ผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* L.)

EFFECTS OF MEDIUM AND GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* PROPAGATION OF NECKLACE POD (*Sophora tomentosa* L.)

ณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์

NATTIKA RUNGPRATEEPPAIBOON

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2567
KMITL-2024-SC-M-020-022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF MEDIUM AND GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* PROPAGATION OF NECKLACE POD (*Sophora tomentosa* L.)

NATTIKA RUNGPRATEEPPAIBOON

A THESIS SUBMITTED IN 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
2024

KMITL-2024-SC-M-020-022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2024
SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* L.)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์
รหัสประจำตัว	62605066
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเพื่อศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* L.) พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสารพัดพิษด้วยเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) และเมอร์คิวริกคลอไรด์ (0.1 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ cefotaxime และ PPM (1 มิลลิลิตรต่อลิตร) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ จากนั้นเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP GA_3 kinetin *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากทราบว่า BAP และ GA_3 มีความเหมาะสมต่อการเกิดยอดของเมล็ด จึงศึกษาระดับความเข้มข้นเพิ่มเติมคือ 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงสรุปได้ว่า BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เมล็ดเกิดยอดได้มากที่สุด (3.33 ยอดต่อเมล็ด) และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีความยาวมากที่สุด (51.88 มิลลิเมตร) และศึกษาผลของความเค็มต่อการเกิดยอด โดยเติม NaCl ความเข้มข้น 0.5 1 2 หรือ 3 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเค็มส่งผลให้ร้อยละการเกิดยอดและจำนวนยอดลดลง

จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงต้นสารพัดพิษโดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปราศจากแสงเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าความเข้มข้นอื่นทั้ง 2 สภาวะการเพาะเลี้ยง และแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสงมีสีเขียวมากกว่า ซึ่งอาจสามารถชักนำต่อให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้

จากการศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดจากตายอดของต้นสารพัดพิษ โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP GA_3 kinetin *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TDZ (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งผลให้เกิดยอดหลายยอดมากที่สุด แต่กลุ่มยอดนี้ไม่สามารถเจริญต่อเป็นยอดใหม่ได้ แต่ *m*T สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดที่มีลักษณะพร้อมเจริญไปเป็นยอดใหม่ได้ และ GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มความสูงของยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มากที่สุด จึงได้มีการใช้ GA_3 ร่วมกับ *m*T พบว่าที่ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดที่สามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้มากที่สุด (21.60 ยอดต่อขวด)

การศึกษาการชักนำให้เกิดรากของต้นสารพัดพิษบนอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS ร่วมกับ 2,4-D IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วย AC 1 กรัมต่อลิตร พบว่าสูตรที่เสริม IAA (0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 33.33 และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด (5.40 รากต่อยอด) นำไปปรับสภาพเป็นเวลา 16 สัปดาห์ โดยใช้พีทมอสร่วมกับเพอร์ไรท์ (2 : 1) เป็นวัสดุปลูก และรดด้วย 1/4 MS ปราศจากน้ำตาลทุกสัปดาห์ ในการปรับสภาพสัปดาห์ที่ 16 พบว่าต้นสารพัดพิษมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 60

คำสำคัญ : การชักนำแคลลัส การชักนำยอดหลายยอด การชักนำราก การเพิ่มความยาวยอด ต้นสารพัดพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Effects of Medium and Growth Regulators on *In Vitro* Propagation of Necklace Pod (*Sophora tomentosa* L.)
Student Name	Miss Nattika Rungprateeppaiboon
Student ID	62605066
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2024
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Anurug Poeaim
Thesis Co-advisor	Dr. Piyarat Parinyapong Chareonsap

Abstract

This thesis aims to study the suitable medium and plant growth regulators for *in vitro* propagation of *Sophora tomentosa*. Seeds were surface sterilized by ethanol (70%) and the solution of mercuric chloride (0.1%) with cefotaxime and PPM (1 mL/L) was found to be an effective method for seed surface sterilizing. The seeds were cultured on MS medium supplemented with BAP, GA_3, kinetin, *m*T and TDZ at 1 mg/L. After finding that BAP and GA_3 are suitable for shoot germinating, 0.5 and 2 mg/L of BAP and GA_3 were further studied. It could be reported that 1 mg/L of BAP could induce the seed to have the maximum number of multiple shoots (3.33 shoots/seed). Moreover, 2 mg/L of GA_3 showed the highest average shoot length (51.88 mm.), studying salinity's effect on multiple shoot formation by adding 0.5, 1, 2 or 3% of NaCl to MS medium with 1 mg/L BAP. The salinity affected to reduce the shoot formation rate and the number of shoots.

Callus induction was worked on MS medium supplemented with 2,4-D at 1, 2 and 3 mg/L. Cotyledons of *S. tomentosa* were cultured under darkness conditions compared to photoperiod conditions (16 hrs/day). Found that 2 mg/L of 2,4-D with both conditions of culturing is more effective in inducing callus from cotyledon than other concentrations of 2,4-D, but photoperiod condition induced friable white-green callus that it would be developed to be new shoots.

Multiple shoot induction and elongation were investigated using MS medium added by BAP, GA_3, kinetin, *m*T and TDZ at 1 and 2 mg/L. the result showed that 2 mg/L TDZ could induce the most significant number of multiple shoots, but these groups of shoots could not develop into shoots. While *m*T could induced to form multiple shoots that could become new shoots. GA_3 at 1 mg/L can elongate the shoot length more than other regulators. From the results, the combination of GA_3 and *m*T was used to induce and elongate the multiple shoots simultaneously. GA_3 combined

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

with *m*T at 2 mg/L showed the best result for multiple shoot induction (21.60 shoots/culture).

Rooting was induced using 1/2 MS medium augmented by 2,4-D, IAA, IBA and NAA at 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/L and added by 1 g/L AC. Rooting was formed in 1/2 MS with 0.25 mg/L IAA (33.33% rooting). IAA had the most significant average root (5.40 roots/shoot). The healthy shoots with well-developed roots were transferred to acclimatize under greenhouse conditions using peat moss mixed with perlite (2:1) as potting media and watering by 1/4 MS without sucrose every week. At 16 weeks of acclimatization, 60% of plantlets successfully survived.

Keywords : Callus induction, Multiple shoot induction, Root induction, Shoot elongation, *Sophora tomentosa*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “ผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* L.)” ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่าง ๆ ด้วยความใส่ใจเป็นอย่างยิ่ง ตลอดจนการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์เจริญทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการแก้ไขข้อบกพร่องให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม สำหรับการอนุเคราะห์ตัวอย่างของต้นสารพัดพิษและจัดหาทุน ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2566 สัญญาเลขที่ N21A661218 ในโครงการเรื่อง การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นสารพัดพิษ เพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว ขอบคุณเพื่อน ๆ และทุกท่านที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจทุกท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้เขียนต้องขออภัยเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
กิตติกรรมประกาศ..... จ
สารบัญ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญรูป..... ฌ
คำย่อ/สัญลักษณ์..... ญ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 ข้อมูลทั่วไปของต้นสารพัดพิษ..... 3
2.1.1 การจัดจำแนกอนุกรมวิธาน..... 3
2.1.2 ต้นสารพัดพิษ..... 3
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 4
2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 4
2.2.1.1 ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง..... 4
2.2.1.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 5
2.2.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช..... 6
2.2.1.4 แสงและอุณหภูมิ..... 7
2.2.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 8
2.2.2.1 การทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ..... 8
2.2.2.2 การเพิ่มจำนวนยอด..... 9
2.2.2.3 การชักนำให้เกิดราก..... 12
2.2.2.4 การย้ายออกปลูก..... 12
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 18
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... 18
3.1.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา..... 18
3.1.2 สารเคมี..... 18
3.1.2.1 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง....18
3.1.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต....18
3.1.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ....18
3.1.2.5 อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ 19
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย....19
3.2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ....19
3.2.1.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง....19
3.2.1.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลายยอด....21
3.2.1.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส....22
3.2.1.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอด....22
3.2.1.5 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก....23
3.2.2 วิธีการนำต้นอ่อนออกปลูก....23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล....24
4.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสารพัดพิษที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง....24
4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลายยอด....25
4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส....28
4.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอด....30
4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก....34
4.6 ผลการนำต้นอ่อนออกปลูก....36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ....38
5.1 สรุปผลการวิจัย....38
5.2 ข้อเสนอแนะ....39
เอกสารอ้างอิง....40
ภาคผนวก....44
ภาคผนวก ก....45
ประวัติผู้เขียน....46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ลำดับการฟอกและรูปแบบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างเมล็ดด้วยวิธีต่าง ๆ..... 20
4.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสารพัดพิษเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์..... 25
4.2 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดสารพัดพิษในอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 27
4.3 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงต้นสารพัดพิษในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะปราศจากแสงเปรียบเทียบกับสภาวะมีแสง เป็นเวลา 6 สัปดาห์..... 29
4.4 แสดงร้อยละการเกิดยอดหลายยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยหลังจากเพาะเลี้ยงตายอดในอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....32
4.5 แสดงร้อยละการเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยหลังจากเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย AC 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D หรือ IAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์..... 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะของต้นสารพัดพิษ (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) ฝักเมล็ด..... 3
3.1 (ก) แสดงลักษณะของเมล็ดสารพัดพิษที่สมบูรณ์ (ข) เมล็ดสารพัดพิษที่ไม่สมบูรณ์..... 20
4.1 แสดงลักษณะเมล็ดสารพัดพิษที่ปนเปื้อนเชื้อรา (ก) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ข) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 25
4.2 แสดงลักษณะยอดจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) BAP 0.5 มก./ล. (ค) BAP 1 มก./ล. (ง) BAP 2 มก./ล. (จ) GA_3 0.5 มก./ล. (ฉ) GA_3 1 มก./ล. (ช) GA_3 2 มก./ล. (ซ) kinetin 1 มก./ล. (ฌ) *m*T 1 มก./ล. (ญ) TDZ 1 มก./ล. (ฎ) BAP 1 มก./ล. + 0.5% NaCl (ฏ) BAP 1 มก./ล. + 1% NaCl..... 28
4.3 แสดงลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ก) สภาวะปราศจากแสง 1 มก./ล. (ข) สภาวะปราศจากแสง 2 มก./ล. (ค) สภาวะปราศจากแสง 3 มก./ล. (ง) สภาวะมีแสง 1 มก./ล. (จ) สภาวะมีแสง 2 มก./ล. (ฉ) สภาวะมีแสง 3 มก./ล. 30
4.4 แสดงลักษณะยอดต้นสารพัดพิษที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) BAP 1 มก./ล. (ค) BAP 2 มก./ล. (ง) GA_3 1 มก./ล. (จ) GA_3 2 มก./ล. (ฉ) kinetin 1 มก./ล. (ช) kinetin 2 มก./ล. (ซ) *m*T 1 มก./ล. (ฌ) *m*T 2 มก./ล. (ญ) TDZ 1 มก./ล. (ฎ) TDZ 2 มก./ล. (ฏ) GA_3 1 มก./ล. + *m*T 1 มก./ล. (ฐ) GA_3 2 มก./ล. + *m*T 2 มก./ล. 33
4.5 แสดงลักษณะกลุ่มยอดต้นสารพัดพิษจาก TDZ ที่นำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ GA_3 1 มก./ล. เป็นเวลา 16 สัปดาห์..... 34
4.6 แสดงลักษณะรากที่เกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงยอดต้นสารพัดพิษในอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) 2,4-D 0.25 มก./ล. (ค) IAA 0.25 มก./ล..... 36
4.7 (ก) แสดงลักษณะต้นอ่อนสารพัดพิษระหว่างการปรับสภาพสัปดาห์ที่ 1 (ข) สัปดาห์ที่ 6..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
BAP, BA	6-Benzylaminopurine
GA_3	Gibberellic acid
$HgCl_2$	เมอร์คิวริกคลอไรด์
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	3-Indolebutyric acid
MS	อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)
*m*T	*Meta*-Topolin
NAA	α-Naphthaleneacetic acid
PPM	Preservative Plant Mixture
TDZ	Thidiazuron

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สารพัดพิษ (Necklace pod) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Sophora tomentosa* L. หรือชื่อท้องถิ่นเรียกว่า ซับพิษ ส้มพอ กักไม้ฝอย หรือสะนาน (Puechkaset, 2559) โดยทั่วไปตามธรรมชาติต้นสารพัดพิษขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด แต่เมล็ดแก่ส่วนใหญ่ตามธรรมชาติมักจะขึ้นราหรือถูกแมลงเจาะตั้งแต่ยังอยู่ในฝัก ตามปกติใน 1 ก้าน จะมีเมล็ดสารพัดพิษประมาณ 8 – 10 เมล็ด แต่พบเมล็ดที่สมบูรณ์ไม่มีรอยเจาะของแมลงหรือขึ้นราเพียง 2 – 4 เมล็ด เท่านั้น จำนวนเมล็ดที่สมบูรณ์จึงมีน้อย และทุกส่วนของต้นสารพัดพิษยังมีสรรพคุณทางสมุนไพร โดยเฉพาะเมล็ดที่มีสรรพคุณในการรักษาอาการท้องร่วงและลดไข้ และยังเป็นส่วนผสมในยาสมุนไพรหลายตำรับ จึงทำให้มีการเก็บเมล็ดสารพัดพิษไปขายและเพื่อใช้เอง นอกจากนี้ต้นสารพัดพิษจะเจริญเติบโตอยู่ตามบริเวณป่าแนวชายฝั่งทะเล ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นอาคารและสถานที่อื่น ๆ จึงทำให้ปัจจุบันและในอนาคตประเทศไทยอาจพบต้นสารพัดพิษได้น้อยลง ต้นสารพัดพิษยังสามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยการตอนกิ่ง แต่วิธีนี้ไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเป็นวิธีที่ง่ายกว่า จากเหตุผลดังกล่าว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเพิ่มปริมาณต้นสารพัดพิษให้ได้ปริมาณมาก อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่รายงานว่าสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสารพัดพิษได้สำเร็จ มีเพียงงานวิจัยจากพืชในสกุล *Sophora* เดียวกันเท่านั้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสารพัดพิษที่มีประสิทธิภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสารพัดพิษภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ
2. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากเมล็ดต้นสารพัดพิษ
3. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบเลี้ยงต้นสารพัดพิษให้เกิดแคลลัส
4. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดของต้นสารพัดพิษ
5. ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากและเป็นต้นที่สมบูรณ์และออกปลูกสู่ธรรมชาติ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหรือยอดหลายยอด การชักนำใบเลี้ยงให้เกิดแคลลัส การเพิ่มจำนวนยอดและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวยอด และการชักนำให้เกิดรากเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์พร้อมออกปลูกสู่ธรรมชาติของต้นสารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* L.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนสารพัดพิษได้จำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อและสามารถนำต้นอ่อนออกปลูกสู่ธรรมชาติได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของต้นสารพัดพิษ

2.1.1 การจัดจำแนกอนุกรมวิธาน

Kingdom : Plantae

Order : Fabales

Family : Fabaceae

Genus : *Sophora*

Species : *S. tomentosa*

(Natural History Museum, 2024)

2.1.2 ต้นสารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* L.)

ต้นสารพัดพิษเป็นไม้พุ่ม มีความสูงประมาณ 1 – 3 เมตร ลำต้นอ่อนและกิ่งอ่อนมีสีเขียวนวล ยอดอ่อนมีขนสีเงินแน่น ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกยอดเดี่ยว มีใบย่อย 5 – 10 คู่ ออกตรงข้าม รวม 1 ใบ ที่ปลายยอด กว้าง 2 – 4 เซนติเมตร ยาว 3 – 6 เซนติเมตร รูปไข่ถึงรีกว้าง ปลายกลม โค่นกลมมน ใบแก่เนื้อหนามีสีเขียวเข้มและเกลี้ยงด้านบน ด้านล่างมีสีอ่อนกว่า มีขนสีเงินแน่น ก้านใบยาว 2 – 4 เซนติเมตร ดอกมีสีเหลืองสดรูประฆัง ออกดอกเดี่ยวเป็นช่อตั้ง ไม่แตกแขนง ยาว 10 – 45 เซนติเมตร แกนกลางมีเส้นขนสีเงิน ก้านดอกเล็กเรียว ยาว 5 – 10 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร กลีบดอกกว้าง 12 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 16 มิลลิเมตร กลีบรูปไข่ เกสรตัวผู้มี 10 อัน แยกกันหมด รังไข่มีขนแน่น ก้านสั้น ก้านเกสรตัวเมียติดที่ปลาย ผล กว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 5 – 19 เซนติเมตร รูปทรงกระบอก คอดลึกระหว่างเมล็ดคล้ายลูกปัดเป็นข้อ ๆ เมล็ด 3 – 9 ดังรูปที่ 2.1 เมล็ด ขนาด 6 – 7 มิลลิเมตร ค่อนข้างกลม สีน้ำตาลเป็นมัน ไม่มีเยื่อหุ้มเมล็ด พบทั่วไปตามชายฝั่งทะเล ในทุ่งหญ้าหรือด้านหลังชายหาด (ไซมอนและคณะ, 2559) และพบได้ตามภาคเหนือ ภาคใต้และตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของต้นสารพัดพิษ (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) ฝักเมล็ด (ที่มา : Brown and Cooprider, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพัดพิษจัดเป็นพรรณไม้ป่ามีพิษชนิดหนึ่ง สารพิษสำคัญที่พบได้ในสารพัดพิษ ได้แก่ นิโคติน (Nicotine) ไซโตซีน (Cytocine) และ เลเบลลีน (Lebelline) ซึ่งออกฤทธิ์ทำลายประสาทเมื่อนำสารพัดพิษไปใช้ในปริมาณมาก แต่มีสรรพคุณในการถอนพิษจากสัตว์มีพิษต่าง ๆ ได้ดี แต่ละส่วนของต้นสารพัดพิษสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เมื่อใช้ในปริมาณที่น้อย เช่น ลูกสดและเมล็ดนำไปต้มดื่มสามารถแก้พิษไข้ รักษาอาการท้องเสีย หรือนำไปบดทาแก้ฝีหนอง รากนำไปต้มใช้ดื่มแก้ร้อนใน หรือบดทาแก้พิษงู แมงป่อง และตะขาบได้ ใบนำมาต้มดื่มแก้พิษงูหรือสัตว์อื่นได้ (Puechkaset, 2559) ซึ่งจากงานวิจัยของ Aly *et al.* (2020) ได้รายงานว่าสารสกัดจากใบของต้นสารพัดพิษสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (มานี, 2542)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การนำเอาชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อโปรโตพลาสต์ (Protoplast) และอวัยวะบางอย่างของพืช เช่น ยอด ลำต้น ราก ใบ และส่วนต่าง ๆ ของดอกหรือผล มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุอาหารที่พืชต้องการ นอกจากนั้นยังประกอบด้วย น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช จึงควรมีการคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนี้

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.1.1 ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของพืช ชนิดและชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจะมีการตอบสนองต่อปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้รับ การเจริญ และการพัฒนาที่แตกต่างกัน

1) ตาของพืช เซลล์ของตาที่ปลายยอด ตาข้าง ตาที่ข้อ และเนื้อเยื่อเจริญที่รากหรือลำต้น สามารถนำมาขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และมักจะขัดขวางการเจริญเติบโตของตาข้าง ตาที่ยังอ่อนจะขยายพันธุ์ได้ดีกว่าตาแก่ และสามารถทำให้เกิดรากได้ง่าย

2) เอ็มบริโอ (Embryo) ชิ้นส่วนของเอ็มบริโอ สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ โดยใช้ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิและพัฒนาเป็นไซโกตแล้วมาเลี้ยงในหลอดทดลอง ชิ้นส่วนของเอ็มบริโอจะมีเนื้อเยื่อเจริญที่ยังอ่อน ดังนั้นเซลล์จะเจริญเป็นเซลล์อ่อนอีกครั้งหนึ่งได้ ทำให้เกิดเอ็มบริโอจำนวนมาก เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อที่เป็น 2n ที่ได้จาก ลำต้น ใบ แคมเบียม (Cambium) ราก ยอด กลีบดอก กลีบเลี้ยง และนิวเคลียส เป็นต้น เนื้อเยื่อเหล่านี้สามารถชักนำให้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) ได้อวัยวะบางส่วนอาจพัฒนาไปเป็นตาหรือเอ็มบริออยด์ (Embryoid)

นอกจากนี้การคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความแข็งแรง ไม่มีโรคมาเป็นต้นแม่สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้สามารถขยายพันธุ์พืชที่ปลอดโรคได้ การคัดเลือกชิ้นส่วนพืชจึงมีความสำคัญมากเพราะพืชมีความแตกต่างกันทั้งทางพันธุกรรมและทางสรีรวิทยา ทำให้ผลของอาหารที่ใช้เลี้ยงต่อชิ้นส่วนพืชมีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) การคัดเลือกต้นแม่ที่จะนำมาใช้ต้องเป็นต้นที่มีลักษณะเด่น ต้านทานโรค แข็งแรง ให้ผลผลิตสูง และคุณภาพดี

2) การเจริญงอกงามของชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงต้องเจริญงอกงามดีและแข็งแรง สามารถเจริญเติบโตได้ดี และใช้อาหารที่เฉพาะเจาะจงในการคัดเลือก และทดลองในแต่ละสปีชีส์

3) ขนาดของชิ้นส่วนพืช รูปร่าง ปริมาตร และจำนวนเซลล์ของชิ้นส่วนพืช มีผลต่อการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ โดยไม่เกิดแคลลัส

4) ตำแหน่งของชิ้นส่วนพืช บริเวณที่อยู่ในระยะกำลังพัฒนา เช่น ปลายยอด และส่วนของต้นอ่อน มีความเหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยง โดยที่ตายอดจะเจริญได้ดีกว่าตาข้าง

5) ฤดูกาลและเวลาในการเลือกพืช ควรเลือกพืชในช่วงฤดูที่ตากำลังพัฒนา

2.2.1.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะของพืช สามารถเจริญได้ดีในหลอดทดลอง เพราะมีอาหารที่เหมาะสมกับความต้องการ อวัยวะต่างชนิดกันอาจต้องการอาหารต่างกัน ถึงแม้ว่าเป็นพืชชนิดเดียวกันก็ตาม อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่มีองค์ประกอบคล้าย ๆ กัน แบ่งออกได้ ดังนี้

1) ธาตุอาหารที่เป็นสารอนินทรีย์ (Inorganic compounds) มี 2 พวก คือ

- ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมากและจำเป็น ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ ซึ่งอยู่ในรูปสารประกอบ เช่น KH_2PO_4 $CaCl_2$ เป็นต้น

- ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย แต่ขาดไม่ได้ ได้แก่ แมงกานีส ทองแดง สังกะสี เหล็ก เป็นต้น ซึ่งธาตุอาหารเหล่านี้พืชต้องการน้อยมากมักใช้ในหน่วยความเข้มข้นเป็นไมโครโมลต่อลิตร อยู่ในรูปสารประกอบ เช่น $MnSO_4.4H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$

2) ธาตุอาหารที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ (Organic compounds) มีอยู่หลายอย่าง คือ

- วิตามิน เป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ทำให้ต้นพืชสมบูรณ์แข็งแรง วิตามินที่ใช้ เช่น วิตามินซี (Ascorbic acid)

- กรดแอมิโน กรดแอมิโนไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช แต่ถ้าในอาหารมีสารอินทรีย์ไม่เพียงพออาจเติมกรดแอมิโนลงไปได้ เช่น L-glutamin

- ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยในการเจริญเติบโตของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดจะมีผลต่อเนื้อเยื่อแตกต่างกัน เช่น ไซโทไคนิน ช่วยในการเจริญของเนื้อเยื่อ ความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและชิ้นส่วนพืชที่ใช้

- แหล่งคาร์บอน โดยทั่วไปพืชสีเขียวสามารถสร้างเองด้วยวิธีการสังเคราะห์แสง แต่พืชที่เกิดขึ้นในขวดเพาะเลี้ยง หรือชิ้นส่วนพืชขนาดเล็กในช่วงแรก ยังไม่สามารถพัฒนาตัวเองเพื่อการสังเคราะห์แสง จึงจำเป็นต้องเติมสารประกอบคาร์บอน และสารให้พลังงานลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย ได้แก่ น้ำตาล นิยมใช้ปริมาณ 20 – 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้ำตาลที่ใช้ได้ดี คือ น้ำตาลซูโครส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สารธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ สามารถช่วยในการเจริญของเนื้อเยื่อได้ โดยเฉพาะในน้ำมะพร้าว ซึ่งมีกรดแอมิโน วิตามิน น้ำตาล ฮอร์โมน ไซโทไคนิน และอื่น ๆ

- สารทำให้คงตัว (Gelling agent) ที่นิยมใช้ ได้แก่ วุ้น (Agar) มีคุณภาพหลายระดับให้เลือกใช้ตามความเหมาะสม ใช้สำหรับทำอาหารแข็ง

นอกจากสารดังกล่าวแล้ว ยังมีสารที่ไม่มีคุณค่าทางอาหารและอื่น ๆ ต่อพืช (Inert material) ที่ใส่ลงไปในอาหารเพื่อให้พืชสามารถตั้งอยู่อย่างมั่นคงบนอาหาร เช่น กระดาษกรอง เป็นต้น สารช่วยดูดซับสารพิษและป้องกันการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ ผงถ่าน ซึ่งจะใส่ประมาณ 0.1 – 1.0 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) เป็นสูตรที่มีธาตุอาหารตามที่พืชส่วนใหญ่ต้องการ จึงนิยมนำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการเพิ่มจำนวนต้น แต่พืชบางชนิดอาจมีความต้องการธาตุอาหารบางอย่างแตกต่างจากสูตรอาหาร MS หรือสำหรับพืชบางชนิดความเข้มข้นของธาตุอาหารในสูตร MS อาจมากเกินความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ในการชักนำให้เกิดราก พบว่าการใช้อาหารสูตรครึ่ง MS (1/2 MS) ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่าง ๆ ลดลงครึ่งหนึ่งมีความเหมาะสมต่อการชักนำรากมากกว่าการใช้ MS เต็มสูตร Bhandari *et al.* (2021) ได้ทดลองชักนำรากต้น *Sophora mollis* โดยนำยอดที่มีความสูง 4 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS 1/2 MS และ 1/4 MS พบว่าอาหารสูตร MS ไม่พบการเกิดรากในขณะที่อาหารสูตร 1/2 MS และ 1/4 MS มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 10.14 และ 7.32 ตามลำดับ และการเลือกใช้อาหารสูตรอื่นที่ตรงกับความต้องการของพืช เช่น อาหารสูตร Woody Plant (Lloyd and McCown, 1980) มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็งมากกว่าการใช้อาหารสูตร MS ซึ่งในปัจจุบันอาหารสูตรต่าง ๆ จะอยู่ในรูปแบบผงสำเร็จที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารครบตามแต่ละสูตร จึงง่ายต่อการเตรียมอาหารมากขึ้น โดยส่วนใหญ่มักจะปรับพีเอช (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้อยู่ในช่วง 5.6 – 5.8 ก่อนเติมวุ้น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 – 20 นาที หรืออาจเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและปริมาณอาหารที่เตรียม และควรทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน ก่อนนำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

นอกจากธาตุอาหารต่าง ๆ ที่ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีแล้ว ยังขึ้นอยู่กับฮอร์โมนชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต แบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ ออกซิน (Auxin) จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) ไซโทไคนิน (Cytokinin) กรดแอบไซซิก (Abscisic acid, ABA) และเอทีลีน (Ethylene) สารควบคุมการเจริญเติบโตเกิดขึ้นตามธรรมชาติตามเนื้อเยื่อของพืช ซึ่งมีอิทธิพลทำให้พืชเจริญเติบโต มีการพัฒนา และสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะต่าง ๆ ของอวัยวะได้ เช่น สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นตาและรากได้

- ออกซิน มีอิทธิพลต่อพืชในด้านควบคุมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ เช่น การเจริญเติบโตของตา ทำให้เซลล์ยืดยาว ทำให้เกิดราก การเจริญเติบโตพัฒนาของปลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยอด เป็นต้น ออกซินที่นิยมใช้ทั่วไปมีหลายชนิด ได้แก่ IAA (Indole-3-acetic acid) IBA (Indole-3-butyric acid) NAA (1-Naphthalene acetic acid) และ 2,4-D (2,4-Dichloro phenoxyacetic acid)

- จิบเบอเรลลิน มีอิทธิพลต่อพืชในการกระตุ้นการยืดตัวและแบ่งเซลล์ของลำต้น ปล้อง ทำให้ลำต้นยืดยาวสูงขึ้น แต่ยับยั้งการยืดตัวและการเกิดรากใหม่ กระตุ้นการงอกของเมล็ด และยับยั้งการเจริญเติบโตของตาดอก จิบเบอเรลลินเป็นสารประกอบที่มีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้มากที่สุด และให้ผลดีกว่าจิบเบอเรลลินชนิดอื่น คือ จิบเบอเรลลิน เอ 3 (GA_3)

- ไซโทไคนิน แหล่งที่สร้างอยู่ตามปลายรากและเมล็ดที่กำลังพัฒนา มีอิทธิพลต่อพืชในการทำให้เซลล์แบ่งตัว กระตุ้นการเจริญของตาข้าง แต่ไม่เกิดราก ชะลอการแก่ สร้างคลอโรพลาสต์ ทำให้ใบเขียวขึ้น ตัวอย่างไซโทไคนิน ได้แก่ Zeatin Kinetin BAP (6-Benzyl amino purine) และ TDZ (Thidiazuron) เป็นต้น

- กรดแอบไซซิก เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช มีอิทธิพลต่อพืชทำให้ปากใบเปิด ปลายยอดพักตัว ปล้องสั้น ใบเล็กลง ใบร่วง เซลล์หยุดการแบ่งตัว ยับยั้งการงอกของเมล็ด ยับยั้งการแตกใบอ่อน

- เอทีลีน เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อการสุกของผลไม้ สร้างขึ้นในเซลล์ทำให้ผลไม้สุก อิทธิพลที่มีต่อพืช ได้แก่ หยุดการพักตัว ต้นเจริญเติบโตและงอกงาม ใบร่วงและผลร่วง สร้างราก ชักนำให้สร้างดอก ทำให้ดอกไม้บ้านและผลไม้สุก

2.2.1.4 แสงและอุณหภูมิ

แสงมีความจำเป็นต่อกระบวนการเกิดรูปร่าง (Morphogenic process) ของพืชภายในขวดเพาะเลี้ยง ความเข้มของแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเพิ่มจำนวนพืช การเพาะเลี้ยงพืชที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่มีแสง 16 ชั่วโมง และปราศจากแสง 8 ชั่วโมง ต่อวัน ความเข้มของแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเพิ่มจำนวนต้นของเยอบีร่าและพืชล้มลุกอื่น ๆ อีกหลายชนิด ถ้าความเข้มของแสงมากกว่า 3,000 ลักซ์ ลำต้นจะอ่อนแอและยืดยาวมากกว่าปกติ (Murashige, 1977) และการใช้แสงสีที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อการเจริญของพืชเช่นกัน จากการศึกษาผลของแสงต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง พบว่าการใช้แสงสีแดง สีน้ำเงิน และสีขาว ทั้ง 3 สี ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยอด แต่ส่งผลต่อการเกิดราก โดยแสงสีแดงสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด แต่การใช้แสงสีขาวจะชักนำให้เกิดรากที่มีความยาวมากที่สุด (สุรวิช และศิริลักษณ์, 2542)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการนำมาใช้ในหลายสาขาวิชา เช่น ด้านการแพทย์ การเกษตร เภสัชวิทยา วิทยาศาสตร์ และพันธุศาสตร์ เป็นต้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีประโยชน์ในด้านการขยายพันธุ์พืช ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีข้อดี ดังนี้

- พืชที่ได้จะมีพันธุ์เหมือนเดิม มีเพียงส่วนน้อยที่อาจกลายพันธุ์
- สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น
- ช่วยขยายพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ได้ยาก ทำให้ไม่สูญพันธุ์
- ใช้ในการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Plant conservation) สามารถเก็บพันธุ์พืชไว้ได้จำนวนมาก แต่ใช้เนื้อที่เพียงเล็กน้อย ทำให้ไม่เปลืองพื้นที่ ไม่เสี่ยงต่อการสูญเสีย หรือถูกทำลายจากภัยธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใช้ในการแลกเปลี่ยนพันธุ์จากต่างประเทศได้อย่างสะดวก และปลอดภัยจากเชื้อโรค

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังมีประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น การผลิตสารเคมี ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิจากเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพร ทางด้านพันธุศาสตร์และการผสมพันธุ์พืช และทางด้านโรคพืช เป็นต้น การขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

2.2.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (บุญยืน, 2540)

2.2.2.1 การทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ

การปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยง สาเหตุของการปนเปื้อนมีหลายประการ เช่น มาจากพืช เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ขั้นตอนในการปฏิบัติการ การปนเปื้อนจากแบคทีเรีย รา ยีสต์ เป็นต้น ดังนั้นก่อนนำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงต้องมีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช โดยใช้สารเคมี หรือสารฆ่าเชื้อต่าง ๆ โดยเฉพาะชิ้นส่วนพืชที่นำมาจากธรรมชาติภายนอกจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อยู่ภายใน ซึ่งทำให้ปลอดเชื้อได้ยาก จึงเกิดการปนเปื้อน

การกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างพืชก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสำคัญมาก เพราะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีสารอาหารที่สมบูรณ์และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่าสภาวะตามธรรมชาติที่พืชกับจุลินทรีย์สามารถอยู่ร่วมกันได้ จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจะแย่งอาหาร และอาจสร้างสารพิษที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่อ่อนแอจากการอยู่ภายในภาวะเครียด เช่น ภายใต้สภาวะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืชแต่ละชนิดและชิ้นส่วนตัวอย่างของพืชที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องการศึกษาสารกำจัดจุลินทรีย์และความเข้มข้นที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืช (Darworth and Callan, 1996)

1) สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ สารเคมีที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้แต่ไม่ทำลายชิ้นส่วนพืช ที่นิยมใช้เป็นพวกสารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Bacteriocide) สารฆ่าเชื้อรา (Fungicide) และสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ได้แก่

- เอทานอล มีความสามารถแทรกซึมเข้าไปในชิ้นส่วนพืชและฆ่าจุลินทรีย์โดยใช้ความเข้มข้น 70 – 75 เปอร์เซ็นต์ จุ่มอย่างรวดเร็วประมาณ 30 วินาที อาจใช้ในระยะแรกสำหรับการฆ่าเชื้อบริเวณผิว แต่อาจไม่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด จึงต้องใช้สารชนิดอื่นเพิ่ม

- เมอร์คิวริกคลอไรด์ (Mercuric chloride, $HgCl_2$) เป็นสารฆ่าเชื้อที่ดี อาจใช้ความเข้มข้น 0.1 – 0.2 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 6 – 12 นาที หลังจากแช่ด้วยสารชนิดนี้แล้วควรล้างสารออกทันทีด้วยน้ำปราศจากเชื้ออย่างน้อย 5 ครั้ง

- โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite, NaOCl) ความเข้มข้น 2 – 10 เปอร์เซ็นต์ หรือคลอร็อกซ์ แช่เป็นเวลา 15 – 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 3 – 6 ครั้ง สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยไม่ทำลายพืช

- สารฟอกขาว (Bleach) ซึ่งมีแคลเซียมไฮโปคลอไรท์อยู่ 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใช้ฆ่าเชื้อได้ดี โดยแช่ชิ้นส่วนพืชประมาณ 20 – 30 นาที ทำลายเนื้อเยื่อน้อยและสามารถล้างออกได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ความเข้มข้น 6 – 12 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าเชื้อได้ดี ไม่ทำลายพืชและล้างออกได้ง่าย ใช้กับการฆ่าเชื้อที่ผิวใบ

2) สารปฏิชีวนะและสารกำจัดเชื้อรา นอกจากใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ยังใช้เพื่อขัดขวางการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารที่นิยมใช้กันได้แก่ เซฟาโลทิน (Cephalothin) เซโฟซิติน (Cefoxitin) และเซโฟทาไซม์ (Cefotaxime) พบว่าสารเหล่านี้ไม่มีพิษต่อเซลล์พืช เมื่อใช้ในความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอาจใช้ร่วมกับสารชนิดอื่นได้ ทำให้ลดการปนเปื้อนได้โดยไม่เป็นพิษต่อพืช

ในการเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อบริเวณผิว ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวของน้ำ ได้แก่ ทวีน 20 (Tween-20) หรือทวีน 80 (Tween-80) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายที่ใช้ฆ่าเชื้อ และเมื่อนำชิ้นส่วนพืชไปแช่ในสาระลายควรนำไปคนหรือเขย่าเพื่อไล่ฟองอากาศ ทำให้สารเคมีแทรกซึมและฆ่าเชื้อได้อย่างทั่วถึง

Mng'omba *et al.* (2012) ได้อธิบายถึงวิธีการใช้และการเลือกใช้สารกำจัดจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอทานอลสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และสปอร์ที่อยู่บนพื้นผิวของตัวอย่างพืชได้ดี แต่เอทานอลไม่สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในท่อลำเลียง (endophyte) ได้ ส่วนใหญ่นิยมใช้เอทานอลความเข้มข้นตั้งแต่ 20 – 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เอทานอลที่ความเข้มข้นสูง (100 เปอร์เซ็นต์) อาจจะทำลายตัวอย่างพืชที่อ่อนนิ่มได้ และควรใช้ระยะเวลาสั้น ๆ (5 – 20 วินาที) ในการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายตัวอย่างพืช สารฆ่าเชื้อราส่วนใหญ่มีทั้งในรูปแบบที่เป็นผงและของเหลว ซึ่งส่วนใหญ่การใช้ในปริมาณน้อยก็มีประสิทธิภาพมากพอต่อการกำจัดเชื้อรา การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อราส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับชนิดของรา (เช่น ราที่อยู่ภายในท่อลำเลียง)

จากงานวิจัยของ Mng'omba *et al.* ในปี 2007 พบว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($CaOCl_2)_2$) ไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนเชื้อราในพืช *U. kirkiana* ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราที่อยู่ภายในท่อลำเลียงของพืช แต่จากการใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา จึงสรุปได้ว่าเมอร์คิวริกคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราที่อยู่ภายในท่อลำเลียงได้มากกว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ และ Mng'omba *et al.* ยังได้อธิบายอีกว่าการใช้สารฆ่าเชื้อราเพียงอย่างเดียวอาจทำให้จุลินทรีย์อื่น เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย สามารถเพิ่มจำนวนได้ จึงควรมีการใช้สารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (antibiotics) ร่วมด้วย

Boruah (2020) ได้ทำการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างและปลายยอดของพืช *Persea bombycina* King โดยใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อใช้เวลา 3 นาที มีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อเหมาะสมที่สุด ซึ่งให้ร้อยละการปนเปื้อนทั้งเชื้อราและแบคทีเรียน้อยที่สุดและมีร้อยละการรอดชีวิตมากที่สุด

2.2.2.2 การเพิ่มจำนวนยอด

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสำคัญในการเพิ่มปริมาณพืชที่ต้องการด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในหลอดทดลอง สามารถทำได้ 3 แนวทาง ดังนี้

1) การชักนำยอดจากแคลลัส แคลลัส คือ กลุ่มเซลล์พืชที่มีแนวโน้มที่จะเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัด ซึ่งแคลลัสสามารถชักนำให้พัฒนากลายเป็นยอดใหม่ได้ และจากศักยภาพนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เองที่สามารถเพิ่มจำนวนพืชได้อย่างมากในพืชหลายชนิด แต่ความสามารถในการเจริญไปเป็นยอดนี้อาจลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป และการเพิ่มจำนวนยอดผ่านทางแคลลัสอาจจะมีความไม่คงตัวทางพันธุกรรมของเซลล์ (Genetic Instability)

เนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ เช่น เมล็ด ราก เอ็มบริโอ ราก ลำต้น ใบ หรือดอก สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสได้ทั้งนั้น ซึ่งเอ็มบริโอ ใบเลี้ยง และใบอ่อน สามารถชักนำให้แคลลัสได้ดีมากกว่าส่วนอื่น การกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดการแบ่งเซลล์และสร้างแคลลัส ทำได้โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่นิยมใช้ คือ 2,4-D และ NAA หรือในพืชบางชนิดอาจมีการใช้ไซโทไคนินร่วมด้วย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้สำเร็จไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงแต่มักจะขึ้นอยู่กับสภาวะในการเพาะเลี้ยง ซึ่งพืชแต่ละชนิดต้องการแสงไม่เท่ากัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสอยู่ในช่วง 22 – 28 องศาเซลเซียส แคลลัสสามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวได้ดีกว่าในอาหารแข็ง แต่การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งแคลลัสจะเกิดการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะต่อไป เช่น ราก ใบ หรือยอด (ศิวพงศ์, 2546)

Narasimhulu and Reddy (1983) ได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) โดยใช้ลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ใบ และใบเลี้ยง เป็นชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดแคลลัส ทำการทดลองโดยนำชิ้นส่วนตัวอย่างพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D IAA NAA และ kinetin ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพมากกว่าอาหารสูตรอื่นในการชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วจึงนำแคลลัสที่เกิดขึ้นไปชักนำให้เกิดยอดในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน หลังการเพาะเลี้ยง พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) NAA (0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ kinetin (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสดังกล่าวได้ หลังจากเกิดยอดแล้วจึงใช้อาหารที่เสริมด้วย NAA (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ kinetin (0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในการชักนำให้เกิดราก

Malik *et al.* (2004) ได้ศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวสาลีสายพันธุ์ Inqilab-91 และ Pavon-76 โดยใช้อาหารสูตร Linsmaier and Skoog's (LS, 1965) ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เจลไรท์ (Gelrite®) 0.12 เปอร์เซ็นต์ และเสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.75 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 5 วัน ข้าวสาลีทั้ง 2 สายพันธุ์ เริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้นและมากที่สุดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการทดลองดังกล่าวได้รายงานผลว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้นสูง (4 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะยับยั้งการเกิดแคลลัส และที่ความเข้มข้นต่ำจะพบการเกิดยอดร่วมด้วย โดยความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวสาลี คือ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะแข็งแรงและมีปริมาณมากที่สุด

2) การชักนำให้เกิดตาพิเศษ (Adventitious bud formation) ตาพิเศษคือ ตาที่เกิดขึ้นโดยตรงจากอวัยวะหรือชิ้นส่วนของพืช เช่น ราก โดยใช้อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เหมาะสมมาชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดตาพิเศษในปริมาณมากและเพาะเลี้ยงจนกลายเป็นต้นที่สมบูรณ์มีทั้งยอดและราก ซึ่งปกติแล้วชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดเล็กในธรรมชาติมักจะไม่รอดชีวิต แต่การนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองสามารถนำชิ้นส่วนพืชเหล่านี้ไปใช้ขยายพันธุ์พืชได้

Franklin *et al.* (2004) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของใบเลี้ยงที่โตเต็มที่แล้วเปรียบเทียบกับใบเลี้ยงที่ยังโตไม่เต็มที่ของถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ซึ่งใบเลี้ยงที่โตเต็มที่แล้วได้จากการนำเมล็ดถั่วเหลืองที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงให้เมล็ดงอกบนอาหารแข็งสูตร MS จนได้ต้นอ่อนอายุ 6 วัน จึงนำใบเลี้ยงที่โตเต็มที่แล้วไปใช้ ส่วนใบเลี้ยงที่ยังไม่โตได้จากฝักที่เก็บหลังระยะบานของดอกไม้ 20 วัน นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แล้วจึงนำใบเลี้ยงทั้ง 2 แบบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 ที่เสริมด้วย TDZ อย่างเดียว และที่เสริมด้วย TDZ ร่วมกับ BAP หลังการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสง 16 ชั่วโมง ต่อวัน เป็นเวลา 40 วัน พบว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ใบเลี้ยงทั้ง 2 แบบ มีร้อยละการเจริญเป็นต้นใหม่และมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวในทุกความเข้มข้น ซึ่งหลังจากเพาะเลี้ยงต่อจนเป็นตายอด (shoot bud) แล้วจึงนำไปเพิ่มความยาวยอดโดยการใช้ GA_3 ความเข้มข้น 0.29 ไมโครโมลาร์ จนได้ยอดที่มีความสูง 3 – 5 เซนติเมตร จึงนำไปชักนำให้เกิดราก โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS และ MS ที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 0 0.54 และ 2.69 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 วัน พบว่าการใช้อาหารสูตร 1/2 MS ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดรากได้น้อยกว่าการใช้อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA ซึ่ง NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ มีร้อยละการเกิดรากมากที่สุด (ร้อยละ 88.3)

3) การส่งเสริมให้เกิดตาข้าง (Enhanced axillary branching) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินในการชักนำให้เกิดการแตกสาขาของตาข้าง (Axillary branching) เพื่อเพิ่มจำนวนยอด และยอดที่เกิดขึ้นสามารถนำไปเพิ่มจำนวนต่อได้อย่างไม่มีจำกัดด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม

Hakim *et al.* (2010) ได้ศึกษาวิธีการเพาะต้นกล้าด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นคารอบ (*Certonia siliqua* L.) ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต แล้วจึงตัดตาข้างของต้นอ่อนที่เกิดขึ้น (อายุ 3 – 4 สัปดาห์) ไปชักนำให้เกิดยอดหลายยอดด้วยอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย BAP อย่างเดียว และที่เสริมด้วย BAP (0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ IAA หรือ GA_3 (0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ไม่พบการเกิดยอดหลายยอดเมื่อใช้ BAP เพียงอย่างเดียว ยอดที่เกิดขึ้นเป็นยอดเดี่ยวและมีการเกิดแคลลัสที่ฐานของชิ้นส่วนพืช แต่การใช้ BAP ร่วมกับ IAA หรือ GA_3 ส่งผลให้เกิดยอดหลายยอด โดยการใช้ BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีที่สุด

Kapildev *et al.* (2020) ได้ศึกษาผลของ *m*T ต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อของถั่วดำ (*Vigna mungo* L.) ให้เกิดยอดหลายยอด ทำการทดลองโดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย *m*T อย่างเดียว และที่เสริมด้วย *m*T ร่วมกับ BAP (0.25 0.5 0.75 1.0 1.25 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตร) ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการใช้ *m*T ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการตอบสนองของชิ้นส่วนพืชและจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชมากที่สุด และได้ทำการเพิ่มความสูงของยอดด้วยการใช้ GA_3 ช่วงความเข้มข้น 1.0 – 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงผลร้อยละการตอบสนองของชิ้นส่วนพืช ความยาวยอด และจำนวนยอดต่อข้อมากกว่าความเข้มข้นอื่น

2.2.2.3 การชักนำให้เกิดราก

ยอดที่เจริญมาจากแคลลัสหรือตาข้างโดยการชักนำด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินมักจะไม่เกิดราก เพื่อให้ได้ต้นที่สมบูรณ์มีทั้งยอดและราก จึงควรย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำราก โดยทั่วไปนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เช่น IAA IBA และ NAA

Perveen *et al.* (2013) ได้ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนตัวอย่างเมล็ดต้น *Albizia lebbeck* (L.) จากการนำเมล็ดที่สมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงจนต้นอ่อนมีอายุ 25 วัน จึงทำการตัดลำต้นเหนือใบเลี้ยงไปชักนำให้เกิดยอดหลายยอดด้วยอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย TDZ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ หลังจากได้ยอดที่มีความสูงประมาณ 4 – 5 เซนติเมตร และมีใบมากกว่า 47 ใบแล้ว จึงนำไปชักนำรากนอกขวดเพาะเลี้ยงโดยการนำฐานของยอดไปจุ่มใน IBA และ NAA (50 100 150 200 250 และ 300 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปลูกในกระถางโดยใช้ดิน vermiculite หรือ soilrite เป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกใส แล้วเลี้ยงต่อในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากผลการทดลอง IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า NAA ที่ไม่พบการเกิดราก โดย IBA ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเกิดราก (ร้อยละ 82) จำนวนราก (21 รากต่อยอด) และความยาวราก (4 เซนติเมตร) สูงที่สุด และหากใช้เวลาในการจุ่มนานกว่า 30 นาที จะทำให้เกิดแคลลัสที่ฐานของยอด

Kapildev *et al.* (2020) ได้ศึกษาผลของออกซินต่อการชักนำรากต้นถั่วดำ โดยนำยอดที่มีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย IAA IBA และ NAA (0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลร้อยละการเกิดราก จำนวนรากต่อยอด และความยาวรากสูงสุด รองลงมาคือ IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.2.4 การย้ายออกปลูก

ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายในขวด ใบจะมีลักษณะที่อ่อน บาง และสังเคราะห์แสงได้ไม่ดีเท่าต้นพืชที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติ เพราะพืชจะได้รับสารอาหารจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง จึงไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์แสงเอง และภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีความชื้นสูง (90 - 100 เปอร์เซ็นต์) พืชจะไม่ค่อยมีการพัฒนาของชั้นคิวทิเคิล (Cuticle) หากพืชมีชั้นคิวทิเคิลหนา (พบได้ในพืชที่เจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้ง) พืชจะมีการคายน้ำที่น้อย และการเปิดปิดของปากใบที่ไม่ปกติ ทำให้พืชคายน้ำมากเกินไป ซึ่งเป็นสาเหตุให้ในช่วงแรกของการย้ายออกปลูกพืชจึงเกิดการสูญเสียน้ำจำนวนมาก ซึ่งการปรับสภาพของพืชก่อนออกปลูกโดยการลดความชื้นเพื่อให้พืชค่อย ๆ ชิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับสภาวะภายนอกขวดอาจทำให้ขนาดของปากใบลดลง ซึ่งช่วยลดการสูญเสียน้ำได้ (Pierik, 1997) เมื่อได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์แข็งแรงมีทั้งยอดและรากแล้ว เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจึงควรมีการปรับสภาพต้นอ่อนที่นำออกจากขวดเพาะเลี้ยงก่อนนำไปออกปลูก ซึ่งควรทำด้วยความระมัดระวังและเบามือ โดยการล้างวุ้นอาหารออกจากรากของพืช แล้วจึงนำต้นอ่อนไปแช่ในสารฆ่าเชื้อเราเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราจากความชื้นที่สูง วัสดุปลูกควรมีการฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้เพื่อช่วยให้ปลอดจากเชื้อรา เมื่อนำพืชลงภาชนะปลูกแล้ว ดังนั้นการรักษาความชื้นในการเพาะเลี้ยง 10 – 15 วันแรก หลังจากออกปลูกจึงสำคัญมากซึ่งทำได้โดยการคลุมภาชนะหรือต้นพืชที่ออกปลูกด้วยถุงพลาสติกใสเจาะรูเล็ก ๆ เพื่อให้ถ่ายเทอากาศได้ หลังจากพืชปรับให้ชินกับความชื้นภายนอกขวดเพาะเลี้ยงได้แล้ว จึงย้ายไปเก็บรักษาในร่มที่เรือนเพาะชำก่อนนำออกสู่ธรรมชาติ ซึ่งระยะเวลาในการปรับสภาพนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและความแข็งแรงของต้นพืช

จากงานวิจัยของ Franklin *et al.* (2004) หลังจากชักนำใบเลี้ยงของต้นถั่วเหลืองจนได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์แข็งแรงแล้ว จึงนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงไปปรับสภาพให้แข็งแรง โดยการล้างรากผ่านน้ำประปาและใช้ Redi-earth® เป็นวัสดุปลูก คลุมด้วยถุงพลาสติกใสและเพาะเลี้ยงภายในเรือนกระจก หลังจากนำไปออกปลูกแล้วพืชที่เจริญเป็นต้นใหม่มาจากใบเลี้ยงนี้มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 87

Perveen *et al.* (2013) ได้ทำการย้ายต้นกล้า *Albizia lebbeck* (L.) ลงในกระถางที่มีส่วนผสมของดินและ soilrite (1 : 1) นำไปเลี้ยงต่อที่สภาวะเดียวกับในขวดเพาะเลี้ยงจนครบ 6 สัปดาห์ พบว่าหลังจากย้ายออกจากขวด 4 สัปดาห์ ต้นกล้าที่ใช้ soilrite เป็นวัสดุปลูกในการปรับสภาพมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 76.6 และหลังจากย้ายต้นกล้าไปเพาะเลี้ยงในกระถางที่มีส่วนผสมของดินและ soilrite (1 : 1) จนครบ 6 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 78

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ramakrishna *et al.* (1991) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวบาร์เลย์พบว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 12.5 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 15 และ 30 นาที สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของ *Fusarium* spp. *Epicoccum purpurascens* และ *Bacillius* spp. แต่ไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของ *Alternaria alternate* แต่การใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที สามารถยับยั้งการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ทั้งหมด ยกเว้น *Bacillus* spp. ที่ถูกกำจัดได้โดยการใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งส่งผลทำให้การงอกของเมล็ดข้าวบาร์เลย์ลดลง

Yadav and Singh (2011) ได้ศึกษาผลของฤดูเก็บเกี่ยวเมล็ดและการฟอกฆ่าเชื้อที่มีต่อการงอกของเมล็ด และศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *Albizia lebbeck* (L.) โดยทำการเก็บตัวอย่างเมล็ดในเดือนพฤศจิกายน (ฝักมีสีเหลือง) ธันวาคม (ฝักมีสีเหลืองเข้ม) และมกราคม (ฝักมีสีน้ำตาล) ทำการแกะเมล็ดออกจากฝักแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ (0.05 0.1 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 2 5 และ 8 นาที และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาล พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการงอกมากที่สุด (ร้อยละ 83.3) และเมล็ดที่เก็บในเดือนธันวาคมหรือมีฝักสีเหลืองเข้มมีอัตราการงอกสูงสุด (ร้อยละ 83.3) และใช้เวลาในการงอกน้อยที่สุด (4.29 วัน) หลังจากต้นอ่อนมีอายุ 15 วัน จะถูกตัดข้อ (node) และลำต้นระหว่างข้อ (internode) ไปใช้เป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยออกซิน (2,4-D IAA IBA หรือ NAA) ร่วมกับไซโทไคนิน (BAP หรือ kinetin) หรือที่เสริมด้วยออกซินหรือไซโทไคนินอย่างเดียว พบว่า BAP สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อเกิดยอดใหม่ได้มากกว่า kinetin และการใช้ BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ (ร้อยละ 60) และจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด (4.6 ยอดต่อขวด) และการใช้ BAP อย่างเดียวก็ให้ผลการชักนำยอดอยู่ในระดับที่ดีเหมือนกัน สำหรับการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน internode พบว่าการใช้ BAP (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (ร้อยละ 85) รองลงมาคือ การใช้ BAP เพียงอย่างเดียว แคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเขียวปนสีขาวจับตัวกันแบบหลวม ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงยอดจนมีความสูง 2 – 3 เซนติเมตร จะถูกนำไปชักนำรากในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย IAA (0.5 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ร้อยละ 60 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน แล้วจึงนำต้นกล้าที่มีรากที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วไปปรับสภาพโดยการล้างอาหารออกจากรากด้วยน้ำประปา แล้วนำไปปลูกลงกระถางที่มีดินผสมกับทรายในอัตราส่วน 1 : 1 คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกใสเจาะรู รดน้ำด้วย 1/4 MS วันเว้นวัน หลังจากผ่านไป 2 สัปดาห์ ทำการเปิดถุงพลาสติกออกวันละ 3 – 4 ชั่วโมง เพื่อเป็นการปรับให้พืชคุ้นเคยกับความชื้นในธรรมชาติ หลังจากผ่านไปอีก 1 สัปดาห์ จึงทำการย้ายต้นพืชไปปลูกในกระถางที่ใหญ่ขึ้นและมีส่วนผสมของทรายและดินในอัตราส่วน 1 : 3 และเลี้ยงต่อในสภาวะธรรมชาติ

Rajaram *et al.* (2013) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างพืชจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของพืช *Tephrosia tinctoria* Pers. จากงานวิจัยนี้แคลลัสที่ได้มีเหลืองและจับตัวกันหลวม ๆ (friable callus) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน โดยใช้ชิ้นส่วนจากใบ ลำต้น และราก มาเป็นตัวอย่างในการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสด้วยอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส (3 เปอร์เซ็นต์) วุ้น (1 เปอร์เซ็นต์) ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เสริมด้วย 2,4-D หรือ NAA อย่างเดียว (1 – 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) และที่เสริมด้วย 2,4-D (1 – 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BAP (0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ไม่มีแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 45 วัน พบว่าชิ้นส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าชิ้นส่วนจากลำต้นหรือราก โดยใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chakravarthy and Negi (2014) ได้ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนของต้นอ่อน *Albizia lebbeck* (L.) โดยการนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 – 12 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และแช่น้ำข้ามคืนภายใต้สภาวะไร้แสงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมล็ดที่มีการงอกของรากแรกเกิด (Radicle) จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงต่อในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารสูตร 1/2 MS และน้ำตาลซูโครส 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เกิดการเจริญต่อเป็นต้นอ่อน หลังจากต้นอ่อนมีอายุ 10 – 14 วัน จะถูกตัดใบเลี้ยง ใบ และราก ไปชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เสริมด้วย BAP หรือ kinetin (0.5 – 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ IAA (0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าการนำเมล็ดไปแช่ข้ามคืนในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้เมล็ดมีอัตราการงอกมากขึ้น จาก 25 – 30 เปอร์เซ็นต์ เป็น 90 – 95 เปอร์เซ็นต์ จากการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าชิ้นส่วนพืชที่มีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุดคือ ใบเลี้ยง (ร้อยละ 95.50) รองลงมาคือ ใบ (ร้อยละ 91.06) และราก (ร้อยละ 59.96) โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเขียวจับกันเป็นก้อนแข็ง (compact callus) และแคลลัสที่ชักนำโดยใช้ kinetin ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA มีลักษณะที่จับตัวกันหลวมกว่าและใช้ระยะเวลานานกว่าในการชักนำให้เกิดยอด จากนั้นนำแคลลัสที่เกิดขึ้นไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เสริมด้วย BAP (0.2 – 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA (0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มความยาวยอด พบว่าอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดได้มากที่สุด (ร้อยละ 95.55) มีการเกิดยอดหลายยอดมากที่สุด (20.50 ยอดต่อแคลลัส) และมีความยาวยอดสูงสุด จากนั้นจึงทำการตัดยอดที่มีความสูง 4 – 5 เซนติเมตร ออกจากก้อนแคลลัสไปชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่มีน้ำตาลมอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ เสริมด้วย IBA NAA หรือ IAA (0.5 – 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 16 และจากการชักนำรากด้วย IBA IAA และ NAA รากที่เกิดขึ้นมีการพัฒนาที่สมบูรณ์ โดย IBA มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 69.96 และ IAA มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 41.06 หลังจากเพาะเลี้ยงจนได้ต้นกล้าที่มียอดและระบบรากที่สมบูรณ์ นำไปล้างวุ้นออกจากรากโดยเปิดให้น้ำประปาไหลผ่านแล้วจึงย้ายลงกระถางพลาสติกที่มีฮิวมัส (Humus) ทราย และดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนที่เท่ากันเป็นวัสดุปลูก หลังจากปรับสภาพเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการย้ายต้นกล้าไปปลูกในกระถางที่มีทรายผสมกับดิน (1 : 3) เพาะเลี้ยงต่อในเรือนเพาะชำก่อนนำออกสู่ธรรมชาติ

Shohani *et al.* (2014) ได้ศึกษาผลของความเค็มและ GA_3 ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเลนทิล สายพันธุ์ Kimia และ Ilam หลังจากฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วเลนทิลด้วยสารฆ่าเชื้อรา (benomyl) ร่วมกับแอมพิซิลลินแล้ว จึงนำไปเพาะเลี้ยงในจานแก้ว (petri dish) ขนาด 9 มิลลิเมตร ที่รองด้วยกระดาษกรอง และให้ความชื้นด้วยสารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้น 0 60 120 และ 180 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 0 2 4 และ 6 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าความเค็มมีผลทำให้การงอกของเมล็ดทั้ง 2 สายพันธุ์ลดลง และส่งผลต่อการเจริญเติบโตในระยะแรกของต้นอ่อนสายพันธุ์ Kimia มากกว่าสายพันธุ์ Ilam และ GA_3 สามารถเพิ่มการงอกของเมล็ดถั่วเลนทิลทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ และ GA_3 ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการเกิดรากได้ในสายพันธุ์ Kimia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mensha *et al.* (2020) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของ GA_3 และ kinetin ต่อการงอกของเมล็ดพืช *Sesbania sesban* L. และ *Sesbania rostrata* L. โดยการนำเมล็ดของพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ไปแช่ใน GA_3 หรือ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำและเพาะเลี้ยงต่อบนจานแก้วที่รองด้วยกระดาษกรองภายใต้สภาวะไร้แสง พบว่าการแช่เมล็ดพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ ใน kinetin ส่งผลให้การงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้นได้ดีกว่าการแช่เมล็ดใน GA_3 แต่การแช่เมล็ดใน GA_3 ทำให้เมล็ดงอกได้มากกว่าการแช่ในน้ำธรรมดา

Pholjad *et al.* (2020) ได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นถั่ว *Arachis glabrata* สายพันธุ์ florigraze ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนข้อ โดยการนำชิ้นส่วนข้อไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ สารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (antibiotics) cefotaxime และ PPM ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที (ร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 73.3) แล้วนำชิ้นส่วนข้อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปชักนำให้เกิดยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP kinetin *m*T และ TDZ (0 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงที่สภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารทุก 4 – 6 สัปดาห์ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด (ร้อยล 66.67) และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด (18.43 มิลลิเมตร) รองลงมาคือ kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชักนำให้เกิดยอดได้ร้อยละ 60 และมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 9.89 มิลลิเมตร หลังจากเกิดยอดที่สมบูรณ์แล้วจึงทำการย้ายไปชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA (0 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเติม AC 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังผ่านไป 8 – 12 วัน จึงพบการเกิดรากในอาหารสูตรที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 50 และเมื่อผ่านไป 40 วัน NAA ส่งผลให้จำนวนรากและความยาวรากเพิ่มขึ้น โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 3.75 รากต่อยอด จากนั้นจึงทำการปรับสภาพโดยย้ายต้นกล้าลงกระถางซึ่งมีดินและเพอร์ไลท์ (Perlite) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 2 : 1 เป็นวัสดุปลูก และคลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกใส เพาะเลี้ยงต่อในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำออกสู่เรือนเพาะชำ หลังการปรับสภาพพบว่าต้นกล้าสามารถเติบโตได้เป็นปกติในสภาวะธรรมชาติ

Bhandari *et al.* (2021) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของพืช *Sophora mollis* ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 6 กรัมต่อลิตร และค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP kinetin และ TDZ และที่ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ NAA พบว่า อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย BAP อย่างเดียวที่ความเข้มข้น 8.9 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเกิดยอดสูงสุด (ร้อยละ 96.27) จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืชมากที่สุด (25.32 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) และมีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด (4.5 เซนติเมตร) ซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากได้ยอดที่มีความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร จึงได้ทดลองชักนำให้เกิดรากโดยเลือกใช้อาหารสูตร 1/2 MS (มีอัตราการเกิดรากมากที่สุดเท่ากับ 10.14) ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA IBA และ NAA เพื่อชักนำให้เกิดราก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า NAA ที่ความเข้มข้น 21.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครโมลาร์ มีร้อยละการเกิดราก (ร้อยละ 86.30) จำนวนรากต่อยอด (21.26 รากต่อยอด) และความยาวรากมากที่สุด (4.5 เซนติเมตร) ทำการปรับสภาพก่อนออกปลูกสู่ธรรมชาติโดยการย้ายต้นกล้าที่มีรากที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วลงในกระถางพลาสติกที่มีดินและทรายในอัตราส่วน 1 : 1 และทรายอย่างเดียว ทำการเพาะเลี้ยงในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าการใช้ทรายเพียงอย่างเดียวเป็นวัสดุปลูกต้นกล้าสามารถปรับสภาพได้ดีกว่า และหลังจากผ่านไป 2 เดือน ทำการย้ายต้นกล้าลงถุงพลาสติกสำหรับปลูกต้นไม้ที่มีดินเป็นวัสดุปลูกและเพาะเลี้ยงต่อในสภาวะเดิม หลังการปรับสภาพ พบว่าต้นไม้ร้อยละ 60 สามารถย้ายออกสู่สภาวะแวดล้อมแบบเปิดและสามารถปรับตัวเข้ากับป่าในธรรมชาติได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา

ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดต้นสารพัดพิษ (*Sophora tomentosa*) จาก รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม โดยเก็บตัวอย่างมาจากเกาะยาวน้อย จังหวัดพังงา ประเทศไทย

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ; Phytotech
น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
เจลแลนกัม (Gellan gum) ; Phytotech
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
ผงถ่านกัมมันต์ (Activated Charcoal; AC)

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่าง

ไฮโดรคลอริก (HCl)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.1.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารกลุ่มออกซิน (Auxin)
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ; Phytotech
3-Indolebutyric acid (IBA) ; Phytotech
Indole-3-acetic acid (IAA) ; Phytotech
α-Naphthalene acetic acid (NAA) ; Phytotech
สารกลุ่มไซโทไคนิน (Cytokinin)
6-Benzylaminopurine (BAP) ; Phytotech
Kinetin (Kn) ; Phytotech
Meta-Topolin (*m*T) ; Phytotech
Thidiazuron (TDZ) ; Phytotech
สารในกลุ่มจิบเบอเรลลิน (Gibberellin)
Gibberellic acid (GA_3) ; Phytotech

3.1.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

เมอร์คิวริกคลอไรด์ (Mercuric chloride; $HgCl_2$)
เซฟโฟแทกซีม (Cefotaxime) ; Nida Pharma incorporation
Plant Preservative Mixture (PPM) ; Plant cell technology
ทวีน 20 (Tween-20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์เบนดาซิม (Carbendazim) ; ซันวิสติน
เอทานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
ไฮเตอร์ (Hyter)

3.1.2.5 อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ

หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ; Tomy, ES-315, Japan
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ; Memmert, INB 500, Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ; Boss Tech
เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Caliper) ; Labnet
เครื่องเขย่า (Shaker) ; Innova 2000, New Brunswick Scientific
เตาไมโครเวฟ (Microwave oven)
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส (Refrigerator)
ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
ไฟแช็ค (Lighter)
ไมโครปิเปต (Micropipette)
ไมโครปิเปตทิปขนาดต่าง ๆ (Micropipette tips) ; Quality Scientific Plastics
มีดผ่าตัด (Scalpel) ; Dura
กรรไกร (Scissors)
ปากคีบ (Forceps) ; AMICO Germany stainless
กระบอกตวง (Cylinder) ; Vit Lab
จานแก้ว (Petri dish) ; ANUMBRA
บีกเกอร์ (Beaker) ; Kartell

3.1.2.6 วัสดุออกปลูก

กระถางพลาสติก (Plastic pot)
พีทมอส (Peat moss) ; เจียไต๋
เพอร์ไลท์ (Perlite)

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 วิธีการเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2.1.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ทำการแกะเมล็ดออกจากฝักและคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ ต้องมีลักษณะกลม แข็ง ไม่มีเชื้อรา ไม่ลีบแบน และไม่มีรูพรุนหรือรอยเจาะของแมลง (รูปที่ 3.1) ทำความสะอาดตัวอย่างด้วยน้ำยาล้างจานแล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดตามวิธีการฟอก ดังตารางที่ 3.1 ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Ramakrishna *et al.* (1991) เมื่อครบเวลาย้ายชิ้นส่วนตัวอย่างลงในเพลทที่มีกระดาษรองเพื่อผึ่งให้แห้งภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ หลังจากเมล็ดแห้งทำการตัดเปลือกหุ้มเมล็ดให้แตกด้วยกรรไกร ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น นำไปปรับค่าพีเอชที่ 5.6 – 5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร สุดท้ายนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ใส่เมล็ดขวดละ 1 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด เมื่อครบ 1 สัปดาห์ ตรวจผลส่วนของการฟอกฆ่าเชื้อและคำนวณร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามสมการที่ 3.1

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่มีการปนเปื้อน}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.1)$$

ก **ข**

รูปที่ 3.1 (ก) แสดงลักษณะของเมล็ดสารพัดพิษที่สมบูรณ์ (ข) เมล็ดสารพัดพิษที่ไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 3.1 ลำดับการฟอกและรูปแบบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างเมล็ดด้วยวิธีต่าง ๆ

ลำดับการฟอก	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3	วิธีที่ 4
1	เอทานอล 70% ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที			
2	ไฮเตอร์ 10%	ไฮเตอร์ 20%	PPM และ cefotaxime 1 มล./ล. $HgCl_2$ 0.1% และ tween-20 2 – 3 หยด	PPM และ cefotaxime 2 มล./ล. $HgCl_2$ 0.2% และ tween-20 2 – 3 หยด
	ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที			
3	PPM และ cefotaxime 1 มล./ล. ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที			
4	น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลายยอด

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP kinetin *m*T และ TDZ และใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มจิบเบอเรลลิน คือ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้อาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นเดียวกันร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0 0.5 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาผลของความเค็มต่อการงอกของเมล็ดและการเกิดยอดหลายยอด หลังการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนำไปปรับค่าพีเอชที่ 5.6 – 5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ เพื่อให้เจลแลนกัมละลาย อาหารสูตรที่ใส่ NaCl ใช้สำลีแทนเจลแลนกัมเนื่องจาก NaCl ทำให้เจลแลนกัมไม่แข็งตัว เทลงขวดปิดฝา สุดท้ายนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น GA_3 ที่นำไปกรองแล้วเติมลงไปในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายหลัง ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ใส่เมล็ดขวดละ 1 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด สังเกตการงอกของเมล็ด การเกิดยอดใหม่ของเมล็ด ทำการบันทึกผลและคำนวณร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ยต่อเมล็ด และความยาวยอดเฉลี่ย หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตามสมการที่ 3.2 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

หลังจากทราบชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลายยอดแล้ว จึงทำการทดลองซ้ำโดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS แต่เปลี่ยนเป็นเสริมด้วย BAP หรือ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำยอด เมล็ดที่เกิดยอดและรากทำการตัดส่วนยอดไปเพิ่มความแข็งแรงและชักนำราก ส่วนที่เหลือและรากทำการย้ายลงอาหารใหม่ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่ เมล็ดที่เกิดยอดแต่ไม่มีรากนำไปเพิ่มความยาวยอดแล้วชักนำให้เกิดรากต่อไป และทำการตัดใบเลี้ยงไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัส

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{จำนวนยอดเฉลี่ยจากเมล็ด} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนยอดที่เกิดจากเมล็ด}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \quad (3.3)$$

$$\text{ความยาวยอดเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมความยาวยอดทั้งหมด}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \quad (3.4)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส

ทำการตัดชิ้นส่วนใบเลี้ยงจากเมล็ดที่งอกแล้วในขวดเพาะเลี้ยงให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนำไปปรับค่าพีเอชที่ 5.6 – 5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ เพื่อให้เจลแลนกัมละลาย เทลงขวดปิดฝา สุดท้ายนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากแสง 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ใส่ชิ้นส่วนใบเลี้ยงขวดละ 4 ชิ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด ทุก ๆ 1 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของใบเลี้ยง การเกิดแคลลัส ทำการเปลี่ยนอาหารและบันทึกรูปแบบของแคลลัส ทุก ๆ 4 สัปดาห์ คำนวณร้อยละการเกิดแคลลัส ตามสมการที่ 3.5

$$\text{ร้อยละการเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนใบเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.5)$$

3.2.1.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอด

ทำการตัดแยกตายอดจากยอดในขวดเพาะเลี้ยงด้วยมีดผ่าตัดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยกำหนดความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP kinetin *m*T และ TDZ และใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มจิบเบอเรลลิน คือ GA_3 หลังการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนำไปปรับค่าพีเอชที่ 5.6 – 5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ เพื่อให้เจลแลนกัมละลาย เทลงขวดปิดฝา สุดท้ายนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น GA_3 ที่นำไปกรองแล้วเติมลงไปในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายหลัง ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ใส่ตายอดขวดละ 1 ชิ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด สังเกตการเกิดยอดหลายยอดและวัดความสูงของยอดที่เกิดขึ้น ทำการบันทึกผลและเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ คำนวณร้อยละการเกิดยอดหลายยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ย ตามสมการที่ 3.6 3.7 และ 3.4 ตามลำดับ หลังจากทราบสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนและความยาวยอดแล้ว จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้ GA_3 และ *m*T ร่วมกัน ที่ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงนำยอดที่มีความยาวยอด 30 – 40 มิลลิเมตร ไปชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อไป

$$\text{ร้อยละการเกิดกลุ่มยอดใหม่} = \frac{\text{จำนวนตายอดที่เกิดยอดหลายยอด}}{\text{จำนวนตายอดทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.6)$$

$$\text{จำนวนยอดเฉลี่ยจากกลุ่มยอด} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนยอดที่เกิดจากตายอด}}{\text{จำนวนตายอดทั้งหมด}} \qquad (3.7)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.5 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก

หลังจากชักนำให้เกิดยอดด้วยอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย GA_3 ร่วมกับ *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงนำยอดที่มีความยาวยอด 30 – 40 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรครึ่ง MS (1/2 MS) ที่มีความเข้มข้น 2.215 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยกำหนดความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D IAA IBA และ NAA หลังการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนำไปปรับค่าพีเอชที่ 5.6 – 5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร และ AC ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ เพื่อให้เจลแลนกัมละลาย เทลงขวดปิดฝา สุดท้ายนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น IAA ที่นำไปกรองแล้วเติมลงไปในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายหลัง เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด สังเกตการเกิดรากทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากเกิดรากทำการย้ายยอดที่เกิดรากลงขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารใหม่สูตรเดิมที่ไม่เติมเจลแลนกัมและ AC เพื่อทำการบันทึกผลจำนวนรากและความยาวของรากที่เกิดขึ้น คำนวณร้อยละการเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย ตามสมการที่ 3.8 3.9 และ 3.10 ตามลำดับ

$$\text{ร้อยละการเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\text{จำนวนรากเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนรากที่เกิดทั้งหมด}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดราก}} \quad (3.9)$$

$$\text{ความยาวรากเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมความยาวรากทั้งหมด}}{\text{จำนวนรากทั้งหมด}} \quad (3.10)$$

3.2.2 วิธีการนำต้นอ่อนออกปลูก

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนได้ต้นอ่อนที่มียอดและรากที่สมบูรณ์แล้ว ทำการปรับสภาพต้นอ่อน ซึ่งดัดแปลงวิธีการมาจาก Pholjad *et al.* (2020) โดยล้างอาหารแข็งที่ติดอยู่ตามรากออกด้วยน้ำสะอาด และนำไปแช่ในสารฆ่าเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง แล้วจึงย้ายลงกระถางพลาสติกที่มีวัสดุปลูกซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คือ พีทมอสร่วมกับเพอร์ไรท์ในอัตราส่วน 2 : 1 คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกโปร่งใสและเจาะรูทั่วถุงพลาสติก เพาะเลี้ยงในห้องที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารสูตร 1/4 MS ที่ปราศจากน้ำตาลรดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ บันทึกผล คำนวณอัตราการรอดชีวิตและความยาวยอดเฉลี่ย ตามสมการที่ 3.11 และ 3.4 ตามลำดับ

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นอ่อนที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นอ่อนทั้งหมดที่ออกปลูก}} \times 100 \quad (3.11)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสารพัดพิษที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เมล็ดสารพัดพิษที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อต้องมีลักษณะกลม แข็ง ไม่มีเชื้อรา ไม่ลีบแบน และไม่มีรูพรุนหรือรอยเจาะของแมลง เมื่อนำไปแช่น้ำ เมล็ดที่ดีจะลอยน้ำและแข็ง หากเมล็ดมีรอยเจาะของแมลงน้ำจะสามารถเข้าไปในเมล็ดทำให้เมล็ดจมน้ำและมีลักษณะบวมนิ่ม หลังจากทำความสะอาดเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจานแล้ว นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด แสดงผลการฟอกฆ่าเชื้อเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ ดังตารางที่ 4.1 วิธีการที่ 3 และ 4 ที่ใช้สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกันมีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการที่ 1 และ 2 ที่ใช้ไฮเตอร์เพียงอย่างเดียวในการฟอกฆ่าเชื้อ หลังการฟอกฆ่าเชื้อ 1 สัปดาห์ เมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 2 และ 3 เริ่มมีการงอกของเมล็ด แต่วิธีการที่ 4 เมล็ดเริ่มงอกในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อผ่านไปจนครบ 4 สัปดาห์ พบว่าวิธีการที่ 2 จะมีการปนเปื้อนเชื้อราที่เปลือกของเมล็ด ซึ่งวิธีการที่ 3 เป็นวิธีการที่สามารถฆ่าเชื้อได้ ไม่ทำลายเมล็ด และไม่เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากเปลือกเมล็ดอีกระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ PPM และ cefotaxime ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที แล้วฟอกซ้ำอีกครั้งในสารละลายแบบเดิมที่ไม่มีเมอร์คิวริกคลอไรด์ เป็นเวลา 15 นาที ซึ่ง Mng'omba *et al.* (2012) ได้อธิบายว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอาจก่อให้เกิดสารพิษที่เป็นอันตรายต่อพืชหรือแย่งอาหารจากพืช ดังนั้นการฟอกฆ่าเชื้อจึงเป็นวิธีการที่จำเป็นเพื่อให้การเพาะเลี้ยงพืชอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ในหลาย ๆ ตัวอย่างมีการใช้สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ และมีการใช้ Teepol หรือน้ำยาล้างจานผสมกับน้ำเพื่อให้ตัวอย่างพืชเปียกน้ำได้ดีขึ้น และเพื่อชะล้างสิ่งสกปรกออกจากตัวอย่างพืช เอทานอลเป็นสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในการฆ่าเชื้อและสปอร์ แต่เอทานอลที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) อาจเป็นอันตรายต่อตัวอย่างพืช ดังนั้นจึงควรใช้เป็นเวลาสั้น ๆ และการใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อรามากกว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) แต่เมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงอาจทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง ดังนั้นจึงควรเลือกความเข้มข้นให้เหมาะสมกับชนิดพืช และทำการล้างตัวอย่างพืชด้วยน้ำอีก 2 – 3 ครั้ง เพื่อลดความเป็นพิษของเมอร์คิวริกคลอไรด์ และจากงานวิจัยของ Ramakrishna *et al.* (1991) ได้ใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวบาร์เลย์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. alternate* และ *Fusarium* spp. ได้ และจากงานวิจัยของ Yadav and Singh (2011) ที่ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของเมอร์คิวริกคลอไรด์และระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกเมล็ดต้น *Albizia lebbeck* (L.) พบว่าหลังจากฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เมล็ดมีอัตราการงอกมากที่สุดและต้นอ่อนที่งอกมีลักษณะแข็งแรง และถึงแม้ว่าการใช้เมอร์คิกคิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถลดการปนเปื้อนได้มากกว่าแต่ส่งผลให้อัตราการงอกของเมล็ดลดลง

เนื่องจากเมล็ดสารพัดพิษมีเปลือกหุ้มเมล็ดที่ปิดมิดชิดและมีลักษณะเป็นมันวาว จึงต้องใช้กรรไกรตัดเมล็ดให้มีรอยแตกเพื่อให้ความชื้นสามารถเข้าไปในเมล็ดได้ ทำให้เมล็ดงอกได้เร็วและง่าย

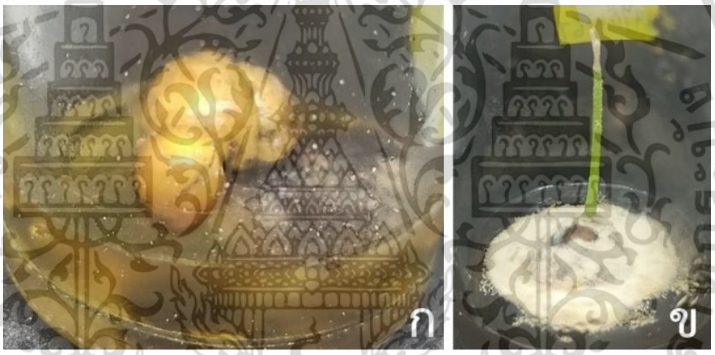
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้น ดังเช่นในงานวิจัยของ Jara-Peña and Marín-Bravo (2023) พบว่าลักษณะที่เป็นมันวาวของเมล็ดพืช หรือเมล็ดพืชที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดที่แข็งและหนา จะทำให้น้ำหรือความชื้นเข้าสู่ภายในเมล็ดได้ยาก การทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดเป็นรอยแผลโดยทางกายภาพ (การขัดด้วยกระดาษทราย) หรือการใช้สารเคมี (แช่ในกรดซัลฟิวริก) เป็นวิธีที่ทำให้เมล็ดงอกได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีอัตราการงอกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้ทำให้เกิดรอยแผล

ตารางที่ 4.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสารพัดพิษเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์

ชิ้นส่วนพืช	วิธีฟอกฆ่าเชื้อ	ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์[1]
เมล็ด (20 เมล็ด)	1	70.00[a]
	2	8.33[b]
	3	5.00[bc]
	4	1.67[c]

*หมายเหตุ [1/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะเมล็ดสารพัดพิษที่ปนเปื้อนเชื้อรา (ก) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ข) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลายยอด

จากการนำเมล็ดสารพัดพิษมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้แก่ BAP GA_3 kinetin *m*T และ TDZ หลังจากเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดมากที่สุดเท่ากับ 92.86 ยอดที่เกิดเป็นยอดเดี่ยว มีลักษณะเรียวสูง มีความยาวยอดมากที่สุด และมีรากแตกแขนงที่สมบูรณ์ (รูปที่ 4.2 ฉ) ในขณะที่ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 75.00 เกิดยอดเฉลี่ย 3.33 ยอดต่อเมล็ด ยอดมีลักษณะหนาและเตี้ยกว่ายอดจาก GA_3 และรากมีลักษณะสั้นหรือไม่มีราก (รูปที่ 4.2 ค) kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 31.25 ยอดที่เกิดไม่สูงมากและไม่มีราก (รูปที่ 4.2 ซ) *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 21.43 และ 46.15 ตามลำดับ ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะเตี้ย ไม่มีใบ และรากไม่สมบูรณ์หรือไม่มีราก (รูปที่ 4.2 ฌ และ ญ ตามลำดับ)

จากการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่า BAP และ GA_3 มีความเหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอด จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของ BAP และ GA_3 เพิ่มเติม คือ 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า BAP ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น แต่ BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยที่มากกว่า BAP ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ GA_3 ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเดี่ยวที่มีความยาวเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 51.88 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างจาก GA_3 ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (50.83 และ 51.58 มิลลิเมตร) และสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ ดังตารางที่ 4.2 จากการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhandari *et al.* (2021) ที่พบว่าการใช้ BAP ความเข้มข้น 8.9 ไมโครโมลาร์ (ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดได้จำนวนมากที่สุด เมื่อเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นในกลุ่มไซโทไคนิน และจากงานวิจัยของ Mensha *et al.* (2020) ที่ได้ศึกษาผลของ GA_3 และ kinetin ต่อการงอกของเมล็ด *Sesbania sesban* L. และ *Sesbania rostrata* L. พบว่าการนำเมล็ดของพืชดังกล่าวไปแช่ใน GA_3 หรือ kinetin ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ มีร้อยละการงอกมากกว่าเมื่อเทียบกับการนำไปแช่ในน้ำธรรมดา โดยเฉพาะในสายพันธุ์ *S. rostrata* GA_3 ส่งผลให้มีร้อยละการงอกมากกว่า kinetin

เนื่องจาก BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด จึงนำมาเป็นตัวควบคุมในการศึกษาผลของความเค็มต่อการงอกและการเกิดยอดหลายยอดของเมล็ด โดยการเติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.7 และใช้สำลีแทนเจลแลนกัม พบว่า NaCl ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละการเกิดยอดลดลงเหลือเท่ากับ 40 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.45 ยอดต่อเมล็ด (รูปที่ 4.2 ฎ) และเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นเมล็ดจะมีร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอด และความยาวยอดลดลง เมื่อเทียบกับยอดจาก BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่เติม NaCl ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เนื่องจากต้นสารพัดพิษเป็นพืชที่เติบโตอยู่ตามแนวป่าชายฝั่งทะเลจึงสามารถทนต่อความเค็มที่มีความเข้มข้นของ NaCl ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ ได้ แต่ถ้าความเข้มข้นข้นของ NaCl มากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เมล็ดไม่เกิดทั้งยอดและราก จากงานวิจัยของ Shohani *et al.* (2014) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น เมล็ดถั่วเลนทิลมีร้อยละการงอกและความยาวของต้นอ่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกทดสอบด้วย NaCl จากงานวิจัยของ Vu *et al.* (2015) ที่ได้ทำการศึกษาผลของความเค็มต่อการงอกของเมล็ด *Melilotus officinalis* เนื่องจากเมล็ดมีความแข็งและหนามากจึงได้ทำการขัดเมล็ดด้วยกระดาษทรายก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงที่รองด้วยกระดาษกรอง 2 ชั้น และให้ความชื้นด้วยน้ำกลั่น (ตัวควบคุม) และสารละลายที่มีส่วนผสมของเกลือ (NaCl และ Na_2SO_4) และเกลืออัลคาไลน์ในอัตราส่วนต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดที่ให้ความชื้นด้วยน้ำกลั่นมีอัตราการงอกของเมล็ดมากที่สุด และเมล็ดที่ให้ความชื้นด้วยสารละลายผสมของเกลือและเกลืออัลคาไลน์ในทุกอัตราส่วนมีอัตราการงอกของเมล็ดลดลง และเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นมากกว่า 150 ไมโครโมลาร์ จะทำให้อัตราการงอกลดลงอย่างมาก และจากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพืช *Retama raetam* subsp. *bovei* โดย Mechergui *et al.* (2017) ได้ทำการนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปวางบนจานเพาะเลี้ยงที่รองด้วยกระดาษกรองที่แช่ในน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลั่น (ตัวควบคุม) และสารลาย NaCl ที่ความเข้มข้น 3 6 9 12 และ 15 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดภายใต้สภาวะไม่มีแสงเป็นเวลา 30 วัน จึงตรวจผลการงอกของเมล็ดโดยการนับจำนวนเมล็ดที่มีการงอกของรากแรกเกิด (Radicle) มากกว่า 2 มิลลิเมตร พบว่าอัตราการงอกของเมล็ดจะลดลงตามความเข้มข้นของ NaCl ที่เพิ่มขึ้น และลดลงอย่างมากเมื่อ NaCl มีความเข้มข้นมากกว่า 15 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.2 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดสารพัดพิษในอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	ความเข้มข้น (มก./ล.)	ร้อยละการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/เมล็ด)	ความยาวยอดเฉลี่ย$^{1/2}$ (มม.)
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	0	84.62	1	49.71^{c} ±0.87
BAP	0.5	61.11	1.91	34.46^{d}±0.89
	1	75.00	3.33	29.49^{e}±0.80
	2	41.67	2.60	24.92^{f}±0.97
GA_3	0.5	83.33	1	50.83^{b}±0.47
	1	92.86	1	51.18^{b}±0.80
	2	80.00	1	51.88^{a}±0.81
kinetin	1	31.25	1	15.73^{i}±0.71
*m*T	1	21.43	1	12.02^{j}±0.76
TDZ	1	46.15	1	3.45^{k}±0.63
BAP 1 + 0.5% NaCl		40.00	2.45	23.89^{g}±0.76
BAP 1 + 1% NaCl		15.79	1.80	18.11^{h}±0.67
BAP 1 + 2% NaCl		0	0	0
BAP 1 + 3% NaCl		0	0	0

*หมายเหตุ $^{1/}$ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

$^{2/}$ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะยอดจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) BAP 0.5 มก./ล. (ค) BAP 1 มก./ล. (ง) BAP 2 มก./ล. (จ) GA_3 0.5 มก./ล. (ฉ) GA_3 1 มก./ล. (ช) GA_3 2 มก./ล. (ซ) kinetin 1 มก./ล. (ฌ) *m*T 1 มก./ล. (ญ) TDZ 1 มก./ล. (ฎ) BAP 1 มก./ล. + 0.5% NaCl (ฏ) BAP 1 มก./ล. + 1% NaCl

4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส โดยทำการตัดชิ้นส่วนใบเลี้ยงจากเมล็ดที่งอกแล้วในขวดเพาะเลี้ยงให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจาก 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงใน 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดแคลลัสมากที่สุดทั้งภายใต้สภาวะปราศจากแสงและมี

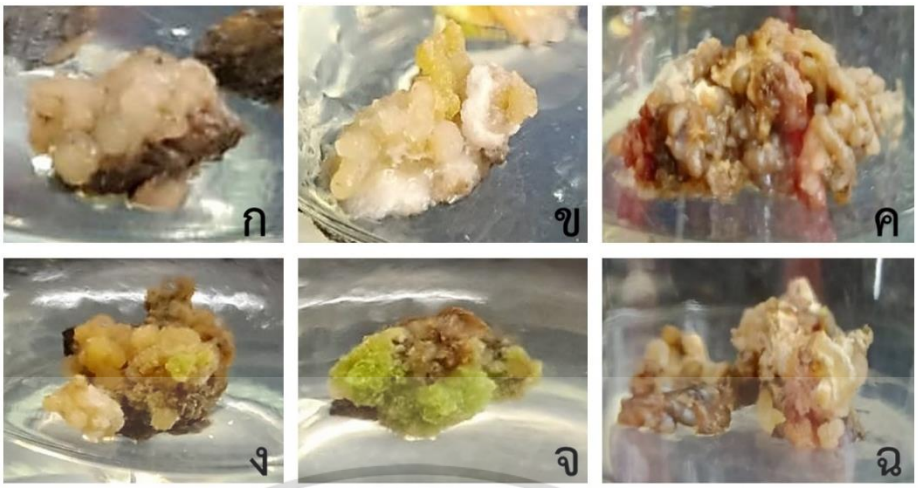
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงเท่ากับ 61.67 และ 60 ตามลำดับ รองลงมาคือ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยภายใต้สภาวะปราศจากแสง แคลลัสจาก 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสีขาว ฉ่ำน้ำ และจับตัวกันหลวม ๆ (รูปที่ 4.3 ก – ข) เปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน แคลลัสจาก 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสีเขียวปนสีขาว และจับตัวกันหลวม ๆ (รูปที่ 4.3 ง – จ) แคลลัสจาก 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะจับตัวกันหลวม ๆ มีสีน้ำตาลเข้ม ฉ่ำน้ำ (รูปที่ 4.3 ค และ ฉ) จากงานวิจัยของ Narasimhulu and Reddy (1983) พบว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำชิ้นส่วนต้นอ่อนของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) ให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด จากงานวิจัยของ Malik *et al.* (2004) ทำการทดลองชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวสาลี พบว่าที่ความเข้มข้นสูง 2,4-D จะยับยั้งการเกิดแคลลัส ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำแคลลัสที่เกิดขึ้นมีการเกิดยอดร่วมด้วย และในงานวิจัยของ Rajaram *et al.* (2013) ได้ใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำชิ้นส่วนใบของ *Tephrosia tinctoria* ให้เกิดแคลลัสได้ภายใน 45 วัน

ตารางที่ 4.3 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงต้นสารพัดพิษในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะปราศจากแสงเปรียบเทียบกับสภาวะมีแสง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	สภาวะ	จำนวนใบเลี้ยง (ชิ้น)	ร้อยละการเกิดแคลลัส
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	ปราศจากแสง	20	0
	มีแสง	20	0
2,4-D 1	ปราศจากแสง	20	30
	มีแสง	20	25
2,4-D 2	ปราศจากแสง	20	61.67
	มีแสง	20	60
2,4-D 3	ปราศจากแสง	20	15
	มีแสง	20	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ก) สภาวะปราศจากแสง 1 มก./ล. (ข) สภาวะปราศจากแสง 2 มก./ล. (ค) สภาวะปราศจากแสง 3 มก./ล. (ง) สภาวะมีแสง 1 มก./ล. (จ) สภาวะมีแสง 2 มก./ล. (ฉ) สภาวะมีแสง 3 มก./ล.

4.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอด

จากการตัดแยกตายอดจากต้นในขวดเพาะเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BAP GA_3 kinetin *m*T และ TDZ โดยกำหนดความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า TDZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้มากที่สุด โดยมีร้อยละการเกิดยอดหลายยอดเท่ากับ 46.67 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 10.71 ยอด รองลงมาคือ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีร้อยละการเกิดยอดหลายยอดเท่ากับ 33.33 แต่ยอดที่เกิดขึ้นจากการชักนำด้วย TDZ ทั้ง 2 ความเข้มข้น มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน บวม ฉ่ำน้ำ และไม่มีใบ จึงไม่สามารถบันทึกผลความยาวยอดได้ (รูปที่ 4.4 ญ – ฏ) ในขณะที่ *m*T ทั้งความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดหลายยอดเท่ากับ 26.67 และมีจำนวนยอดที่เกิดใหม่น้อยกว่า TDZ แต่กลุ่มยอดใหม่นี้ไม่มีการบวมหรือฉ่ำน้ำและพร้อมเจริญต่อไปเป็นยอดใหม่ได้ (รูปที่ 4.4 ซ – ฌ) GA_3 ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดหลายยอดเท่ากับ 20 และ 26.67 ตามลำดับ แม้ว่าจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยกว่า แต่ GA_3 สามารถเพิ่มความยาวยอดได้ โดย GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 33.94 มิลลิเมตร รองลงมาคือ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 33.14 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะสูง เรียว มีใบ พร้อมสำหรับการนำไปชักนำให้เกิดราก (รูปที่ 4.4 ง – จ) ในส่วนของ BAP kinetin และสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีร้อยละการเกิดยอดหลายยอดเท่ากับ 20 และมีผลจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ตายอดที่ชักนำด้วย BAP ยอดที่เกิดขึ้นมีความหนาและเตี้ยกว่าเมื่อเทียบกับยอดที่ชักนำด้วย GA_3 (รูปที่ 4.4 ข – ค) kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเตี้ยที่มีใบและมีลักษณะฐานยอดกว้าง (รูปที่ 4.4 ฉ) แต่ใน kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดขึ้นมีลักษณะสั้นแต่ไม่มีอาการฉ่ำน้ำ (รูปที่ 4.4 ช) และในสูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตยอดมีลักษณะเตี้ย ผอม และไม่มีอาการฉ่ำน้ำ (รูปที่ 4.4 ก)

จากผลการทดลองข้างต้นที่ *m*T สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่มีลักษณะพร้อมเจริญเป็นต้นอ่อนใหม่ได้ จึงได้มีการนำกลุ่มยอดดังกล่าวมาเพิ่มความยาวยอดโดยการนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 เสริมด้วย GA_3 ร่วมกับ *m*T ที่ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้ GA_3 ร่วมกับ *m*T มีจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 4.4 ยอดที่เกิดขึ้นจาก GA_3 ร่วมกับ *m*T ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะเป็นกลุ่มยอดเล็ก ๆ อยู่รวมกับบางยอดที่มีลักษณะเรียว สูง โดยที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีจำนวนยอดสูงที่มากกว่า แต่มีความยาวยอดเฉลี่ยน้อยกว่า (รูปที่ 4.4 ฏ – ฐ) และกลุ่มยอดจาก TDZ ที่มีลักษณะบวมน้ำ ไม่เจริญต่อเป็นยอดใหม่นั้น ได้นำมาทำการทดลองต่อกับอาหารสูตรเดิมแต่เปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็น GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มความสูงของยอด พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดดังกล่าวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เริ่มมีลักษณะของกลุ่มยอดที่พร้อมเจริญต่อไปเป็นยอดปรากฏขึ้น และเมื่อผ่านไป 16 สัปดาห์ สามารถมองเห็นการเกิดยอดที่ชัดเจนโดยมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 29.21 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.5)

Akasaka *et al.* (2000) พบว่า TDZ นั้น มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงสายพันธุ์ Chico ได้มากที่สุด แต่การเพาะเลี้ยงต่อเนื่องในอาหารที่มี TDZ นั้นจะส่งผลให้ยอดที่เกิดขึ้นมีการพัฒนาที่ผิดปกติและไม่สามารถเจริญไปเป็นต้นอ่อนได้ ดังนั้นการใช้ TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงไม่ควรเกิน 21 วัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pholjad *et al.* (2020) ที่ได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดยอดจากข้อของ *A. glabrata* พบว่าการใช้ TDZ ทำให้ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะเตี้ย ไม่สมบูรณ์ และมีความฉ่ำน้ำ

Kapildev *et al.* (2020) พบว่า *m*T นั้นมีบทบาทสำคัญต่อถั่วดำ (*Vigna mungo* L.) ในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด โดยส่งผลให้เกิดยอดใหม่และจำนวนยอดเฉลี่ยได้มากกว่าการใช้ BAP kinetin หรือ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ และยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่สามารถชักนำให้เป็นต้นอ่อนต่อไปได้ จากการทดลองพบว่าการใช้ *m*T ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นดีที่สุด การเพิ่มหรือลดความเข้มข้นจะส่งผลให้ร้อยละการเกิดยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยลดลง แต่การใช้ *m*T ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ได้ดีเหมือนกัน (มีร้อยละการเกิดยอดใหม่เท่ากับ 86.60 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 8 ยอด) และการใช้ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มความยาวยอดที่เกิดขึ้นได้สูงที่สุด ยอดที่ได้มีลักษณะปกติและแข็งแรง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Franklin *et al.* (2004) ที่ได้ใช้ GA_3 ในการเพิ่มความยาวของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงต้นถั่วเหลือง (*Glycine max* L.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงร้อยละการเกิดยอดหลายยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยหลังจากเพาะเลี้ยงตายอดในอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	ร้อยละการเกิดยอดหลายยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย[1/2] (ยอด/ขวด)	ความยาวยอดเฉลี่ย[1/2] (มม.)
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	0	20.00	3.60^{fg}±0.54	10.81^{i}±0.68
BAP	1	20.00	2.40^{h}±0.55	11.73^{gh}±0.87
	2	20.00	3.20^{gh}±0.45	15.35^{e}±0.52
GA_3	1	20.00	4.20^{f}±0.45	33.94^{a}±0.57
	2	26.67	4.40^{f}±0.55	33.13^{b}±0.93
kinetin	1	20.00	2.60^{h}±0.55	10.78^{i}±0.47
	2	20.00	4.00^{fg}±0.70	11.29^{h}±0.46
*m*T	1	26.67	7.20^{d}±0.84^{d}	11.91^{g}±0.74
	2	26.67	8.60^{c}±0.89^{c}	14.79^{f}±0.67
TDZ	1	33.33	6.00^{e}±0.71	-
	2	46.67	10.60^{b}±0.55	-
GA_3 + *m*T	1	26.67	11.40^{b}±0.89	31.23^{c}±0.59
GA_3 + *m*T	2	26.67	21.60^{a}±0.89	21.76^{d}±0.60

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะยอดต้นสารพัดพิษที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) BAP 1 มก./ล. (ค) BAP 2 มก./ล. (ง) GA_3 1 มก./ล. (จ) GA_3 2 มก./ล. (ฉ) kinetin 1 มก./ล. (ช) kinetin 2 มก./ล. (ซ) *m*T 1 มก./ล. (ฌ) *m*T 2 มก./ล. (ญ) TDZ 1 มก./ล. (ฎ) TDZ 2 มก./ล. (ฏ) GA_3 1 มก./ล. + *m*T 1 มก./ล. (ฐ) GA_3 2 มก./ล. + *m*T 2 มก./ล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะกลุ่มยอดต้นสารพัดพิษจาก TDZ ที่นำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ GA_3 1 มก./ล. เป็นเวลา 16 สัปดาห์

4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก

ทำการคัดเลือกยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย GA_3 ร่วมกับ *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีความยาวยอด 30 – 40 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรครึ่ง MS (1/2 MS) ที่มีความเข้มข้น 2.215 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร AC 1 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2,4-D IAA IBA และ NAA โดยกำหนดความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า IBA และ NAA ทุกความเข้มข้นไม่เกิดรากและ NAA ทำให้ใบร่วง มีเพียงอาหารสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่เสริมด้วย 2,4-D หรือ IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พบการเกิดราก ในสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 13.33 จำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 3.67 รากต่อยอด รากที่เกิดขึ้นเป็นรากเส้นเดี่ยวหลายเส้น แตกออกมาจากฐานของยอด มีลักษณะบางเปราะขาดง่าย และมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 8.36 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.6 ก) 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ร้อยละ 26.67 รากที่เกิดขึ้นเป็นรากเดี่ยวแตกออกมาจากฐานของยอดมีลักษณะสั้น บาง และเปราะขาดง่าย มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 4.5 รากต่อยอด และความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 9.91 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.6 ข) ในขณะที่ IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากได้ร้อยละ 33.33 รากที่เกิดขึ้นเป็นรากเส้นเดี่ยวมีลักษณะยาวและเปราะขาดง่าย แตกออกจากฐานของยอด มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 5.4 รากต่อยอด และมีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 38.72 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.6 ค)

Bhandari *et al.* (2021) ได้ทำการทดลองสูตรอาหาร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำรากในพืช *Sophora mollis* พบว่าอาหารสูตร 1/2 MS มีร้อยละการเกิดรากมากกว่าอาหารสูตร 1/4 MS และสูตร MS ที่ไม่พบการเกิดราก Ozkul *et al.* (2016) ได้ศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์รากของหัวหอม (*Allium cepa*) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS เสริมด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าค่า mitotic index เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง และ Karami *et al.* (2023) พบว่า 2,4-D มีผลยับยั้งการเกิดรากแขนง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่สามารถชักนำให้เกิดรากพิเศษ (adventitious root) ได้มากกว่า IBA และ NAA ในพืช *Arabidopsis thaliana*

ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตามหลักทฤษฎีแล้ว IAA มีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดรากและรากแขนงจากชิ้นส่วนลำต้น (Davies, 2010) จากงานวิจัยของ Savarimuthu *et al.* (2000) ได้ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำรากต้น *Pterocarpus santalinus* (L.) พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร 1/4 MS ที่เสริมด้วย IAA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และ Fratini and Ruiz (2003) ได้รายงานว่าการใช้ IAA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำต้นถั่วเลนทิลให้เกิดรากได้มากที่สุด (ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 100) และมีจำนวนรากมากที่สุด และจากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้ง IAA ต่อการชักนำรากในต้นถั่ว พบว่า IAA มีส่วนทำให้จำนวนรากที่เกิดขึ้นลดลง แต่การเติม AC ลงไปจะช่วยดูดซับทั้งสารที่ยับยั้งและสารที่เร่งการเกิดราก จึงใช้เวลาในการเกิดรากช้าลงแต่มีจำนวนรากเพิ่มขึ้น (Eliasson, 1981)

ตารางที่ 4.5 แสดงร้อยละการเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยหลังจากเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย AC 1 ก./ล. ร่วมกับ 2,4-D หรือ IAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	จำนวนยอด	ร้อยละการเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย[1/2] (ราก/ยอด)
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	5	13.33	3.67^{c}±0.82
2,4-D 0.25	5	26.67	4.50^{b}±0.53
IAA 0.25	5	33.33	5.40^{a}±0.55

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะรากที่เกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงยอดต้นสารพัดพิษในอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) 2,4-D 0.25 มก./ล. (ค) IAA 0.25 มก./ล.

4.6 ผลการนำต้นอ่อนออกปลูก

หลังจากเพาะเลี้ยงต้นสารพัดพิษภายใต้สภาวะปลอดเชื้อจนได้ต้นอ่อนที่มียอดและรากที่สมบูรณ์แล้ว จึงทำการปรับสภาพต้นอ่อน โดยล้างวุ้นอาหารที่ติดอยู่ออกด้วยน้ำสะอาด และนำไปแช่ในสารฆ่าเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ก่อนนำไปออกปลูกโดยใช้พีทมอสและเพอร์ไรท์ในอัตราส่วน 2 : 1 เป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกใสเจาะรู และใช้อาหารสูตร 1/4 MS ที่ปราศจากน้ำตาลรดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง พบว่าในการปรับสภาพสัปดาห์ที่ 6 ต้นสารพัดพิษมีลักษณะต้นที่แข็งแรง ความสูงเพิ่มขึ้น สามารถแตกยอดและใบใหม่ได้ (รูปที่ 4.7 ข) เมื่อปรับสภาพครบ 16 สัปดาห์ ต้นสารพัดพิษมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 60 เนื่องจากสภาวะที่ใช้ปรับสภาพมีความชื้นสูง จึงเกิดเชื้อราที่วัสดุปลูกระหว่างการปรับสภาพ ซึ่งทำให้รากเน่าและต้นอ่อนตายในที่สุด Brown and Cooprider (2009) ได้กล่าวว่าต้นสารพัดพิษเป็นพืชที่เจริญเติบโตอยู่ตามแนวป่าชายฝั่งทะเล แต่ก็ไม่สามารถทนต่อการแช่อยู่ในน้ำเค็มหรือน้ำกร่อยเป็นเวลานานที่อาจทำให้รากเน่าได้ ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดเชื้อราและเพื่อการระบายน้ำที่ดี การใช้เพอร์ไรท์จะช่วยเพิ่มช่องว่างในดินทำให้ไม่จับตัวกันเป็นก้อน จึงช่วยให้มีการถ่ายเทอากาศและระบายน้ำในดินได้ดี (Grant, 2021)

จากงานวิจัยของ Yadav and Singh (2011) ได้ทำการปรับสภาพต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *Albizia lebbeck* (L.) ก่อนนำออกสู่ธรรมชาติ โดยการย้ายต้นกล้าที่มีการพัฒนาของรากจนสมบูรณ์แล้วลงในกระถางพลาสติกที่มีดินและทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกใสเจาะรู เพื่อคงสภาพความชื้นสูงเช่นเดียวกับที่เพาะเลี้ยงภายในหลอดทดลอง นำไปเลี้ยงต่อในห้องเพาะเลี้ยงและรดด้วย 1/4 MS ทุก 2 วัน เมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ ทำการเปิดถุงพลาสติกวันละ 3 – 4 ชั่วโมง เพื่อให้พืชสามารถปรับตัวให้เข้ากับความชื้นตามธรรมชาติได้ หลังการปรับสภาพเป็นเวลา 1 เดือน จึงทำการย้ายต้นไม้ไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมธรรมชาติในกระถางที่มีดินและทรายในอัตราส่วน 1 : 3 พบว่าต้น *Albizia lebbeck* (L.) สามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติและมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 (ก) แสดงลักษณะต้นอ่อนสารพัดพิษระหว่างการปรับสภาพสัปดาห์ที่ 1 (ข) สัปดาห์ที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสารพัดพิษ โดยใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ cefotaxime และ PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที แล้วฟอกซ้ำอีกครั้งในสารละลายแบบเดิมที่ไม่มีเมอร์คิวริกคลอไรด์ เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยไม่ทำลายเมล็ด และควรทำการตัดเปลือกเมล็ดให้มีรอยแตกเพื่อให้ความชื้นสามารถเข้าสู่เมล็ดได้ง่ายขึ้น หลังจากนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ามีร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์เท่ากับ 5 และไม่เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากเปลือกเมล็ดอีกในระหว่างการเพาะเลี้ยง

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและการเกิดยอดหลายยอดจากเมล็ดสารพัดพิษ ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP GA_3 kinetin *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีร้อยละการเกิดยอดสูงสุด (ร้อยละ 92.86) ในขณะที่ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรส่งเสริมให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 3.33 ยอดต่อเมล็ด จึงได้ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ GA_3 และ BAP เพิ่มเติม คือ 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดที่เกิดขึ้นมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 51.88 มิลลิเมตร ส่วน BAP สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ทุกความเข้มข้น แต่เมื่อลดหรือเพิ่มความเข้มข้นจาก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีร้อยละการเกิดยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยลดลง ดังนั้นจึงได้ทำการเลือก BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเป็นตัวควบคุมในการศึกษาผลของความเค็มต่อการเกิดยอดของเมล็ดสารพัดพิษ โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีส่วนประกอบเหมือนเดิม เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NaCl ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นร้อยละการเกิดยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยจะลดลง และไม่พบการเกิดยอดเมื่อความเข้มข้นของ NaCl มากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของต้นสารพัดพิษด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0 1 2 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปราศจากแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เปรียบเทียบกับสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงให้มีร้อยละการเกิดแคลลัสสูงสุดทั้ง 2 สภาวะการเพาะเลี้ยง โดยการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน แคลลัสจะมีสีเขียวและจับตัวกันแน่นมากกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปราศจากแสงปราศจากแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดโดยการตัดแยกตายอดจากยอดภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP GA_3 kinetin *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า TDZ มีร้อยละการเกิดยอดหลายยอดมากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น แต่กลุ่มยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะบวมน้ำ และไม่สามารถเจริญต่อไปเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ ในขณะที่ *m*T มีร้อยละการเกิดยอดหลายยอดรองลงมา แต่กลุ่มยอดนี้ไม่มีอาการฉ่ำน้ำ และสามารถชักนำให้เป็นยอดใหม่ที่สมบูรณ์ได้ และ GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มความยาวยอดให้มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด จากผลการทดลองดังกล่าว จึงได้ทำการใช้ GA_3 ร่วมกับ *m*T เพื่อเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดในเวลาเดียวกัน พบว่าการใช้ GA_3 ร่วมกับ *m*T ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดยอดหลายยอดที่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นยอดใหม่ได้มากที่สุด แต่การใช้ GA_3 เพียงอย่างเดียวยังคงชักนำให้ยอดมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด จากผลการทดลองนี้ จึงได้ทำการย้ายกลุ่มยอดที่เกิดขึ้นจาก TDZ ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มความยาวของยอด ซึ่ง GA_3 สามารถเพิ่มความยาวยอดจนเป็นยอดใหม่ได้ในเวลา 16 สัปดาห์

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำรากของต้นสารพัดพิษ โดยการนำยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และเสริมด้วย GA_3 ร่วมกับ *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีความสูง 30 – 40 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AC 1 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ อาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด (ร้อยละ 33.33) โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 5.4 รากต่อยอด รากที่เกิดขึ้นมีลักษณะบางและเปราะขาดง่าย

การศึกษาวิธีการนำออกปลูก โดยการปรับสภาพต้นอ่อนสารพัดพิษที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อจนมียอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วนำไปล้างวุ้นอาหารที่ติดอยู่ออกด้วยน้ำสะอาด และนำไปแช่ในสารฆ่าเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยใช้พีทมอสกับเพอร์ไรท์ในอัตราส่วน 2 : 1 เป็นวัสดุปลูก คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกใสเจาะรู และใช้อาหารสูตร 1/4 MS ที่ปราศจากน้ำตาลรดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง พบว่าระหว่างการปรับสภาพในสัปดาห์ที่ 6 ต้นสารพัดพิษมีลักษณะต้นที่แข็งแรง ความสูงเพิ่มขึ้น สามารถแตกยอดและใบใหม่ได้ เมื่อปรับสภาพครบ 16 สัปดาห์ ต้นสารพัดพิษมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 60

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 แม้ว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสงจะมีเริ่มสีเขียวแต่ยังไม่พบการเกิดตายอดหรือลักษณะที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ และยังคงมีปริมาณที่น้อย จึงควรเพิ่มปริมาณแคลลัสให้ได้จำนวนมาก แล้วจึงนำไปชักนำให้เกิดยอดต่อด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม

5.2.2 รากที่ถูกชักนำโดย IAA ถึงแม้ว่าจะมีการเกิดรากที่ดูสมบูรณ์มากกว่าอาหารสูตรอื่น แต่ยอดยังมีลักษณะไม่แข็งแรงและมีใบน้อย จึงควรมีการเพิ่มความแข็งแรงของยอดและจำนวนใบก่อนนำไปออกปลูก เพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของต้นอ่อนที่นำไปออกปลูก

5.2.3 ควรมีการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนที่มีรากสมบูรณ์ให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปศึกษาวิธีการปรับสภาพเพิ่มเติม เช่น การใช้วัสดุออกปลูกอื่น ความเข้มข้นของสารอาหารที่รด (อาจเป็น 1/2 MS ที่ปราศจากน้ำตาล) ระยะเวลาในการรดน้ำ หรือค่าพีเอชของน้ำที่ใช้รด เพื่อเพิ่มร้อยละการรอดชีวิตของต้นกล้าสารพัดพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ไซมอน การ์ดเนอร์, พินดา สิทธิสุนทร และก่องกานดา ชยามฤต. 2559. **ไม้ป่าภาคใต้**. เล่มที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โครงการจัดพิมพ์คบไฟ

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2540. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น : หจก. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา

มานี เตื้อสกุล. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชเพื่อการเกษตร (Plant Tissue Culture in Agriculture)**. สงขลา : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี

สุรวิช วรรณไกรโรจน์ และศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต. 2542. “ผลของแสงและความชื้นสัมพัทธ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่งก่อนนำออกปลูก”. *วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.).* 33 : 522-529

Akasaka, Y. Daimon, H. and Mii, M. 2000. “Improved Plant Regeneration from Cultured Leaf Segments in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) by Limited Exposure to Thidiazuron”. *Plant Science*. 156(2) : 169-175.

Aly. S.H. Elissawy, A.M. Eldahshan, O.A. Elshanawany, M.A. and Singab, A.N.B. 2020. “Phytochemical Investigatation Using GC/MS Analysis and Evaluation of Antimicrobial and Cytotxic Activities of the Lipoidal matter of Leaves of *Sophora secundiflora* and *Sophora tomentosa*”. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*. 4(2) : 207-214.

Bhandari, A. Singh, H. Srivastava, A. Kumar, P. Panwar, G.S. and Mao, A. A. 2021. “*In Vitro* Propagation and Cytological Analysis of *Sophora mollis* Royle: An Endangered Medicinal Shrub”. *Journal of Genetics Engineering and Biotechnology*. 19(40) : https://doi.org/10.1186/s43141-021-00140-3.

Boruah, J. 2020. “Effect of 0.1% $HgCl_2$ on Surface Sterilization of *Som* (*Persea bombycina* King) Explant during Tissue Culture – A Major Host Plant of Muka Silkworm”. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 9(7) : 954-958.

Brown, S. H. and Cooprider, K. 2009. ***Sophora tomentosa***. [Online]. Available : https://silo.tips/download/sophora-tomentosa-necklace-pod-silver-bush-yellow-necklace-pod.

Chakravarthy, V.S.K. and Negi, P.S. 2014. “Enhanced *In Vitro* Regeneration from Seedling Explants of a Medicinally Important Leguminous Tree (*Albizia lebbeck* Benth.)”. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 3(9) : 65-73.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Darworth, C.E. and Callan, B.E. 1996. “Manipulation of Endophytic Fungi to Promote their Utility as Vegetation Biocontrol Agents”. *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants, Systematics, Ecology and Evolution. S.C. Redlin & L.M. Carris (Eds)* : 209–216.

Davies, P.J. 2010. **Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action**. New York : Springer.

Eliasson, L. 1981. “Factors Affecting the Inhibitory Effect of Indolylacetic Acid on Root Formation in Pea Cuttings”. *Physiologia Plantarum*. 51 : 23-26.

Franklin, G. Carpenter, L. Davis, E. Reddy, C.S. Al-Abed, D. Abou Alaiwi, W. Parani, M. Smith, B. Goldman S.L. and Sairam, R.V. 2004. “Factors Influencing Regeneration of Soybean from Mature and Immature Cotyledons”. *Plant Growth Regulation.* 43 : 73-79.

Fratini, R. and Ruiz, M.L. 2003. “A Rooting Procedure for Lentil (*Lens culinaris* Medik.) and other Hypogeous Legumes (Pea, Chickpea and *Lathyrus*) Based on Explant Polarity”. *Plant Cell Rep*. 21 : 726-732.

Grant, A. 2021. **What is Perlite: Learn About Perlite Potting Soil**. [Online]. Available : https://www.gardeningknowhow.com/garden-how-to/soil-fertilizers/perlite-potting-soil.htm.

Hakim, L. Islam M.R. Mamun, A.N.K. Ahmed, G. and Khan, R. 2010. “Clonal Propagation of Carob (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae)”. *Bangladesh J. Bot*. 39(1) : 15-19.

Jara-Peña E. and Marín-Bravo M. 2023. **The Role of the Internal Structure of Fabaceae Seeds in the Processes of Dormancy and Germination. Production and Utilization of Legumes - Progress and Prospects**. [Online]. Available : http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.109627.

Kapildev, G. Chinnathambi, A. Sivanandhan, G. Rajesh, M. Jeyaraj, M. Selvaraj, N. Alharbi, S.A. and Ganapathi, A. 2020. “Meta-Topolin and β-cyclodextrin Enhance Multiple Shoot and Root Production in Black Gram *Vigna mungo* (L.) Hepper”. *Indian Journal of Experimental Biology*. 58 : 314-322.

Karami, O. de Jong, H. Somovilla, V.J. Villanueva Acosta, B., Sugiarta, A.B. Ham, M. Khadem, A. Wennekes, T. and Offringa, R. 2023. “Structure–activity Relationship of 2,4-D Correlates Auxinic Activity with the Induction of Somatic Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*”. *The Plant Journal*. 116 : 1355-1369.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Lloyd, G. and McCown, B.H. 1980. "Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, Kalmia latifolia, by Use of Shoot-Tip Culture". *Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society*. 30 : 421-427.

Malik, S.I. Hamid, R. Tayyaba, Y. AND Nasir, M.M. 2004. "Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid on Callus Induction from Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds". *International Journal of Agriculture and Biology*. 6(1) : 156-159.

Mechergui, K. Mahmoudi, H. Khouja, M.L. and Jaouadi, W. 2017. "Factors Influencing Seed Germination of the Pastoral Plant *Retama raetam* subsp. *bovei* (Fabaceae) : Interactive Effects of Fruit Morphology, Salinity and Osmotic Stress". *Biologija*. 63(2) : 134-151.

Mensah, S.I. Ekeke, C. and Ibeagi, N.K. 2020. "Effect of Gibberellic Acid (GA_3) and Kinetin on Seed Germination of *Sesbania sesban* L. and *Sesbania rostrata* L. (Fabaceae)". *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*. 5(2) : 32-41.

Mng'omba, S.A. du Toit, E.S. and Akinnifesi, F.K. 2007. "Effective Preconditioning Methods for In Vitro Propagation of *Uapaca kirkiana* Müell Arg. Tree Species". *African Journal of Biotechnology*. 6(14) : 1670 – 1676.

Mng'omba, S.A. Sileshi, G. du Toit, E.S. and Akinnifesi, F.K. 2012. **Fungicides for Plant and Animal Diseases, Dr.Dharumadurai Dhannasekaran (Ed.)**. [Online]. Available : http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/efficacy-and-utilization-offungicides-and-other-antibiotics-for-aseptic-plant-cultures.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Growth and Bioassays with Tobacco Tissue." *Physiol. Plant*. 15 : 473-797.

Murashige, T. 1977. "Plant Cell and Organ Cultures as Horticultural Practices". *Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes*. 78 : 17-30.

Narasimhulu, S.B. and Reddy, G.M. 1983. "Plantlet Regeneration from Different Callus Cultures of *Arachis hypogaea* L." *Plant Science Letters*. 31(2-3) : 157-163.

Natural History Museum. 2024. **Natural History Museum (London) Collection Specimens**. [Online]. Available : https://www.gbif.org/occurrence/1056805541.

Ozkul, M. Ozel, C.A. Yuzbasioglu, D. and Unal, F. 2016. "Does 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Induce Genotoxic Effects in Tissue Cultured *Allium* Roots?". *Cytotechnology*. 68 : 2395-2405.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Perveen, S. Anis, M. and Aref, I.M. 2013. "Resource Communication *In Vitro* Plant Regeneration of *Albizia lebbeck* (L.) Benth from Seed Explants". *Forest Systems.* 22(2) : 241-248.

Pholjad, A. Pongtongkam, P. Arananant, J. and Poeaim, A. 2020. "*In Vitro* Propagation from Nodal Segments of *Arachis glabrata* Cultivar Florigraze". *International Journal of Agricultural Technology*. 16(5) : 1175-1184.

Pierik, R.L.M. 1997. ***In Vitro* Culture of Higher Plants**. 1st ed. Dordrecht : Spinger

Puechkaset. 2559. **สารพัดพิษ ประโยชน์ และสรรพคุณสารพัดพิษ**. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : https://puechkaset.com/สารพัดพิษ /#google_vignette.

Rajaram, K. Moushmi, M. Velayutham Dass Prakash, M. Kumpati, P. Ganasaraswathi, M. and Sureshkumar, P. 2013. "Comparative Bioactive Studies Between Wild Plant and Callus Culture of *Tephrosia tinctoria* Pers". *Applied Biochemistry and Biotechnology.* DOI: 10.1007/s12010-013-0444-3.

Ramakrishna, N. Lacey, J. and Smith J.E. 1991. "Effect of Surface Sterilization, Fumigation and Gamma Irradiation on the Microflora and Germination of Barley Seeds". *Unternational Journal of Food Microbiology*. 13(1) : 47-54.

Savarimuthu, A. Savarimuthu, I. and Melchias, G. 2000. "Influence of Growth Regulators and Explant Type on *In Vitro* Shoot Propagation and Rooting of Red Sandal Wood (*Pterocarpus santalinus* L.)". *Indian Journal of Experimental Biology*. 38 : 1270-1273.

Shohani, F. Mehrabi, A.A. Khavarinegad, R.M. Safari, Z. and Kian, S. 2014. "The Effect of Gibberellic Acid (GA_3) on Seed Germination and Early Growth of Lentil Seedlings under Salinity Stress". *Middle-East Journal of Scientific Research*. 19(7) : 995-1000.

Vu, T.S. Zhang, D.W. Xiao, W. Chi, C. Xing, Y. Fu, D. and Yuan, Z. 2015. "Mechanisms of Combined Effects of Salt and Alkaline Stresses on Seed Germination and Seedlings of *Melilotus officinalis* (Fabaceae) in Northeast of China". *Pakistan Journal of Botany*. 47(5) : 1603-1611.

Yadav, K. and Singh, N. 2011. "Effect of Seed Harvesting Season and Sterilization Treatments on Germination and *In Vitro* Propagation of *Albizia lebbeck* (L.) Benth". *Analele Universităţii din Oradea - Fascicula Biologie.* 18(2) : 151-156.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก ที่ 1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS : Murashige and Skoog (1962) ; Phytotech

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium Nitrate	1650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride, Hexahydrate	0.025
EDTA, Disodium Salt	37.26
Ferrrous Sulfate, Heptahydrate	37.8
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate	16.9
Potassium Iodine	0.83
Potassium Nitrate	1900
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	170
Sodium Molybdate (VI), Dihydrate	0.25
Zinc Sulfate, Heptahydrate	8.6
Glycine	2.0
Myo-Inositol	100
Nicotinic Acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Sucrose	30000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณัฐติกา รุ่งประทีปไพบูลย์
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2540
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 101/26 หมู่ที่ 7 ตำบลบางพลีใหญ่ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540
ประวัติการศึกษา	(2562) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.49 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2567) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาสำหรับหลักสูตรระดับปริญญาโท เป็นระยะเวลาไม่เกิน 2 ปี ผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการยกระดับเศรษฐกิจและสังคมรายตำบลแบบบูรณาการ (1 ตำบล 1 มหาวิทยาลัย เป็นระยะเวลา 3 เดือน)

ผลงานทางวิชาการ

ได้นำเสนอ (Oral presentation) บทความวิจัยเรื่อง “Effects of Growth Regulators on *In Vitro* Propagation of *Sophora tomentosa* L. (Necklace Pod)” ในงานประชุมวิชาการ International Conference on the Integration of Science and Technology for Sustainable Development ครั้งที่ 11 วันที่ 1 – 3 กุมภาพันธ์ 2567 ณ Sathyabama Institute of Science and Technology Chennai, Tamil Nadu, India.

Rungprateeppaiboon, N. Chareonsap, P.P. Pongtongkam, P. Poeaim, A. and Poeaim, S. 2024. “Effects of Growth Regulators on *In Vitro* Propagation of *Sophora tomentosa* L. (Necklace pod)”. *International Journal of Agricultural Technology*. 20(3) : 1237-1246.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้