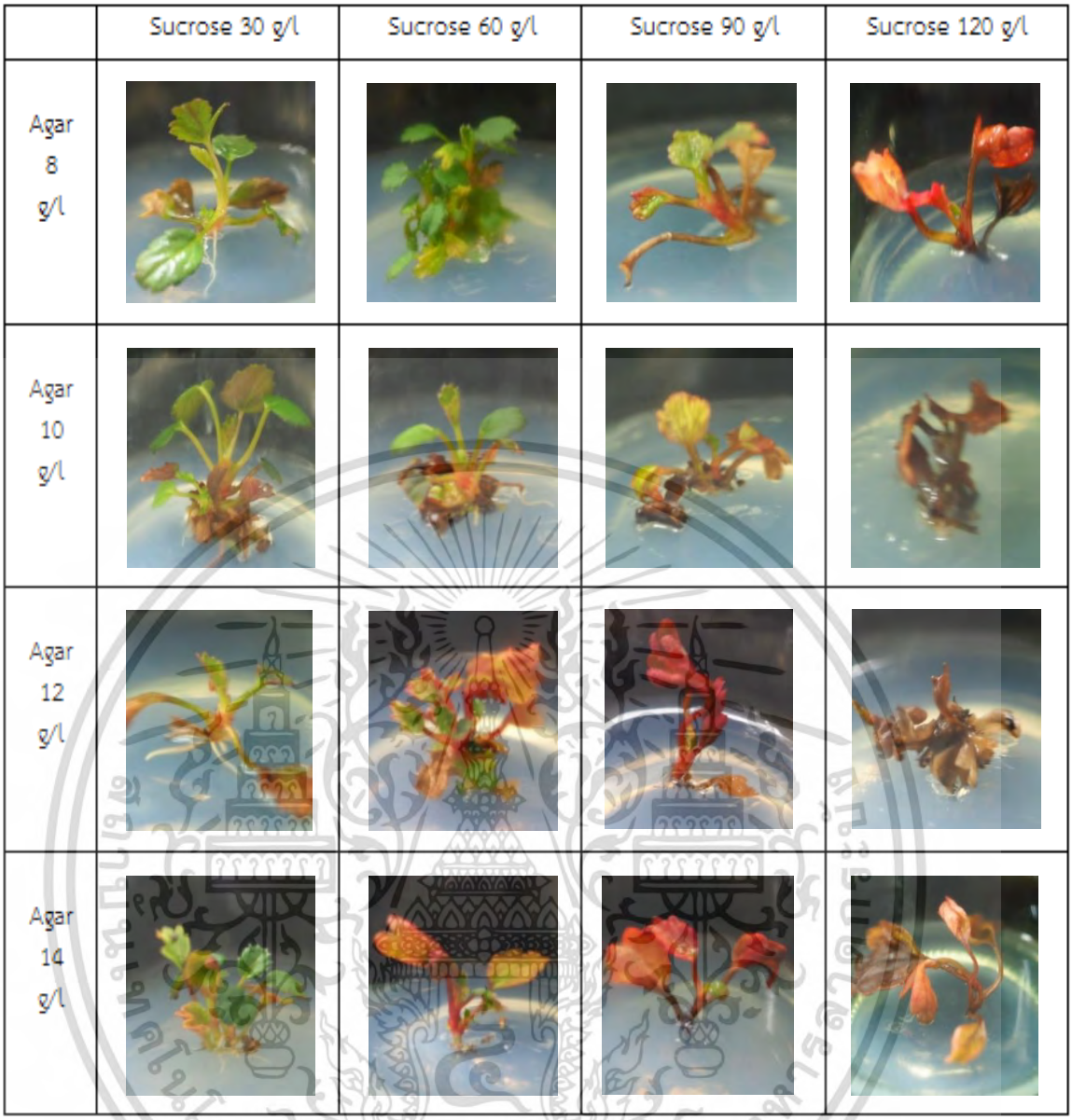
อาหาร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลและผงวุ้น (กรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์ปริมาณความชื้นต่อต้น	น้ำหนักสดต่อต้น (มิลลิกรัม) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	น้ำหนักแห้งต่อต้น (มิลลิกรัม) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
น้ำตาล	วุ้น					
30	8	100	90	347.00±7.19b	33.80±8.49ab	53
60	8	53	83	186.96±8.80bc	38.83±2.05ab	0
90	8	20	79	588.53±7.38a	17.70±4.71bc	0
120	8	13	70	113.16±2.18bc	34.93±1.44ab	0
30	10	86	88	214.53±8.58bc	22.30±2.11bc	53
60	10	53	75	121.46±4.55bc	27.93±4.28ab	46
90	10	30	74	121.43±5.48bc	30.63±1.12ab	0
120	10	0	0	0c	0c	0
30	12	100	87	211.90±9.76bc	27.30±2.43ab	20
60	12	86	75	114.36±3.36bc	31.06±1.03ab	0
90	12	46	67	110.80±4.24bc	35.13±1.13ab	0
120	12	0	0	0c	0c	0
30	14	100	82	169.23±4.15bc	30.00±2.47ab	20
60	14	66	68	92.63±5.03bc	22.56±1.22bc	0
90	14	20	67	144.96±6.65bc	46.06±1.97a	0
120	14	0	0	0c	0c	0

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

2. ปริมาณความชื้น = $\frac{m_1 - m_2}{m_1}$ X 100

โดยที่ m_1 คือ น้ำหนักสดของต้นพืชก่อนอบ m_2 คือ น้ำหนักแห้งของต้นพืชหลังอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นที่มีอาการฉ่ำน้ำบนอาหาร MS ที่มีประกอบด้วยน้ำตาลร่วมกับ ผงวุ้น ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก

นำต้นสตรอว์เบอร์รีที่รักษาอาการฉ่ำน้ำจากการทดลองก่อนหน้า ขนาด 3-4 เซนติเมตร มาชักนำให้เกิดรากโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS โดยทำการเปรียบเทียบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการชักนำให้เกิดราก 7-14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 13.12 ราก รากมีลักษณะยาวและบาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณโคนต้น (รูปที่ 4.8) เมื่อทำการเปรียบเทียบชิ้นส่วนปลายยอดสตรอว์เบอร์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย NAA และ IBA พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (2-3 สัปดาห์) จะใช้เวลาชักนำให้เกิดรากได้เร็วกว่า NAA (3-4 สัปดาห์) และรากที่เกิดขึ้นในอาหารทีประกอบด้วย NAA จะมีลักษณะ สั้น หนาและเกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น ส่วนรากที่เกิดขึ้นในอาหาร IBA จะมีลักษณะ บางและยาว

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ashrafuzzaman. *et al*. (2013) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยใช้เวลา 8-10 วัน เกิดรากจำนวน 6 ราก และมีความยาว 3.05 เซนติเมตร และงานวิจัยของ Chung and Ouyang (2020) ที่กล่าวว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA สามารถกระตุ้นอัตราการเกิดรากในต้นสตรอว์เบอร์รีที่เกิดจากออร์แกโนเจนิคแคลลัสได้ดีกว่า NAA เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Ghasemi. *et al.* (2015) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงต้นสตรอว์เบอร์รีบนอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA เป็นแหล่งของออกซินสามารถกระตุ้นให้เกิดรากได้ดีกว่า NAA โดยรากที่เกิดขึ้นใน IBA จะลักษณะยาวและจำนวนมากกว่าใน NAA นอกจากนี้ยังรายงานว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA จะกระตุ้นให้เกิดแคลลัสที่โคนของต้นและเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ปริมาณของแคลลัสจะเพิ่มขึ้นด้วย

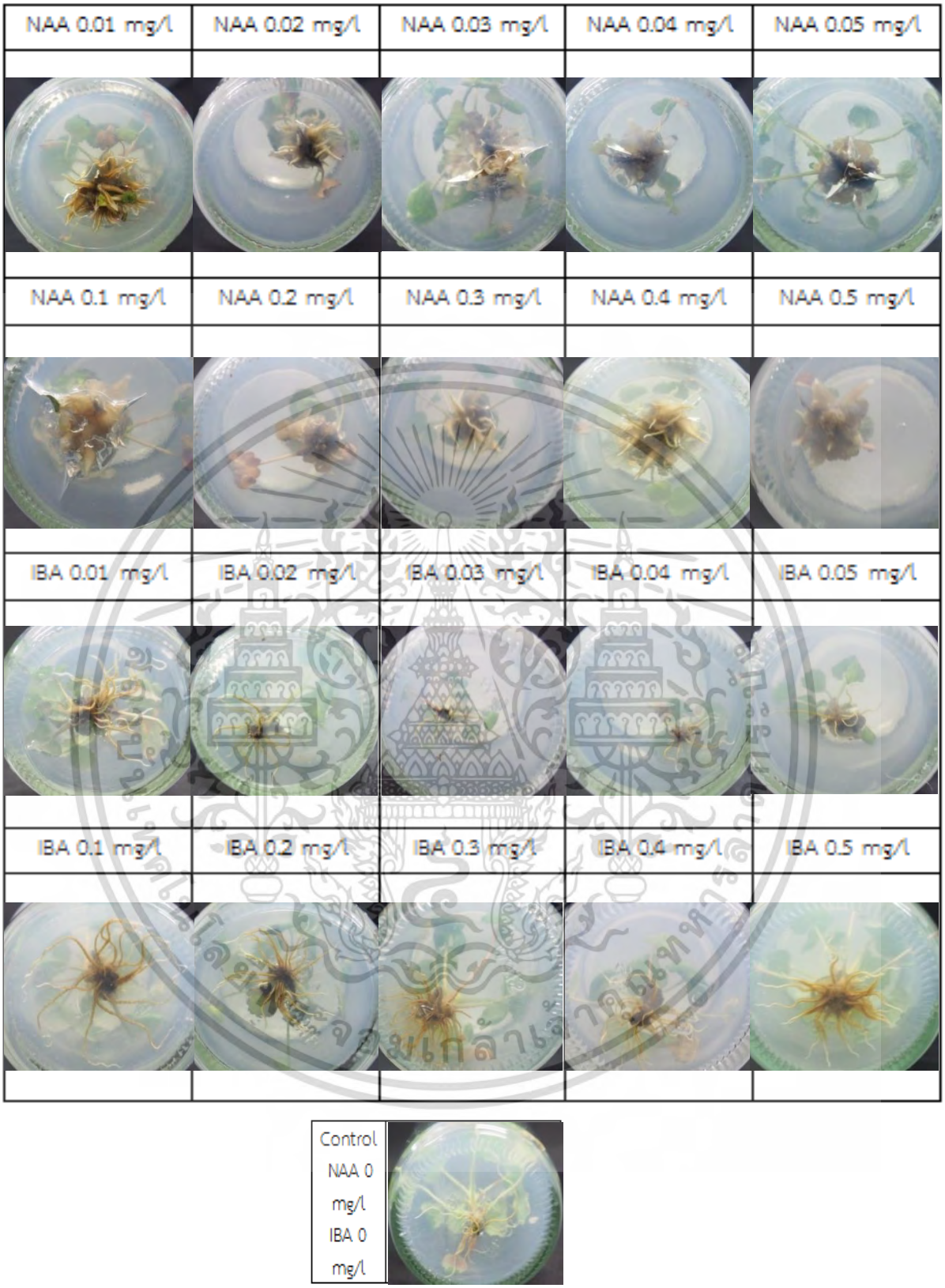
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดรากของชิ้นส่วนปลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์

อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	เวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดราก (วัน)	จำนวนรากต่อต้น (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะที่รากเกิดขึ้น
NAA	IBA				
0		100	21-28	9.53±1.77bc	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
0.01		100	14-21	10.20±1.57ab	รากสั้น หนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.02		93	21-28	8.92±1.09bc	รากสั้น บาง เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.03		100	21-28	6.00±0.83def	รากสั้น บาง เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.04		80	28-35	5.83±1.34ef	รากสั้น หนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.05		73	21-28	5.36±1.41ef	รากสั้น บาง เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.1		100	21-28	7.86±1.26cd	รากสั้น หนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.2		100	21-28	6.06±1.75de	รากสั้น หนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.3		93	21-28	6.28±1.00de	รากสั้น หนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.4		60	21-28	1.33±0.21h	รากสั้น บาง เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
0.5		100	21-28	2.06±0.64h	รากสั้น หนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น
	0.01	80	7-14	8.25±1.98cd	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.02	60	7-14	7.88±1.40cd	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.03	60	14-21	5.11±2.36efg	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.04	60	14-21	3.11±0.77g	รากสั้น หนา ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.05	53	14-21	5.25±1.37ef	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.1	100	7-14	7.76±1.62cde	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.2	100	7-14	9.33±1.34bc	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.3	93	14-21	9.21±2.32bc	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.4	100	14-21	10.06±1.38ab	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
	0.5	100	7-14	13.12±2.41a	รากยาว บาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ลักษณะรากของชิ้นส่วนปลายยอดสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและลักษณะของรากที่ได้จากชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การผลิตเมล็ดเทียมของสตรอว์เบอร์รีจากชิ้นส่วนยอด

4.2.1 ศึกษาประเภทและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด

นำต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาด 3-4 เซนติเมตร มาทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ทำการเปรียบเทียบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10 พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด 7-14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดหลายยอด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นเฉลี่ย 11.80 ต้น (รูปที่ 4.10) ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดรองลงมา คือ อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5-1.5 สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ใกล้เคียงกัน โดย BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด 7-14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดหลายยอด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นเฉลี่ย 7.66, 7.93 และ7.53 ต้น ตามลำดับ (รูปที่ 4.9) นอกจากนี้ พบว่า อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ เพียงอย่างเดียวสามารถชักให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีกว่าการใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ IBA และไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ และ IBA ทุกสูตรอาหาร แต่ในทางกลับกัน อาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA และ NAA ส่วนใหญ่มีแคลลัสเกิดขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ต้นพืชเจริญได้ช้าเนื่องจากสารอาหารถูกแบ่งไปให้กับก้อนแคลลัส (Haddani. et al., 2013)

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haddani. *et al.* (2013) ที่พบว่า อาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 90 เปอร์เซ็นต์ เกิดต้นเฉลี่ย 14.30 ต้น และงานวิจัยของ Diengngan and Murthy (2014) ที่พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของสตรอว์เบอร์รี่บนอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ จะสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะใช้เวลาเร็วที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ โดยใช้เวลาเฉลี่ย 8 วัน Debnath (2005) ได้รายงานว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินในอาหารเพียงอย่างเดียวจะสามารถกระตุ้นให้เกิดต้นใหม่ของสตรอว์เบอร์รีได้ดีกว่าการใช้ควบคู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		**เวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอด (วัน)**	**เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดหลายยอด (%)**	**จำนวนต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง (ค่าเฉลี่ย ± SD)**	**ลักษณะที่เกิดขึ้น**
BA	NAA				
-	-	-	0	1d	ไม่เกิดแคลลัส เกิดราก
0.5	-	7-14	100	7.66±3.65a	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.0	-	7-14	100	7.93±2.91a	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	-	7-14	100	7.53±2.94a	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
-	0.1	-	0	1.00d	เกิดแคลลัส เกิดราก
-	0.5	-	0	1.00d	เกิดแคลลัส เกิดราก
-	1.0	-	0	1.00d	เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
0.5	0.1	14-21	80	3.20±1.42c	เกิดแคลลัส เกิดราก
0.5	0.5	14-21	40	2.20±1.69cd	เกิดแคลลัส เกิดราก
0.5	1.0	-	0	1.0d	เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.0	0.1	14-21	73	3.33±1.87c	ไม่เกิดแคลลัส เกิดราก
1.0	0.5	21-28	40	2.06±1.43cd	เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.0	1.0	-	0	1.0d	เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	0.1	14-21	93	5.60±1.72b	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	0.5	-	0	1.0d	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	1.0	-	0	1.0d	เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

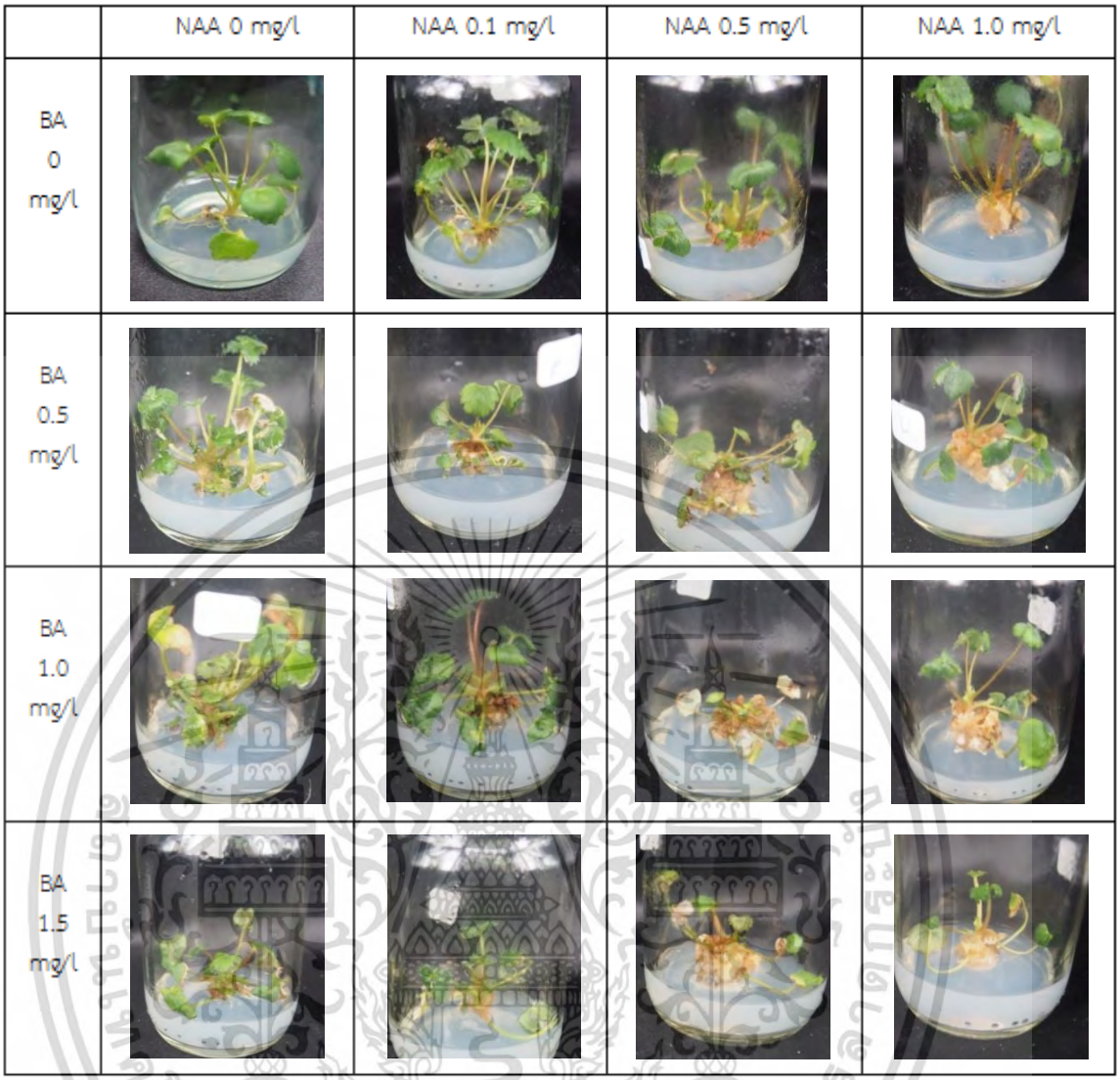
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด (วัน)	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดหลายยอด (%)	จำนวนยอดต่อขวดเพาะเลี้ยง (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะที่เกิดขึ้น
TDZ	IBA				
-	-	-	0	1.0e	ไม่เกิดแคลลัส เกิดราก
0.5	-	7-14	100	11.80±3.98a	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.0	-	7-14	93	3.40±1.24b	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	-	7-14	93	2.60±1.18bc	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
-	0.1	-	0	1.0e	ไม่เกิดแคลลัส เกิดราก
-	0.5	-	0	1.0e	ไม่เกิดแคลลัส เกิดราก
-	1.0	-	0	1.0e	ไม่เกิดแคลลัส เกิดราก
0.5	0.1	14-21	100	3.13±1.35bc	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
0.5	0.5	7-14	93	2.93±1.09bc	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
0.5	1.0	14-21	93	2.67±0.97bc	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.0	0.1	14-21	100	3.20±1.08bc	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.0	0.5	14-21	93	2.93±1.33bc	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.0	1.0	14-21	80	2.00±0.65cde	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	0.1	7-14	100	2.66±0.97bc	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	0.5	21-28	73	2.13±0.91cde	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก
1.5	1.0	14-21	40	1.53±0.74de	ไม่เกิดแคลลัส ไม่เกิดราก

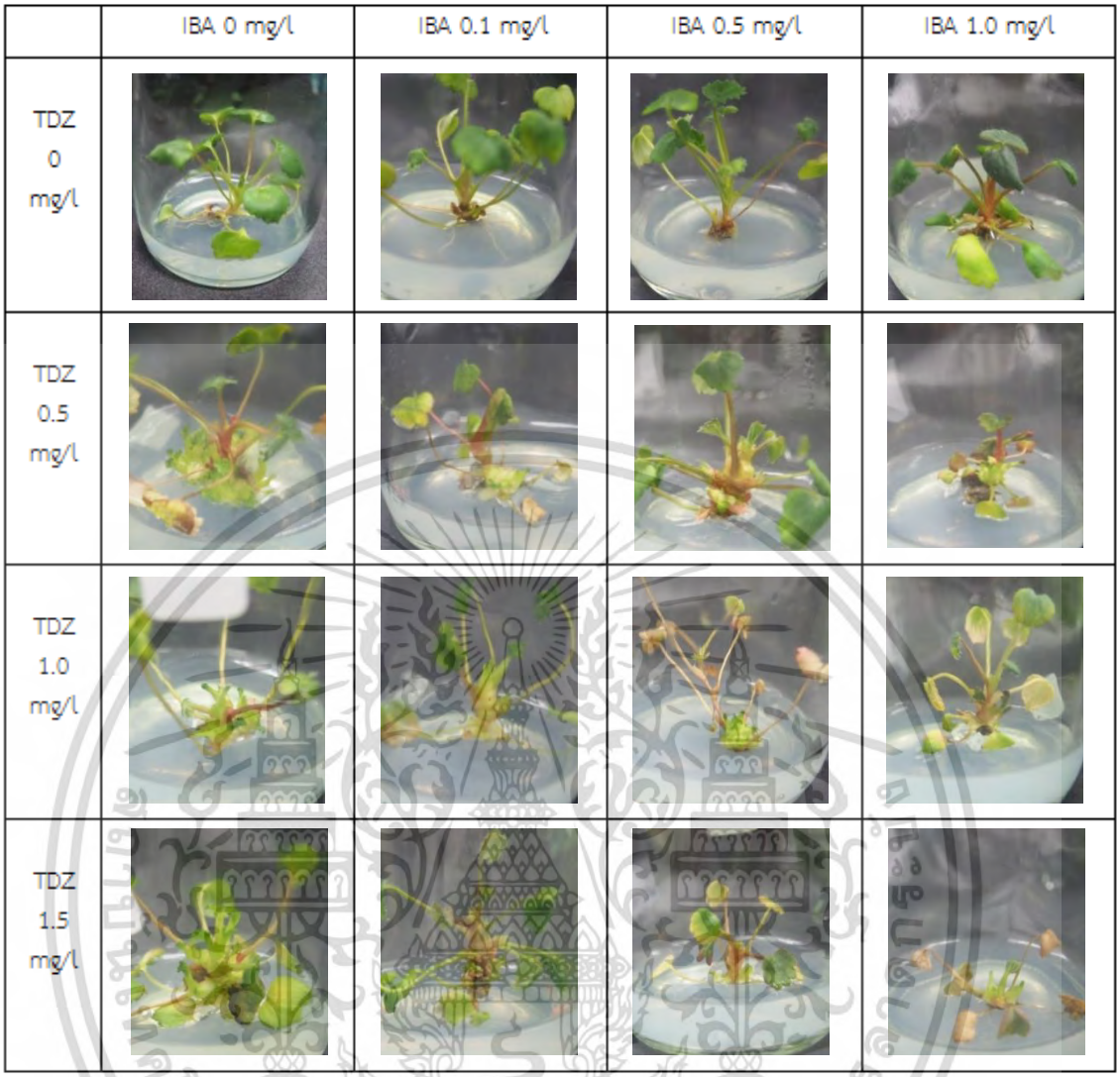
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ IBA หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตเมล็ดเทียม

ทำการศึกษาความเข้มข้นของอัลจีเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตเมล็ดเทียม โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาใช้ผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้โซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.11 และ 4.12 พบว่า การใช้โซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร จะทำให้เมล็ดเทียมที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นทรงกลมมากที่สุด โดยมีค่าความกลมเฉลี่ยที่ 1.02 เนื่องจากค่าความกลมคำนวณหาจากอัตราส่วนด้านยาวต่อด้านสั้น หากค่าความกลมมีค่าเข้าใกล้ 1 มากเท่าไหร่ แสดงว่าเมล็ดเทียมมีความกลมมาก เนื่องจากขนาดของด้านสั้นและยาวมีความใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้นอื่นที่นำมาใช้ห่อหุ้มชิ้นส่วนปลายยอด พบว่า เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตเป็น 3-4 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร จะทำให้เมล็ดเทียมเป็นทรงกลมมากกว่าการใช้โซเดียมอัลจีเนต 1-2 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตรในการห่อหุ้ม เช่นเดียวกันกับค่าความแข็งของเมล็ดเทียมที่พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตที่ใช้ในการห่อหุ้มจะทำให้ค่าความแข็งของเมล็ดเทียมมากขึ้นด้วย โดยเมื่อใช้โซเดียมอัลจีเนต 4 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร ในการห่อหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดจะทำให้เมล็ดเทียมมีค่าความแข็งเฉลี่ยมากที่สุดที่ 296.60 นิวตัน (รูปที่ 4.12) เนื่องจากเมล็ดเทียมที่เกิดจากการใช้โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร ไม่สามารถฟอร์มตัวเป็นทรงกลมได้ (รูปที่ 4.11) จึงไม่ได้นำไปทำการเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร MS เพราะว่าไม่ใช่รูปทรงของเมล็ดเทียมที่ต้องการ และเมื่อนำเมล็ดเทียมที่ใช้โซเดียมอัลจีเนต 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า เมล็ดเทียมที่ใช้โซเดียมอัลจีเนต 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกยอดสูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลา 7-14 วันในการงอกยอด และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตเป็น 4 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร จะทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเทียมลดลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตจะทำให้ผิวของเมล็ดเทียมมีความแข็งมากขึ้นและส่งผลให้ต้นพืชไม่สามารถแทงยอดทะลุออกมานอกเมล็ดเทียมได้และตายลงในที่สุด

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัย Sarmah. *et al.* (2010) ที่รายงานว่าเมล็ดเทียมของกล้วยไม้ (*Vanda coerulea* Grifft) ที่ใช้โซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็น Gelling agent จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดคือ 94.9 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลา 7 วันในการงอก เช่นเดียวกันกับงานวิจัยเมล็ดเทียมอีกหลายงานที่พบว่า โซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการผลิตเมล็ดเทียม (Ahmad and Anis, 2010; Hung and Trueman, 2011; Tabassum. *et al*., 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

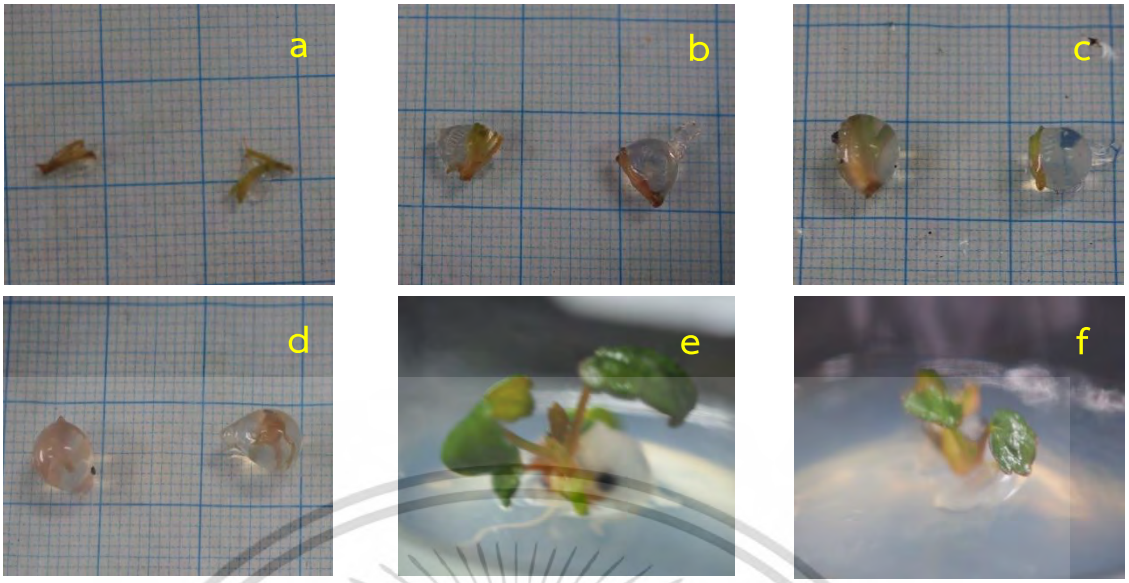
ตารางที่ 4.11 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่อความกลมและความแข็งของเมล็ดเทียม

ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนต (%)	ความยาวของด้านยาว (ค่าเฉลี่ย ± SD) (มิลลิเมตร)	ความยาวของด้านสั้น (ค่าเฉลี่ย ± SD) (มิลลิเมตร)	ความกลมของเมล็ดเทียม (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ค่าความแข็ง (นิวตัน) (ค่าเฉลี่ย ± SD)
1	6.40±1.20	3.55±0.56	1.84±0.43	54.78±15.72
2	6.74±1.49	4.93±1.14	1.42±0.44	104.67±8.62
3	5.82±0.58	5.69±0.60	1.02±0.01	137.39±18.87
4	6.80±1.06	6.17±1.02	1.10±0.08	296.60±30.49

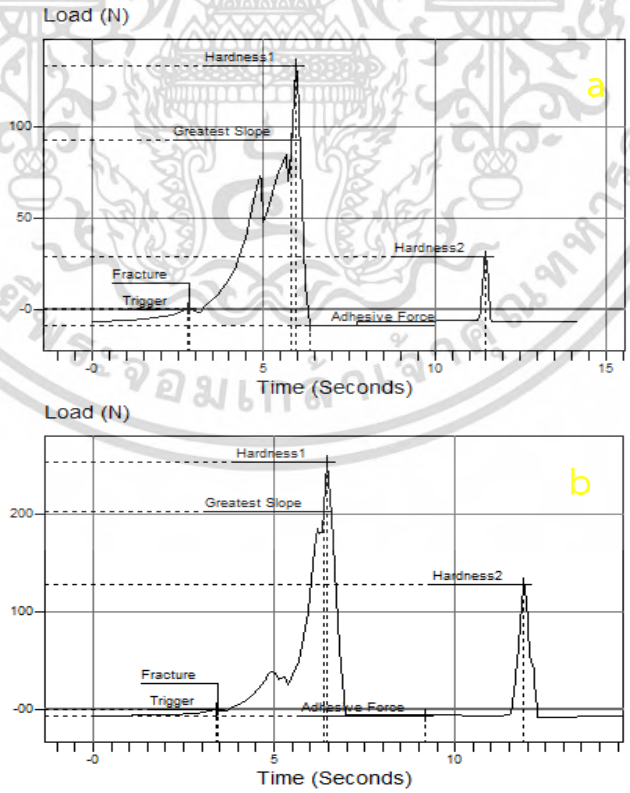
ตารางที่ 4.12 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนต (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ดเทียม	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเทียม	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	ลักษณะที่เกิดขึ้นหลังจากครบระยะเวลาเพาะเลี้ยง
MS	1	-	-	-	เมล็ดเทียมไม่เป็นทรงกลม
	2	-	-	-	เมล็ดเทียมไม่เป็นทรงกลม
	3	7-14	100	46	ต้นอ่อนทุกต้นงอกออกจากเมล็ด มีรากเกิดขึ้นบางต้น
	4	7-14	53	33	ต้นอ่อนบางต้นงอกออกจากเมล็ด แต่เมล็ดบางส่วนไม่เกิดการงอก มีรากเกิดขึ้นเพียงบ้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่อลักษณะของเมล็ดเทียมและการงอกของเมล็ดเทียม รูป a ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป b ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป c ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป d ลักษณะของเมล็ดเทียมที่ได้จากโซเดียมอัลจีเนต 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร รูป e การงอกของเมล็ดเทียมที่มีโซเดียมอัลจีเนต 3 เปอร์เซ็นต์ รูป f การงอกของเมล็ดเทียมที่มีโซเดียมอัลจีเนต 4 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.12 ค่าความแข็งที่วัดโดยใช้เครื่อง Texture Analyzer ของเมล็ดเทียมที่ใช้โซเดียมอัลจีเนต 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรในการผลิตเมล็ดเทียม รูป a และ b ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม

ทำการผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตที่ 3 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร และนำเมล็ดเทียมที่ได้มาทำการศึกษาหาความเข้มข้นของอาหาร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหาร MS 1/2MS 1/4MS และ 1/8MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่า อาหาร 1/4MS สามารถชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียมได้ดีที่สุด โดยใช้เวลา 4-5 วัน ในการชักนำให้เกิดการงอก มีเปอร์เซ็นต์การงอกของยอด 100 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 90 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 5.8 ราก รากมีลักษณะยาวและบาง ไม่เพียงแต่เปอร์เซ็นต์การงอกที่เพิ่มขึ้น แต่บนอาหาร 1/4MS ยังสามารถชักนำให้เกิดความยาวและจำนวนรากสูงที่สุด นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่าเมื่อทำการลดความเข้มข้นของอาหาร MS ลงจะเกิดสีแดงขึ้นบนก้านใบของต้นสตรอว์เบอร์รี และสีแดงจะเข้มมากขึ้น เมื่อลดความเข้มข้นของอาหาร MS (รูปที่ 4.13) ซึ่งเมล็ดเทียมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/8 MS ก้านใบของต้นสตรอว์เบอร์รีที่งอกออกจากเมล็ดเทียมจะมีสีแดงเข้มและเห็นได้ชัดกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ความเข้มข้นอื่น ซึ่งเกิดจากความเครียดของต้นพืชที่เกิดขึ้นในสภาวะการเพาะเลี้ยงจึงทำให้เกิดการสะสมของแอนโธไซยานิน (Chalker-Scott, 1999)

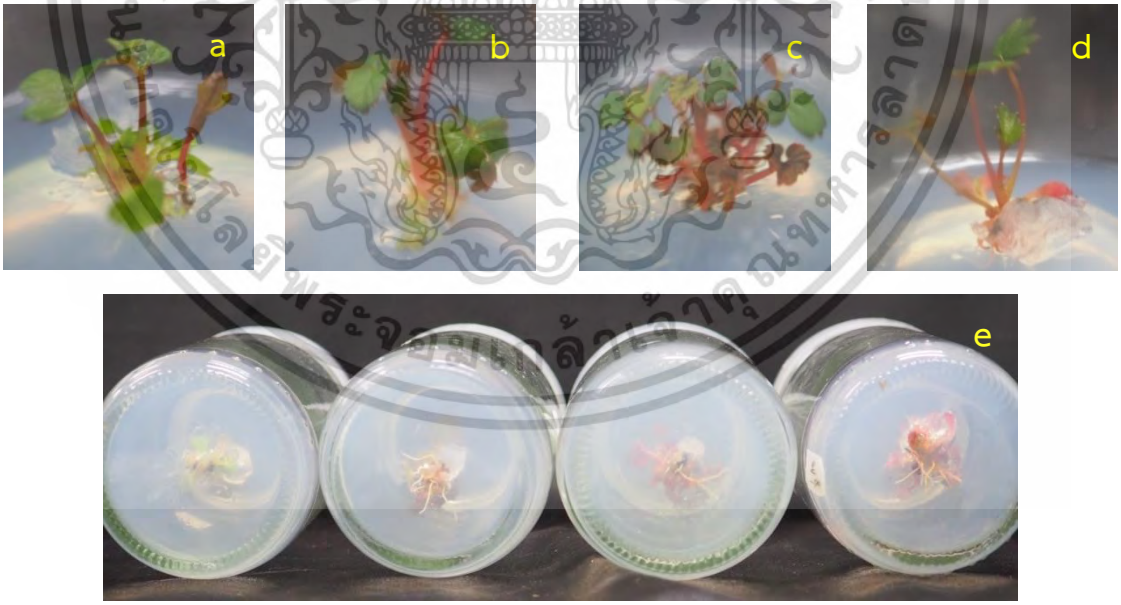
จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huh. *et al*. (2016) ที่ทำการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของอาหาร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ (*Cypripedium macranthos* Sw.) พบว่า อาหาร 1/4MS สามารถชักนำให้เกิดการงอกได้สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 68.1 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pinhal. *et al.* (2017) ที่รายงานว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดของชุมเห็ดเทศ (*Dipteryx alata* Vog) บนอาหาร MS ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์จะสามารถชักนำให้เกิดการงอกได้ดีที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการลดความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยให้ต้นพืชสามารถดูดซึมน้ำและแร่ธาตุในอาหารได้ดีขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้นและเปอร์เซ็นต์การงอกจะลดลงเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของอาหาร MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 อิทธิพลของความเข้มข้นของอาหาร MS ต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอดของเมล็ดเทียม (วัน)	เปอร์เซ็นต์การงอกยอด	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากต่อต้น (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่เกิดขึ้น
MS	9-10	100	53	1.40±0.48b	ก้านใบมีสีเขียวสลับแดง รากสั้นและบาง
1/2MS	7-8	100	73	2.57±0.90ab	ก้านใบมีสีเขียวสลับแดง รากยาวและบาง
1/4MS	4-5	100	93	3.80±1.59a	ก้านใบและใบมีสีแดง รากยาวและบาง
1/8MS	7-8	100	93	2.80±0.97ab	ก้านใบและใบมีสีแดง รากสั้นและบาง

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test



รูปที่ 4.13 ความเข้มข้นของอาหาร MS ต่อการงอกของเมล็ดเทียม รูป a อาหาร MS รูป b อาหาร 1/2MS รูป c อาหาร 1/4MS รูป d อาหาร 1/8MS รูป e ลักษณะของรากที่เกิดขึ้นจากเมล็ดเทียมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS 1/2MS 1/4MS และ 1/8MS ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ศึกษาองค์ประกอบของเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

ทำการผลิตเมล็ดเทียมโดยใช้น้ำกลั่น, อาหาร MS และอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร โดยมีโซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์เป็นสารก่อเจลและมีชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนตเป็นชุดทดลองควบคุม ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน เมื่อครบเวลาในการเก็บรักษา ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหาร 1/4MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.14 - 4.20 พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดที่ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตจะสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้ม โดยชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มจะเก็บรักษาได้เพียง 1 เดือน พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นในเดือนที่สองชิ้นส่วนปลายยอดจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (รูปที่ 4.14) ชิ้นส่วนปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าเนื่องจากจากโซเดียมอัลจีเนตที่ทำการห่อหุ้มชิ้นส่วนพืชไว้ช่วยลดการสูญเสียน้ำในระหว่างการเก็บรักษา ทำให้ชิ้นส่วนพืชสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานขึ้น รวมถึงการมีสารอาหารอยู่รอบๆ ชิ้นส่วนพืชทำให้ชิ้นส่วนพืชสามารถนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ขณะที่อยู่ในสภาวะพักและสามารถอยู่รอดได้ (Das. *et al.,* 2016) เมื่อทำการเปรียบเทียบปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมกับปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยธาตุอาหารเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม พบว่า ปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยธาตุอาหารที่เป็นเอนโดสเปิร์มเทียมจะสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นที่เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม โดยชิ้นส่วนปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมสามารถเก็บรักษาได้เพียง 1 เดือนเท่านั้น และพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นในเดือนที่สองชิ้นส่วนปลายยอดภายในเมล็ดเทียมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด แต่ชิ้นส่วนปลายยอดที่มีธาตุอาหารเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมจะสามารถเก็บรักษาได้ 4-6 เดือน และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สารอาหารที่เป็นส่วนประกอบในสารก่อเจลมีความสำคัญต่อชิ้นส่วนพืชโดยทำหน้าที่เป็นเอนโดสเปิร์มเทียมให้พืชได้ใช้เป็นแหล่งพลังงานในขณะที่อยู่ในระยะพักตัวและช่วยในการการพัฒนาของยอดเมื่อถูกนำออกจากเก็บรักษา (Hegazi, 2011) และเนื่องจากสารอาหารที่อยู่ภายในเมล็ดเทียมเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเก็บรักษา จึงทำให้เมล็ดเทียมที่ประกอบด้วยอาหาร MS และน้ำตาลซูโครส สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดถึง 6 เดือน และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการงอก 35-42 วัน และมีความสูงต้นเฉลี่ย 1.25 เซนติเมตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 1 ราก (ตารางที่ 4.20) ส่วนเมล็ดเทียมที่ประกอบด้วยอาหาร MS เพียงอย่างเดียวสามารถทำการเก็บรักษาได้เพียง 4 เดือน และเมื่อครบระยะเวลาการเก็บรักษาในเดือนที่ 5 ชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดเทียมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ 4.15) เมื่อนำไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/4MS เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมจะทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง (รูปที่ 4.14) เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่ถูกห่อหุ้มเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิตและจำเป็นต้องมีการหายใจ แต่เมื่อถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตทำให้ชิ้นส่วนพืชไม่สามารถนำออกซิเจนจากภายนอกเมล็ดเทียมมาใช้ได้ จึงมีการดึงเอาออกซิเจนที่อยู่ภายในเมล็ดเทียมมาใช้และทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นมาแทนที่ ดังนั้นเมื่อออกซิเจนภายในเมล็ดเทียมลดลงจนมีไม่เพียงพอต่อการหายใจจะทำให้ชิ้นส่วนพืชตายในที่สุดเป็นผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อเนื่องเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา (Redenbaugh. *et al*., 1987; Ikalaq. *et al*., 2010)

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ballester. *et al*. (1997) ที่รายงานว่า ชิ้นส่วนพืชที่ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่าชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้ห่อหุ้ม และ Singh. *et al*. (2006) ทำการศึกษาการเกิดต้นใหม่จากชิ้นส่วนปลายยอดที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตของลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schum and Thonn) พบว่า หลังจากระยะเวลาในการเก็บรักษาปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยเจลเมทริกซ์ที่ประกอบด้วยอาหาร MS จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 0 วัน

ประเภทของเอ็นโดสเปิร์มเทียม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (วัน)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่งอกออกจากเมล็ดเทียม
NS	100	100	7-14	2.80±0.83a	ปลายยอดมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 14-21 วัน จำนวน 2 ราก
DW	100	100	7-14	2.73±0.61a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 14-21 วัน จำนวน 2 ราก
MS	100	100	7-14	2.80±0.70a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 7-14 วัน จำนวน 2 ราก
MSS	100	100	7-14	3.06±0.88a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 7-14 วัน จำนวน 2 ราก

หมายเหตุ 1. NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนต DW = น้ำกลั่น MS = อาหาร MS MSS = อาหาร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส

2. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ 4.15 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

ประเภทของเอ็นโดสเปิร์มเทียม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (วัน)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่งอกออกจากเมล็ดเทียม
NS	20	20	14-21	1.33±0.47b	ปลายยอดมีสีเหลือง เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เมล็ดเทียมส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่มีบางส่วนเกิดการงอกยอดในช่วง 14-21 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 21-28 วัน จำนวน 2 ราก
DW	40	40	14-21	1.50±0.50b	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเหลืองอมน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เมล็ดเทียมส่วนใหญ่ไม่เกิดการงอกและชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดกลายเป็นสีน้ำตาล มีเพียงบางเมล็ดที่เกิดการงอกยอดในช่วง 14-21 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 21-28 วัน จำนวน 3 ราก
MS	73	73	7-14	2.09±0.66a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 14-21 วัน จำนวน 2 ราก
MSS	93	93	7-14	2.42±0.62a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 7-14 วัน จำนวน 1 ราก

หมายเหตุ 1. NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนต DW = น้ำกลั่น MS = อาหาร MS MSS = อาหาร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส

2. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ 4.16 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 เดือน

ประเภทของเอ็นโดสเปิร์มเทียม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (วัน)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่งอกออกจากเมล็ดเทียม
NS	0	0	-	-	ปลายยอดมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น ไม่มีรากเกิดขึ้น
DW	0	0	-	-	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีการงอกเกิดขึ้น
MS	53	53	14-21	1.25±0.43a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 14-21 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 21-28 วัน จำนวน 2 ราก
MSS	86	86	7-14	1.69±0.46a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 14-21 วัน จำนวน 2 ราก

หมายเหตุ 1. NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนต DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MSS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

2. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ 4.17 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 เดือน

ประเภทของเอ็นโดสเปิร์มเทียม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (วัน)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่งอกออกจากเมล็ดเทียม
NS	0	0	-	-	ปลายยอดมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น ไม่มีรากเกิดขึ้น
DW	0	0	-	-	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีการงอกเกิดขึ้น
MS	40	40	14-21	1.33±0.47b	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียวอมเหลือง เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเมล็ดเทียมส่วนใหญ่ไม่เกิดการงอกและชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดกลายเป็นสีน้ำตาลมีเพียงบางเมล็ดที่เกิดการงอกยอดในช่วง 14-21 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 21-28 วัน จำนวน 2 ราก
MSS	80	80	7-14	2.08±0.64a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเขียว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เกิดการงอกยอดในช่วง 7-14 วัน หลังจากเกิดนั้นรากในช่วง 14-21 วัน จำนวน 2 ราก

หมายเหตุ 1. NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนต DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MSS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

2. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ 4.18 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 4 เดือน

ประเภทของเอ็นโดสเปิร์มเทียม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (วัน)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่งอกออกจากเมล็ดเทียม
NS	0	0	-	-	ปลายยอดมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น ไม่มีรากเกิดขึ้น
DW	0	0	-	-	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีการงอกเกิดขึ้น
MS	20	20	14-21	1.33±0.47a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีเหลืองอมน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารส่วนใหญ่ไม่เกิดการงอกและชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดกลายเป็นสีน้ำตาล มีบางเมล็ดที่เกิดการงอกยอดในช่วง 14-21 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 21-28 วัน จำนวน 2 ราก
MSS	40	40	14-21	1.83±0.37a	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมเริ่มมีสีเหลือง เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เมล็ดเทียมส่วนใหญ่ไม่เกิดการงอกและชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดกลายเป็นสีน้ำตาล มีบางเมล็ดที่เกิดการงอกยอดในช่วง 14-21 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 14-21 วัน จำนวน 2 ราก

หมายเหตุ 1. NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนต DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MSS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

2. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ 4.19 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 5 เดือน

ประเภทของเอ็นโดสเปิร์มเทียม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (วัน)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่งอกออกจากเมล็ดเทียม
NS	0	0	-	-	ปลายยอดมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น ไม่มีรากเกิดขึ้น
DW	0	0	-	-	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีการงอกเกิดขึ้น
MS	0	0	-	-	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีการงอกเกิดขึ้น
MSS	26	26	35-42	1.25±0.43	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เมล็ดเทียมส่วนใหญ่ไม่เกิดการงอกและชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดกลายเป็นสีน้ำตาล มีบางเมล็ดที่เกิดการงอกยอดในช่วง 35-42 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 35-42 วัน จำนวน 2 ราก

หมายเหตุ 1. NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนต DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MSS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

2. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

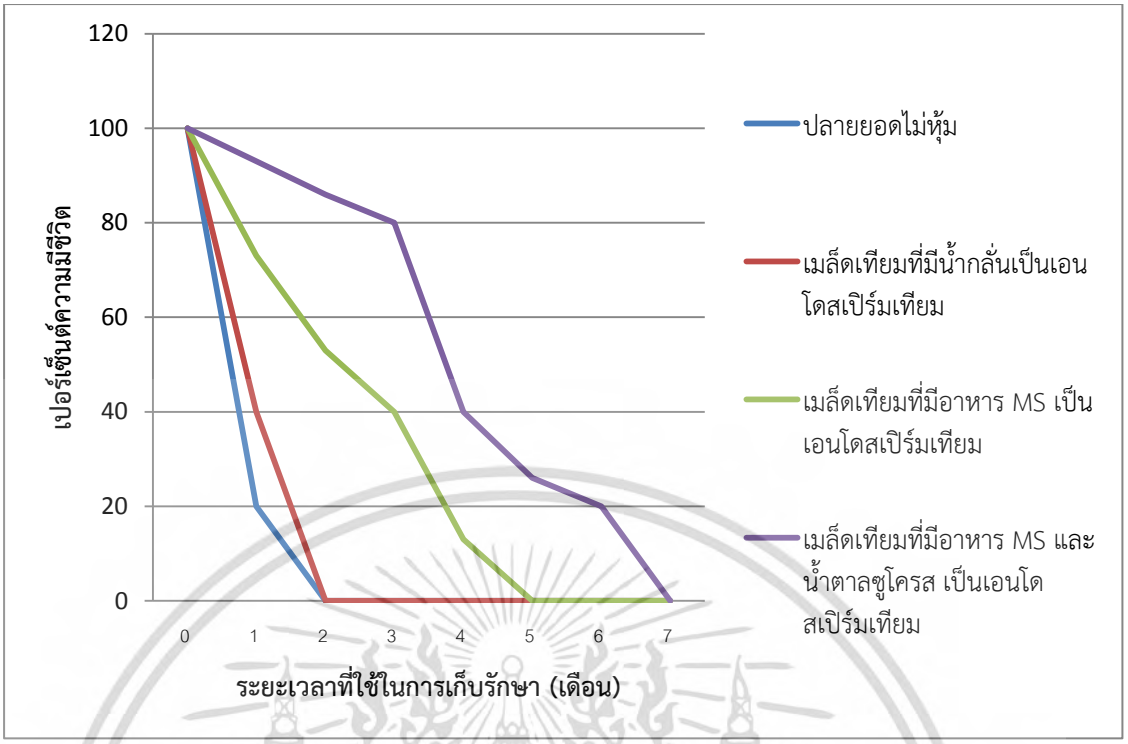
ตารางที่ 4.20 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการมีชีวิตของเมล็ดเทียม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 6 เดือน

ประเภทของเอ็นโดสเปิร์มเทียม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (%)	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (วัน)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) (ค่าเฉลี่ย ± SD)	ลักษณะของต้นที่งอกออกจากเมล็ดเทียม
NS	0	0	-	-	ปลายยอดมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น ไม่มีรากเกิดขึ้น
DW	0	0	-	-	ปลายยอดภายในเมล็ดทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีการงอกเกิดขึ้น
MS	0	0	-	-	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีการงอกเกิดขึ้น
MSS	20	20	35-42	1.25±0.43	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เมล็ดเทียมส่วนใหญ่ไม่เกิดการงอกและชิ้นส่วนพืชภายในเมล็ดกลายเป็นสีน้ำตาล มีบางเมล็ดที่เกิดการงอกยอดในช่วง 35-42 วัน หลังจากนั้นเกิดรากในช่วง 35-42 วัน จำนวน 1 ราก

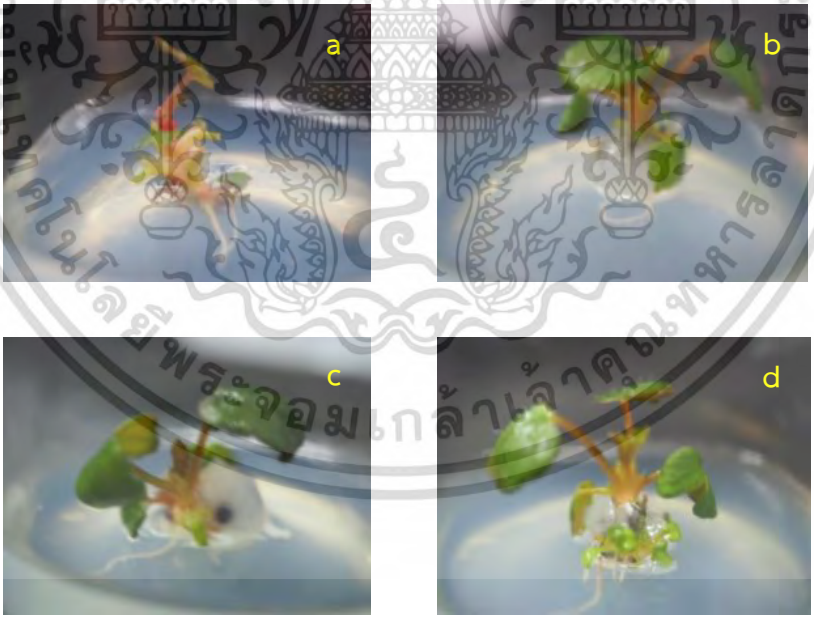
หมายเหตุ 1. NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนต DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MSS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

2. ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

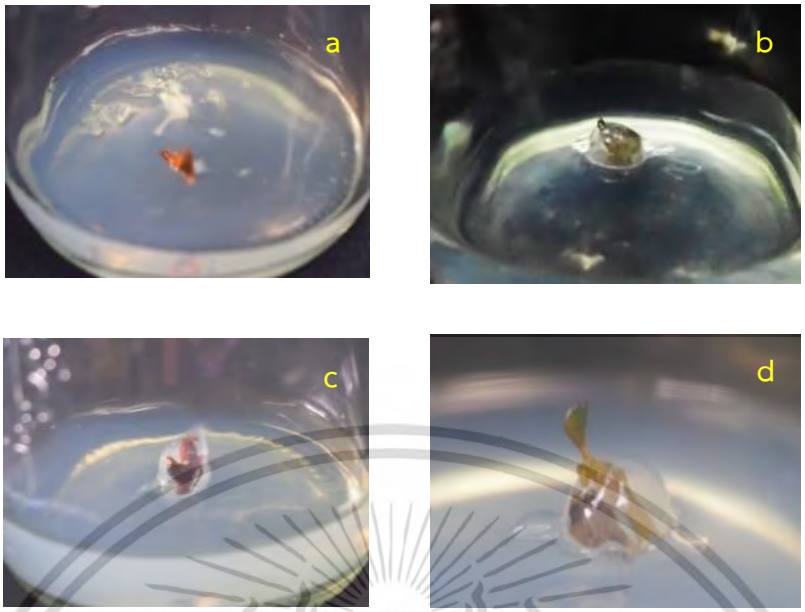


รูปที่ 4.14 อิทธิพลของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดเทียมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด ณ เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.15 การทดสอบความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยเอนโดสปิร์มเทียมชนิดต่างๆ ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด รูป a ชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนต รูป b ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป c ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MSเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป d ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 การทดสอบความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยเอนโดสปิร์มเทียมชนิดต่างๆ หลังทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 6 เดือน รูป a ชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนต รูป b ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป c ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MSเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม รูป d ชิ้นส่วนพืชที่ห่อหุ้มด้วยอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง

4.3.1 ศึกษาขนาดของต้นสตรอว์เบอร์รีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเมื่อทำการออกปลูกในสภาวะภายนอกหลอดทดลอง

นำต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดประมาณ 0.5 1.0 และ 2.0 เซนติเมตร มาทำการออกปลูกในกระถางขนาด 4 นิ้ว โดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติก หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ จึงนำถุงพลาสติกออก รดด้วยน้ำประปาทุกๆ 2 วัน จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.21 พบว่า ต้นสตรอว์เบอร์รีขนาด 2 เซนติเมตร จะสามารถเจริญในสภาวะตามธรรมชาติได้ดีที่สุด โดยหลังจากการออกปลูก 6 สัปดาห์ มีจะเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงเฉลี่ย 6.7 เซนติเมตรต่อต้น ขนาดใบเฉลี่ย 6.1 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนใบเฉลี่ย 9 ใบต่อต้น (รูปที่ 4.16) จากการทดลองยังพบว่าเมื่อลดขนาดของต้นที่จะใช้ในการออกปลูกจะทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงโดยในต้นที่มีขนาด 0.5 เซนติเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุดที่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ และในต้นที่มีขนาด 1.0 เซนติเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรองลงมาที่ 83.3 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Almeida do Vale. *et al*. (2019) ที่กล่าวว่า ความสูงของต้นพืชก่อนการนำไปออกปลูกจะมีผลต่ออัตราการรอดชีวิต เนื่องจากต้นพืชที่มีขนาดใหญ่กว่าจะสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดรากได้ดีกว่า เป็นผลให้สามารถดูดซึมธาตุอาหารที่อยู่ภายในวัสดุปลูกได้ดีกว่า และทำให้สามารถเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดชีวิตในสภาวะภายนอกหลอดทดลองที่ดีกว่า เช่นเดียวกับ Garcia-Ramirez. *et al.* (2015) ที่พบว่า การใช้ต้นไผ่เหลือง (*Bambusa vulgaris*) ขนาด 4 เซนติเมตร ในการออกปลูกจะทำให้ต้นพืชมีอัตราการเจริญเติบโต พื้นที่ใบ การเกิดรากที่ดีกว่าการใช้ต้นขนาด 3 เซนติเมตร ในการออกปลูก และงานวิจัยของ Gomes. *et al.* (2015) ที่พบว่า การใช้ต้นปาล์ม (*Elaeis guineensis*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดมากกว่า 10 เซนติเมตร จะมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดที่ 94.1 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ต้นที่มีขนาดเล็กกว่า 2.5 เซนติเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุดเพียง 22.2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 ขนาดของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี เมื่อออกปลูกในพีทมอสเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ระยะเวลาออกปลูก	ขนาดต้น (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%)	ความสูงเฉลี่ยต่อต้น (เซนติเมตร)	พื้นที่ใบเฉลี่ย (ตารางเซนติเมตร)	จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น	ลักษณะต้นสตรอว์เบอร์รี
วันแรกของการออกปลูก	0.5	100	0.5	0.1	3	ต้นมีขนาดเล็ก ใบมีสีเขียวขนาดเล็กยังไม่แตกออกเป็น 3 กลีบ มีรากเล็กน้อย รากสั้นบาง
	1.0	100	1.0	0.2	6	ต้นมีขนาดกลาง ใบมีสีเขียวขนาดเล็กยังไม่แตกออกเป็น 3 กลีบ มีรากเล็กน้อยและค่อนข้างสั้น
	2.0	100	2.0	1.2	5	ต้นมีขนาดใหญ่ ใบมีสีเขียวขนาดเล็กยังไม่แตกออกเป็น 3 กลีบ มีรากเล็กน้อย รากสั้นบาง
หลังจากออกปลูกได้ 6 สัปดาห์	0.5	66.6	1.0	0.3	8.8	ต้นสูงขึ้นหนาขึ้น ใบใหญ่ขึ้นมีสีเขียวและเริ่มมีใบที่แยกเป็น3กลีบ รากยาวและมีจำนวนมากขึ้น
	1.0	83.3	1.8	1.0	8.3	ต้นสูงขึ้นชัดเจน ใบใหญ่ขึ้นมีสีเขียวแยกเป็นแต่ละใบได้ชัดเจน รากบางยาว
	2.0	100	6.7	6.1	9.0	ต้นสูงขึ้น ใบหนาสีเขียวและจำนวนมากขึ้น รากหนามีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดต้น (เซนติเมตร)	ก่อนออกปลูก (วันที่ 0)	หลังออกปลูก (6 สัปดาห์)
0.5		
1.0		
2.0		

รูปที่ 4.17 ลักษณะของต้นสตรอว์เบอร์รีขนาดต่างๆ ก่อนการออกปลูกและหลังจากออกปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ศึกษาวัสดุปลูกและเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียมในสภาวะไม่ปลอดเชื้อภายนอกหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนปลายยอดมาตัดแต่งให้มีขนาด 0.5-1 เซนติเมตร และตัดแต่งรากให้มีความยาวประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร มาทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำกลั่น หรืออาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์และมีชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนตเป็นตัวทดลองควบคุม ทำการออกปลูกในกระถาง 4 นิ้ว โดยใช้พีทมอส เวอร์มิคูไลท์ สแฟกนั่มมอส เป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติก รดด้วยอาหาร 1/8MS ทุกๆ 2 วัน จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.22-4.24 พบว่า เมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม และทำการออกปลูกโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูกจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีใช้ระยะเวลา 5-7 วันในการงอก มีเปอร์เซ็นต์การงอก 40 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ ยอดที่งอกออกมามีขนาด 0.5 เซนติเมตร (รูปที่ 4.19) และเมื่อทำการเปรียบเทียบปลายยอดที่ทำการห่อหุ้มด้วยอาหาร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมกับปลายยอดที่ห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมและปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้ม พบว่า ปลายยอดที่ทำการห่อหุ้มด้วยอาหาร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดในทุกวัสดุปลูก โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกยอดอยู่ในช่วง 30-40 เปอร์เซ็นต์ และปลายยอดที่แทงออกมาจะสูงกว่าอีก 2 ทรีทเมนต์ เนื่องจากการมีธาตุอาหารภายในเมล็ดเทียมจะทำให้ชิ้นส่วนปลายยอดได้รับสารอาหารจากทั้งภายนอกและภายใน เป็นผลให้เจริญเติบโตได้ดีกว่าปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มและปลายยอดที่ห่อหุ้มด้วยน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียมที่ได้รับสารอาหารจากภายนอกผ่านการรดด้วยอาหาร 1/8MS เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้พบว่า การใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูกจะช่วยให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุดโดยจะอยู่ในช่วง 80-100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับสแฟกนั่มมอสที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดเทียมจะอยู่ในช่วง 80-100 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้เวอร์มิคูไลท์และสแฟกนั่มมอสเป็นวัสดุปลูกสามารถช่วยให้เมล็ดเทียมยังคงความมีชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากวัสดุปลูกทั้งสองชนิดมีความโปร่ง ทำให้มีอากาศภายในวัสดุปลูกเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดเทียม แต่การใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูกจะทำให้ชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มและเมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การงอกยอดที่สูงกว่าและมีระยะเวลาในการงอกยอดที่เร็วกว่า โดยใช้เวลา 5-7 วัน ในการงอกยอด ซึ่งเกิดจากความสามารถในการดูดซับน้ำได้สูงของสแฟกนั่มมอส (Manhaes. *et al*., 2015) ทำให้ดูดซับอาหาร 1/8MS ที่ทำการรดจนเมล็ดเทียมนำไปใช้ได้ในปริมาณน้อย ทำให้เมล็ดเทียมใช้ระยะเวลาในการงอกที่นานกว่าเมื่อเทียบกับเวอร์มิคูไลท์ ส่วนการใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูกจะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ต่ำที่สุดโดยจะอยู่ในช่วง 30-60 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.18) เนื่องจากพีทมอสเป็นวัสดุปลูกที่มีความโปร่งน้อยกว่าวัสดุปลูกอื่น ทำให้อากาศภายในวัสดุปลูกมีน้อย (Gonbad. *et al*., 2013) จากการออกปลูกในสภาวะไม่ปลอดเชื้อ การใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่มากกว่าวัสดุปลูกอีกสองชนิดจึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เป็นผลให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตน้อยที่สุดและพบว่าเมื่อทำการออกปลูกเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เมล็ดเทียมรวมถึงชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มจะตายลงทั้งหมดในวัสดุปลูกทั้งสามชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Manhaes. et al. (2015) ที่ทำการศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการออกปลูกของต้นกล้วยไม้ (*Cattleya guttata*) พบว่า การใช้สแฟกนั่มมอสเป็นวัสดุปลูกจะทำให้ต้นกล้วยไม้ที่ออกปลูกมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าวัสดุปลูกอื่น เนื่องจากความชื้นในวัสดุปลูกที่มากเกินไปจนไม่เหมาะต่อการเจริญของต้นพืช และงานวิจัยของ Promchot and Boonprakob (2007) ที่ทำการศึกษาการใช้เวอร์มิคูไลท์ ขุยมะพร้าว และถ่านแกลบในการเพาะเลี้ยงเมล็ดของต้นพีช (*Prunus persica* L.) พบว่า การใช้เวอร์มิคูไลท์จะทำให้เมล็ดของต้นพีชมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 100 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากออกปลูก 58 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อทำการออกปลูกโดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

วัสดุปลูก	เอนโดสเปิร์มเทียม	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอด	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การงอกยอด (%)	ลักษณะของต้นสตรอว์เบอร์รี
พีทมอส	NS	8-10	30	10	ปลายยอดส่วนใหญ่กลายเป็นสีน้ำตาล และไม่มีการงอกเกิดขึ้น มีปลายยอดเพียง 1 ยอดที่ยังเป็นสีเขียวและมียอดใหม่แทงออกมา ยอดใหม่สูงประมาณ 0.2 เซนติเมตร
	DW	5-7	50	20	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมครึ่งหนึ่งยังเป็นสีเขียว มี 5 เมล็ดที่ชิ้นส่วนปลายยอดกลายเป็นสีน้ำตาล มีเมล็ดเทียมส่วนน้อยที่ปลายยอดแทงออกมานอกเมล็ดเทียม ยอดที่แทงออกมาสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร
	MSS	5-7	60	40	ปลายยอดส่วนใหญ่ภายในเมล็ดเทียมยังเป็นสีเขียว มี 2 เมล็ดที่ชิ้นส่วนปลายยอดกลายเป็นสีน้ำตาลและมี 2 เมล็ดเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ มีเมล็ดเทียมบางส่วนที่มียอดแทงออกมานอกเมล็ด ยอดที่แทงออกมาสูง ประมาณ 1.0 เซนติเมตร

หมายเหตุ NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้ม DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.23 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อทำการออกปลูกโดยใช้สแฟกนั่มมอสเป็นวัสดุปลูก เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

วัสดุปลูก	เอนโดสเปิร์มเทียม	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอด	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การงอกยอด (%)	ลักษณะต้นสตรอว์เบอร์รี
สแฟกนั่มมอส	NS	12-14	80	20	ปลายยอดส่วนใหญ่เป็นสีเขียว มีปลายยอด 2 ยอดที่มียอดใหม่แทงออกมา ยอดใหม่สูงประมาณ 0.2 เซนติเมตร
	DW	12-14	100	10	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมทั้งหมดเป็นสีเขียว แต่มีเพียง 1 เมล็ดที่ปลายยอดแทงออกมานอกเมล็ดเทียม ยอดที่แทงออกมาสูง ประมาณ 0.2 เซนติเมตร
	MSS	8-10	80	30	ปลายยอดส่วนใหญ่ภายในเมล็ดเทียมยังเป็นสีเขียว มี 2 เมล็ดที่ชิ้นส่วนปลายยอดกลายเป็นสีน้ำตาล มีเมล็ดเทียม 3 เมล็ดที่มียอดแทงออกมานอกเมล็ด ยอดที่แทงออกมาสูง ประมาณ 1.0 เซนติเมตร

หมายเหตุ NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้ม DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.24 ประเภทของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการงอกของเมล็ดเทียม เมื่อทำการออกปลูกโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูก เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

วัสดุปลูก	เอนโดสเปิร์มเทียม	ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกยอด	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (%)	เปอร์เซ็นต์การงอกยอด (%)	ลักษณะต้นสตรอว์เบอร์รี
เวอร์มิคูไลท์	NS	5-7	100	30	ปลายยอดทั้งหมดยังเป็นสีเขียว มีบางส่วนเกิดยอดใหม่แทงออกมา ยอดใหม่สูงประมาณ 0.3 เซนติเมตร
	DW	5-7	100	10	ปลายยอดภายในเมล็ดเทียมทั้งหมดเป็นสีเขียว แต่มีเพียง 1 เมล็ดที่ปลายยอดแทงออกมานอกเมล็ดเทียม ยอดที่แทงออกมาสูง ประมาณ 0.2 เซนติเมตร
	MSS	5-7	80	40	ปลายยอดส่วนใหญ่ภายในเมล็ดเทียมยังเป็นสีเขียว มี 2 เมล็ดที่ชิ้นส่วนปลายยอดกลายเป็นสีน้ำตาล มีเมล็ดเทียม 4 เมล็ดที่มียอดแทงออกมานอกเมล็ด ยอดที่แทงออกมาสูง ประมาณ 0.5 เซนติเมตร

หมายเหตุ NS = ปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้ม DW = ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MS = ปลายยอดที่มีอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	พีทมอส	สแฟกนั่มมอส	เวอร์มิคูไลท์
NS			
DW			
MSS			

รูปที่ 4.18 ชนิดของวัสดุปลูกและชนิดของเอนโดสเปิร์มเทียมต่อความมีชีวิตของเมล็ดเทียมหลังจากทำการออกปลูกเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยที่ NS คือ ปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้ม DW คือ ปลายยอดที่มีน้ำกลั่นเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม MSS คือ ปลายยอดที่มีอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM

รูปที่ 4.19 การงอกของเมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม หลังจากทำการออกปลูกในเวอร์มิคูไลท์เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 และ 4 มิลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยแคลลัสมีลักษณะจับกันแน่น (compact callus) มีสีเขียวอ่อนและมีปริมาณแคลลัสมาก ส่วนในอาหารที่ประกอบด้วยออกซินเพียงอย่างเดียว (2,4-D หรือ NAA) แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะจับกันไม่แน่น (friable callus)

การศึกษาการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.02 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสของชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส 49-56 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดออร์แกโนเจเนซิส 73 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสมีสีเขียวอ่อน มีจำนวนต้นใหม่ที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 5 ต้นต่อชิ้นแคลลัส

การศึกษาการชักนำให้เกิดการยืดของยอดขนาดเล็กโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดขนาดเล็กสามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยต้นจะมีความสูงเฉลี่ย 1.89 เซนติเมตร ได้จำนวนต้นเฉลี่ย 8.3 ต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยต้นจะมีความสูงเฉลี่ย 0.96 เซนติเมตร ได้จำนวนต้นเฉลี่ย 8.3 ต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ต้นที่ได้มีอาการฉ่ำน้ำ (Hyperhydricity) ในทุกซ้ำการทดลอง

การศึกษาการเพิ่มปริมาณของยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว โดยการนำยอดขนาดเล็กไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm พบว่า ยอดขนาดเล็กที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด โดยเกิดต้นใหม่ได้มากที่สุด 43.6 ต้นต่อสูตร แต่ต้นที่ได้จะมีขนาดเล็กที่สุด (0.59 เซนติเมตร) และดัชนีการเจริญของน้ำหนักแห้งเฉลี่ยน้อยที่สุด (14.06) ในทางตรงกันข้าม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดต้นที่สูงที่สุดคือ 1.23 เซนติเมตร และมีดัชนีการเจริญของน้ำหนักแห้งมากที่สุดที่ 25.62

ศึกษาการรักษาอาการฉ่ำน้ำของต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยนำต้นสตรอว์เบอร์รีที่มีอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ปราศจากสาควบคุมการเจริญเติบโต ที่ประกอบด้วยผงวุ้นความเข้มข้น 8 10 12 และ 14 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 60 90 และ 120 กรัมต่อลิตร พบว่า อาหาร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้นความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร สามารถรักษาอาการฉ่ำน้ำในต้นพืชได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ปริมาณความชื้นต่อต้น 90 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 53 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นพืชลดลงและในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพียง 0-13 เปอร์เซ็นต์

ศึกษาการชักนำให้เกิดราก โดยการเพาะเลี้ยงต้นสตรอว์เบอร์รีบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการชักนำให้เกิดราก 7-14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 13.12 ราก และใช้เวลาในการชักนำให้เกิดราก 7-14 วัน

ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด 7-14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดหลายยอด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นเฉลี่ย 11.80 ต้น ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดรองลงมา คือ อาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5-1.5 สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ใกล้เคียงกัน โดย BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด 7-14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดหลายยอด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นเฉลี่ย 7.66 7.93 และ 7.53 ต้น ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตเมล็ดเทียม โดยใช้โซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร ในการห่อหุ้มชิ้นส่วนปลายยอด และนำเมล็ดเทียมไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า การใช้โซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์มวลต่อปริมาตร จะทำให้เมล็ดเทียมที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นทรงกลมมากที่สุด และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกยอดสูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลา 7-14 วันในการงอกยอด

ศึกษาความเข้มข้นของอาหาร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียม โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหาร MS 1/2MS 1/4MS และ 1/8MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า อาหาร 1/4MS สามารถชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียมได้ดีที่สุด โดยใช้เวลา 4-5 วัน ในการชักนำให้เกิดการงอกของยอด มีเปอร์เซ็นต์การงอกของยอด 100 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การงอกของราก 90 เปอร์เซ็นต์มีจำนวนรากเฉลี่ย 5.8 ราก รากมีลักษณะยาวและบาง และเปอร์เซ็นต์การงอกจะลดลงเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของอาหาร MS นอกจากนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/8 MS ก้านใบของต้นสตรอว์เบอร์รีที่งอกออกจากเมล็ดเทียมจะมีสีแดงเข้ม ซึ่งเกิดจากความเครียดในสภาวะการเพาะเลี้ยงของต้นพืช

ศึกษาองค์ประกอบของเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการห่อหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และใช้น้ำกลั่น, อาหาร MS หรืออาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียมและมีชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนตเป็นตัวแปรควบคุม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน พบว่า เมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครส เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดถึง 6 เดือน โดยเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/4MS มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการงอก 35-42 วัน และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 33 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 1 ราก

ศึกษาขนาดของต้นสตรอเบอร์รี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดที่เหมาะสมต่อการออกปลูกในดิน โดยนำต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดประมาณ 0.5 1.0 และ 2.0 เซนติเมตร มาทำการออกปลูกโดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก พบว่า ต้นสตรอว์เบอร์รีขนาด 2 เซนติเมตร จะมีความสามารถในการเจริญในสภาวะตามธรรมชาติมากที่สุด โดยหลังจากการออกปลูก 6 สัปดาห์ มีจะเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงเฉลี่ย 6.7 เซนติเมตรต่อต้น ขนาดใบเฉลี่ย 6.1 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนใบเฉลี่ย 9 ใบต่อต้น

ศึกษาวัสดุปลูกและเอนโดสเปิร์มเทียมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเทียมในสภาวะไม่ปลอดเชื้อภายนอกหลอดทดลอง โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดมาตัดแต่งให้มีขนาด 0.5-1 เซนติเมตร และตัดแต่งรากให้มีความยาวประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร มาทำการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำกลั่น หรืออาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียมและมีชิ้นส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ห่อหุ้มโซเดียมอัลจีเนตเป็นตัวควบคุม ทำการออกปลูกในกระถาง 4 นิ้ว โดยใช้พีทมอส เวอร์มิคูไลท์ สแฟกนั่มมอส เป็นวัสดุปลูก พบว่า เมล็ดเทียมที่มีอาหาร MS และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PPM ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมิลลิลิตร เป็นเอนโดสเปิร์มเทียมจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดในทุกวัสดุปลูก โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกยอดอยู่ในช่วง 30-40 เปอร์เซ็นต์ และปลายยอดที่แทงออกมาจะสูงกว่าอีก 2 ทรีทเมนต์ และการใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูกจะช่วยให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุดโดยจะอยู่ในช่วง 80-100 เปอร์เซ็นต์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจจะทำให้ต้นพืชเกิดจากกลายพันธุ์ (somaclonal variation) ในอนาคตจึงควรนำต้นพืชไปทำการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

5.2.2 ศึกษาการเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในเอนโดสเปิร์มเทียม เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา

5.2.3 ศึกษาการใช้แสงสีต่างๆ เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Abbasi, F. Majd, A. Farahvash, F. and Nejadsattar, T. 2021. "Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of in vitro-derived shoot-tips and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L." *Nexo Revista Científica*. 33(02) : 276-285.

Adhikari, S. Bandyopadhyay, T.K. and Ghosh, P. 2014. "Assessment of genetic stability of *Cucumis sativus* L. regenerated from encapsulated shoot tips." *Scientia Horticulturae*. 170 : 115-122.

Ahmad, N. and Anis, M. 2010. "Direct plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Vitex negundo*." *Biologia Plantarum*. 54 : 748-752.

Almeida do Vale, P.A. Oliveira Júnior, J.B. Silva Costa, F.H. and Scherwinski-Pereira, J.E. 2019. "Height and number of shoots on the survival and development of micropropagated bamboo plantlets during pre-acclimatization." *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 49(53751) : 1-8.

Amatori, S. Mazzoni, L. Miguel Alvarez-Suarez, J. Giampieri, F. Gasparrini, M. Forbes-Hernandez, T.Y. Afrin, S. Provenzano, A.E. Persico, G. Mezzetti, B. Amici, A. Fanelli, M. and Battino, M. 2016. "Polyphenol-rich strawberry extract (PRSE) shows *in vitro* and *in vivo* biological activity against invasive breast cancer cells." *Scientific Reports*. 6(30917), [Online]. Available : https://doi.org/10.1038/srep30917.

Ara, H. Jaiswal, U. and Jaiswal, V.S. 2000. "Synthetic seed: Prospects and limitations." **Current Science.** 78(12) : 1438-1444.

Ara, T. Karim, R. Karim, M.R. Islam, R. and Hossain, M. 2012. "Callus induction and shoot regeneration in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.)." *International Journal of Biosciences*. 2(10) : 93-100.

Ashrafuzzaman, M. Faisal, S.M. Yadav, D. Khanam, D. and Raihan, F. 2013. "Micropropagation of strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) through runner culture." *Bangladesh Journal of Agricultural Research*. 38(3) : 467-472.

Asmah, H. Hasnida, H. Noraliza, A. Nashatul Zaimah, N.A. and Salmi, N.N. 2012. "*In vitro* propagation of Acacia hybrid through alginate-encapsulated shoots and axillary buds." *African Journal of Biotechnology*. 11(65) : 12814-12817.

Ayub, R.A. Neves dos Santos, J. Zanlorensi Junior, L.A. Mendes da Silva, D. Cristina de Carvalho, T. and Grimaldi, F. 2019. "Sucrose concentration and volume of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

liquid medium on the *in vitro* growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems." *Agricultural Science Journal.* 43 : 1-8.

Bahmani, R. Karami, O. and Gholam, M. 2009. "Influence of Carbon Sources and Their Concentrations on Rooting and Hyperhydricity of Apple Rootstock MM.106." *World Applied Sciences Journal.* 6(11) : 1513-1517.

Banerjee, S. Singh, S. Pandey, H. Pandey, P. and Rahman, L.U. 2012. "Conservation and storage of Curcuma amada Roxb. synseeds on Luffa sponge matrix and RAPD analysis of the converted plantlets." *Ind Crop Prod.* 36(38) : 3–8.

Barclay Poling, E. 1997. **Strawberry Plant Structure and Growth Habit.** North Carolina : Raleigh.

Biswas, M.K. Islam, R. and Hossain, M. 2007. "Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 90 : 49-54.

Biswas, M.K. Dutt, M. Roy, U.K. Islam, R. and Hossain, M. 2009. "Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits." *Scientia Horticulturae*. 122 : 409-416.

Biswas, M.K. Roy, U.K. Islam, R. and Hossain, M. 2010. "Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry (*Fragaria* sp.) clones." *Turkish Journal of Biology.* 34 : 75-80.

Brian, P.W. 1959. "Effects of gibberellins on plant growth and development." *Biological Reviews.* 34 : 37-84.

Cao, D.H. Chang, H.H. Hyun, B.J. Seon, K.K. Nguyen, V.K. Min, W.N. Dae, H.C. and Hye, I.L. 2015. "Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs." *Scientia Horticulturae*. 194 : 194-200.

Cappelletti, R. Sabbadini, S. and Mezzetti, B. 2016. "The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars." *Scientia Horticulturae*. 207 : 117-124.

Capuano, G. Piccioni, E. and Standardi, A. 1998. "Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds." *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 73 : 299-305.

Casanova, E. Moysset, L. and Trillas, M.I. 2008. "Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots." *Biologia Plantarum.* 52(1) : 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chalker-Scot, L. 1999. "Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses." *Photochemistry and Photobiology.* 70(1) : 1-9.

Chung, H.H. and Ouyang, H.Y. 2020. "Use of Thidiazuron for High-Frequency Callus Induction and Organogenesis of Wild Strawberry (*Fragaria vesca*)." *Plants.* 10(1) : 67.

Cleland, R.E. **Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!.** 3rd ED. Dordrecht : Springer. 2010.

Das, D.K. Rahman, A. Kumar, D. andi Kumari, N. 2016. "Synthetic Seed Preparation, Germination and Plantlet Regeneration of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)." *American Journal of Plant Sciences.* 07(10) : 1395-1406.

Debnath, S.C. 2005. "Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration." *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 41 : 671-676.

Diengngan, S. and Murthy, B.N.S. 2014. "Influence of plant growth promoting substances in micropropagation of Strawberry cv. Festival." *The Bioscan*. 9(4) : 1491-1493.

Flaya, M. 2019. **Strawberry plant with green leaves, flowers, ripe red berries and root system isolated.** [Online]. Available : https://depositphotos.com/285683608/stock-illustration-strawberry-plant-green-leaves-flowers.html.

García-Ramírez, Y. González-González, M. Freire-Seijo, M. O-Cárdenas, M.L. León-Quintana, M. Roque-Morales, B. Mena-Méndez, E. Mendoza-Rodríguez, M.F. and Rivero-Quintana, L. 2015. "Effect of Morphological and Physiological Development on the Acclimatization of in Vitro Plants of *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl in Liquid Culture Medium." *Open Access Library Journal.* 2(1787) : 1-7.

George, E.F. Hall, M.A. and Klerk, G.J.D. **Plant Propagation by Tissue Culture.** 3rd ED. Dordrecht : Springer. 2008.

Gerdakaneh, M. Mozafi, A.A. Khalighi, A. and Sioseh-mardah, A. 2009. "The effects of Carbohydrate Source and Concentration on Somatic Embryogenesis of Strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.)." *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science.* 6(1) : 76-80.

Gerdakaneh, M. Mozafi, A.A. Mardah, A.S. and Sarabi, B. 2011. "Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.)." *Acta Physiologiae Plantarum*. 33 : 1847-1852.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ghasemi, Y. Beaicknejad, S. Sohrevardi, F. Sharifani, M. Amiri, E. and Nematzadeh, G.A. 2015. "Adventitious Shoot and Root Regeneration of Wild Strawberry (*F. viridis* Duch.) by Means of Tissue Culture Medium Optimization." *Biological Forum-An International Journal*. 7(2) : 436-441.

Gomes, H.T. Bartos, P.M.C. and Scherwinski-Pereira, J.E. 2015. "Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos." *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 51(1) : 111-117.

Gonbad, R.A. Moghaddam, S.S. Sinniah, U.M. Aziz, M.A. and Safarpor, M. 2013. "Determintion of Potting Media for Effective Acclimatization in Micropropagated Pants of tea Clone Iran 100." *International Journal of Forest, Soil and Erosion*. 3(1) : 40-44.

Harbinson, J. and Rosenqvist, E. 2003. "An introduction to chlorophyll fluorescence." 1-29. In DeEll J.R. and Toivonen, P.M.A. **Practical applications of chlorophyll fluorescencein plant biology.** Boston : Kluwer Academic Publishers.

Haddadi, F. Aziz, M.A. Saleh, G. Rashid, A.A. and Kamaladini, H. 2010. "Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from *In vitro* Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine." *HortScience*. 45(3) : 453-456.

Hasan, M.N. Nigar, S. Rabbi, M.A.K. Mizan, S.B. and Rahman, M.S. 2010. "Micropropagation of strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.)." *International Journal of Sustainable Crop Production*. 5(4) : 36-41.

Hegazi, GA. 2011. "Viability of encapsulated shoot tips of *Capparis orientalis* Duh." *Nature and Science*. 9(8) : 223-228.

Hiti Bandaralage, J.C.A. Hayward, A. O'Brien, C. and Mitter, N. 2015. "Gibberellin and cytokinin in synergy for a rapid nodal multiplication system of avocado." *Congreso Mundial de la Palta*. 15 : 95-103.

Huh, Y.S. Lee, J.K. Nam, S.Y. Hong, E.Y. Paek, K.Y. and Son, S.W. 2016. "Effects of altering medium strength and sucrose concentration on in vitrogermination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw." *Journal of Plant Biotechnology*. 43 : 132-137.

Hummer, K.E. and Hancock, J.H. 2009. "Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies." 413–435. in Folta,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K.M. and Gardiner, S.E. **Plant genetics and genomics of crops and models.** 6. Berlin : Heidelberg.

Hummer, K.E. Bassil, N. and Njuguna, W. 2011. "Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources." 17-44. In Kole, C. **Temperate Fruits.** Berlin : Heidelberg.

Hung, C.D. and Trueman, S.J. 2011. "Encapsulation technology for short-term preservation and germplasm distribution of the African mahogany *Khaya senegalensis*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 107 : 397-405.

Hung, C.D. Hong, C.H. Jung, H.B. Kim, S.K. Ket, N.V. Nam, M.W. Choi, D.H. and Lee, H.I. 2015. "Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs." *Scientia Horticulturae.* 194 : 194-200.

Ikhlaq, M. Hafiz, I.A. Micheli, M. Ahmad, T. Abbasi, N.A. and Standardi, A. 2010. "*In vitro* storage of synthetic seeds: Effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability." *African Journal of Biotechnology.* 9(35) : 5712-5721.

Jadan, M. Ruiz, J. Soria, N. and Mihai, R.A. 2015. "Synthetic seeds production and the induction od organogenesis in blackberry (*Rubus glaucus* Benth)." *Romanian Biotechnological Letters*. 20(1) : 10134-10142.

Kaminska, M. Golebiewski, M. Tretyn, A. and Trejgell, A. 2018. "Efficient long-term conservation of Taraxacum pieninicum synthetic seeds in slow growth conditions." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 132 : 469-478.

Karami, O. Kordestani, G.K. and Mohamadi, M. 2007. "Direct somatic embryogenesis and Plant regeneration in strawberry (*Fragaria* x *ananassa*)." *Indian Journal Plant Physiol.* 12(4) : 322-326.

Karim, R.M. Aziz, M.A. Roy, U.K. Hoque, M.A. and Hossain, M.M. 2011. "*In vitro* response of strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Dutch.) for callus induction and shoot regeneration." *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 1(1) : 29-36.

Karhu, S. and Hakala, K. 2002. "Micropropagated strawberries on the field." *Acta Horticulturae.* 567(567) : 321-324.

Kitto, S.L. and Janick, J. 1982. "Polyox as an artificial seed coat for a sexual embryo." *Hortscience*. 17 : 448.

Koene, F.M. Amano, E. and Ribas, L. 2019. "Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae)" *Nexo Revista Científica.* 121 : 83-91.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lisek, A. and Orlikowska, T. 2004. "*In vitro* Storage of Strawberry and Raspberry in Calcium-Alginate Beads at 4°C." *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 78(2) : 167-172.

Litwinczuk, W. Okolotkiewicz, E. and Matyaszek, I. 2009. "Development of *in vitro* shoot cultures of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) 'Senga Sengana' and 'Elsanta' under the influence of high doses of gibberellic acid." *Floria Horticulturae*. 21(2) : 43-52.

Lucyszyn, N. Quoirin, M. Koehler, H.S. Reicher, F. and Sierakowski, M.-R. 2006. "Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation." *Scientia Horticulturae*. 107 : 358-364.

Manhães, N.E. Jasmim, J.M. Silva, L.A.A. Castro, B.B. Motta, N.L. Pereira, V.R. and Ertha, A.P.R.C. 2015. "Loofah Fiber and Sphagnum Moss in the Acclimatization of *Cattleya guttata* and *Zygopetalum mackayi* Inoculated with Plant Growth-Promoting Bacteria." *Acta Horticulturae.* 1076 : 113-118.

Mohamed, E.M. Fekry, W.A. Wahdan, H.M. and Bardisi, A. 2016. "EFFECT OF GIBBERELLIC ACID ON STRAWBERRY (*Fragaria* X *ananassa* Duch.) MICROPROPAGATION DURING MULTIPLICATION STAGE" *Zagazig Journal of Horticultural Science.* 43(3) : 755-761.

Moradi, K. Otroshy, M. and Azimi, M.R. 2011. "Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures." *Journal of Agricultural Technology.* 7(6) : 1755-1763.

Murashige, T. 1977. "Plant cell and organ cultures as horticultural practices." *Acta Horticult.* 78 : 17–30.

Nieves, N. Martínez, M.E. Castillo, R. María, A.B. and González-Olmedo, J.L. 2001. "Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane." *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 65 : 15–21.

Palei, S. Rout, G.R. Das, A.K. and Dash, D.K. 2017. "Callus Induction and Indirect Regeneration of Strawberry (*Fragaria × Ananassa*) Duch. CV. Chandler." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 6(11) : 1311-1318.

Patel, A.V. Pusch, I. Mix-Wagner, G. and Vorlop, K.D. 2000. "A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds." *Plant Cell Reports.* 19 : 868–874.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pattnaik, S.K. Sahoo, Y. Chand, P.K. 1995. "Efficient plant retrieval from alginate encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees." *Scientia Horticulturae*. 61(2) : 27–39.

Pearez-Tornero, J.E. Olmos, E. and Burgos, L. 2000. "Control of Hyperhydricity in Micropropagated Apricot Cultivars." *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 37 : 250-254.

Piccioni, E. 1997. "Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock." *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 47(2) : 55–60.

Pinhal, H.F. Araruna, E.C. Carneiro, P.A.P. Asmar, S.A. Melo, B. and Luz, J.M.Q. 2017. "Concentration of MS Medium and cutting of seeds on in vitro estrablishment of Baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.)." *Bioscience Journal.* 33(2) : 306-313.

Pinker, I. and Abdel-Rahman, S.S.A. 2005. "Artificial seed for propagation of *Dendranthema* × *grandiflora* (Ramat.)." *Propagation of Ornamental Plants.* 5 : 186–191.

Pond, S. and Cameron, S. 2003. "Tissue culture: artificial seeds." 1379-1388. in Thomas, B. Murphy, D.J. and Murray, B.G. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences.** .Amsterdam : Elsevier Academic Press.

Pradhan, S. Turiwa, B.L. Subedee, B.R. and Pant, B. 2014. "Micropropagation of Cymbidium Aloifolium (L.) Sw., A medical orchid by artificial seeds technology." *Journal of Natural History Museum*. 28 : 42-48.

Preil, W. **Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation.** Dordrecht : Springer. 2005.

Promchot, S. and Boonprakob, U. 2007. "Replacing Agar with Vermiculite, Coconut Fiber and Charcoal Rice Husk in Culture Media for Embryo Recue of Immature Nectarines Seeds." *Thai Journal of Agricultural Science*. 40(3-4) : 167-173.

Rahman, W. Zohora, S. Talukder, A.I. and Kayess, O. 2015. "Effect of Different Hormone Combinations on Callus Induction and Plant regeneration of Strawberry." *International Journal of Advanced Research.* 3(6) : 1244-1250.

Redenbaugh, K. Slade, D. Viss, P. and Fujii, J.A.A. 1987. "Synthetic seed technology for mass cloning of crop plants: problems and perspectives." *Hortscience*. 22 : 796–814.

Redenbaugh, K. and Walker, K. 1990. "Role of artificial seeds in alfalfa breeding." 102–135. In Bhojwani, S.S. **Plant tissue culture : applications and limitations.** Amsterdam : Elsevier Academic Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Redenbaugh, K. Fuji, J.A.A. Slade, D. 1993. "Hydrated coatings for synthetic seeds." 35–46. in : Redenbaugh, K. **Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement.** Boca Raton : CRC Press.

Saher, A. Piqueras, A. Hellin, E. and Olmos, E. 2005. "Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: Implications of oxidative stress" *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 81(2) : 149-158.

Sakila, S. Ahmed, M.B. Roy, U.K. Biswas, M.K. Karim, R. Razvy, M.A. Hossain, M. Islam, R. and Hoque, A. 2007. "Micropropagation of Strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) A Newly Introduced Crop in Bangladesh." *American-Eurasian Journal of Scientific Research.* 2(2) : 151-154.

Sánchez, G.F. García, S.S. Palma López, D.J. Lagunes Espinoza, L.C. Samuel, H.O.L. and Sánchez, C. 2019. "Artificial seed viability of sugarcane (Saccharum officinarum L. cv. Mex 69-290) under conditions of Huimanguillo-Tabasco, Mexico." *Número actual.* 51(2) : 27-41.

Sarkar, D. and Naik, P.S. 1998. "Synseeds in potato: an investigation using nutrient-encapsulated in vitro nodal segments." *Scientia Horticulturae*. 73 : 179-184.

Sarmah, D.K. Borthakur, M. and Borua, P.K. 2010. "Artificial seed production from encapsulated PLBs regenerated from leaf base of *Vanda coerulea* Grifft. ex. Lindl. An endangered orchid." *Current Science.* 98 : 686-690.

Sharma, S. Shahzad, A. Jan, N. and Sahai, A. 2009. "*In vitro* studies on shoot regeneration through various explants and alginate-encapsulated nodal segments of *Spilanthes mauritiana* DC., an endangered medicinal herb." *International Journal of Plant Developmental Biology.* 3 : 56–61.

Singh, B. Sharma, S. Rani, G. Virk, G.S. Zaidi, A.A. and Nagpal, A. 2007. "*In vitro* response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of Kinnow mandarin (Citrus nobilis Lour×C. deliciosa Tenora)." *Plant Biotechnology Reports*. 1 : 101–107.

Standardi, A. and Micheli, M. 2013. "Encapsulation of *In Vitro* - Derived Explants: An Innovative Tool for Nurseries." 397-418. in Lambardi, M. **Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants.** New York : Springer Science+Business Media.

Szekalska, M. PuciBowska, A. SzymaNska, E. , Ciosek, P. and Winnicka, K. 2016. "Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications." *International Journal of Polymer Science.* 8 : 1-17.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tabassum, B. Nasir, I.A. Farooq, A.M. Rehman, Z. Latif, Z. and Husain, T. 2010. "Viability assessment of *in vitro* produced synthetic seeds of cucumber." *African Journal of Biotechnology*. 9 : 7026–7032.

Thomas, T.D. 2003. "Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry." *Biologia Plantarum.* 46 : 529-533.

Timbert, R. Barbotin, J.N. and Thomas, D. 1996. "Enhancing carrot somatic embryo survival during slow dehydration, by encapsulation and control of dehydration. *PlantSci*. 120 : 215–222.

Valles, M. and Boxus, P. 1987. "Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars." *Acta horticulturae*. 212 : 611-617.

Waghmare, S.G. Pawar, K.R. Tabe, R.H. and Jamdade, A.S. 2017. "Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) Var.Camarosa." *Global Journal of Bio-science and Biotechnology.* 6(2) : 309-313.

West, T.P. and Preece, J.P. 2009. "Bulk alginate encapsulation of *Hibiscus moscheutos* nodal segments." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 97 : 345–351.

Wu, M.C. Hou, C.Y. Jiang, C.M. and Wang, Y.T. 2007. "A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings." *Food Chemistry.* 101(4) : 1753-1758.

Zatyko, J.M. Kiss, J. Radics, Z. and Simon, I. 1989. "Initiation of strawberry runner formation *in vitro*." *Acta Horticulturae.* 265 : 349-352.

Zobayer, N. Shamsul, H.P. Sikdar, S.U. Azim, S. and Ashrafuzzaman, M. 2011. "STUDY OF SHOOT MULTIPLICATION OF STRAWBERRY (*Fragaria ananassa*)." *International Journal of Agricultural Research Innovation and Technology*. 1 : 69-72.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไปและชักนำการเกิดแคลลัส แสดงดังตารางที่ 5.1 ดังนี้

ตารางที่ 5.1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
FeSO4.7H2O	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100
Agar	8000
Sucrose	30000
pH 5.7	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับการชักนำการเจริญของเมล็ดสตรอว์เบอร์รี ชักนำให้เกิดแคลลัส ออร์แกโนเจเนซิส ชักนำให้เกิดการยืด ชักนำให้เกิดราก ชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและชักนำให้เกิดการงอของเมล็ดเทียม ใช้อาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์สูตร MS ปริมาตร 4.43 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่า pH ของอาหารประมาณ 5.6-5.8 ผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโคไคนินและออกซินที่ต้องการทดสอบ และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูงอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยเทอาหารเพาะเลี้ยงใส่ขวดขนาด 8 ออนซ์ ปริมตร 20 มิลลิลิตร ขวดขนาด 4 ออนซ์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร หรือหลอดทดลองปริมาตร 15 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายปราการ ชมบูรณ์

วัน เดือน ปีเกิด วันจันทร์ที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน 188/59 หมู่ 8 ถนนเทพารักษ์ ตำบลเทพารักษ์ อำเภอเมืองสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ 10270

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2559 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 2.62 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2563 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลงานทางวิชาการ

Chomboon P. and Lohasupthawee, P. 2022. "Mass Propagation System of Strawberry (Fragaria × ananassa) Microshoots by Liquid Shake Culture." *Current Applied Science and Technology*. *22*(1) : 1-12.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Current Applied Science and Technology Vol. 22 No. 1 (January-February 2022)

Research article

Mass Propagation System of Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Microshoots by Liquid Shake Culture

Prakarn Chomboon and Pana Lohasupthawee*

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

Received: 2 December 2020, Revised: 5 May 2021, Accepted: 27 May 2021

DOI.....

Keywords

hyperhydric;
liquid shake culture;
mass propagation;
microshoots;
strawberry

Abstract

The future of strawberry propagation and sales is very positive, so an efficient mass propagation system for strawberry (*Fragaria × ananassa*) was developed in this study. Strawberry leaf explants successfully induced green compact calli in semi-solid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA within 2 weeks. Subculture the calli in semi-solid MS medium supplemented with 1 mg/l TDZ and 0.2 mg/l 2,4-D produced 3.8 microshoots per callus within 49-56 days. These leaf-derived calli with adventitious shoots were cultured with 0.1 mg/l GA_3 and shaken at 120 rpm. The number of shoots increased from 15.3 shoots to 43.6 shoots per culture (100 ml) within 2 weeks, but all were hyperhydric shoots. Hyperhydric shoots recovered to normal shoots within 1 month when cultured on semi-solid MS medium with 8 g/l agar. Shoots formed roots on semi-solid MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA within 2 weeks. Rooted plantlets were acclimatized for 1 week before being transferred to the field at Bendito farm, where the strawberry plants were grown until maturity.

1. Introduction

Strawberry (*Fragaria × ananassa*) is one of the economically important fruits in Thailand, and it is mainly cultivated in the northern part of Thailand, a region of appropriate temperature and humidity for its propagation. Increased consumption of strawberry has not only been associated with its alluring color, scent and taste but also a source of useful compounds such as vitamin C, flavonoids, anthocyanins and other polyphenols [1]. The health benefits of strawberries have been the subject of many studies over recent decades. It has been demonstrated that this fruit exerts a wild range of biological activities such as antioxidant, cardioprotective effects and anti-inflammatory properties [2]. These activities have been attributed to the fruit's high level of polyphenols. Strawberry can be used as raw material for flavouring agent in food and beverage products.

*Corresponding author: E-mail: pana_lohasupthawee@hotmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The cultivated strawberry is a dicotyledonous, perennial and low-growing herb. Conventional methods for vegetative propagation of strawberry are labor-intensive and offer low production of plants from a selected genotype. Tissue culture is one of the useful methods for mass propagation in a short time, preserving the genetic characteristics of the mother plants [3]. This method has been applied to many plants [4, 5], including the strawberry [6].

Earlier work on strawberry micropropagation was reported more than 30 years ago [7]. Strawberry leaf explants have been shown to have high regeneration rates [8-10]. In 1990, James *et al*. [11] reported the highest regeneration rates when using the youngest leaves explants. There have been many research studies on strawberry regeneration [12-15] but there are still problems with regeneration reported. For example, the highest percentage of shoot regeneration was only 4% [16], which was not suitable for commercialization.

The technique of microshoot culture in liquid medium, either under stationary [17] or shaking [18] conditions, allows the nutrient medium and plant growth regulators to stimulate and support the development and growth of multiple axillary buds. Continuous shaking medium causes the disappearance of apical dominance in microshoots, and thus leads to the induction and proliferation of axillary buds. Liquid cultures also dilute the toxic compounds (phenols) released by the shoots, producing culture oxidation and browning which usually occur in semi-solid medium. Nhut *et al*. [19] reported on the rapid mass shoot propagation of *Gladiolus* by liquid shake culture which produced 216 shoots in 50 ml MS liquid medium after three subcultures within 45 days. However, liquid culture can cause hyperhydricity of plantlets.

Therefore, the aims of this study were to determine the appropriate growth regulator for callogenesis and indirect organogenesis of strawberry leaf explants, establish the best suspension culture for mass propagation, facilitate recovery of hyperhydric shoots, promote root induction, acclimatize plantlets in peat moss, and finally transfer to the field.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material and surface sterilization

Strawberry (*Fragaria × ananassa*) seeds were obtained from Bendito Farm, Mae Hong Son, Thailand. The seeds were surface sterilized with 20% clorox® containing 1 drop of Tween-20 per 100 ml for 20 min with occasionally shaking. The seeds were then removed and washed three times with sterile distilled water. Finally, the seeds were cultured on semi-solid MS medium [20] without plant growth regulators and incubated in a cultured room for 7 days in order to examine microbial contamination. The healthy seedlings were continually grown on MS medium for 2 months, after which the plantlets were used as a source of explants.

2.2 Callogenesis

In vitro leaf explants (0.5 cm long) were cultured on semi-solid MS media supplemented with 0.5, 1, 2 and 4 mg/l NAA or 2,4-D in combination with 0.5 and 1 mg/l BA. MS medium without plant growth regulators was used as control. The cultures were kept under 2000 lx light for 16 h per day at 25±2°C. The observed parameters for the callogenesis experiment were degree of callus formation, texture and color of callus, days for callus initiation and callogenesis percentage (%). Number of days of callus initiation was started from the inoculation of the explants and the other data was recorded after 4 weeks. Each treatment consisted of 15 replicates.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Current Applied Science and Technology Vol. 22 No. 1 (January-February 2022)

2.3 Shoot proliferation from leaf-derived callus

Light green compact calli from the callogenesis experiment were cultured on semi-solid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA for 4 weeks in order to use the explant in this experiment. Callus pieces (ca. 100 mg fresh weight) were subcultured on semi-solid MS media supplemented with 0.5, 1 or 1.5 mg/l TDZ in combination with 0.02 or 0.2 mg/l 2,4-D. MS medium without plant growth regulators was used as control. The cultures were kept under 2000 lx light for 16 h per day at 25±2°C. The observed parameters for shoot proliferation experiment were shoot regeneration percentage (%), days for shoot induction, and number of microshoots per explant. The number of days for shoot induction was started from the inoculation of the callus and the other data was recorded after 8 weeks. Each treatment consisted of 15 replicates.

2.4 Mass propagation of microshoots in liquid shake cultures

Leaf derived calli with adventitious shoots (ca. 3 g fresh weight per culture) were inoculated in 100 ml liquid MS media with different concentrations of GA_3 (0.1, 0.5, 1 and 2 mg/l). MS liquid medium without plant growth regulators was used as control. The cultures were shaken at 120 rpm on an orbital shaker and kept under 2000 lx light for 16 h per day at 25±2°C. The observed parameters for mass propagation experiment were length of longest petiole, number of shoots per culture and the dry weight growth index. The data were recorded within 2 weeks. The dry weight growth index was measured using equation 1. Each treatment consisted of 15 replicates.

$$\text{Dry weight growth index} = \frac{DW_2 - DW_1}{DW_1} \quad (1)$$

Where: DW_1 = Initial dry weight of calli with adventitious shoots (first day of culture) (g/culture)
DW_2 = Final dry weight of microshoots (after 14 days of culture) (g/culture)

2.5 Effect of agar concentration on hyperhydric shoots

Two weeks old hyperhydric shoots (1 cm) from the mass propagation experiment were cultured on semi-solid MS media supplemented with different agar concentrations (8, 10, 12 and 14 g/l) without plant growth regulators. The cultures were kept under 2000 lx light for 16 h per day at 25±2°C. The observed parameters for this experiment were percentage of water content, fresh matter, dry matter and root formation percentage (%). The percentage of water content was measured using equation 2 [21]. The data were recorded within 4 weeks. Each treatment consisted of 15 replicates.

$$\text{Water content per shoot (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (2)$$

where: m_1 = Fresh weight (mg/shoot) and m_2 = Dry weight (mg/shoot)

2.6 Effect of growth regulators on the rooting of the plants

Healthy shoots (2 cm) without roots from the previous experiment were transferred to MS media supplemented with only NAA or IBA (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg/l). MS medium without plant growth regulators was used as control. The cultures were kept under 2000 lx light for 16 h per day at 25±2°C. The observed parameters for the root induction experiment were root formation percentage (%), days for root induction, average number of roots per culture and root morphology. The observation of number of day till the root induction was started following the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

shoot inoculation and the other data was recorded 4 weeks later. Each treatment consisted of 15 replicates.

2.7 Acclimatization of plantlets

Regenerated plants, with strong stems and healthy root systems, were selected and thoroughly washed with tap water to remove any traces of agar before transferring into pots containing sterile peat moss, covered with a plastic bag that was gradually opened during the acclimation period. Plants were maintained in a culture room under 2000 lx light for 16 h per day at 25±2°C and watered every other day for 1 week. Acclimatized plants were transferred to the field of Bendito farm in Mae Hong Son.

2.8 Statistical analyses

Statistical parameters, such as percentage, mean, and standard deviation, were estimated using Microsoft Office Excel program and the data were analyzed by Duncan's multiple range test (DMRT) at $P \leq 0.05$ with SPSS ver. 23

3. Results and Discussion

3.1 Callogenesis

There was a wide range of variation in days for callus initiation, callogenesis percentage (%), degree of callus formation, callus characteristics (texture and color), depending on various concentrations of plant growth regulator application. In Table 1, the results showed that auxin (2,4-D and NAA) alone promoted callus induction and took a minimum of 7-14 days for callusing but the calli were creamy and soft in texture (Figure 1A). Friable callus occurred in MS medium with auxin alone because auxin plays a major role in controlling cell elongation, which consists of two interrelated processes; osmotic uptake of water and extension of the cell wall [22]. The combination of cytokinin (BA) and auxin (2,4-D and NAA) produced better results compared to the use of auxin alone. The combination of 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA produced maximum callogenesis percentage (100%) and minimum days for callus induction (7-14 days) and the calli were light green compact (Figure 1B). The auxin:cytokinin ratio plays an important role in the formation of cell phenotype, and in the regulation of organogenesis *in vitro* and plant morphogenesis [23]. Several researches reported that green calli with hard texture and good regeneration ability could be used for shoot proliferation [24-26]. In MS medium without any plant growth regulators, it was found that there was no callogenesis.

Our result was concomitant with Ara *et al.* [15] who found that the best response in callus induction of strawberry on MS medium was with 1.0 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA, 2 weeks after culture.

3.2 Shoot proliferation from leaf-derived callus

Diengngan and Murthy [27] found that TDZ was significantly better than BA in the performance of *in vitro* shoot response of strawberry nodal segments. Debnath [28] also reported that TDZ was more effective for plant regeneration from leaves of strawberry. In this experiment, shoot regeneration from leaf derived calli of strawberry cultured on MS medium with combination of 2,4-D and TDZ were summarized in Table 2. The results showed that green callus happened in every treatment after 4 weeks, and adventitious buds appeared on these green calli resulting in microshoots

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

within 49-56 days of culture. The best shoot regeneration percentage was observed on MS medium

Table 1. Effect of different concentrations of 2,4-D or NAA in combination with BA on callus induction of strawberry leaf explants after 4 weeks of culture

Plant growth regulators (mg/l)			Days for callus initiation	Callogenesis percentage (%)	Color and texture of callus	Degree of callus formation
2,4-D	NAA	BA				
0		0	-	0	-	-
0.5		0	7-14	80	CrFr	+
1.0		0	7-14	93	CrFr	++
2.0		0	7-14	93	CrFr	+++
4.0		0	14-21	80	CrFr	++
0.5		0.5	7-14	100	LGrCom	++
1.0		0.5	7-14	100	LGrCom	+++
2.0		0.5	7-14	100	LGrCom	+
4.0		0.5	7-14	100	LGrCom	++
0.5		1.0	14-21	93	LGrCom	++
1.0		1.0	14-21	93	LGrCom	+
2.0		1.0	14-21	93	LGrCom	+++
4.0		1.0	14-21	73	LGrCom	+
	0.5	0	7-14	100	CrFr	+
	1.0	0	7-14	53	CrFr	++
	2.0	0	14-21	73	CrFr	++
	4.0	0	14-21	80	CrFr	+
	0.5	0.5	14-21	73	CrCom	+
	1.0	0.5	14-21	100	LGrCom	+
	2.0	0.5	14-21	93	CrCom	++
	4.0	0.5	14-21	60	LGrCom	++
	0.5	1.0	21-28	80	LGrCom	++
	1.0	1.0	21-28	73	LGrCom	+
	2.0	1.0	21-28	100	LGrCom	++
	4.0	1.0	21-28	100	LGrCom	+

Note: Com = Compact, Fr = Friable, LGr = Light Green, Cr = Creamy
+ = Slight callus growth, ++ = Moderate callus growth, +++ = Massive callus grow, - = no callus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 1. Texture and color of callus initiated from leaves explants in MS medium with different plant growth regulators. A) Creamy and soft texture callus in MS medium with auxin alone, B) Light green compact callus in MS medium with combination of auxin and cytokinin

Table 2. Effect of different concentrations of TDZ in combination with 2,4-D for shoot proliferation of strawberry (*Fragaria × ananassa*) after 8 weeks of culture

Plant growth regulators (mg/l)		Days for shoot proliferation	Shoot proliferation percentage (%)	Average number of shoots per callus (Mean±SD)
TDZ	2,4-D			
0	0	-	0	0e
0.5	0.02	49-56	13	0.6±1.59e
1.0	0.02	49-56	53	2.0±1.96bc
1.5	0.02	49-56	40	1.5±1.92cd
0.5	0.2	49-56	40	1.5±1.99cd
1.0	0.2	49-56	73	3.8±2.42a
1.5	0.2	49-56	33	1.4±2.32cd

Mean values with different letters in each column are significantly different according to Duncan's test at $P < 0.05$.

with 1 mg/l TDZ and 0.2 mg/l 2,4-D (73%), which gave the maximum number of shoots per callus (3.8 shoots/callus) as shown in Figure 2. Our result was concomitant with Passey *et al.* [29] who found the best response in shoot regeneration of strawberry on MS medium with 1.0 mg/l TDZ and 0.2 mg/l 2,4-D. However, all shoots obtained in the medium with TDZ and 2,4-D could not form any root.

3.3 Mass propagation of microshoots in liquid shake cultures

Suspension cultures provide an alternative and potentially more economic method for mass propagation. In this study, the influences of gibberellic acid (GA_3) on strawberry microshoot culture growth and development were investigated in suspension culture. Litwinczuk *et al.* [30] found that GA_3 significantly increased the number of axillary shoots of strawberry cultured in semi-solid medium. The present investigation is concomitant with the report by Litwinczuk *et al.* [30]. Table 3 showed that the number of shoots per culture in MS medium supplemented with GA_3 (0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l) was significantly increased within 2 weeks of culture when compared to the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Current Applied Science and Technology Vol. 22 No. 1 (January-February 2022)

MS medium without GA_3. Two mg/l GA_3 significantly increased the growth of microshoots (growth index = 25.62) which showed the highest elongation of petioles (1.23±0.08 cm). The highest number of proliferated shoots was found in MS medium supplemented with 0.1 mg/l GA_3 (43.6 shoots per culture) (Figure 3). However, the growth index was 14.06 because there was no elongation of petiole. In general, GA_3 at high concentration could increase elongation of shoot [31] but low concentration could increase the number of shoot formation [32]. For mass propagation of microshoots in liquid shake culture, the suitable GA_3 concentration was 0.1 mg/l. However, the proliferated shoots were hyperhydric with translucent, fragile leaves and without root formation. These characteristics are mainly caused by the high level of water available in cultures [33]. Hyperhydric shoots are the cause of considerable loss in commercial plant micropropagation. Reversion of shoot hyperhydricity was investigated in the next study.

3.4 Effect of agar concentration on hyperhydric shoots

The hyperhydric shoots derived from the previous experiment were cultured on MS media with different concentrations of agar. Casanova *et al.* [34] found that the hyperhydricity of adventitious

Figure 2. Shoot regeneration from leaf-derived callus cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l TDZ and 0.2 mg/l 2,4-D after 49-56 days

Table 3. Effect of different concentrations of GA_3 for shoot proliferation in liquid shake cultures after 2 weeks of culture

Plant growth regulators (mg/l) GA_3	Longest petiole length (cm) (Mean±SD)	Average number of shoots per culture (Mean±SD)	Average Dry weight growth index (Mean±SD)
0	0.47±0.03d	15.3±1.52d	6.58±0.80c
0.1	0.59±0.08cd	43.6±1.15a	14.06±1.61b
0.5	0.73±0.07bc	32.6±1.52c	15.29±1.62b
1.0	0.81±0.09b	34.3±3.05c	23.67±2.44a
2.0	1.23±0.08a	38.0±3.00b	25.62±2.28a

Mean values with different letters in each column are significantly different according to Duncan's test at $P < 0.05$.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Current Applied Science and Technology Vol. 22 No. 1 (January-February 2022)

Figure 3. Mass propagation of microshoots in MS liquid medium supplemented with 0.1 mg/l GA_3 using a liquid shake culture system

shoots decreased when the agar concentration of MS medium was increased. The present investigation is concomitant with the report by Casanova *et al.* [34]. Plantlet hyperhydricity can be measured by water content and fresh matter of the plantlets. Table 4 showed that increasing the agar concentration in the medium resulted in decreasing the fresh matter and the water content of plantlets. We found that the water content of hyperhydric plantlets in the suspension culture was 92.5%. After 4 weeks of culture in 8g/l agar medium, 100% of the hyperhydric plantlets attained normal development. The normal plantlets had water content of 90%. However, we found that the higher the concentration of agar in the medium, the lower percentage of root formation in the plantlets (Table 4). Due to nutrient uptake limitation in higher agar concentrations, root production and growth of the plantlets was decreased. Thus, 8 g/l agar in the MS medium was the most suitable for reversion of shoot hyperhydricity.

3.5 Effect of growth regulators on the rooting of the plants

Based on frequency of rooting, number of roots and root germinated time, all treatments with IBA and NAA induced roots, but the highest mean number of roots (13.1±2.41) was recorded in the medium supplemented with 0.5 mg/l IBA, which started root initiation within 7-14 days of inoculation (Table 5). This indicated that NAA resulted in thicker and short roots in contrast to IBA containing medium. Callusing at the base of the shoots was observed in all MS medium that contained NAA. It was found that the higer the NAA concentration, the higher the callus formation. NAA mades roots shorter, which in turn caused less growth for roots in acclimatization medium.

3.6 Acclimatization of plantlets

Strawberry plantlets were grown *in vitro* with medium containing sugar and nutrients under high humidity and low light intensity in aseptic conditions, so they needed acclimatization in order to survive in the field. Usually, the stomata and root systems of cultured plants are poorly developed, so direct transfer to *ex vitro* conditions causes high mortality of the plantlets. In order to increase growth and reduce mortality in the plantlets at the acclimatization stage, the strawberry plantlets were grown in pots containing sterile peat moss, covered with plastic bags and maintained in the culture room for 1 week. After 1 week, the plastic bag covers were taken off, and 98% of the acclimatized plantlets were able to be transferred to the field of Bendito farm, in Mae Hong Son. All the plants transferred to the field were grown until maturity as shown in Figure 4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4. Effect of different concentrations of agar on the reversion of shoot hyperhydricity after 4 weeks of culture

Agar concentration (g/l)	Water content per shoot (%) (Mean±SD)	Average fresh weight matter (mg/shoot) (Mean±SD)	Average dry weight matter (mg/shoot) (Mean±SD)	Root formation percentage (%)
8	90±0.19a	347.0±7.19a	33.8±0.11a	53
10	88±1.63ab	214.5±5.48b	22.3±0.09a	46
12	87±1.24ab	211.9±9.76b	27.3±0.33a	20
14	82±1.13b	169.2±4.15c	30.0±0.43a	20

Mean values with different letters in each column are significantly different according to Duncan's test at $P < 0.05$.

Table 5. Effect of different concentrations of NAA or IBA on root induction of strawberry plantlets (*Fragaria × ananassa*) after 4 weeks of culture

MS + Plant growth regulators (mg/l)		Days of root initiation	Root formation (%)	Number of roots/culture (Mean±SD)	Root morphology
NAA	IBA				
0		21-28	100	9.5±1.77bc	Thin, long
0.01		14-21	100	10.2±1.57ab	Thick, short, callus at base
0.02		21-28	90	8.9±1.09bc	Thick, short, callus at base
0.03		21-28	100	6.0±0.83def	Thick, short, callus at base
0.04		28-35	80	5.8±1.34ef	Thick, short, callus at base
0.05		21-28	70	5.4±1.41ef	Thick, short, callus at base
0.1		21-28	100	7.9±1.26cd	Thick, short, callus at base
0.2		21-28	90	6.1±1.75de	Thick, short, callus at base
0.3		21-28	70	6.3±1.00de	Thick, short, callus at base
0.4		21-28	60	1.3±0.21h	Thick, short, callus at base
0.5		21-28	80	2.1±0.64h	Thick, short, callus at base
	0.01	21-28	80	8.25±1.98cd	Thin, long
	0.02	7-14	60	7.8±1.40cd	Thin, long
	0.03	7-14	60	5.1±2.36efg	Thin, long
	0.04	14-21	60	3.1±0.77g	Thin, long
	0.05	14-21	50	5.3±1.37ef	Thin, long
	0.1	14-21	100	7.7±1.62cde	Thin, long
	0.2	7-14	100	9.3±1.34bc	Thin, long
	0.3	14-21	90	9.2±2.32bc	Thin, long
	0.4	14-21	100	10.0±1.38ab	Thin, long
	0.5	7-14	100	13.1±2.41a	Thin, long

Mean values with different letters in each column are significantly different according to Duncan's test at $P < 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 4. Acclimatized strawberry plantlets transferred to the field of Bendito farm, in Mae Hong Son, after 2 months

4. Conclusions

From leaf explants to whole plant within 5 months through indirect organogenesis has proved to be a reliable method for mass propagation of strawberry, and especially in liquid shake culture. However, liquid media may produce hyperhydric plantlets which need a recovery process if they are to develop into normal plants. Somaclonal variation may occur since these plantlets were formed from callus. Further investigation is needed to better assess the performance and the genetic variations of these plantlets.

5. Acknowledgements

This research project were financially supported by Talent Mobility Program (National Science Technology and innovation Policy Office, Thailand), Bendito Farm Co., Ltd., and Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

References

[1] de Souza, V.R., Pereira, P.A., da Silva, T.L., de Oliveira L.L.C., Pio, R. and Queiroz, F., 2014. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.

[2] Amatori, S., Mazzoni, L., Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Provenzano, A.E., Persico, G., Mezzetti, B., Amici, A., Fanelli, M. and Battino, M., 2016. Polyphenol-rich strawberry extract (PRSE) shows *in vitro* and *in vivo* biological activity against invasive breast cancer cells. *Scientific Reports*, 6, 30917, https://doi.org/10.1038/srep30917.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[3] Donnoli, R., Sunseri, F., Martelli, G. and Greco, I., 2001. Somatic embryogenesis, plant regeneration and genetictransformation in *Fragaria* spp. *Acta Horticulturae*, 560, 235-240.
[4] Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J.L., Nuñez-Palenius, H.G. and Ochoa-Alejo, N., 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43, 660-665.
[5] Martin, K.P., Joseph, D., Madassery, J. and Philip, V.J., 2003. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andreanum*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39, 500-504.
[6] Hasan, M.N., Nigar, S., Rabbi, M.A.K., Mizan, S.B. and Rahman, M.S., 2010. Micropropagation of strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). *International Journal of Sustainable Crop Production*, 5(4), 36-41.
[7] Miller, A.R. and Chandler C.K., 1990. Plant regeneration from excised cotyledons of mature strawberry achenes. *HortScience*, 25(5), 569-571.
[8] Nehra, N.S., Stushnoff, C. and Kartha, K.K., 1990. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant Science*, 66(1), 119-126.
[9] Liu, Z.R. and Sanford, J.C., 1988. Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner culture. *HortScience*, 23, 1056-1059.
[10] Nehra, N.S., Stushnoff, C. and Kartha, K.K., 1989. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114, 1014-1018.
[11] James, D.J., Passey, A.J. and Barbara, D.J., 1990. Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. *Plant Science*, 69(1), 79-94.
[12] Șuțan, A.N., Popescu, A. and Isac, V., 2010. *In vitro* culture medium and explant type effect on callogenesis and shoot regeneration in two genotypes of ornamental strawberry. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 12-17.
[13] Moradi, K., Otroshy, M. and Azimi, M.R., 2011. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1755-1763.
[14] Folta, K.M., Dhingra, A., Howard, L., Stewart, P.J. and Chandler, C.K., 2006. Characterization of LF9, an octoploid strawberry genotype selected for rapid regeneration and transformation. *Planta*, 224, 1058-1067.
[15] Ara, T., Karim, R., Karim, M.R., Islam, R. and Hossain, M., 2012. Callus induction and shoot regeneration in strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). *International Journal of Biosciences*, 2, 93-100.
[16] Debnath, S.C., 2006. Zeatin overcomes thidiazuroninduced inhibition of shoot elongation and promotes rooting in strawberry culture *in vitro*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 81, 349-354.
[17] Preece, J.E., 2010. Micropropagation in stationary liquid media. *Propagation of Ornamental plants*, 10(4), 183-187.
[18] Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., Tzoulis, T. and Eleftheriou, E., 2005. Experimental use of a novel temporary immersion system for liquid culture of olive microshoots. In: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil, eds. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Dordrecht: Springer, pp. 263-274.
[19] Nhut, D.T., Teixeira da Silva, J.A., Huyena, P.X. and Paek, K.Y., 2004. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. *Scientia Horticulturae*, 102(4), 407-414.
[20] Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้