การขยายพันธุ์ไม้แดง (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

MICROPROPAGATION OF IRONWOOD (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) BY TISSUE CULTURE

ศศิวิมล ปั้นอุดม

SASIWIMON PANUDOM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2567

KMITL-2024-SC-M-020-028

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MICROPROPAGATION OF IRONWOOD (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) BY TISSUE CULTURE

SASIWIMON PANUDOM

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

DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2024

KMITL-2024-SC-M-020-028

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 การขยายพันธุ์ไม้แดง (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชื่อนักศึกษา นางสาวศศิวิมล ปั้นอุดม

รหัสประจำตัว 63605053

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยา

พ.ศ. 2567

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

ไม้แดง *Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub เป็นพืชยืนต้นขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยจัดอยู่ในกลุ่มไม้เนื้อแข็ง จึงนิยมนำส่วนของเนื้อไม้ไปใช้ประโยชน์ในด้านการก่อสร้างต่างๆ ในปัจจุบันพบว่า ไม้แดงขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ดเพียงวิธีเดียว และอัตราการงอกของเมล็ดจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น จึงทำการศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นไม้แดงอย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น และคงรักษาลักษณะทางพันธุกรรมเดิมไว้ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดและชิ้นส่วนข้อของไม้แดงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารป้องกันเชื้อรา Carbendazim สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เมอคิวริกคลอไรด์ เอทานอล สารปฏิชีวนะ Antibiotic Antimycotic และCefotaxime สารละลายPreservative for plant tissue culture media active (PPM) และสารละลาย Tween-20 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ ในส่วนของเมล็ดไม้แดง นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำการงอกของเมล็ด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ร้อยละการงอกของเมล็ดสูงที่สุดเท่ากับ 90 โดยระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 3.5 วัน เพาะเลี้ยงจนครบ 8 สัปดาห์ จึงนำมาชักนำให้เกิดยอด โดยการตัดชิ้นส่วนข้อจากการงอกของเมล็ด และชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP หรือ KN ความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 2.0 และ3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า การเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับจากชิ้นส่วนข้อจากการงอกเมล็ด ส่งผลให้มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.031 เซนติเมตร ตามลำดับ และการเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับจากชิ้นส่วนข้อจากการฟอกฆ่าเชื้อ ส่งผลให้มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 3.418 เซนติเมตร ตามลำดับ

ในการศึกษาการชักนำให้เกิดราก โดยการนำส่วนยอดจากข้อและเมล็ดที่เจริญเติบโตสมบูรณ์เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA ความเข้นข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละเกิดรากสูงที่สุดเท่ากับ 93.33 และ 86.67 ตามลำดับ มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 2.80 และ 2.53 ตามลำดับ และมีระยะเวลาการงอกของรากเฉลี่ยเท่ากับ 11.5 และ 9.6 วัน ตามลำดับ สำหรับการปรับสภาพต้นกล้าโดยใช้วัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ได้แก่ เพอร์ไลท์ ร่วมกับดิน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จึงสามารถออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมได้ และขั้นตอนสุดท้ายทำการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 9 ไพร์เมอร์ สำหรับต้นเริ่มต้นของไม้แดง และต้นกล้าในสภาวะหลอดทดลองที่มีอายุ 12 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรม

คำสำคัญ : การขยายพันธุ์ การชักนำการเกิดยอด การชักนำการเกิดราก พืชตระกูลถั่ว ไม้แดง
สารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Micropropagation of Ironwood (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) by Tissue Culture
Student Name	Miss Sasiwimon Panudom
Student ID	63605053
Degree	Master of Science
Department	Biology
Year	2024
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

Xylia xylocarpa (Roxb.) Taub, commonly known as Mai-Daeng or Ironwood, is a large-sized perennial plant in the Fabaceae family, categorized under hardwood trees. It is widely utilized for various construction purposes due to its durable wood. Ironwood is primarily propagated through seed germination, and the germination rate tends to decrease with more extended storage periods. Therefore, there is a need to explore tissue culture propagation methods to increase the Ironwood population while maintaining its genetic characteristics rapidly. A study investigated tissue culture propagation methods aiming to expedite Ironwood growth quickly while preserving its genetic traits. It was found that pretreating seeds and node segments with sterilized distilled water supplemented with Carbendazim, Sodium hypochlorite, Mercuric chloride, Ethanol, Antibiotic Antimycotic solution, Cefotaxime, Plant Preservative Mixture (PPM), and Tween-20 effectively inhibited bacterial growth. Seeds were cultured on ½MS medium devoid of growth regulators to induce germination. After two weeks, the highest germination rate observed was 90%, with an average germination time of 3.5 days. Following an 8-week culture period, nodal segments from the seedlings and sterilized nodes were transferred to MS medium supplemented with cytokinins (BAP or KN) at 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 3.0 mg/L concentrations. Optimal shoot induction was achieved with 0.5 mg/L BAP, resulting in a 100% shoot induction rate and an average shoot length of 4.031 cm from seed-derived

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nodes. 0.25 mg/L BAP yielded the highest shoot induction rate at 100% for sterilized nodes and an average shoot length of 3.418 cm.

Root induction studies using IBA at concentrations of 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0 mg/L on ½ MS medium revealed that 0.75 mg/L IBA produced the highest root induction rates of 93.33% and 86.67%, with average root numbers of 2.80 and 2.53, and an average rooting time of 11.5 and 9.6 days, respectively. For acclimatization, seedlings were grown in a 1:1 perlite-to-soil mixture for 8 weeks before being transplanted into the environment. Finally, genetic fidelity was assessed using ISSR molecular markers with nine primers on the original Mai Daeng trees and 12-week-old *in vitro* plantlets. The results demonstrated no genetic variation between the parent trees and the tissue cultured plantlets, confirming the genetic stability of the propagated plants.

Keywords: Micropropagation, Shoot induction, Root induction, Fabaceae, Ironwood, Plant Growth Regulator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “การขยายพันธุ์ไม้แดง (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ” ฉบับนี้สำเร็จลงไปด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำและปรึกษาตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความใส่ใจเป็นอย่างยิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยสำนักบริหารงานวิจัยและนวัตกรรมพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (KMITL Research and Innovation Services (KRIS)) (สัญญาเลขที่ KREF016312) ที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดระยะเวลา 2 ปี ที่ดำเนินการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และอาจารย์ผู้สอนทุกท่านที่ได้มอบความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยา ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทุกท่านที่เป็นทั้งผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางที่เหมาะสม และช่วยเป็นกำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา, มารดา และครอบครัว อันเป็นที่รักและเคารพ ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาตลอดมา ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใด ขออภัยมา ณ ที่นี้

นางสาวศศิวิมล ปั้นอุดม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฏ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลทั่วไปของไม้แดง	4
2.1.1 อนุกรมวิธานของต้นไม้แดง	4
2.1.2 ลักษณะทางพฤษศาสตร์	4
2.1.3 การขยายพันธุ์	7
2.1.4 การคัดเลือกและเก็บรักษาเมล็ด	7
2.2 ประโยชน์ของไม้แดง	8
2.2.1 ประโยชน์ด้านเศรษฐกิจ	8
2.2.2 ประโยชน์ด้านการแพทย์	8
2.2.3 ประโยชน์ด้านระบบนิเวศป่าไม้	9
2.3 สารฟอกฆ่าเชื้อ	9
2.3.1 สารละลายไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite)	9
2.3.2 สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride; $HgCl_2$)	10
2.3.3 แอลกอฮอล์	10
2.3.4 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.5 Plant Preservative Mixture (PPM) 10
2.3.6 Antibiotic 11
2.3.7 Carbendazim 11
2.3.8 Cefotaxime 12
2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 12
2.4.1 ชิ้นส่วนพืช (explant) 13
2.4.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 13
2.4.3 ธาตุอาหารจำพวกสารอนินทรีย์ (inorganic salts) 13
2.4.4 ธาตุอาหารจำพวกสารอินทรีย์ (organic salts) 13
2.4.5 วุ้น (agar) 14
2.4.6 ความเป็นกรดและด่าง (พีเอช) 15
2.4.7 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 15
2.5 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 16
2.5.1 วิธีการการสกัดดีเอ็นเอจากพืช 16
2.5.2 วิธีการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ 16
2.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (PCR) 18
2.6.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็น 18
2.7 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) 20
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24
2.8.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อและสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ด 24
2.8.2 วิธีการการฟอกฆ่าเชื้อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดของชิ้นส่วนข้อ 26
2.8.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก 32
2.8.4 วิธีการการปรับสภาพ และการออกปลูกสู่สภาวะล้อม 33
2.8.5 การสกัดดีเอ็นและตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ 34
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ทดสอบ 39
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ 39
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 39
3.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ 40
3.5 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ 40
3.6 สารเคมีที่ใช้ในวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 41
3.7 อุปกรณ์ 41
3.8 วิธีการดำเนินการทดลอง 41
3.8.1 การเตรียมตัวอย่างพืช 43
3.8.2 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม 43
3.8.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด 46
3.8.4 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก 47
3.8.5 การศึกษาวิธีการปรับสภาพและออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม 48
3.8.6 การสกัดดีเอ็นเอ 49
3.8.7 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ 50
3.8.8 การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeat: ISSR) 51
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 54
4.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม 54
4.1.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่เหมาะสม 54
4.1.2 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่เหมาะสม 58
4.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด 63
4.2.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด 63
4.2.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ 68
4.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก 74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากเมล็ดให้เกิดราก 74
4.3.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากต้นแม่พันธุ์ให้เกิดราก 77
4.4 การศึกษาการปรับสภาพและออกปลูกต้นกล้าของไม้แดงสู่สภาวะแวดล้อม 80
4.5 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ 82
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 87
5.1 สรุปผลการวิจัย 87
5.2 ข้อเสนอแนะ 88
เอกสารอ้างอิง 89
ภาคผนวก 99
ภาคผนวก ก 100
ประวัติผู้เขียน 103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ และอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์	51
3.2	องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง	51
3.3	เวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์	52
4.1	ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของต้นไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	56
4.2	ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของต้นไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	61
4.3	การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	65
4.4	การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	66
4.5	การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากต้นแม่พันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.6 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากต้นแม่พันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ 71

4.7 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากข้อของเมล็ดให้เกิดราก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 75

4.8 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากข้อของต้นแม่พันธุ์ให้เกิดรากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 78

4.9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์สำหรับตัวอย่างพืชเริ่มต้นจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืชเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 12 สัปดาห์จำนวน 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของไม้แดง (ก) ลำต้น (ข) ฝักหรือผล (ค) ดอก (ง) ใบ (จ) เมล็ด	6
2.2	แบบจำลองของ Monomorphic marker Polymorphic marker codominant marker และ dominant marker	22
4.1	การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของต้นไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก)การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (ข) การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (ค)การเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	58
4.2	การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นแม่พันธุ์ไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จากวิธีที่ 1 (ข) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดสีน้ำตาลไหม้ จากวิธีที่ 2 (ค) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่เกิดสีน้ำตาลไหม้ จากวิธีที่ 3	61
4.3	ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.3	(ช) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ญ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฎ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	66
4.4	ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด (ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร	67
4.5	ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร(ช) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.5	สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ญ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฎ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	72
4.6	ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด (ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร	73
4.7	รากที่เกิดจากการชักนำยอดจากเมล็ดของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด	76
4.8	รากที่เกิดจากการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อต้นแม่พันธุ์ของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด	79
4.9	การออกปลูกต้นกล้าไม้แดงสู่สภาวะแวดล้อม ด้วยวัสดุปลูกดินและเพอร์ไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ต้นกล้าจากการชักนำชิ้นส่วนข้อของเมล็ดไม้แดง (ข) ต้นกล้าจากการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นแม่พันธุ์ไม้แดง	81
4.10	แถบดีเอ็นเอของไม้แดงต้นเริ่มต้น และในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 4 8 และ 12 สัปดาห์ อย่างละ 1 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 UBC880 UBC844 UBC836 UBC825 และ UBC824 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp	84
4.11	แถบดีเอ็นเอของไม้แดงต้นเริ่มต้น และในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 4 8 และ 12 สัปดาห์ อย่างละ 1 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 UBC880 UBC824 UBC825 UBC844 และ UBC836 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
BAP	6-Benzylaminopurimne
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
GA_3	Gibberellic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
$HgCl_2$	เมอคิวริกคลอไรด์
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indolebutyric acid
ISSR	Inter-simple sequence repeat
Kn	6-furfurylaminopurine (kinetin)
MS	Murashige and Skoog (MS, 1962)
NAA	1-Napthalene acetic acid
PPM	Preservative for Plant Tissue Culture Media Active
PVP	Polyviny|pyrrolidone
TBE buffer	Tris-borate EDTA buffer
TDZ	Thidiazuron
TE buffer	Tris-EDTA buffer
WPM	Woody Plant Medium (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไม้แดง *Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub เป็นพืชยืนต้นขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae มีถิ่นกำเนิดในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยไม้แดงนั้นเจริญเติบโตได้ดีในที่พื้นที่แห้งแล้ง อุณหภูมิสูงถึง 38 ถึง 39 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยประมาณ 1,000 มิลลิเมตรต่อปี และพื้นที่ที่สภาพดินค่อนข้างลึก ซึ่งสามารถพบได้ในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรังทางภาคเหนือของประเทศไทย(กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2556) และไม้แดงยังเป็นต้นไม้ประจำจังหวัดตากที่อยู่ภาคเหนือของประเทศไทย (สำนักเศรษฐกิจการป่าไม้, 2563) ไม้แดงถูกจัดอยู่ในกลุ่มของไม้ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ โดยเป็น 1 ใน 58 ต้นไม้ที่มีมูลค่าในการใช้เป็นหลักประกันธุรกิจแก่สถาบันการเงิน (อรรถพล, 2561) เนื่องจากไม้แดงจัดอยู่ในกลุ่มไม้เนื้อแข็งจึงมีจุดเด่นอยู่ที่เนื้อไม้ โดยลักษณะของเนื้อไม้มีความแข็งแรงและหนาแน่นมาก รับน้ำหนักได้ดี ทนต่อความร้อน ความชื้น และความเค็มจากน้ำทะเล อีกทั้งยังทนต่อการถูกทำลายจากปลวกและแมลง ไม้แดงจึงนิยมใช้ในงานก่อสร้างอาคารบ้านเรือนในทั้งภายนอกและภายใน โดยจะใช้เป็นส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้างของอาคารบ้านเรือน เช่น พื้น บันได ประตู หน้าต่าง และวงกบ เป็นต้น และ และนำมาทำเครื่องเรือนต่าง ๆ เช่น โต๊ะ ตู้เสื้อผ้า และเตียงนอน เป็นต้น (สมาคมธุรกิจรับสร้างบ้าน, 2566) นอกจากนี้ประโยชน์ทางด้านนิเวศวิทยา โดยการปลูกไม้แดงจะช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นและช่วยรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน ช่วยปรับปรุงสภาพสิ่งแวดล้อม ชะลอการพังทลายของหน้าดิน เนื่องจากไม้แดงมีระบบรากลึกและแผ่กว้าง (เมดไทย, 2563) และส่วนเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างกิ่งไม้แดงที่แห้งหรือหล่นลงจากต้นสามารถนำมาทำเป็นถ่านไม้ สำหรับเป็นเชื้อเพลิงก่อไฟ โดยไม้แดงสามารถให้ความร้อนได้ดี และมีค่าความร้อนสูงถึง 7,384 แคลอรีต่อกรัม (เกษตรตำบล,2559) และยังมีประโยชน์สรรพคุณทางยา ได้แก่ เปลือกไม้ช่วยบรรเทาอาการท้องร่วงและสมานธาตุ และส่วนของแก่น ช่วยบรรเทาอาการท้องเสีย และลดการอักเสบต่างๆ อีกทั้งเป็นยาบำรุงโลหิต เป็นต้น (เมดไทย, 2563) ในปัจจุบันการปลูกไม้แดงนั้นมีน้อยมากและยังไม่ได้รับความสนใจที่จะปลูกมากนัก เนื่องจากการขยายพันธุ์ของไม้แดงโดยทั่วไปคือการเพาะเมล็ดเพียงวิธีการเดียวซึ่งให้ผลตอบแทนช้าเมื่อเปรียบเทียบกับไม้โตเร็วชนิดอื่นๆ (บุญวงศ์, 2554) ทั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการส่งเสริมการขยายพันธุ์ โดยวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณต้นไม้แดงในปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น อีกทั้งยังเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ของไม้แดงเพื่อในอนาคตไม้แดงจะมีผลต่อการค้าเชิงพาณิชย์ของตลาดไม้เศรษฐกิจและเป็นการส่งเสริมการค้าและเศรษฐกิจของประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมของเมล็ดและชิ้นส่วนข้อของไม้แดง

1.2.2 เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด และรากจากชิ้นส่วนข้อในสภาวะแวดล้อม และในสภาวะปลอดเชื้อของไม้แดง

1.2.3 เพื่อศึกษาการปรับสภาพและวัสดุปลูกที่เหมาะสมในการออกปลูกต้นกล้าของไม้แดงสู่สภาวะแวดล้อม

1.2.4 เพื่อศึกษาการตรวจสอบการแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับชิ้นส่วนเมล็ดและข้อของไม้แดง จากนั้นศึกษาชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากชิ้นส่วนข้อในสภาวะภายแวดล้อมและในสภาวะปลอดเชื้อ ทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงที่เพาะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมและสภาวะปลอดเชื้อด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และศึกษาการปรับสภาพและวัสดุปลูกสำหรับต้นกล้าของไม้แดงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับเมล็ดและชิ้นส่วนข้อของไม้แดง

1.4.2 ทราบถึงชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด และรากจากชิ้นส่วนข้อของไม้แดง

1.4.3 ต้นกล้าของไม้แดงจากการวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตสู่สภาพวะแวดล้อมภายนอกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.4 ได้ต้นกล้าของไม้แดงที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อทำการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

1.4.5 สามารถเพิ่มปริมาณต้นไม้แดงได้มากขึ้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของไม้แดง

ชื่อทางวิทยาศาสตร์: (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.)

ชื่อทางการค้า: Ironwood, Jamba, Pyinkdo และIrul

2.1.1 อนุกรมวิธานของต้นไม้แดง

Kingdom: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Xylia*

Species: *X. xylocarpa*

2.1.2 ลักษณะทางพฤษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีความสูง 30 ถึง 37 เมตร ลำต้นค่อนข้างตรง หรือเป็นปุ่มปม เปลือกเรียบสีเทาอมแดง ตกสะเก็ดออกเป็นแผ่นกลมบางๆ รอบลำต้น เมื่อสับเปลือกทิ้งไว้จะได้ชันสีแดง (รูปที่ 2.1 ก)

ใบ เป็นช่อแบบขนนกสองชั้น ก้านใบยาว 2 ถึง 7 เซนติเมตร ช่อใบยาว 10 ถึง 22 เซนติเมตร แต่ละช่อมีใบย่อย 4 ถึง 5 คู่ ใบย่อยรูปทรงไข่ แผ่นใบมักจะเบี้ยว มีขนาดไม่เท่ากันกว้าง 3 ถึง 7 เซนติเมตร ยาว 7 ถึง 20 เซนติเมตร ปลายใบแหลมมน ใบไม่มีขนปกคลุม ก้านใบย่อยยาว 2 ถึง 4 มิลลิเมตร (รูปที่ 2.1 ง)

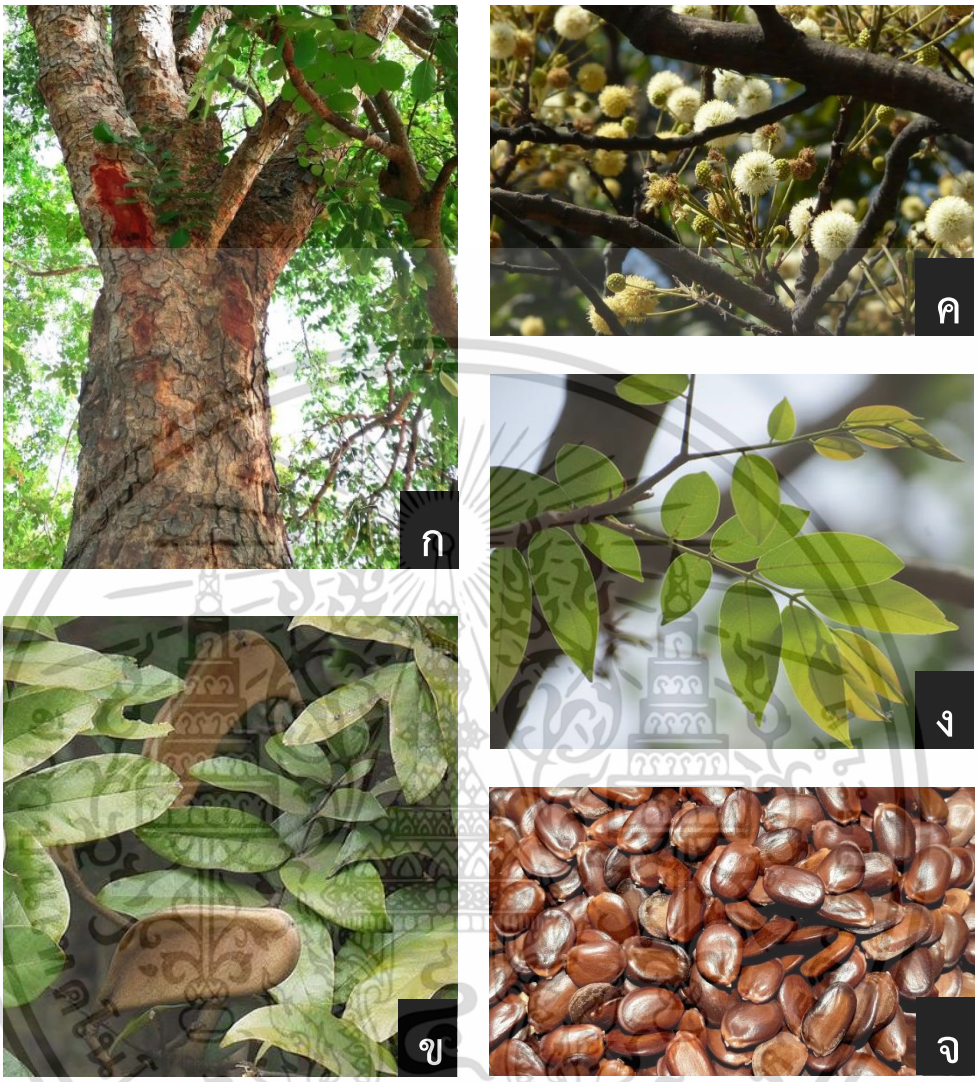
ดอก มีสีเหลือง ขนาดเล็ก ขึ้นอัดกันแน่นบนช่อกลมเดี่ยว ๆ หรือแตกกิ่งก้าน หรือขึ้นเป็นกลุ่มๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง แต่ละช่อประมาณ 1.4 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาว 2 ถึง 5 เซนติเมตร กลีบรองกลีบดอกเชื่อมติดกันคล้ายรูประฆัง ตรงปลายแยกออกเป็น 5 กลีบ มีขนสีเหลืองปกคลุม กลีบดอก 5 กลีบติดกันเล็กน้อยที่บริเวณฐาน เกสรตัวผู้มี 10 อัน แยกจากกันเป็นอิสระยื่นออกมานอกดอก (รูปที่ 2.1 ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผล เป็นฝักแบน รูปขอบขนานเรียวและโค้งงอที่ส่วนปลาย ฝักแข็ง ยาวประมาณ 7 ถึง 10 เซนติเมตร สีน้ำตาลอมเทา ผิวเรียบ ไม่มีขนปกคลุม ไม่มีก้าน เมื่อฝักแก่จะแตกออกเป็น 2 ซีก ผนังของฝักที่แตกมักจะม้วนบิดงอ ฝักหนึ่งจะมีเมล็ดจำนวนหลายเมล็ด (รูปที่ 2.1 ข)

เมล็ด รูปทรงแบนรีหรือเกือบกลมยาว 0.4 ถึง 0.7 นิ้ว กว้าง 0.35 ถึง 0.5 นิ้ว สีน้ำตาลเป็นมัน เปลือกหุ้มเมล็ดแข็งเล็กน้อย (รูปที่ 2.1 จ) (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของไม้แดง (ก) ลำต้น (ข) ฝักหรือผล (ค) ดอก (ง) ใบ (จ) เมล็ด

ที่มา : (ก) https://sites.google.com/site/mai-daeng.com

(ข) https://chaipatpark.com/tips.html

(ค) https://www.bettermyanmar.com/pyinkado.html

(ง)https://efloraofindia.com/xylia-xylocarpa.com

(จ) https://thaipick.com/product

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์ไม้แดงในปัจจุบันมีเพียงวิธีการเดียว ได้แก่ การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด เพราะสามารถผลิตกล้าได้เป็นจำนวนมาก สำหรับวิธีการอื่นยังไม่ได้มีการนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ โดยแหล่งเมล็ดพันธุ์ พบทั่วไปในป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง ควรเก็บฝักแก่สีน้ำตาลซึ่งยังไม่แตกออก จากนั้นนำมาตากแดดให้แห้งสนิทเป็นเวลา 1 ถึง 2 วัน หลักจากนั้นใช้มีดผ่าฝักเพื่อแกะเมล็ดออกแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง โดยเมล็ดแดง 1 กิโลกรัม สามารถผลิตกล้าไม้ได้ประมาณ 3,700 กล้า ตัดเมล็ดแดงให้มีแผลเล็กน้อย นำเมล็ดแดงไปแช่น้ำ 3 ถึง 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปลงที่แปลงเพาะ (สรรณ์ญา, 2563) โดยการเตรียมแปลงเพาะ เตรียมดินร่วนผสมทราย เนื่องจากทรายเป็นวัสดุเพาะที่เหมาะสมสำหรับเมล็ดแดง ทำการหว่านเมล็ดลงแปลง จากนั้นกลบเมล็ดด้วยทราย หรือขุยมะพร้าวบางๆ หนาประมาณ 1 เซนติเมตร และอาจจะคลุมด้วยฟางอีกชั้นหนึ่ง เพื่อรักษาความชื้นในดินการย้ายชำ เมื่อเมล็ดแดงโผล่พ้นผิวทรายก็ย้ายชำลงในถุงชำบรรจุดิน และย้ายกล้าไม้ไปไว้ในเรือนเพาะชำที่ได้รับแสงประมาณร้อยละ 50 ถึง 70 การดูแลรักษากล้าไม้ บำรุงรักษาให้กล้าไม้เติบโต โดยการรดน้ำเช้าและเย็น การให้ปุ๋ยในระยะแรกอาจไม่จำเป็นหากส่วนผสมของวัสดุชำมีปุ๋ยหมักผสมอยู่ ถ้าต้องการใส่ปุ๋ยในระยะหลังควรใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ที่มีการปลดปล่อยธาตุอาหารช้า เช่น ออสโมคอต เป็นต้น และเมื่อกล้าไม้แดงมีความสูงประมาณ 30 ถึง 40 เซนติเมตร ก็สามารถนำกล้าไม้ไปปลูกได้ การปลูก การปลูกไม้แดงควรปลูกในช่วงต้นฤดูฝน (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม) เพราะจะทำให้กล้าไม้มีการเติบโตดี และมีอัตราการรอดตายสูง และก่อนที่จะทำการย้ายกล้าไม้แดงไปปลูกประมาณ 1 เดือน ควรทำให้กล้าแกร่ง เพื่อที่จะให้กล้าไม้เคยชินกับสภาพแวดล้อมในพื้นที่ปลูก ซึ่งจะทำให้กล้าไม้มีอัตราการรอดตายสูง โดยมีวิธีการปฏิบัติ คือ ลดการให้น้ำ ซึ่งปกติอาจเคยรดน้ำ วันละ 2 ครั้ง ก็ควรลดการให้น้ำเหลือเพียงวันละครั้ง คือ ให้น้ำเฉพาะช่วงเช้าเพียงครั้งเดียว ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นก็ลดการให้น้ำเป็นวันเว้นวัน และในกรณีที่กล้าไม้แดงอยู่ในเรือนเพาะชำ ก็ควรย้ายกล้าไปไว้ในพื้นที่โล่ง เพื่อให้กล้าได้รับแสงเต็มที่ (จำนรรจ์, 2559) (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2561)

2.1.4 การคัดเลือกและเก็บรักษาเมล็ด

เมล็ดไม้แดงที่จะนำมาเพาะควรเป็นเมล็ดที่มีคุณภาพดี และมีความแก่ที่สมบูรณ์เต็มที่ ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเมล็ด ควรอยู่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์จนถึงมีนาคม แต่ในบางปีอาจยืดออกไปถึงเดือนเมษายน การเก็บเมล็ดสามารถทำได้ทั้งการเก็บบนพื้นดิน และการปีนขึ้นไปบนต้นโดยตัดเอาฝักลงมา ฝักที่เก็บควรเป็นฝักสีน้ำตาลแดงเขียวแห้งซึ่งไม่แตกออก จะทำให้ได้เมล็ดที่ค่อนข้างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำฝักที่ได้มาตากแดดจนฝักแตกออก ทำการเก็บเมล็ดออกจากฝัก นำมาตากแดด 1 ถึง 2 วันเพื่อให้เมล็ดแห้งสนิท ทำการคัดเมล็ดออกแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในห้องอุณหภูมิธรรมดา เมล็ดไม้แดงสามารถเก็บไว้เป็นเวลานานถึง 4 เดือน หลังจากเก็บเมล็ดแล้ว โดยที่ไม่มีการสูญเสียการงอกแต่อย่างใด ซึ่งจากการศึกษาการงอกของเมล็ดแดงช่วงเวลาต่างๆกัน หลังจากเก็บเมล็ดแล้ว 1 ถึง 4 เดือน ปรากฏว่าอัตราการงอกของเมล็ดแดงที่เก็บรักษาในช่วง 4 เดือนแรกมีอัตราการงอกไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 5 อัตราการงอกของเมล็ดจะเริ่มลดลง เนื่องจากความสามารถในการงอกของเมล็ดส่วนใหญ่จะลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 6 เดือน (จำนรรจ์, 2559) (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2561)

2.2 ประโยชน์ของไม้แดง

2.2.1 ประโยชน์ด้านเศรษฐกิจ

เนื้อไม้ มีสีแดงหรือสีน้ำตาลอมแดง เนื้อไม้ละเอียด มีความแข็งแรง และหนาแน่น อายุของไม้แดงตามธรรมชาติเกินกว่า 10 ปี คือตั้งแต่ 10 ถึง 18 ปี เฉลี่ยประมาณ 15.9 ปี มีความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.18 เนื้อไม้มีความแข็งประมาณ 1,030 กิโลกรัม (สมาคมป่าไม้แห่งประเทศไทย, 2526) เนื่องจากเนื้อไม้ค่อนข้างแข็งแรง ทนทานต่อการกระแทกสูง รับน้ำหนักได้ดี ทนต่อความร้อน ความชื้น และความเค็มจากน้ำทะเล อีกทั้งยังทนต่อการถูกทำลายจากปลวกและแมลง การใช้ประโยชน์เนื้อไม้จึงใช้ในการก่อสร้างอาคารบ้านเรือน โดยจะใช้เป็นส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้างของอาคารบ้านเรือน เช่น พื้น บันได ประตู หน้าต่าง และวงกบ เป็นต้น และ และนำมาทำเครื่องเรือนต่าง ๆ เช่น โต๊ะ ตู้เสื้อผ้า และเตียงนอน เป็นต้น อีกทั้งยังทำเครื่องมือกสิกรรมต่างๆ (ชาลี และคณะ, 2527) (เกษตรตำบล, 2559) (สมาคมธุรกิจรับสร้างบ้าน, 2566) โดยราคาประเมินมูลค่าสำหรับส่งออกของไม้แดงที่แปรรูปประมาณ 92,900 บาทต่อลูกบาศก์เมตร และราคาไม้ท่อน 13,400 บาทต่อลูกบาศก์เมตร (กรมศุลกากร, 2566)

2.2.2 ประโยชน์ด้านการแพทย์

สำหรับสรรพคุณทางยาและการรักษาและบรรเทาโรคของไม้แดง โดยทั่วไปจะนำไปเป็นส่วนผสมกับตัวยาอื่นๆที่มีฤทธิ์เสริมกัน ได้แก่ แก่นไม้ นำไปผสมยาแก้ทางโลหิตและโรคกษัย บำรุงโลหิตและอาการปวดอักเสบของฝีต่างๆดับพิษไข้กาฬ เปลือกไม้ มีรสฝาด ใช้สมานแผล และดอก นำไปผสมยาแก้ไขบำรุงหัวใจ (เมดไทย, 2563) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัย การสกัดสารจากลำต้น เมล็ด และเปลือกไม้ของไม้แดง ได้แสดงผลลัพธ์ที่โดดเด่นในเรื่องการต้านอนุมูลอิสระ (Ramli *et al.,* 2018) และจากการศึกษาวิจัย สารสกัดที่ได้มาจากใบของไม้แดง พบว่ามีคุณสมบัติทางยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่าง ๆ เช่น โรคเรื้อน การรักษาบาดแผล เยื่อบุตา โรคหัวใจขาดเลือด โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคโลหิตจาง โรคท้องเดินและแผลในกระเพาะอาหาร เป็นต้น (Chowdhury *et al.,* 2021)

2.2.3 ประโยชน์ด้านระบบนิเวศป่าไม้

1. สามารถนำมาปลูกเพื่อใช้ตกแต่ง และให้ร่มเงาบริเวณอาคารสถานที่ หรือสวนสาธารณะ
2. สามารถช่วยเพิ่มความชุ่มชื้น รักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน ปรับปรุงสภาพสิ่งแวดล้อม ชะลอการพังทลายของหน้าดินโดยเฉพาะดินร่วน และดินทราย เนื่องจากไม้แดงมีระบบรากลึกและแผ่กว้าง (Reichel and Boonyaputthipong, 2021)
3. ใบแก่ของไม้แดงที่ร่วงลงบนดิน มีอัตราการสลายตัวสูง ซึ่งมีส่วนช่วยเพิ่มแร่ธาตุต่างๆ ให้กับดินได้เป็นอย่างมาก เหมาะในการนำมาปลูกเพื่อปรับปรุงสภาพป่าเสื่อมโทรม (Marod *et al.,* 2017)
4. ต้นไม้แดงทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนอย่างมีประสิทธิภาพ โดยจับและดูดซึมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Srinivas and Sundarapandian, 2018)
5. ไม้แดงมีคุณสมบัติด้านความแข็งแรง และมีความทนทานต่อน้ำและความชื้นสูง จึงนิยมปลูกเพื่อทำฝายชะลอน้ำ
6. ไม้แดงเป็นไม้ที่ทนไฟในตัว เมื่อปลูกบริเวณภูเขาจึงสามารถลดการเกิดไฟไหม้ป่าได้
7. ไม้แดงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการทำเป็นถ่านและไม้ฟืนได้ดี เพราะไม้แดงมีกิ่งก้านมากพอสมควร โดยถ่านจากไม้นั้นจะให้ค่าความร้อนสูงถึง 7,384 แคลอรี่ต่อกรัม (เกษตรตำบล, 2559) (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2561)

2.3 สารฟอกฆ่าเชื้อ

2.3.1 สารละลายไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) ได้แก่ โซเดียม หรือ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพดีกว่า สารฆ่าเชื้อชนิดอื่น การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ถึง 0.6 ในระยะเวลา 15 ถึง 30 นาที

2.3.2 สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride; $HgCl_2$) โดยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์นำมาผสม น้ำ หรือแอลกอฮอล์ ร้อยละ 50 สามารถนำมาใช้ฆ่าเชื้อบริเวณ ผิวของชิ้นส่วนพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ตาข้าง ใบ และเมล็ด เป็นต้น ตัวอย่างเช่น เมล็ดไม้สน ซึ่งในกรณีของเมล็ดไม้สน สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ ยังมีประสิทธิภาพในการเร่งเร้ากระบวนการ imbibition และการงอกของเมล็ดอีกด้วย การใช้สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเมล็ดนั้น ประจุของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรอทจะถูกดูดซับไว้ที่เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) จึงต้องล้างประจุออก การล้างประจุออกต้องล้างด้วยสารละลาย potussium chloride หรือน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แม้ว่าสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีแต่เป็นสารที่ค่อนข้างจะอันตรายสำหรับมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงควรพยายามหลีกเลี่ยงการใช้สารชนิดนี้ หรือถ้าจำเป็นต้องใช้ ควรระมัดระวังในการใช้อย่างมาก สารละลายที่เหลือจากการใช้ต้องเก็บถังมีฝาปิด แล้วนำไปทำลาย ระวังอย่าเทสารละลายที่เหลือทิ้งในอ่างล้างเครื่องมือโดยตรง เนื่องจากจะก่อให้เกิดมลพิษต่อแหล่งน้ำ

2.3.3 แอลกอฮอล์ ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อมี 2 ชนิด คือ ethyl และ isopropyl โดยแอลกอฮอล์จะมีความเข้มข้น ร้อยละ 70 ถึง 95 วิธีการใช้แอลกอฮอล์ในการฆ่าเชื้อคือ วิธีการราด หรือจุ่มชิ้นส่วนพืชเป็นระยะเวลาสั้นๆ 30 ถึง 60 วินาที ชิ้นส่วนพืชบางชนิดที่มีความแข็ง เช่น เมล็ด หรือกิ่งของไม้เนื้อแข็งอาจแช่ได้นานถึง 5 นาที

2.3.4 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ได้แก่ tween-20 triton-X teepol หรือน้ำยาล้างจานในการเตรียมสารน้ำยาฆ่าเชื้อ หลังจากที่ผสมน้ำยาลงในน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อแล้วควรผสมสารลดแรงตึงผิวประมาณ 2 ถึง 3 หยด โดยการใช้สารฆ่าเชื้อนั้นต้องมีการใช้ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยทำให้สารละลายสามารถแทรกเข้าไปตามซอกมุมต่างๆ ที่อาจมีจุลินทรีย์เกาะอยู่ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อให้ดียิ่งขึ้น (ณัฏฐากร, 2552)

2.3.5 Plant Preservative Mixture (PPM) เป็นสารผสมในกลุ่ม preservative หรือbiocide เกิดจากการผสมสารเคมีหลายชนิด มีประสิทธิภาพในการป้องกันหรือลดการปนเปื้อนเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการงอกของเมล็ด การเกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นของพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ สามารถเติมได้ทั้งก่อนและหลังนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เนื่องจากสามารถทนความร้อนสูงได้ สามารถป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากทางอากาศ ทางน้ำ และการสัมผัสได้เป็นอย่างดี โดย PPM เป็นสารผสมที่สามารถฆ่าเซลล์แบคทีเรียและเชื้อรา ป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อรา และหากใช้ในความเข้มข้นที่มากขึ้น จะสามารถกำจัดเชื้อที่อาศัยอยู่ภายในต้นพืช (endophyte) ได้ กลไกการทำงานของ PPM คือ ส่วนผสมของ PPM จะแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อราและเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ในกลไกการเผาผลาญอาหารหรือเมแทบอลิซึม เช่นการหายใจและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของแบคทีเรียและเชื้อรา รวมถึงกลไกการดูดซึมน้ำตาลและกรดแอมิโนจากอาหารของแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด แต่ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพของ PPM จะลดลงหากมีเชื้อจำนวนมากปนเปื้อนอยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นที่มากขึ้นในกรณีที่พืชมีการติดเชื้ออยู่ก่อนแล้ว รวมถึงชิ้นส่วนที่อาจมีเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกาะติดอยู่มากเช่น เมล็ด รากหรือเหง้า เป็นต้น จำเป็นต้องมีการฟอกฆ่าเชื้อเบื้องต้นเพื่อลดปริมาณเชื้อที่ผิวก่อนโดยใช้สารละลายโซเดียวไฮโปคลอไรท์หรือวิธีการอื่นๆ ที่เหมาะสม ซึ่งปริมาณการใช้ PPM จะใช้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 2.0 มิลลิลิตรต่อลิตร แต่หากเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะมีเชื้ออาศัยอยู่ก่อนหน้าแล้ว เช่น เชื้อที่อาศัยในท่อลำเลียง จะต้องใช้ PPM ในความเข้มข้นที่มากขึ้น สำหรับเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงมีเชื้ออาศัยอยู่ก่อนหน้าแล้ว เช่น เชื้อที่อาศัยในท่อลำเลียง หรือเปลือกหุ้มเมล็ด สำหรับเมล็ดหรือไม้เนื้อแข็งที่มีเชื้อเจริญอยู่ให้นำเมล็ดมาแช่ในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ ได้แก่ MS หรือWPM เป็นต้น เติม PPM ความเข้มข้นร้อยละ 2 ถึง 3 เป็นเวลา 8 ถึง 12 ชั่วโมง จากนั้นค่อยนำเมล็ดมาเพาะในอาหารวุ้นปกติที่เติม PPM เข้าไป 0.1 ถึง 1 มิลลิลิตรต่อลิตร (Plant Tissue Culture Supplies by SAC SCI-ENG, 2016)

2.3.6 Antibiotic ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะหลักๆ 3 ชนิด ได้แก่ amphotericin B เป็นสารที่ออกฤทธิ์โดยการจับกับ ergosterol ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเชื้อราบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นรู เกิดการเคลื่อนที่ของสารประกอบภายในเซลล์ของเชื้อราออกสู่ภายนอก เชื้อราจึงไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ penicillin เป็นสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์โดยการขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก โดยการยับยั้งการสร้างครอสลิงก์ (crosslink) ระหว่างสายของเปบทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียอ่อนแอและถูกทำลาย(พรพรรณ และคณะ, 2556) และstreptomycin เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides ที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มักใช้ในการควบคุมโรคในพืชพวกไม้ผลต่างๆ รวมทั้งโรคใบไหม้ในพืช (วิชาญ, 2559) โดยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า เมื่อเติม antibiotic ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ขณะทำการย้ายแคลลัสของต้นข้าวโพดลงอาหารใหม่ทุกครั้ง (subcultures) พบว่า มีจำนวนการเกิดเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด (Danilova. *et al*., 2004)

2.3.7 Carbendazim กลไกการออกฤทธิ์ คือ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยขัดขวาง หรือทำลายการแบ่งตัวของเซลล์ระหว่างการสืบพันธุ์ โดยนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อราในพืชผัก พืชไร่ ข้าว ธัญพืช ผลไม้ และไม้ดอก ได้แก่ โรคใบจุด โรคแอนแทรคโนส โรคใบไหม้ โรคกาบใบแห้ง โรคราแป้ง โรคใบขีดสีน้ำตาล โรคราสีเทา โรคใบจุดสีดำ โรคผลเน่า โรคใบปื้นเหลือง เป็นต้น (พะยอม, 2558) ซึ่งวิธีการใช้งาน ทำได้โดยการผสมกับน้ำในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20ลิตร ฉีดพ่นลงบนพืชให้ทั่วทุกๆ 7 วัน หรือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช และเมล็ด โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.1 ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืชแต่ละประเภท (จงรักษ์ และคณะ, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.8 Cefotaxime เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม third generation cephalosporin มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ดีในแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวก (วิชาญ, 2559) โดยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเมื่อเติม cefotaxime ที่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ขณะทำการย้ายแคลลัสของต้นข้าวโพดลงอาหารใหม่ทุกครั้ง (subcultures) พบว่า สามารถช่วยให้เห็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแคลลัสในแต่ละระยะได้ชัดเจนมากขึ้น (Danilova. *et al*., 2004) จากงานวิจัยการศึกษาการเติมสารลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง *Butea monosperma var. lutea* ได้แก่ การเติม PPM ความเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อลิตร การเติม streptomycin ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และ carbendazim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตร WPM เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนทองกวาวเหลือง หลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน 1 สัปดาห์ พบว่า การเติม PPM ความเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อลิตร ร่วมกับ streptomycin ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และ carbendazim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุด (ร้อยละ 22.22) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเทียบกับการ PPM เพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 33.33) (Kanjanawattanawong. *et al.,* 2019)

2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Plant tissue culture) คือ การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศประเภทหนึ่ง โดยการนำชิ้นส่วนพืช (explant) ซึ่งอาจเป็นโปรโตพลาสต์ (protoplast) เซลล์ (cell) เนื้อเยื่อ (tissue) หรือ อวัยวะ (organ) ของพืช มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (medium) ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่แสงอุณหภูมิ และความชื้น เพื่อให้ชิ้นส่วนเหล่านั้นเจริญ และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ต่อไป (อนุรักษ์, 2550)

2.4.1 ชิ้นส่วนพืช (explant) คือ ชิ้นส่วนพืชเล็กๆ ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ อวัยวะ (organ) เนื้อเยื่อ (tissue) กึ่งอวัยวะหรือกึ่งเนื้อเยื่อ (organ/tissue intermediate) เซลล์ (cell) แคลลัส (callus) และโปรโทพลาสต์ (protoplast) ตัวอย่างเช่น ปลายยอด (shoot tip) ปลายราก (root tip) ใบเลี้ยง (cotyledon) อับเรณู (anther) คัพภะ (embryo) เป็นต้น (ณัฏฐากร, 2552)

2.4.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาวะปลอดเชื้อในห้องเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญคือ การเลือกใช้อาหารที่เหมาะสมกับชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดพืช องค์ประกอบของอาหารที่สำคัญคือ แร่ธาตุอาหารที่ได้จากสารเคมี แหล่งของธาตุคาร์บอน วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต อาจมีบางชนิดเพิ่มเติมจากที่กล่าวนี้อีกเพื่อวัตถุประสงค์บางอย่าง ชนิดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่ใช้กันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นต้นพืช คือ Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) สำหรับเพาะเลี้ยงพืชได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ B5 (Gamborg. *et al*., 1968) และ Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1980) สำหรับเพาะเลี้ยงพวกไม้ยืนต้น และสูตรดัดแปลงจากอาหาร MS ต่างๆ (ณัฏฐากร, 2552)

2.4.3 ธาตุอาหารจำพวกสารอนินทรีย์ (inorganic salts) ได้แก่ ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แบ่งได้เป็น

1. ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และขาดไม่ได้ เช่น คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) เป็นต้น

2. ธาตุอาหารรอง (micronutrients) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และขาดไม่ได้เช่น เหล็ก (Fe) โคบอลต์ (Co) ทองแดง (Cu) เป็นต้น

2.4.4 ธาตุอาหารจำพวกสารอินทรีย์ (organic salts) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) รวมไปถึง คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และสารควบคุม

1. คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยส่วนใหญ่ใช้น้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชในการเจริญเติบโตในหลอดทดลอง ที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (sucrose) ประมาณร้อยละ 1 ถึง 5 โดยน้ำหนัก

2. วิตามิน (vitamin) มีส่วนช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เป็นไปได้อย่างดี โดยปกติพืชสามารถสังเคราะห์วิตามินได้เอง แต่ในหลอดทดลอง อาจสร้างได้ไม่เพียงพอ จึงต้องเติมวิตามินเพิ่ม ซึ่งวิตามินที่นิยมใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ วิตามิน B1 (thiamine) วิตามิน B2 (riboflavin) วิตามิน B6 (pyridoxine) กลุ่มวิตามิน Bรวม (inositol) วิตามิน C (ascorbic acid) ไนอะซิน (nicotinic acid)

3. สารควบคุมการเจริญ (Plant Growth Regulators) ฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในต้นพืชในธรรม-ชาติ ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่าง ๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์เนื้อเยื่อ และ secondary metabolism เนื่องจากการฮอร์โมนที่สร้างขึ้นมีปริมาณน้อย การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นให้มีประสิทธิภาพการทำงานเช่นเดียวกับฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้น ซึ่งเมื่อเติมลงในอาหารจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต หรือการกำเนิดอวัยวะต่างๆ ตลอดจนพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ กลุ่มออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ การรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส รวมทั้งควบคุมการขยายขนาด และการยืดตัวของเซลล์ และมีผลในการกระตุ้นการเกิดราก ออกซินสามารถพบได้ทั้งชนิดที่พืชสังเคราะห์ตามธรรมชาติ โดยสร้างมากที่บริเวณปลายยอด ปลายราก ผลอ่อน และบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) เช่น Indoleacetic acid (IAA) และชนิดที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น เช่น 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) Indole-3-butyric acid (IBA) และ2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) เป็นต้น สำหรับกลุ่มไซโทไคนิน (cytokinin) ช่วยชักนำให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการเจริญของตาข้างของพืช และสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดหลายๆยอดได้ ไซโทไคนิน สามารถพบได้ทั้งชนิดที่พืชสังเคราะห์ตามธรรมชาติ โดยพบมากในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) และในคัพภะ (embryo) เช่น zeatin และชนิดที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น เช่น 6-Benzylaminopurine (BA) และ6-Furfurylaminopurine (Kinetin) เป็นต้น สำหรับกลุ่มจิบเบอร์เรลลิน (gibberellin) ได้จากการสังเคราะห์ตามธรรมชาติของพืช โดยมีปริมาณน้อยมาก ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีการนำสารกลุ่มนี้มาใช้น้อย โดยสารที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid หรือ GA_3) ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ขยายขนาดเซลล์ รวมทั้งชักนำให้เมล็ดเกิดการงอก

2.4.5 วุ้น (agar) ใช้สำหรับการเตรียมอาหารแข็ง และกึ่งแข็งทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะของเนื้อเยื่อพืช โดยมีหลากหลายชนิดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการใช้งาน สำหรับวุ้นทั่วๆไป จะใช้ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.8 ถึง 1.0 ตัวอย่างเช่น วุ้น Phytagel ของบริษัท Sigma Chemical เป็นวุ้นที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ คือ ร้อยละ 1.25 ถึง 2.6 โดยลักษณะวุ้นจะใส เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบการเจริญเติบโตของราก เป็นต้น (อนุรักษ์, 2550)

2.4.6 ความเป็นกรดและด่าง (พีเอช) ความเป็นกรดและด่าง (พีเอช) ในสารละลาย คือการวัดความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน (Hydrogen ion, H^+) ในสารละลาย มาตราส่วนที่ใช้วัดพีเอช เริ่มจากที่เป็นกรดมาก (พีเอช 0) จนถึงเป็นด่างมาก (พีเอช14) และจุดสมดุลหรือเป็นกลาง (พีเอช 7) ความเป็นกรดและด่างของอาหารโดยทั่วไปจะปรับอยู่ในช่วง 5.6 ถึง 5.8 ก่อนที่จะนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งคามดันอย่างไรก็ตาม พีเอชมีอิทธิพลต่อการละลายของอิออนในอาหาร ความสามารถการละลายของวุ้น และมีผลต่อการเจริญของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นการกำหนดค่าที่ถูกต้องและการควบคุมคามเป็นกรด และด่างให้คงที่จึงจำเป็นอย่างยิ่ง โดยทั่วไปในการกำหนดค่าของพีเอช จะใช้เครื่องวัดพีเอช (พีเอชมิเตอร์) ร่วมกับสารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรด และด่าง ได้แก่ ด่าง หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดเกลือ หรือกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นที่ใช้ 0.01 ถึง 1.0 นอร์มอล์ (อนุรักษ์, 2550) (อภิสรา, 2564)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.7 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. งานด้านการขยายพันธุ์ (clonal propagation) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตจำนวนต้นได้เป็นปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น ต้นทุนการผลิตต่ำ ใช้พื้นที่ตลอดจนแรงงานน้อยกว่า การเพาะจากเมล็ด นอกจากนี้คุณภาพของต้นที่ผลิตได้มีความสม่ำเสมอกัน จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ผลิตพืชในเชิงการค้า และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ด

2. งานด้านการปรับปรุงพันธุ์ (crop improvement) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีหนึ่ง ที่สามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของต้นรุ่นแม่มายังรุ่นลูกได้ ดังนั้นจึงเหมาะในการนำมาใช้กับงานการผลิตต้นที่ต้องการเก็บรักษาสายพันธุ์แท้ของต้นรุ่นแม่ไว้ (pure line)

3. งานด้านการสร้างสายพันธุ์ (breeding) เพื่อใช้ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) การสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว (haploid) หรือหลายชุด (polyploid) สร้างพืชลูกผสม ทั้งในสกุลเดียวกันและต่างสกุล หรือการสร้างพืชให้มีความเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมหรือความต้องการใช้งาน เช่น การสร้างพืชสายพันธุ์ทนเค็ม สายพันธุ์ทนแล้ง สายพันธุ์ทนโรคและแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัดทั้งพื้นที่ แรงงาน ตลอดจนเงินทุน

4. การเก็บรักษาพันธุ์ (preservation) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้สำหรับงานการเก็บรักษาพันธุ์พืช หรือการอนุรักษ์พันธุ์ได้เป็นอย่างดี การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย แรงงาน และพื้นที่ได้มาก และยังสามารถใช้เก็บรักษาพันธุ์พืชได้ในระยะยาว โดยเก็บในสภาพอุณหภูมิต่ำที่ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งเรียกว่า cryopresevation วิธีนี้ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน (ณัฏฐากร, 2552)

2.5 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

2.5.1 วิธีการการสกัดดีเอ็นเอจากพืช นิยมใช้วิธี CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

เป็นวิธีการนำสารประกอบdetergent ที่มีประจุบวก สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และจับโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนหลังจากทำให้เซลล์แตกและทำการบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ CTAB ที่ 65 องศาเซลเซียสดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนได้ด้วย isopropanol หรือ ethanol ในบางกรณีจะเห็นการตกตะกอนเป็นลักษณะขาวขุ่น สามารถแยกดีเอ็นเอออกได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงให้ดีเอ็นเอตกตะกอน จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการกำจัด RNA, polysaccharides และpolyphenols

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีวิธีสกัดดีเอ็นเออีกหลายวิธี หรือการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งมีอยู่หลายบริษัทให้เลือกใช้ อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีใดก็ตามขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อพืชและชนิดของพืช (ธนากร, 2551) สำหรับขั้นตอนวิธีสกัดดีเอ็นเอ CTAB ของ Doyle และ Doyle (1987) โดยทำการนำชิ้นส่วนพืชที่ทำความสะอาดแล้ว ปริมาณ 0.1 กรัม นำมาบดให้ละเอียดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) จากนั้นนำมาใส่ในไมโครทิวป์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB buffer (ที่ประกอบด้วย CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 2, NaCl 1.4 โมลาร์, PVP 1 เปอร์เซ็นต์ , EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิโมลาร์ , Tris HCl (pH 8.0) 100 มิลลิโมลาร์ , 2-mercaptoethanol ความเข้มข้นร้อยละ 2) ปริมาตร 600 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการเติม chloroform ต่อ isoamyl alcohol อัตราส่วน (24 ต่อ 1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ทำซ้ำ 2 ครั้ง และทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการละลายตะกอนใน TE buffer (ที่ประกอบด้วยTris HCl (pH 8.0) 10 ไมโครลิตร, EDTA (pH 8.0) 1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (ธนากร, 2551)

2.5.2 วิธีการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

เมื่อแยกสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์พืชได้แล้ว ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอก่อนนำไปทำการวิจัยต่อไป สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometry) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของ Nucleic acid (DNA และ RNA) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ในส่วนของอาร์เอ็นเอการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะคล้ายกับดีเอ็นเอ โดยวัดค่าความยาวคลื่นที่ A260/A280 ถ้าค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 1.8 ถึง 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์หรือมีคุณภาพดี ส่วนโปรตีนสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร การวัดค่าทำได้ โดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายให้มีปริมาตร 300 ไมโครลิตร อัตราส่วนดังนี้คือ ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 297 ไมโครลิตร จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นวัดก่อน แล้วจดปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากการอ่านของเครื่อง และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (พรพรต, 2560)

2. วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) เป็นเทคนิคที่มีหลักการมาจากการที่โครงสร้างของดีเอ็นเอมีประจุโดยรวมเป็นลบจากหมู่ฟอสเฟต เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวกเสมอ ความเร็วในการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoiled DNA) จะมีแรงเสียดทานน้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง (linear DNA) และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด (circular DNA) ทำให้สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันออกจากกันได้ โดยตำแหน่งของดีเอ็นเอบนเจลภายหลังการแยกแล้วสามารถมองเห็นได้ โดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide, EtBr) ซึ่งจะสอดแทรกระหว่างพันธะไฮโดรเจนของแต่ละคู่นิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ แล้วนำเจลที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) แต่เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) ที่รุนแรง อาจเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อวิรูป (teratogen) ในคน ดังนั้นต้องระมัดระวังในการสัมผัสโดยตรง นอกจากนี้ปัจจุบันมีการพัฒนาสีย้อมดีเอ็นเอที่มีความปลอดภัยมากกว่า ethidium bromide เช่น SYBR Green®, SYBR® Safe, SYBR® Gold และ GelRed™ เป็นต้น โดยขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ขั้นตอนแรกทำการหลอมอะกาโรสเจล (อะกาโรสเจล ร้อยละ1) 0.5 กรัม ในบัฟเฟอร์ 1X TBE 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้สักพักจนอุ่น แล้วเทลงใส่ถาดเทเจลที่เตรียมไว้เสียบหวีให้ตรงตำแหน่ง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีออกแล้วนำถาดเจลใส่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสในทิศทางจากลบไปบวก ทำการเติมบัฟเฟอร์ 1X TBE buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับการทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร และloading dye 2 ไมโครลิตร จากนั้นดูดขึ้นลงเพื่อผสมกับดีเอ็นเอด้วยไมโครปิเปต ทำการดูดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมแล้วทีละตัวอย่าง ค่อย ๆ หยอดในหลุมเจลที่เกิดจากหวีที่เสียบไว้ จากนั้นประกอบเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วต่อเข้ากับกระแสไฟฟ้า ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เพื่อดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 10 นาที โดยต้องสวมถุงมือตลอดการปฏิบัติการ เมื่อครบเวลาตักเจลไปแช่ในน้ำสะอาด เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกไป หลังจากนั้นตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation) (พรพรต, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการการจำลองตัวเอง ในธรรมชาติดีเอ็นเอ จะอยู่เป็นสายคู่บิดเกลียวขวา ประกอบด้วยเบส A T C และ G

2.6.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็น

1. **Denaturation** เป็นขั้นตอนที่เพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น เพื่อแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ (double strand DNA; dsDNA) เป็นสายเดี่ยว (single strand DNA; ssDNA) โดยทั่วไปขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิประมาณ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 ถึง 60 วินาที

2. **Annealing** เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงให้อยู่ประมาณ 50 ถึง 66 องศาเซลเซียสประมาณ 30 วินาทีเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับสายดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ในบริเวณที่เป็นนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมทั้งสองสายอย่างจำเพาะ

3. **Extension** เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทางจาก 5’ ไป 3’ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ complementary กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเป็นการสร้างต่อจากไพรเมอร์ที่เกาะอยู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้นิวคลีโอไทด์ (dNTPs) ทั้งสี่ชนิดที่ใส่ลงไปในปฏิกิริยาเป็นวัตถุดิบในการสร้าง โดยทั่วไป *Taq* DNA polymerase จะมีอุณหภูมิเหมาะสมในขั้นตอนนี้อยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 ถึง 180 วินาที

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จะดำเนินไปในแต่ละรอบซึ่งประกอบด้วย denaturation, annealing และ extension หลังการทำปฏิกิริยาจำนวนทั้งสิ้นประมาณ 30 ถึง 40 รอบ จะมีการเพิ่มดีเอ็นเอบริเวณที่ศึกษาขึ้นแบบทวีคูณในปริมาณ 2n (n = จำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเป็นเอ) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น สามารถนำมาศึกษาต่อได้ เช่น การนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อศึกษาขนาดของดีเอ็นเอบริเวณที่เราสนใจ การทำ hybridization หรือนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

2.6.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ที่สำคัญ

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) คือดีเอ็นเอตัวอย่าง ซึ่งอาจเป็นของผู้ป่วยหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ต้องการศึกษา ในดีเอ็นเอต้นแบบจะต้องมีส่วนของสายดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการศึกษา อยู่ซึ่งทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ได้ โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณดีเอ็นเอ ต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ไพรเมอร์ (Primers) คือนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้นๆ (Single-stranded oligonucleotides) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยไพรเมอร์ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำเป็นต้องมีไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่ (forward primer และ reverse primer ซึ่งจะมีทิศทางสวนทางกัน) ซึ่งคู่ของไพรเมอร์นี้เมื่อเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอตัวอย่างแล้ว จะคร่อมส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณปลาย 5’ เรียกว่า “forward primer” ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้น forward primer จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็น anti-sense strand (3’-> 5”) ส่วนไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณปลาย 3’ เรียกว่า “reverse primer” ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้น reverse primer จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็น sense strand (5’-> 3”) สำหรับการสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์เส้น reverse primer ทั่วไปมักเขียนในทิศทาง 5’->3’ เช่นเดียวกันกับ forward primer

3. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ได้แก่ dATP, dTTP, dGTP, dCTP นิวคลีโอไทด์ทั้งสี่ชนิดนี้จะใช้เป็นวัตถุดิบ (substrate) ในการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่

4. DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการสร้างสายดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จะต้องเป็นชนิดที่สามารถทนความร้อนได้สูงอย่างน้อย 94 ถึง 95 องศาเซลเซียส โดยไม่เสียสภาพ ปัจจุบันเอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคือ *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่สกัดมาจากแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Thermus aquaticus* (*Taq*) ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณน้ำพุร้อนได้ โดยความเข้มข้นของ DNA polymerase ที่ใช้ขึ้นกับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ รวมทั้งสารประกอบอื่น ๆ ด้วย การใช้เอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต (PCR product) ที่ไม่จำเพาะขึ้น แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ

6. Magnesium ion (Mg^{2+}) เป็น co-factor เพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ให้ปฏิกิริยาการสร้างสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดยความเข้มข้นของ magnesium ion ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

7. เครื่อง Thermal cycler สำหรับปรับเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะสมตามโปรแกรมที่จัดตั้งไว้ (พรพรต, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers)

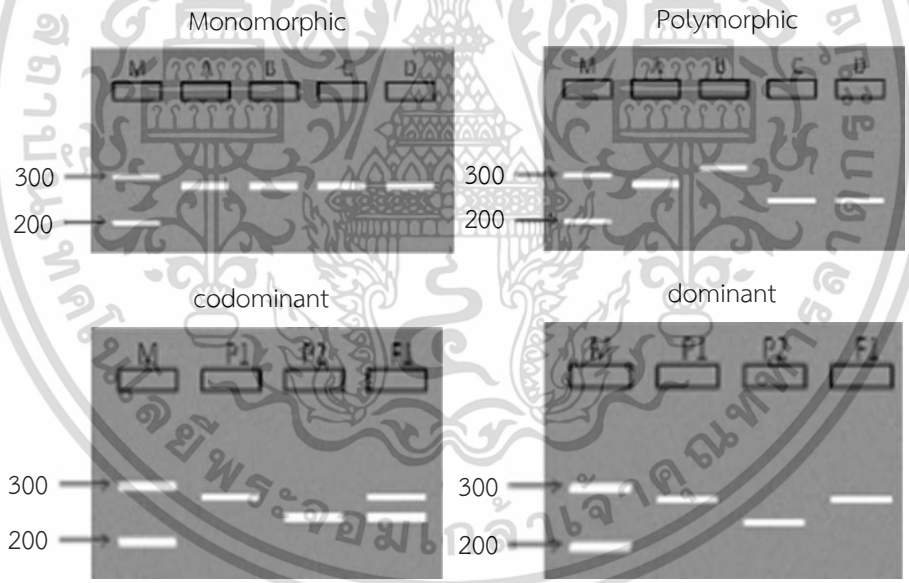
เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers) หมายถึงเครื่องหมายที่ใช้ระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละต้นหรือต่างชนิดกัน เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ (tightly Linked) กับยีนที่สนใจนั้นเป็นการระบุถึงการปรากฏอยู่ของยีนนั้นๆ โดยที่เครื่องหมายทางพันธุกรรมไม่ได้มีผล ต่อการแสดงออกของลักษณะนั้นเลยเรียกว่า linked markers ส่วนเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ระบุความแตกต่างของหน้าที่ยีนที่สนใจได้จะเรียกว่า functional markers เครื่องหมายทางพันธุกรรมจะมีตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม ซึ่งสามารถจำแนกเครื่องหมายทางพันธุกรรมออกได้เป็น 3 แบบคือ

1. เครื่องหมายทางสันฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สามารถมองเห็นได้จากการแสดงลักษณะนั้นออกมา เช่น สีดอก ความสูง หรือ ทรงต้น
2. เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical markers) เป็นเครื่องหมายที่ได้จากการแสดงออกของยีน นั้นๆ เช่น โปรตีน และเอนไซม์ต่างๆ
3. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ที่เกิดจากความแตกต่างกันของเส้นดีเอ็นเอเครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบสันฐานวิทยาและชีวเคมีนั้นมีข้อจำกัดคือ การแสดงออกที่ตอบสนอง ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม มีจำนวนลักษณะที่ใช้เป็นเครื่องหมายได้น้อย และไม่มีการกระจายตัว ทั่วทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิต แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อความแตกต่าง ที่เกิดขึ้น เป็นเครื่องหมายที่มีจำนวนมากและกระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนม ความแตกต่างของดีเอ็นเอนั้นเกิดขึ้นจากการกลาย พันธุ์ที่เป็นแบบการแทนที่ (substitution mutations หรือ point mutations) การเรียงตัวใหม่ (rearrangements) ทั้งที่เป็นแบบแทรกเข้ามา (insertions) ขาดหายออกไป (deletions) หรือเกิดความคลาดเคลื่อนของการจำลองตัวของลำดับเบสซ้ำ (tandemly repeated DNA) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะถูกคัดเลือกตามธรรมชาติที่อาจเป็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นในบริเวณเกี่ยวข้องหรือไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน นอกจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการสร้างแผนที่พันธุกรรมแล้วยังมีการนำไปใช้งานในการจำแนกพันธุ์หรือสายพันธุ์พืช การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์พืช เป็นต้น เครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 3 แบบตามวิธีการของการตรวจสอบความแตกต่างคือ

1. hybridization-based เช่น RFLP และ microarray
2. polymerase chain reaction (PCR)-based เช่น RAPD AFLP SSLP SSCP SNP
3. DNA sequence-based

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างที่เกิดขึ้นของเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถที่จะมองเห็นได้จากการใช้วิธีที่เรียกว่าอิเล็กโทรโฟรีซิส และการย้อมสีด้วยสารเคมี ethidium bromide หรือ silver หรือการตรวจสอบโดยการใช้สารรังสี (radioactive probes) หรือสารเรืองแสง (colourimetric probes) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละต้นจะเรียกว่า polymorphic markers ส่วนเครื่องหมายที่ไม่สามารถแสดงความแตกต่างได้จะเรียกกว่า monomorphic markers และเครื่องหมายดีเอ็นเอยังสามารถแบ่งตามความสามารถในการจำแนกต้นที่มีพันธุกรรมเป็น hornozygotes หรือ heterozygotes กล่าวคือ เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ codominant จะปรากฏให้เห็นถึงความแตกต่างของชิ้นแถบดีเอ็นเอ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ dominant จะปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยทั่วไปจะเรียกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันว่า อัลลีล (alleles) เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ codominant อาจจะมีหลายอัลลีล ส่วนเครื่องหมาย dominant จะมีเพียง 2 อัลลีล คือ ปรากฏกับไม่ปรากฏ (ธานี, 2555) (พนิดา, 2561)



รูปที่ 2.2 แบบจำลองของ Monomorphic marker Polymorphic marker codominant marker และ dominant marker ที่มา: http://www.corsat.agr.ku.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช ได้แก่

อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) เริ่มต้นจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดจะถูกเรียงตามขนาดความยาว ชิ้นเล็กสุดจะเคลื่อนไปไกลสุดจากจุดเริ่มต้น ย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนล่อนเมมเบรน นำดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ที่เป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารรังสีไปจับกับดีเอ็นเอคู่ผสม จากนั้นใช้ ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ทาบกับแผ่นเมมเบรนให้เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีรังสีบนแผ่นฟิล์ม เทคนิคนี้เรียกว่า autoradiography รูปแบบของจีโนไทป์หรือแถบดีเอ็นเอเป็นแบบข่มสมบูรณ์ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคแรกที่ได้รับความนิยมสูงในอดีตแต่มีขั้นตอนที่ซับซ้อน และเสียเวลา จึงไม่ได้รับความนิยมในเวลาต่อมา

อาร์เอพีดี (Random Amplification Polymorphic DNA: RAPD) เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสขนาดสั้น 8 ถึง 12 เบส พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบ ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์ด้วย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม (arbitrary primer) รหัสเริ่มต้นของดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบส หากอาร์เอพีดีไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์เหลานี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง ถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างคนละชนิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกัน

เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism: AFLP) วิเคราะห์ความแตกต่างของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ ร่วมกับความแตกต่างของตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม สามารถตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอ ค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบหลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน เครื่องหมายนี้มีความจำเพาะและสม่ำเสมอในการทำซ้ำสูงกว่าวิธีอาร์เอพีดีที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากการทำครั้งหนึ่งอาจได้แถบดีเอ็นเอที่มีโพลิมอร์ฟิซึมจำนวนมากเมื่อเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา แถบดีเอ็นเอบนเจลค่อนข้างชัดเจน จึงนิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การสร้างแผนที่พันธุกรรม การค้นและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับยีนที่สนใจ

เอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat: SSR) เป็นไพรเมอร์เจาะจงที่ถูกสร้างหรือออกแบบขึ้นให้จับกับดีเอ็นเอที่ขนาบข้างกับบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) การออกแบบไพรเมอร์ชนิดนี้ต้องทราบลำดับเบสของบริเวณขนาบข้างส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ก่อนจึงเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้ ผลการศึกษาพืชต่างสายพันธุ์กันพบว่ามีจำนวนซ้ำไม่เท่ากันจึงสามารถตรวจความแตกต่างของขนาดชิ้นดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ็นเอได้จากผลของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์หรือเอสเอสอาร์ อาจเป็น multilocus probe เพราะพบกระจายทั่วจีโนมแต่ถ้าออกแบบไพรเมอร์เจาะจง วิธีนี้มีชื่อเรียกต่างๆกันได้แก่ Sequence Tagged Microsatellite (STM) หรือ Simple Sequence Length Polymorplism (SSLP) หรือ Sequence Tagged SSR

ไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR) ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการตรวจสอบไพรเมอร์ของไอเอสเอสอาร์จะมีลักษณะลำดับเบสซ้ำเป็นชุดไปจับกับตำแหน่งเบสคู่สมที่มีลักษณะลำดับเบสซ้ำเช่นเดียวกันบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่เรียกวา Simple Sequence Repeat (SSR) หรือไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งของ SSR ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาเป็นบริเวณระหว่าง SSR สองตำแหน่งโพลีมอร์ฟิซึม หรือความแตกต่างเกิดขึ้นจากความแปรปรวนของลำดับเบสสภาพในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (พนิดา, 2561) วิธีการ ISSR ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว วิธี ISSR เป็นการใช้ประโยชน์ของไมโครแซทเทลไลท์ หรือ simple sequence repeat (SSR) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆ กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของยูแคริโอต (eukaryote) โดยชุดเบสซ้ำหนึ่งหน่วยประกอบไปด้วยลำดับเบส 1 ถึง 6 คู่เบส ความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ เกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนซ้ำ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี เนื่องจากความผันแปรของจำนวนซ้ำสูง หรือมีความหลากหลายของจำนวนอัลลีล และมีอยู่มากมายหลายตำแหน่งในจีโนม ISSR จึงเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีระดับความแตกต่างและมีประสิทธิภาพในการจำแนกความใกล้ชิดทางพันธุกรรมพืช ปัจจุบันวิธี ISSR เป็นวิธีการที่ได้นำมาใช้ทำการทดลองและมีรายงานการทดลองกับพืชหลากหลายชนิด (อารักษ์ และ มารินา, 2558)

ประโยชน์ของการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

1. ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช
2. ใช้เป็นเครื่องหมายตรวจสอบระดับยีน หรือ ดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องหมายช่วยการคัดเลือก (Marker-assisted selection)
3. ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืช
4. ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ เพื่อจัดทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping)
5. ใช้ในการหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เพื่อกำหนดตำแหน่งบนจีโนม เพื่อใช้ศึกษาลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci, QTL) เช่น ลักษณะการเติบโตของพืชที่มักถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกันใน pathway (พนิดา, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อและสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ด

Anita. *et al.* (2009) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Sesbania bispinosa* (Jacq.) จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำเมล็ดมาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 1 นาที และฟอกด้วยสารสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 5 นาที และฟอกด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Kuria. *et al.* (2012) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Warburgia ugandensis* (Sprague) ซึ่งเป็นต้นไม้ในประเทศเคนยา จัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida โดยนำเมล็ดมาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ร่วมกับ Tween® 20 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นฟอกด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง พบว่าให้ร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100

Ramirez. *et al*. (2012) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดของต้นกอร์ส *Ulex europaeus* ซึ่งเป็นต้นไม้ที่พบในทวีปยุโรป และแอฟริกาเหนือ จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 ถึง 22 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS เกิดการงอกดีกว่า สูตร MS

Gbadamosi and Shaibu (2013) ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Senna alata* (Linn) ซึ่งเป็นต้นไม้ที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำเมล็ดมาทำความสะอาดและแช่น้ำในอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาฟอกฆ่าเชื้อสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 6 ครั้ง และฟอกด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลายๆ ครั้ง

Indravathi and Pullaiah (2013) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดของต้น *Albizia amara* (Roxb.) ซึ่งเป็นต้นไม้ในประเทศอินเดีย จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า เมล็ดเกิดการงอกใน 2 สัปดาห์ โดยมีความสูงของลำต้นเท่ากับ 6.8 เซนติเมตร และจำนวนข้อเท่ากับ 3 ถึง 4 ข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bianco (2014) ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Adesmia bicolor* จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae การนำเมล็ดมาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล เป็นเวลา 1 นาที และฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง

Chitdacha. *et al*. (2018) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดของต้นมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida โดยนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS MS และ WPM ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าอาหารสูตร ½MS มีร้อยละการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 93.33

Fernandes. *et al*. (2018) ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Copaifera oblongifolia* ซึ่งเป็นต้นไม้ในประเทศบราซิล จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ทำการนำเมล็ดมาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเขย่าในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 1 นาที

Ahmad. *et al*. (2020) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Arachis hypogaea* L. จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำเมล็ดมาทำความสะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 2 นาที และฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 30 นาที

Gupta. *et al*. (2020) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้นมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida นำเมล็ดมาทำความสะอาดโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าในสารลดแรงตึงผิว tween-20 ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที ทำการฟอกฆ่าเชื้อในสารฆ่าเชื้อรา bavistin ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 60 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสาร streptocycline ความเข้มข้นร้อยละ 0.33 เป็นเวลา 30 นาที และสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 3 นาที 30 วินาที พบว่า มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100

Yahya (2020) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Lupinus albus* จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae นำเมล็ดมาทำความสะอาดโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด และนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 96 เป็นเวลา 2 นาที และฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 วิธีการการฟอกฆ่าเชื้อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดของชิ้นส่วนข้อ

Parveen. *et al.* (2010) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Lam.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยตัดแต่งชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP Kn และ TDZ ที่มีความเข้มข้น 0 0.025 0.1 0.25 1.0และ 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 80

Daud. *et al.* (2012) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Aquilaria malaccensis* ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida โดยนำชิ้นส่วนข้อมาทำความสะอาด และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา Benomyl ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 15 นาที และฟอกด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.15 และ 0.2 เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง พบว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันนเชื้อรา Benomyl ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 15 นาที และเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นวลา 1 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

Kuria. *et al.* (2012) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Warburgia ugandensis* (Sprague) ซึ่งเป็นต้นไม้ในประเทศเคนยา จัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida โดยนำชิ้นส่วนข้อมาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ร่วมกับ Tween® 20 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นฟอกด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง พบว่าให้ร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100

Indravathi and Pullaiah (2013) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น *Albizia amara* (Roxb.) ซึ่งเป็นต้นไม้ในประเทศอินเดีย จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ตัดแต่งชิ้นส่วนข้อจากใบเลี้ยง ข้อจากตาข้าง และปลายยอด จากเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และKn ที่มีความเข้มข้น 0.25 0.5 1.0 และ2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลทำให้ชิ้นส่วนข้อจากใบเลี้ยง มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 90 จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงที่สุดเท่ากับ 6.84±0.30 และการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด ที่เพาะเลี้ยงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 80 จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงที่สุดเท่ากับ 8.30±0.20

Rajabudeen. *et al*. (2014) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้นคราม *Indigofera viscosa* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ทำการนำชิ้นส่วนข้อมาทำความสะอาดโดยปล่อยให้น้ำไหลผ่านตลอด เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิว teepol ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นฟอกด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง สำหรับการเพาะเลี้ยงทำการเปรียบเทียบระหว่างชิ้นส่วนข้อจากสภาวะแวดล้อมที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ และชิ้นส่วนข้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อ ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนข้อที่ได้จากทั้งสองสภาวะเพาะเลี้ยงให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ Kn ที่มีความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA ที่มีความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า ชิ้นส่วนข้อจากสภาวะแวดล้อมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่มีความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 70 สำหรับชิ้นส่วนตาข้างจากสภาวะปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย Kn ที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 60

Jaiswal. *et al*. (2015) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของประดู่อินเดีย *Pterocarpus marsupium* Roxb. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยทำการตัดชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อม ทำความสะอาดโดยล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวเป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับ ยาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 7 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นฟอกด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 7 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ถึง 4 ครั้ง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS WPM และ B5 ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และ Kn เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย Kn ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุด เท่ากับ 64.44 มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนข้อเฉลี่ยเท่ากับ 2.51±0.10 และความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 1.47±0.02 เซนติเมตร

Bouzdoudi. *et al.* (2017) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น Carob (*Ceratonia siliqua* L.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และWPM ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่มีความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 0.8 1.0 และ1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงที่สุดเท่ากับ 4.80±0.45

Choudhary. *et al.* (2017) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น Gliricidia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และKn ที่มีความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 และ4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงที่สุดเท่ากับ 3.3±0.15 รองลงมาคือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 80 และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชเท่ากับ 2.0±0.14

Nunez. *et al.* (2017) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้นธารา (*Caesalpinia spinosa*) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่มีความเข้มข้น 0 0.25 0.5 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 90 และมีความยาวยอดสูงที่สุดเท่ากับ 6.71

Sharma. *et al*. (2017) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้นชงโคนา *Bauhinia racemosa* Lam. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อมาล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ถึง 4 ครั้ง และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 12 ถึง 15 นาที และฟอกด้วยเมอคิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 4 ถึง 5 นาที และฟอกด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ citric acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และ Kn ที่ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 90.4±3.92 มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนข้อเฉลี่ยเท่ากับ 2.89±0.42 และความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.16±0.35 เซนติเมตร

Kumar. *et al.* (2019) ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Saccharum officinarum* L. ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที และสารเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 5 นาที และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 10 นาที และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 85.4

Mishra. *et al.* (2019) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น *Clitoria ternatea* (L.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP Kn และ TDZ ที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.5 1.0 2.0 4.0 และ5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 85 จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงสุดเท่ากับ 3.80±0.50 และ ความยาวยอดสูงที่สุดเท่ากับ 5.00±0.14 เซนติเมตร

Saidi. *et al.* (2019) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น Carob (*Ceratonia siliqua* L.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยตัดแต่งชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP Zeatin Kn และ2-iP ที่มีความเข้มข้น 0 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงที่สุดเท่ากับ 5.32±1.80

Bahar. *et al.* (2020) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น *Medicago sativa* L. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS B5 และWPM ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีความเข้มข้น 0 0.125 0.25 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100

Gupta**.** *et al*. (2020) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้นมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida นำชิ้นส่วนข้อมาทำความสะอาดโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด เป็นเวลา 10 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารลดแรงตึงผิว tween-20 ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที และฟอกด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 60 นาที และฟอกด้วยสารปฏิชีวนะ streptocycline ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 เป็นเวลา 60 นาที และฟอกด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 3 ถึง 4 นาที พบว่า มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100

Pholjad. *et al.* (2020) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Arachis glabrata* Benth ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที และฟอกด้วยสารเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ร่วมกับ สารปฏิชีวนะ antibiotic cefotaxime และ PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที

Shaheen. *et al*. (2020) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้นชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อบริเวณส่วนต้น (ตำแหน่งที่1และ2) ส่วนกลาง (ตำแหน่งที่3 และ5) และส่วนท้าย (ตำแหน่งที่6และ8) ตัดให้มีขนาด 2 ถึง 3 เซนติเมตร นำมาทำความสะอาดปล่อยให้น้ำไหลผ่านตลอดเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิว เป็นเวลา 5 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2 ถึง 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และฟอกด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Yahya. *et al.* (2020) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้นสัก (*Tectona grandis*) ซึ่งเป็นไม้เนื้อแข็งชนิดหนึ่ง โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.25 0.5 1.0และ2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดหลายยอดสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jaiswal. *et al.* (2021) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้นชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนข้อมาทำความสะอาดโดยปล่อยให้น้ำไหลผ่านตลอดเป็นเวลา 20 ถึง 30 นาที และนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา Bavistin ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2 ถึง 3 หยด และล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาฟอกด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 ร่วมกับเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที

Bertsouklis. *et al.* (2023) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น *Senna artemisioides* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยตัดแต่งชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงที่สุดเท่ากับ 2.4 และร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 97

2.8.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก

Uddin. *et al*. (2005) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นนนทรี (*Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne)) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อที่มีความสมบูรณ์ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากสูงที่สุดเท่ากับ 91.66

Hakim. *et al*. (2010) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น Carob (*Ceratonia siliqua* L.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนที่มีการเกิดยอดที่สมบูรณ์มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากต่อยอดสูงที่สุดเท่ากับ 3.5

Parveen and Shahzad (2010) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น *Cassia sophera* Linn. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนที่มีการเกิดยอดที่สมบูรณ์มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโต IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากต่อยอดสูงที่สุดเท่ากับ 5.7±0.5 และมีความยาวรากสูงที่สุดเท่ากับ 5.6±0.5 เซนติเมตร

Kasthurirengan. *et al.* (2013) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นจามจุรี (*Samanea saman*) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในสภาวะปลอดเชื้อ ตัดให้มีขนาด 3 เซนติเมตร ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และNAA ที่มีความเข้มข้น 0 0.5 0.75 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย IBA ที่มีความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากสูงที่สุดเท่ากับ 75

Agarwa *et al*. (2014) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น *Alhagi maurorum* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนที่มีการเกิดยอดที่สมบูรณ์มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ½MS และ ¼MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่มีความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 95

Parveen and Shahzad (2014) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น *Senna sophera* (L.) Roxb. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนที่มีการเกิดยอดที่สมบูรณ์ มีความยาว 4 ถึง 5 เซนติเมตร มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากต่อยอดสูงที่สุดเท่ากับ 7.63±0.23 และมีความยาวยอดสูงที่สุดเท่ากับ 4.86±0.35 เซนติเมตรและร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 96

Hernandez-Garcia. *et al.* (2021) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น *Dalbergia congestiflora* Pittier ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำชิ้นส่วนที่มีการเกิดยอดที่สมบูรณ์ ความยาว2-3 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมและด้วย IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากันเท่ากับ 100 และที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 และ1.0มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุด

2.8.4 วิธีการการปรับสภาพ และการออกปลูกสู่สภาวะล้อม

อภิสรา (2564) การศึกษาวิธีการออกปลูกสภาวะแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยเลือกต้นที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง นำมาทำความสะอาดบริเวณราก จากนั้นแช่ในสารป้องกันเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 15 ถึง 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำอีกครั้ง และลงปลูกในกระถางพลาสติกที่มีวัสดุปลูก ได้แก่ ดินและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูโดยรอบ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้าสามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมภายนอกได้

พชร (2565) การศึกษาการปรับสภาพและออกปลูกต้นกล้าของต้นพะยูงไทย ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยเลือกต้นที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง นำมาทำความสะอาดบริเวณราก จากนั้นแช่ในสารป้องกันเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปลูกลงในกระถางที่มีวัสดุปลุกได้แก่ ดินและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75

Hasancebi. *et al.* (2010) การศึกษาวิธีการออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพของต้น *Astragalus chrysochlorus* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำต้นอ่อนที่มีรากที่สมบูรณ์ออกจากขวดเพาะเลี้ยง ทำความสะอาดบริเวณราก ลงปลูกในกระถางพลาสติกที่มีวัสดุปลูก ได้แก่ ดินและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูโดยรอบ และทำการรดด้วยอาหารเหลว สูตร ¼MS ทุกๆ 4 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 2 สัปดาห์ ทำการเปิดถุงพลาสติกออก และเพาะเลี้ยงในที่มีแสง อุณหภูมิ 19 ถึง 23 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้าสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตต่อไปได้

Parveen. *et al*. (2010) การศึกษาวิธีการออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพของต้นขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Lam.) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำต้นอ่อนที่มีรากที่สมบูรณ์ออกจากขวดเพาะเลี้ยง ทำความสะอาดบริเวณรากโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด ทำการย้ายต้นอ่อนที่ลงในกระถางขนาดเล็กที่ประกอบด้วยดินและเพอร์ไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูโดยรอบ ทำการรดด้วยอาหารเหลวสูตร ¼MS ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำถุงพลาสติกออก ทำการย้ายลงกระถางใหม่ที่ประกอบด้วยปุ๋ยคอก และดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1ต่อ1 เพาะเลี้ยงในโรงเพาะชำ พบว่า มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 85

Bertsouklis. *et al.* (2023) ศึกษาวิธีการปรับสภาพ และการออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพของต้น *Senna artemisioides* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำต้นอ่อนที่ชักนำให้เกิดรากในสภาวะปลอดเชื้อ ย้ายปลูกลงในวัสดุปลูกพีทมอสและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100

2.8.5 การสกัดดีเอ็นและตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

Agarwal. *et al.* (2014) ทำการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Alhagi maurorum* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วมกับไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC823 UBC824 UBC828 UBC841 UBC844 และ UBC845 สำหรับอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing อุณหภูมิอยู่ที่ 48-51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 วินาที จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิต โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 1 กิโลเบส (GeNei™, Bangalore, India 1 kb DNA ladder) พบว่า ทั้ง 6 ไพรเมอร์มีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันทั้งหมดเท่ากับ 19 และจำนวนแถบแบนต่อไพร์เมอร์เฉลี่ยเท่ากับ 3.1และขนาดของแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 200-900 bp และไม่มีความแปรผันทางทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับต้นเริ่มต้น

Oliveira. *et al.* (2017) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้น *Parkia* R.Br. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยใช้วิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1990) เริ่มจากขั้นตอนการเตรียมสารละลาย 2XCTAB ประกอบไปด้วย โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.4 โมลาร์ ปริมาณ 8.12 กรัม สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (พีเอช 8) Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (พีเอช 8) นำสารมาผสมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำที่บริสุทธิ์ให้เป็นปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ สารละลาย PVP (polyvinylpyrrolidone) 1 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย 2-mercaptoethanol 0.2 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย(chloroform ต่อ isoamylalcohol) อัตราส่วน 24ต่อ1 สารละลาย Isopropanol สารละลาย TE (Tris 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8) RNAse 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบ โดยทำการบดชิ้นส่วนใบให้ละเอียด และบรรจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิกรัม เติมสารละลาย 2XCTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ร่วมกับ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มในอ้างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติมสารละลาย chloroform ต่อ isoamylalcohol อัตราส่วน 24ต่อ1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ทำซ้ำในขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง ทำการเติม Isopropanol ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 12000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเททิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ และเททิ้ง ทำการตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วจึงทำการเติมสารละลาย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ RNAse ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Ahmad. *et al.* (2020) ทำการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นประดู่อินเดีย (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลวิธี ไอเอสเอสอาร์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วมกับไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ ซึ่งทำการคัดเลือก จำนวน 15 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC864 UBC866 UBC873 ถึง UBC881 UBC890 UBC891 UBC895 และUBC900 สำหรับขั้นตอน Annealing อุณหภูมิที่ศึกษาอยู่ในช่วง 40-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิต โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 1 กิโลเบส (Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder) พบว่า มี 8 ไพรเมอร์ ที่แสดงผล ได้แก่ UBC866 UBC873 UBC874 UBC876 UBC878 UBC880 UBC891 และUBC895 โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันทั้งหมดเท่ากับ 35 และจำนวนแถบแบนต่อไพรเมอร์เฉลี่ย เท่ากับ 4.38 และพบว่าการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้ง 8 ไพรเมอร์ไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรม

Ahmad. *et al.* (2021) ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นประดู่อินเดีย (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลวิธีไอเอสเอสอาร์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ร่วมกับไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ จำนวน 10 ไพรเมอร์ ที่แสดงผล ได้แก่ UBC818 UBC825 UBC827 UBC834 UBC836 UBC839 UBC841 UBC847 UBC849 และUBC855 สำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอน Annealing อุณหภูมิที่ศึกษา อยู่ที่อุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิต โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 1 กิโลเบส (Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder) โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันทั้งหมดเท่ากับ 60 และจำนวนแถบแบนต่อไพรเมอร์เฉลี่ย เท่ากับ 6 แบน สรุปได้ว่าไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับต้นเริ่มต้น

Ahmad. *et al.* (2021) ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นประดู่อินเดีย (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลวิธีไอเอสเอสอาร์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ร่วมกับไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ สำหรับขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย 10X บัฟเฟอร์ ร่วมกับ (NH4)2SO4 และ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ISSR primers ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 10 primers dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ Taq polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับกระบวนการพีซีอาร์ ขั้นตอนแรก initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการทำซ้ำ 40 รอบ โดยมีขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที สำหรับขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน Elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนสิ้นสุดของกระบวนการการเพิ่มจำนวน (amplification) คือ การเพิ่มความยาวสุดท้ายของดีเอ็นเอถูกดำเนินการที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

Mo and Wangsomnuk (2021) ทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis*) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae สำหรับการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (NanoDrop spectrophotometer; Thermo Scientific Co. Ltd) ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยคุณภาพของดีเอ็นเอจะถูกประเมินผ่านการวัดอัตราส่วน A260/A280 จากนั้นทำกานตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นวิธีการแยกสารโดยเฉพาะกรดนิวคลีอิกหรือโปรตีนที่มีประจุและอยู่รวมกันโดยใช้สนามไฟฟ้าในเจลของอะกาโรส โดยใช้อะกะโรสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในบัฟเฟอร์ 1X Tris borate-EDTA (TBE) เมื่อครบเวลาการรันเจล ทำการย้อมด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ทดสอบ

ตัวอย่างพืช ได้แก่ ต้นและเมล็ดไม้แดง (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) ได้รับความ อนุเคราะห์จาก รศ. ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม โดยชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

- ข้อจากต้นแม่พันธุ์
- ข้อจากเมล็ด
- เมล็ด

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl)
- น้ำกลั่น (Distilled water)
- เมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)
- สารปฏิชีวนะต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (100x) Antibiotic Antimycotic Solution
- สารปฏิชีวนะต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Cefotaxime)
- สารป้องกันเชื้อรา (Carbendazim)
- สารป้องกันการปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Plant Preservative Mixture: PPM)
- สารลดแรงตึงผิว (Tween-20)
- เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- น้ำกลั่น (Distilled water)
- น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
- ผงวุ้น (Crystal agar gel)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต 6-Benzylaminopurine (BAP)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต Indole-3-butyric acid (IBA)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต Kinetin (Kn)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.05 และ1.0 นอร์มอล
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.05 และ 1.0 นอร์มอล
- อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
- เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- Absolute Ethanol
- Beta-Mercaptoethanol
- Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- Chloroform Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP)
- Distilled water Tris-HCl buffer
- Ethanol
- Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)
- Isoamyl alcohol
- Isopropanol
- Liquid nitrogen
- Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP)
- Proteinase K
- RNase A
- Sodium chloride
- Tris-Base
- Tris Ethylenediaminetetra acetic acid buffer (TE buffer)

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

- 10X Standard *taq* reaction buffer
- Deoxyadenosine triphosphate (dATP)
- Deoxycytidine triphosphate (dCTP)
- Deoxyguanosine triphosphate (dGTP)
- Deoxythymidine triphosphate (dTTP)
- Nuclease-free water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ISSR Primer ชนิดแบบ unanchored
- *Taq* DNA polymerase 5000 U/ml (Vivantis)

3.6 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

- 1kb DNA ladder (Vivantis)
- 3X Loading dye (Vivantis)
- Agarose
- Boric acid
- Deionized water
- Ethidium bromide
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- Tris-HCl
- VC 100 bp DNA ladder (Vivantis)

3.7 อุปกรณ์

- กรรไกร (Scissor)
- กระถางต้นไม้พลาสติก (Plastic plant pots)
- กระบอกฉีดน้ำ (Foggy spray)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture bottle)
- คิวเวตควอตซ์ (Semi-micro Quartz cuvettes)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (Analytical balance)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (Autoclave)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารขนาดเล็ก (Spin down)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- เครื่องเขย่าชนิดธรรมดา (Shaker)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Thermal cycle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องไมโครเวฟ (Microwave oven)
- จานแก้ว (Petri dish)
- ชุดถ่ายภาพเจล (Gel document system)
- ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis system)
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- ดิน (Soil)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- ตู้บ่ม (Incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- ตู้เย็น (Refrigerator)
- ตู้แช่แข็ง (Deep freezer)
- ถุงพลาสติกแบบทนความร้อน (Polypropylene bag)
- ถ้วยชั่งสาร (Weighing boat)
- ทิป (Micropipette tips)
- แท่งแก้วคนสาร (Glass stirrer)
- บีกเกอร์ (Beaker)
- ปากคีบ (Forceps)
- มีดผ่าตัด (Knives)
- ไมโครปิเปต (Micropipette)
- วัสดุปลูกเพอร์ไลท์ (Perlite)
- เวอร์เนียดิจิตอล (Digital vernier caliper)
- หลอดดูดอาหาร (Syringe)
- หลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.2 และ1.5 มิลลิลิตร (Microtubes)
- อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.8.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้คือ เมล็ดและชิ้นส่วนข้อของไม้แดงที่ได้จากการปลูกในธรรมชาติโดยวิธีการเพาะเมล็ด ทำการคัดเลือกเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ที่สุด ไม่ติดโรค และไม่มีรอยแผล และชิ้นส่วนข้อที่มีสภาพสมบูรณ์ที่สุด ไม่ติดโรค ไม่มีรอยแผล และควรเป็นชิ้นส่วนที่เพิ่งแตกใหม่ ซึ่งก่อนทำการตัดชิ้นส่วนพืชมาใช้งานเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะทำการพ่นสารฆ่าเชื้อราทั่วลำต้น

3.8.2 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม (ดัดแปลงมาจาก Kumar. *et al.* 2019 และ อภิสรา, 2564)

3.8.2.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด

วิธีที่ 1 นำเมล็ดที่มาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและบ่มในน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ร่วมกับ antibiotic PPM และ cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในทุกขั้นตอนที่ฟอกจะทำการเขย่าภายใต้ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที จากนั้นตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

วิธีที่ 2 นำเมล็ดที่มาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและบ่มในน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 ร่วมกับ antibiotic PPM และ cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในทุกขั้นตอนที่ฟอกจะทำการเขย่าภายใต้ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที จากนั้นตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

วิธีที่ 3 นำเมล็ดที่มาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและบ่มในน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ร่วมกับ antibiotic PPM และ cefotaxime ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในทุกขั้นตอนที่ฟอกจะทำการเขย่าภายใต้ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที จากนั้นตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

จากข้อที่ 3.8.2.1 เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งประกอบไปด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS 2.215 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.8 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และบันทึกผลประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อโดยคำนวณเป็นร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (สมการที่ 3.1) ร้อยละการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (สมการที่ 3.2) ร้อยละการงอกของเมล็ด (สมการที่ 3.3) และระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ย (สมการที่ 3.4) โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

สมการที่ 3.1

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่รอดจากการปนเปื้อน}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \text{X100}$$

สมการที่ 3.2

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \text{X100}$$

สมการที่ 3.3

$$\text{ร้อยละการงอกของเมล็ด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่รอดจากการปนเปื้อน}} \text{X100}$$

สมการที่ 3.4

$$\text{ระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของวันที่เมล็ดเริ่มงอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2.2 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ

วิธีที่ 1 นำชิ้นส่วนข้อขนาด 1.0 เซนติเมตร มาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและล้างโดยให้น้ำไหลผ่านตลอดเป็นเวลา 10 นาที จึงมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 10 นาที ฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารปฏิชีวนะ antibiotic cefotaxime และสารละลายPPM ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในทุกขั้นตอนที่ฟอกจะทำการเขย่าภายใต้ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที จากนั้นตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

วิธีที่ 2 นำชิ้นส่วนข้อขนาด 1.0 เซนติเมตร มาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและล้างโดยให้น้ำไหลผ่านตลอดเป็นเวลา 10 นาที จึงมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 10 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับสารปฏิชีวนะ antibiotic cefotaxime และสารละลายPPM ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในทุกขั้นตอนที่ฟอกจะทำการเขย่าภายใต้ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที จากนั้นตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

วิธีที่ 3 นำชิ้นส่วนข้อขนาด 1.0 เซนติเมตร มาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและล้างโดยให้น้ำไหลผ่านตลอดเป็นเวลา 10 นาที จึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 10 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ร่วมกับสารปฏิชีวนะ antibiotic cefotaxime และสารละลายPPM ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในทุกขั้นตอนที่ฟอกจะทำการเขย่าภายใต้ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที จากนั้นตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อที่ 3.8.2.2 เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งประกอบไปด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.8 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และบันทึกผลประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อโดยคำนวณเป็นร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (สมการที่ 3.5) ร้อยละการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (สมการที่3.6) และร้อยละการเกิดสีน้ำตาลไหม้ ซึ่งสังเกตได้จากการเกิดสีน้ำตาลบนชิ้นส่วนข้อบนพื้นที่ 2 ใน 3 ส่วนของข้อ (สมการที่ 3.7) โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

สมการที่ 3.5

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อที่รอดจากการปนเปื้อน}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด}} \text{X100}$$

สมการที่ 3.6

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด}} \text{X100}$$

สมการที่ 3.7

$$\text{ร้อยละการเกิดสีน้ำตาลไหม้} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อที่เกิดสีน้ำตาลไหม้}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด}} \text{X100}$$

3.8.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด

3.8.3.1 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด

นำชิ้นส่วนข้อที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ จากข้อที่ 3.5.2.1 ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนข้อที่ได้จากการงอกของเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อ อายุ 8 สัปดาห์ ให้มีขนาด 1.0 เซนติเมตร ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ 6-Benzylaminopurine (BAP) หรือKinetin (Kn) ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.8.3.2 การชักนำให้เกิดยอดของชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ

นำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ จากข้อที่ 3.5.2.2 ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนข้อให้มีขนาด 1.0 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ 6-Benzylaminopurine (BAP) และKinetin (Kn) ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากข้อที่ 3.8.3.1 และ3.8.3.2 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ และบันทึกผลการทดลองทุกๆ 4 สัปดาห์ โดยการสังเกตและบันทึกผลร้อยละการเกิดยอด (สมการที่ 3.8) และวัดความยาวยอด (สมการที่ 3.9) โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์แบบดิจิตอล และวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้น และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

สมการที่ 3.8

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด}} \text{X100}$$

สมการที่ 3.9

$$\text{ความยาวยอดเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของความยาวยอดที่เกิด}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}}$$

3.8.4 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก

จากข้อที่ 3.8.3.1 และ 3.8.3.2 เมื่อมีการเกิดยอดที่สมบูรณ์แข็งแรงและมีใบ โดยมีขนาด 4 ถึง 5 เซนติเมตร ทำการตัดมาเพาะเลี้ยงในอาหารบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน คือ Indole-3-butyric acid (IBA) ที่มีความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยการสังเกตและบันทึกผลร้อยละการเกิดราก (สมการที่ 3.10) นับจำนวนรากที่เกิดขึ้น (สมการที่ 3.11) และระยะเวลาการงอกของรากเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(สมการที่ 3.12) และวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้น และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

สมการที่ 3.10

$$\text{ร้อยละการเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \text{X100}$$

สมการที่ 3.11

$$\text{จำนวนรากเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนรากที่เกิด}}{\text{จำนวนยอดที่เกิดรากทั้งหมด}}$$

สมการที่ 3.12

$$\text{ระยะเวลาการงอกของรากเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของวันที่รากเริ่มงอก}}{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}$$

3.8.5 การศึกษาวิธีการปรับสภาพและออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

จากข้อที่ 3.8.4 ทำการคัดเลือกต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อที่มีลำต้นและรากที่สมบูรณ์แข็งแรง ความยาวลำต้น 5 ถึง 6 เซนติเมตร จากนั้นนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงทำการล้างทำความสะอาดบริเวณรากที่มีอาหารเพาะเลี้ยงติดอยู่ และแช่ลงในสารฆ่าเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำอีกครั้ง จากนั้นทำการเพาะลงกระถางขนาดเล็กที่ประกอบด้วยดินร่วมกับวัสดุปลูก คือ เพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1ต่อ1 ฉีดพ่นด้วย carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูโดยรอบ รดด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร ¼MS แบบเหลว ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญและซูโครส ซึ่งประกอบไปด้วย อาหารสังเคราะห์สูตร MS 1.1075 กรัมต่อลิตร ทำการบรรจุใส่กระบอกฉีดน้ำ และฉีดพ่นทุกๆ 2 วัน เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยจะค่อยๆทำการตัดถุงพลาสติกให้รูมีขนาดกว้างขึ้นทุกๆ 1 สัปดาห์ จนกระทั่งครบ 4 สัปดาห์ ทำการเอาถุงที่คลุมออก และเพาะเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ จากนั้นสังเกตและบันทึกผลร้อยละการเจริยเติบโต (สมการที่ 3.13) และวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

สมการที่ 3.13

$$\text{ร้อยละการเจริญเติบโต} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เจริญเติบโต}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \text{X100}$$

3.8.6 การสกัดดีเอ็นเอ

3.8.6.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา มีดังนี้

1. ชิ้นส่วนพืชของต้นเริ่มต้น จำนวน 1 ตัวอย่าง
2. ชิ้นส่วนพืชจากข้อที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ อายุ 4 8 และ 12 สัปดาห์ จำนวนอย่างละ1 ตัวอย่าง
3. ชิ้นส่วนพืชข้อที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง

3.8.6.2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนพืชจากต้นเริ่มต้นมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในสภาวะปลอดเชื้อที่มีอายุ 4 8 และ12 สัปดาห์ อย่างละ 1 ตัวอย่าง และ 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยอ้างอิงวิธีมาจาก Doyle and Doyle (1987) นำชิ้นส่วนพืชปริมาณ 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดเป็นผงโดยใช้โกร่งร่วมกับไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB (แสดงวิธีเตรียมสารดังภาคผนวก ก) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex พันหลอดด้วยพาราฟิลม์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุกๆ 15นาที เมื่อครบเวลาทำการเติม chloroform : isoamyl alcohol สัดส่วน (24 ต่อ 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB (แสดงวิธีเตรียมสารดังภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร chloroform : isoamyl alcohol สัดส่วน (24 ต่อ 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม isopropanol ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ดูดได้ อาทิเช่น ดูดส่วนใสได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติม isopropanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนใสทิ้ง จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนใสทิ้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ และล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง ด้วย เอทานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสออก ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ทำการละลายตะกอนใน Tris-EDTA (TE) buffer ประกอบด้วย Tris HCl (พีเอช 8.0) 10 ไมโครลิตร, EDTA (pH 8.0) 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.8.7 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

โดยวิธีการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และการคำนวณหาความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการเตรียมอะกาโรสเจลให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ เช่น การเตรียมอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการชั่งอะกาโรสเจล 0.4 กรัม ละลาย ด้วย 1XTBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปหลอมละลายให้เป็นสารละลายใสในเครื่องไมโครเวฟ จากนั้นนำมาเทลงในถาดเจล (gel tray) พร้อมหวี (combs) ทิ้งไว้จนเจลแข็ง และนำมาใส่ใน chamber ของเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่เติม 0.5X TBE buffer จนท่วม แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาหยอดลงไปในหลุมเจล โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 3X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 1 kb ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลแช่ในเอธิเดียมโบรไมด์ในที่มืด 10 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที นำเจลไปส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพด้วยชุดถ่ายภาพเจล พร้อมบันทึกผล สำหรับการคำนวณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำได้โดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 3 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 297 ไมโครลิตร (dilution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

factor คือ 100) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร การคำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจะใช้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 ซึ่งจะคำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร หรือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.8 การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeat: ISSR)

การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์เริ่มต้นจากการคัดเลือกเพื่อหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างไม้แดง โดยไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม โดยไพรเมอร์ที่ศึกษาเป็นไพรเมอร์ unanchored ที่เป็นไพรเมอร์ที่มีเฉพาะชุดลำดับเบสซ้ำ ๆ โดยอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Agawal. *et al.* (2014) และ Ahmad. *et al.* (2020 : 2021) ได้แก่ UBC814, UBC824, UBC825, UBC834, UBC836, UBC844, UBC847, UBC855 และUBC880 เป็นต้น โดยมีจำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยมี 9 ไพรเมอร์ ซึ่งแสดงรหัส และลำดับ นิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละเส้น ดังตารางที่ 3.1 โดยการคัดเลือกเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมนั้นใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างไม้แดงที่อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อระยะเวลาการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และเหมือนกัน และไม้แดงต้นเริ่มต้นมาสกัดดีเอ็นเอ โดยขั้นตอนดังข้อ 3.8.6 และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ดังข้อ 3.8.7 ทำการเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอให้เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นนำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 9 ไพรเมอร์ ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งใช้องค์ประกอบต่างๆ ความเข้มข้นของสาร และปริมาตรสาร ในขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อ้างอิงจากรายงานของ Ahmad. *et al.* (2021) นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการพีซีอาร์ โดยใช้เครื่อง Eppendorf Mastercycler ep. Gradient 5 ที่ใช้เวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่อ้างอิงจากรายงานของ Ahmad. *et al.* (2021) ดังตารางที่ 3.3 หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยตัวอย่างผลผลิต ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 3X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 35 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp จากนั้นทำการวิเคราะห์ผล โดยไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ต้องมีคุณสมบัติ คือ ต้องสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่าง และแถบดีเอ็นเอที่ได้ต้องมีความคมชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการวิเคราะห์การผลความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดง โดยทำการนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน และไม่แสดงความแตกต่างกัน และคำนวณหาร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน และไม่แสดงความแตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ ดังสมการที่ 3.14 และ 3.15

สมการที่ 3.14

$$\text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}} X100$$

สมการที่ 3.15

$$\text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างกัน} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างกัน}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}} X100$$

สำหรับชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดง นำมาจากการศึกษางานวิจัยของ Agawal. *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Alhagi maurorum* ด้วยไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่แสดงผล จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC824 และ UBC844 รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้สำหรับขั้นตอน Annealing แสดงดังตารางที่ 3.1 และงานวิจัยของ Ahmad. *et al*. (2020 : 2021) ได้ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Pterocarpus marsupium* Roxb. ด้วยไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่แสดงผล จำนวน 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814 UBC825 UBC834 UBC836 UBC847 UBC855 และ UBC880 รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้สำหรับขั้นตอน Annealing แสดงดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ และอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)
UBC814	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTA-3'	45
UBC824	5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3	50
UBC825	5'-ACACACACACACACACT-3'	50
UBC834	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	45
UBC836	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3'	50
UBC844	5'-CTCTCTCTCTCTCCTC-3'	50
UBC847	5'-CACACACACACACACARC-3'	45
UBC855	5'-ACACACACACACACACYT-3'	45
UBC880	5'-GGAGAGGAGAGGAGA-3'	45

สำหรับองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง นำมาจากการศึกษางานวิจัยของ Ahmad. *et. al.* (2021) ได้ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น Pterocarpus marsupium Roxb. ด้วยไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3.1 โดยองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง ดัดแปลงจาก Ahmad. *et. al.* (2021)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Standard Taq	10X	2.5	1X
dNTPs	100 mM	4	1.25 mM
Primer ISSR	100 pmol	1	10 pmol
Taq DNA polymerase	5000U/ml	0.2	1U
DNA	100 ng	1	100 ng
Pure water		16.3	
ปริมาตรรวม		25	

สำหรับขั้นตอนแต่ละขั้นที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ นำมาจากการศึกษางานวิจัยของ Ahmad. *et. al.* (2021) ได้ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Pterocarpus marsupium* Roxb. ด้วยไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3.1 โดยองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.2 ขั้นตอนแต่ละขั้น อุณหภูมิ และจำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ Ahmad. *et. al.* (2021)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวน (รอบ)
Pre-denaturation	94	5	1 รอบ
Denaturation	94	1	
Annealing	45/50	1	40 รอบ
Extension	72	2	
Final extension	72	10	1 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม

4.1.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของไม้แดงโดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 3 วิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที ฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 3 และ6 ร่วมกับ antibiotic PPM และ cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดโดยวิธีที่ 1 ซึ่งปราศจากการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 60 และมีร้อยละการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบไปด้วยเชื้อราและแบคทีเรียเท่ากับ 40 มีร้อยละการงอกของเมล็ดเท่ากับ 83.33 และระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 3.333±1.455 วัน (รูปที่ 4.1 ก) สำหรับวิธีที่ 2 การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 70 และมีร้อยละการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 30 มีร้อยละการงอกของเมล็ดเท่ากับ 85.70 และระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 3.417±1.613 วัน (รูปที่ 4.1 ข) และวิธีที่ 3 การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 6 มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100 และปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ร้อยละการงอกของเมล็ดเท่ากับ 90 และระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 3.500±1.280 วัน ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (รูปที่4.1ค) (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kuria. *et al.* (2012) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับเมล็ดของต้น *Warburgia ugandensis* (Sprague) ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida พบว่าเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ร่วมกับ tween-20 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นฟอกด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 1 นาที มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100 จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ เช่นเดียวกันกับงานวิจัย Bianco (2014) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับเมล็ดของต้น *Adesmia bicolor* จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล เป็นเวลา 1 นาที และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นวิธีที่ประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ahmad. *et al.* (2020) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่สำหรับเมล็ดของต้น *Arachis hypogaea* L. จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นวิธีที่ประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ สำหรับผลการทดลองวิธีที่ 2 โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตต่ำกว่าวิธีที่ 1 เล็กน้อย ซึ่งถือว่าวิธีที่ 2 เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อค่อนข้างดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fernandes. *et al.* (2018) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Copaifera oblongifolia* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที และฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Gbadamosi and Shaibu (2013) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเมล็ดของต้น *Senna alata* (Linn) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ ทั้งนี้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากชนิดของพืชที่ศึกษาวิจัยแตกต่างกัน ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการฟอกฆ่าเชื้อก็จะแตกต่างกันออกไป ตามชนิดพืชนั้นๆ นอกจากเอทานอลและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ยังมีสารอื่นๆ ที่สำคัญอย่างยิ่งในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารป้องกันเชื้อรา carbendazim ซึ่งในศึกษาวิจัยจะใช้ที่ความเข้มข้น 0.1 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ โดยจะใช้ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของ *Senna sophera* (L.) Roxb ด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin (carbendazim) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ เป็นวิธีที่ประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ (Parveen and Shahzad, 2010 ; Parveen and Shahzad, 2014) สำหรับสาร antibiotic และcefotaxime ซึ่งในการศึกษาวิจัยจะใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ โดยจะใช้ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pence (2005) ได้รายงานไว้ว่า การศึกษาฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช ได้แก่ เมล็ด ใบ และข้อ ของพืชเขตร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายชนิด โดยฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารปฏิชีวนะ cefotaxime ร่วมกับยาปฏิชีวนะอื่นๆ ตัวอย่างเช่น vancomycin และantibiotic เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนสำหรับชิ้นส่วนพืช และมีความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชที่ต่ำ สำหรับสาร PPM ซึ่งในการศึกษาวิจัยจะใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ และ สาร tween-20 จำนวน 3 หยด โดยจะใช้ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Padmanabhan. *et al.* (2017) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเมล็ดของ *Baptisia australis* พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วย PPM ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 และ tween-20 จำนวน 2 หยด เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ สำหรับร้อยละการงอกของเมล็ด และระยะเวลาการการงอกของเมล็ด จากการศึกษาวิจัย พบว่าก็มีร้อยละการงอกมากที่สุดเท่ากับ 90 ระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ยจากทั้ง 3 วิธี ประมาณ 3 ถึง 4 วัน ซึ่งไม่ค่อยมีความแตกต่างกัน และเร็วกว่าการงอกในธรรมชาติเล็กน้อย เนื่องจากในธรรมชาติเมล็ดไม้แดงจะงอกประมาณ 5 วัน (ศุภชัย, 2564) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดมีหลายประการ ได้แก่ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเมล็ด ระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ด สำหรับเมล็ดไม้แดงจะมีร้อยละการงอกลดลง เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดมากกว่า 5 เดือน และการเก็บรักษาเมล็ดในพื้นที่ที่มีความชื้น และความร้อนสูง อีกทั้งความสมบูรณ์ของเมล็ดแต่ละเมล็ด และขนาดของเมล็ดจะไม่เท่ากันเมล็ด แม้ว่าเมล็ดจะเกิดจากต้นเดียวกัน หรืออยู่ภายในฝักเดียวกันก็ตาม ซึ่งในการศึกษาวิจัยจะการคัดเลือกเฉพาะเมล็ดที่มีขนาดใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้อง คือ สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด สำหรับเมล็ดพืชแต่ละชนิดจะมีความทนทานต่อสารเคมีไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับลักษณะของเมล็ด ซึ่งเมล็ดไม้แดงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเมล็ดที่เปลือกหุ้มที่ค่อนข้างแข็ง (จำนรรจ์, 2559) อีกทั้งการศึกษาครั้งนี้ใช้สารเคมีในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำและระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อไม่นาน ซึ่งค่อนข้างเหมาะสมต่อความทนทานของเมล็ด และปัจจัยเรื่องสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเมล็ด ซึ่งในการทดลองพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS มีความเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดไม้แดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramirez**.** *et al*. (2012) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดของต้น *Ulex europaeus* จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร สูตร ½MS เกิดการงอกดีกว่า สูตร MS เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Indravathi and Pullaiah (2013) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดของต้น *Albizia amara* (Roxb.) จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่งผลให้เมล็ดเกิดการงอกภายใน 2 สัปดาห์ และจำนวนข้อเท่ากับ 3 ถึง 4 ข้อต่อต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของต้นไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	จำนวน (เมล็ด)	การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์		การรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์		การงอกของเมล็ด		ระยะเวลาการงอกของเมล็ดเฉลี่ย (วัน)
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	
วิธีที่ 1	30	(12)	40	(18)	60	(15)	83.33	$3.333^{a} \pm 1.455$
วิธีที่ 2	30	(9)	30	(21)	70	(18)	85.70	$3.417^{a} \pm 1.613$
วิธีที่ 3	30	(0)	0	(30)	100	(27)	90.00	$3.500^{a} \pm 1.280$

หมายเหตุ /[1]ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของต้นไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

(ก) การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

(ข) การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

(ค) การเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.1.2 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของไม้แดงโดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 3 วิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันที่ความเข้มข้นของสารเมอคิวริกคลอไรด์ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 10 นาที ฟอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 และ0.2 ร่วมกับ antibiotic PPM และ cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ tween-20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เพาะเลี้ยงบนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อโดยวิธีที่ 1 ซึ่งปราศจากการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดสีน้ำตาลเท่ากับ 53.33 มีร้อยละการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบไปด้วยเชื้อราและแบคทีเรียเท่ากับ 33.33 และร้อยละการเกิดสีน้ำตาลไหม้เท่ากับ 13.33 (รูปที่ 4.2 ก) และวิธีที่ 3 การใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดสีน้ำตาลเท่ากับ 46.67 มีร้อยละการเกิดสีน้ำตาลไหม้เท่ากับ 53.33 และปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ (รูปที่ 4.2 ค) สำหรับวิธีที่ 2 การใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 มีร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดสีน้ำตาลเท่ากับ 80 และมีร้อยละการเกิดสีน้ำตาลไหม้เท่ากับ 20 และปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (รูปที่ 4.2 ข) (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar. *et al.* (2017) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Saccharum officinarum* L. ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที และสารเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 5 นาที และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 10 นาที และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 85.4 และลักษณะชิ้นส่วนข้อสุขภาพดีสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Kuria. *et al.* (2012) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Warburgia ugandensis* (Sprague) ซึ่ง จัดอยู่ในชั้น Magnoliopsida พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ร่วมกับ tween-20 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นฟอกด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที พบว่าให้ร้อยละการรอดชีวิต เท่ากับ 100 เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Boga. *et al.* (2012) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Dalbergia latifolia* Roxb. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 7 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และฟอกด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 ถึง 60 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 8 นาที เป็นวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Rajabudeen. *et al*. (2014) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Indigofera viscosa* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 และเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาวิจัยครั้งนี้ เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Vats and Kamal (2014) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อสำหรับต้น *Cassia occidentalis* L. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วย สารป้องกันเชื้อรา bavistin (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 10 นาที และสารเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 8 นาที เป็นวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Jaiswal. *et al.* (2021) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Glycyrrhiza glabra* L. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันเชื้อรา bavistin (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับ tween-20 จำนวน 2 ถึง 3 หยด และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำมาฟอกด้วยสารเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อสูงที่สุด และจากการทดลองยังพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ยังพบว่าชิ้นส่วนข้อมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นร้อยละ 10 ซึ่งถือว่าไม่มากเมื่อเทียบกับการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนข้อมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นมากถึงร้อยละ 40 โดยชิ้นส่วนข้อที่เกิดสีน้ำตาล จะไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นยอดได้ ทั้งนี้เป็นผลมาจากการใช้ความเข้มข้นของเมอคิวริกคลอไรด์ โดยทั่วไปจะใช้ความเข้มข้นไม่เกิน ร้อยละ 0.1 เนื่องจากเมอคิวริกคลอไรด์เป็นสารเคมีที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี แต่ก็มีข้อเสียที่อาจทำให้ชิ้นส่วนพืชเสียหายไปด้วย ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ และเมื่อยิ่งใช้เมอคิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 0.1 จะมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชถูกทำลายมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้มีร้อยละการรอดชีวิตลดลง ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของเมอคิวริกคลอไรด์นี้จึงไม่เหมาะสมกับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของไม้แดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Neliyati. *et al.* (2019) ได้รายงานไว้ว่าเมอคิวริกคลอไรด์จะมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย และบ่อยครั้งที่ทำให้เกิดการตายของชิ้นส่วนพืชหากใช้โดยไม่เหมาะสม โดยการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ในความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ0.1 อาจเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่สุดสำหรับพืชที่มีการปนเปื้อนอย่างมาก อย่างไรก็ตามการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ควรใช้ด้วยความระมัดระวังสูง เนื่องจากมีพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Kumar. *et al.* (2017) ได้รายงานไว้ว่า การฟอกฆ่าเชื้อโดยเพิ่มความเข้มข้นของเมอคิวริกคลอไรด์ จะส่งผลเสียต่อการรอดชีวิตของพืช โดยพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ0.2 ถึง 0.4 ชิ้นส่วนพืชมีสีน้ำตาลถึงดำและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เนื่องจากเกิดการตายของเนื้อเยื่อพืช สำหรับการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อร่วมกันหลายชนิดจะมีส่วนช่วยในการฟอกฆ่าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dodake. *et al.* (2020) พบว่าการใช้สารเมอคิวริกคลอไรด์ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในปริมาณความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นที่เหมาะสม จะเสริมประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในชิ้นส่วนพืชได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสารที่ใช้ในการฟอกฆ่าร่วมกัน ได้แก่ เอทานอล carbendazim tween-20 สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารเมอคิวริกคลอไรด์ และยังมีสารอื่นๆ ที่สำคัญอย่างยิ่งในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ antibiotic cefotaxime และPPM ซึ่งในการศึกษาวิจัยจะใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ โดยจะใช้ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pence (2005) ได้รายงานไว้ว่า การศึกษาฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช ได้แก่ เมล็ด ใบ และข้อ ของพืชเขตร้อนหลายชนิด โดยฟอกฆ่าเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ cefotaxime ร่วมกับยาปฏิชีวนะอื่นๆ ตัวอย่างเช่น vancomycin และantibiotic เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนสำหรับชิ้นส่วนพืช และมีความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชที่ต่ำ เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Bindu. *et al.* (2017) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้น *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex Willd.) DC. พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วย cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ ได้แก่ เมอคิวริกคลอไรด์ และ carbendazim เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Minipara. *et al.* (2019) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Annona squamosa* L. พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 2 cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 มีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุด และร้อยละการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำที่สุด เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Pavese. *et al.* (2022) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับชิ้นส่วนข้อของต้น *Castanea sativa* พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 วินาทีและฟอกด้วย PPM ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ร่วมกับสารฟอกขาว เป็นเวลา 10 นาที พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิต เท่ากับ100 ซึ่งเป็นวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Okoroafor (2022) ได้รายงานไว้ว่า สาร PPM เป็นสารที่ช่วยเสริมในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเนื้อเยื่อพืช และมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของการชักนำการเกิดแคลลัส และเมื่อเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินจะช่วยเสริมการชักนำการเกิดยอดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่ควรเสริมในปริมาณที่เหมาะสม ถ้ามากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อพืชได้

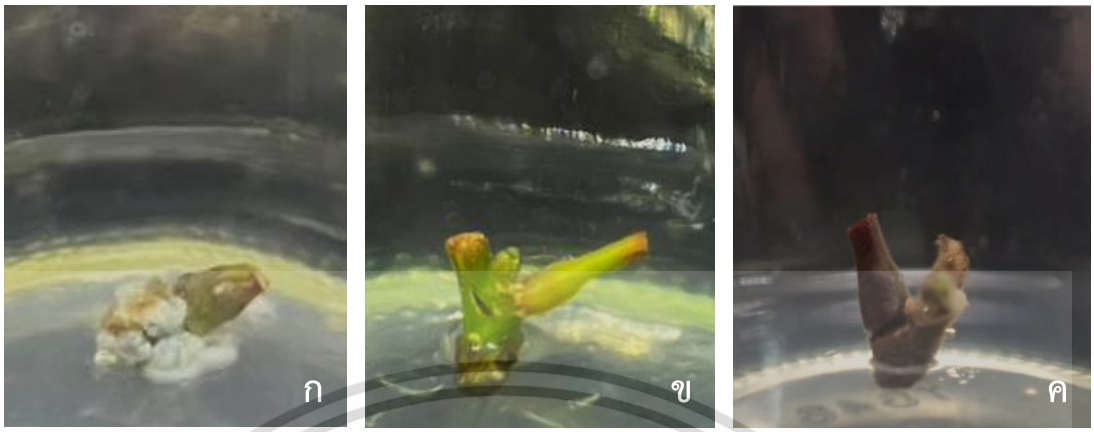
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นแม่พันธุ์ไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	**จำนวน (ข้อ)**	**การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์**		**การเกิดสีน้ำตาลไหม้**		**การรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดสีน้ำตาลไหม้**	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
วิธีที่ 1	30	(10)	33.33	(4)	13.33	(16)	53.33
วิธีที่ 2	30	(0)	0	(6)	20.00	(24)	80
วิธีที่ 3	30	(0)	0	(16)	53.33	(14)	46.67

หมายเหตุ /1ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นแม่พันธุ์ไม้แดง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

(ก) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จากวิธีที่ 1

(ข) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดสีน้ำตาลไหม้ จากวิธีที่ 2

(ค) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่เกิดสีน้ำตาลไหม้ จากวิธีที่ 3

4.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด

4.2.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ไซโทไคนิน ได้แก่ BAP หรือ KN ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1.0 2.0 และ3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และบันทึกผลการทดลองและเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 2.305±0.162 เซนติเมตร (รูปที่ 4.3 ค) (ตารางที่ 4.3) และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 4.031±0.317 เซนติเมตร (รูปที่ 4.4 ก) สำหรับการเสริมด้วย BAP ความเข้มข้นอื่นๆ ที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีร้อยละการเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยอด และความยาวยอดเฉลี่ยที่ลดลง และการเสริมด้วย KN ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น พบว่า มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยลดลงเช่นกัน (รูปที่ 4.3) (ตารางที่ 4.4) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bouzdoudi. *et al.* (2017) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น *Ceratonia silique* L. ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอด จำนวนใบที่เกิดขึ้นและขนาดของยอดสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น พบว่า จำนวนยอด จำนวนใบที่เกิดขึ้นและขนาดของยอดที่ลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของยอด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Saidi. *et al.* (2019) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น *Ceratonia siliqua* L. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้นที่ต่ำหรือสูงขึ้นกว่านี้ พบว่า มีจำนวนยอดเฉลี่ยที่ลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม ซึ่ง0ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและพัฒนาของยอด และทำการเปรียบเทียบระหว่าง BA และ KN ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดที่เกิดจากการเสริมด้วย BAP มีลักษณะยอดและใบที่แข็งแรง ซึ่งให้ผลดีกว่า KN เนื่องจากยอดที่ได้จาก KN มีขนาดเล็ก และใบที่เกิดขึ้นค่อนข้างออนแอ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Bertsouklis. *et al.* (2023) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น *Senna artemisioides* ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้นที่ต่ำหรือสูงขึ้นกว่านี้ พบว่า มีร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยที่ลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง BA และ KN ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดที่เกิดจากการเสริมด้วย BAP แสดงผลไปในทิศทางเดียวกันในทุกความเข้มข้น โดยส่งผลกระตุ้นให้ตาข้างบริเวณข้อสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ดีกว่าและเกิดยอดหลายยอด (multiple shoot) จำนวนมาก ซึ่งให้ผลดีกว่าการเสริมด้วย KN เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Indravathi and Pullaiah (2012) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้น *Albizia amara* (Roxb.) Boiv. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ทำการเปรียบเทียบผลการเสริมด้วย BAP และKN ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเสริมด้วย BAP ทุกความเข้มข้น แสดงผลไปใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทิศทางเดียวกัน คือ มีจและความยาวยอดเฉลี่ยสูงกว่าการเสริมด้วย KN ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นยอดได้อย่างสมบูรณ์ และชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 4.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวน (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ข้อ)	ร้อยละการเกิดยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
Control	0	15	13	86.67	0.550^{e} ± 0.229
BAP	0.25	15	100	100.00	1.798^{b} ± 0.170
	0.5	15	100	100.00	2.305^{a} ± 0.162
	1.0	15	12	80.00	0.992^{cd} ± 0.534
	2.0	15	10	66.67	0.840^{de} ± 0.542
	3.0	15	9	60.00	0.697^{de} ± 0.514
KN	0.25	15	12	80.00	1.303^{c} ± 0.679
	0.5	15	11	73.33	0.681^{de} ± 0.435
	1.0	15	10	66.67	0.633^{de} ± 0.468
	2.0	15	10	66.67	0.620^{de} ± 0.457
	3.0	15	9	60.00	0.577^{e} ± 0.489

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงการนับจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่ได้ มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวน (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ข้อ)	ร้อยละการเกิดยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
Control	0	15	13	86.67	0.798^{e} ± 0.335
BAP	0.25	15	15	100.00	2.907^{b} ± 0.344
	0.5	15	15	100.00	4.031^{a} ± 0.317
	1.0	15	13	86.67	1.361^{d} ± 0.568
	2.0	15	11	73.33	0.915^{e} ± 0.580
	3.0	15	10	66.67	0.769^{e} ± 0.573
KN	0.25	15	13	86.67	1.905^{c} ± 0.787
	0.5	15	11	73.33	0.802^{e} ± 0.507
	1.0	15	10	66.67	0.730^{e} ± 0.539
	2.0	15	10	66.67	0.704^{e} ± 0.520
	3.0	15	9	60.00	0.632^{e} ± 0.538

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงการนับจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่ได้ มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต

(ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ง) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(จ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฉ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ช) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

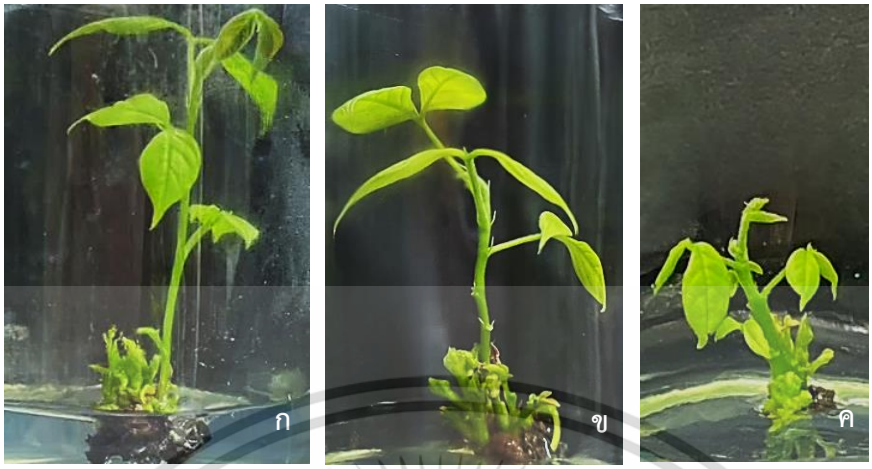
(ซ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฌ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ญ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฎ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

(ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด

(ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ไซโทไคนิน ได้แก่ BAP หรือ KN ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1.0 2.0 และ3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และบันทึกผลการทดลองและเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 2.022±0.218 เซนติเมตร (รูปที่ 4.5 ข) (ตารางที่ 4.5) และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 3.418±0.848 เซนติเมตร (รูปที่ 4.6ก) สำหรับการเสริมด้วย BAP ความเข้มข้นอื่นๆ ที่สูงกว่า 0.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยที่ลดลง และการเสริมด้วย KN ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น พบว่า มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยลดลงเช่นกัน (รูปที่ 4.5) (ตารางที่ 4.6) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nunez. *et al.* (2017) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น *Caesalpinia spinosa* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอดสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า พบว่ามีร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอดที่ลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของยอด เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Yahya. *et al.* (2020) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น *Tectona grandis* ซึ่งเป็นไม้เนื้อแข็งชนิดหนึ่ง ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้นที่ต่ำหรือสูงขึ้นกว่านี้ พบว่า มีจำนวนยอดเฉลี่ยที่ลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Parveen. *et al.* (2010) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น *Cassia siamea* Lam. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอดสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการเสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่า พบว่า มีร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอดที่ลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสริมด้วย BAP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลโดยตรงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการเสริมด้วย BAP และKN ที่ความเข้มข้น 0.025 ถึง 1.125 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเสริมด้วย BAP ทุกความเข้มข้น แสดงผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอดสูงที่สุด และลักษณะของยอดดูมีสุขภาพดีกว่าการเสริมด้วย KN เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Sharma. *et al*. (2017) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น *Bauhinia racemosa* Lam. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ทำการเปรียบเทียบผลการเสริมด้วย BAP และKN ที่ความเข้มข้น 1.0 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเสริมด้วย BAP ทุกความเข้มข้น แสดงผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ ร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอดสูงที่สุด ซึ่งผลดีกว่าการเสริมด้วย KN เนื่องจาก BAPเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสามารถนำไปใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนเมแทบอลิซึมได้ง่ายกว่า และการเคลื่อนที่ของสารในเนื้อเยื่อพืชเคลื่อนที่ได้ง่ายกว่า และสามารถกระตุ้นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสร้างขึ้นโดยกระบวนการทางธรรมชาติให้ทำงานได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Choudhary. *et al.* (2017) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้น *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ทำการเปรียบเทียบผลการเสริมด้วย BAP และKN ที่ความเข้มข้น 0.25และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเสริมด้วย BAP แสดงผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีร้อยละการเกิดยอด และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงกว่าการเสริมด้วย KN นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมด้วย BAP และ KN ที่ความเข้มข้นที่ต่ำจะมีร้อยละการเกิดแคลลัสบริเวณฐานของข้อเกิดขึ้นมาก และการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต จะช่วยลดร้อยละการเกิดแคลลัสบริเวณฐานข้อ ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอด แต่ปริมาณความเข้มข้นที่สูงขึ้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตจะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาไปเป็นยอด ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นยอดได้อย่างสมบูรณ์ และชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากต้นแม่พันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวน (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ข้อ)	ร้อยละการเกิดยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
Control	0	15	11	73.33	0.540[e] ± 0.363
BAP	0.25	15	15	100.00	2.022[a] ± 0.218
	0.5	15	15	100.00	1.619[b] ± 0.222
	1.0	15	12	80.00	0.907[cd] ± 0.484
	2.0	15	11	73.33	0.803[de] ± 0.511
	3.0	15	11	73.33	0.657[de] ± 0.437
KN	0.25	15	13	86.67	1.212[c] ± 0.525
	0.5	15	11	73.33	0.609[de] ± 0.406
	1.0	15	10	66.67	0.570[de] ± 0.436
	2.0	15	9	60.00	0.563[de] ± 0.485
	3.0	15	9	60.00	0.556[de] ± 0.473

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงการนับจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่ได้ มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ P≤0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับข้อจากต้นแม่พันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวน (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ข้อ)	ร้อยละการเกิดยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
Control	0	15	12	80.00	0.687^{e} ± 0.360
BAP	0.25	15	15	100	3.418^{a} ± 0.848
	0.5	15	15	100	2.490^{b} ± 0.344
	1.0	15	13	86.67	1.277^{cd} ± 0.539
	2.0	15	12	80.00	0.929^{de} ± 0.501
	3.0	15	11	73.33	0.782^{e} ± 0.508
KN	0.25	15	14	93.33	1.644^{c} ± 0.483
	0.5	15	11	73.33	0.724^{e} ± 0.462
	1.0	15	10	66.67	0.708^{e} ± 0.524
	2.0	15	9	60.00	0.643^{e} ± 0.547
	3.0	15	9	60.00	0.627^{e} ± 0.531

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงการนับจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่ได้ มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต

(ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ง) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(จ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฉ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ช) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

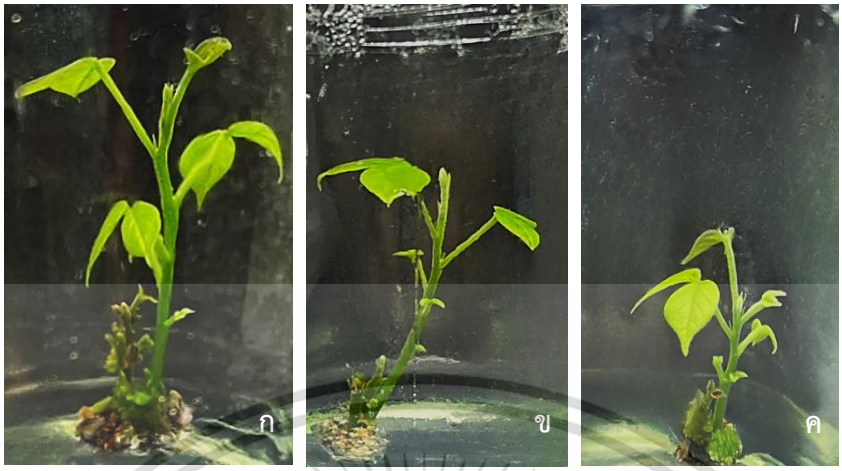
(ซ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฌ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ญ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฎ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ยอดที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ KN ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

(ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด

(ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย KN ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

4.3.1 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากเมล็ดให้เกิดราก

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากเมล็ดให้เกิดราก โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ พบว่า มีร้อยละการเกิดรากสูงที่สุดเท่ากับ 86.67 มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 2.533±1.187 รากต่อชิ้นยอด และมีระยะเวลาการงอกของรากเฉลี่ย เท่ากับ 11.539±1.050 วัน (รูปที่ 4.7 ข) สำหรับการเสริมด้วย IBA ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า พบว่า การเสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีรากเกิดขึ้นเช่นกัน แต่ใช้ระยะเวลาในการเริ่มเกิดรากนานกว่า มีร้อยละการเกิดรากและจำนวนรากต่ำกว่า การเสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้การเสริมด้วย IBA ทุกความเข้มข้น ทั้งที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีรากและไม่มีเกิดขึ้น จะมีก้อนแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณฐานยอดเสมอ โดยการเสริมด้วย IBA ที่ปริมาณความเข้มข้นสูง จะยิ่งมีก้อนแคลลัสเกิดขึ้นมากเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Parveen. *et al*. (2010) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำยอดให้เกิดรากของต้น *Cassia siamea* Lam. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได่แก่ IBA IAA และNAA พบว่า การเสริมด้วย IBA ในการชักนำการเกิดรากมีประสิทธิภาพดีกว่า IAA และNAA และพบว่าการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินในระดับความเข้มข้นที่สูง ส่งผลให้เกิดแคลลัสบริเวณฐานยอดก่อนจะเกิดราก มีผลทำให้รากที่เกิดมาไม่ค่อยแข็งแรง และเนื่องจากการเจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ต้องอาศัยการเชื่อมกันของเนื้อเยื่อระหว่างยอดและรากที่สมบูรณ์และแข็งแรง ทำให้มีผลกระทบอย่างมากต่อร้อยละการรอดชีวิต เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ได้รายงานไว้ว่า การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำยอดให้เกิดรากของต้น *Senna sophera* (L.) Roxb. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ระความเข้มข้นที่สูงมากเกินไป จะยับยั้งศักยภาพการชักนำให้เกิดราก โดยรากที่เกิดขึ้นจะมีขนาดที่สั้น หรืออาจจะไม่มีรากเกิดขึ้น นอกจากนี้การเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำให้เกิดรากในกลุ่มออกซินชนิดอื่นๆ ได้แก่ NAA และIAA พบว่ามีประสิทธิภาพในการชักนำรากต่ำกว่าการเสริมด้วย IBA (Parveen and Shahzad, 2010 ; Parveen and Shahzad, 2014) สำหรับระยะเวลาการงอกของราก โดยความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก มีผลต่อระยะเวลาการงอกของราก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Uddin. *et al*. (2005) ได้รายงานไว้ว่า การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ โดยมีร้อยละการเกิดรากสูงที่สุดเท่ากับ 91.66 และมีระยะเวลาการงอกของรากเท่ากับ 6 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเสริมด้วย IBA ความเข้มข้นอื่นๆ โดยความเข้มข้นของ IBA ที่ไม่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นที่ต่ำหรือสูงมากเกินไป จะทำให้ใช้ระยะเวลาในการงอกของรากนานมากขึ้น หรืออาจไม่เกิดรากเนื่องจากปริมาณความเข้มข้นไม่เหมาะสมต่อพืชชนิดนั้นๆ ทั้งนี้จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเสริมด้วย IBA สำหรับการชักนำให้เกิดรากมีประสิทธิภาพมากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินชนิดอื่นๆ สำหรับพืชหลากหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากข้อของเมล็ดให้เกิดรากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวน (ยอด)	จำนวนยอดที่เกิดราก (ยอด)	ร้อยละการเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย	ระยะเวลาการงอกของรากเฉลี่ย (วัน)
IBA	0	15	0	0.00	0.000^{c} ± 0.000	0.000^{c} ± 0.000
	0.25	15	9	60.00	0.857^{b} ± 0.770	17.222^{b} ± 1.202
	0.5	15	10	66.67	1.267^{b} ± 0.961	15.200^{b} ± 0.789
	0.75	15	13	86.67	2.533^{a} ± 1.187	11.539^{a} ± 1.050
	1.0	15	0	0.00	0.000^{c} ± 0.000	0.000^{c} ± 0.000

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงการนับจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่ได้ มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 รากที่เกิดจากการชักนำยอดจากเมล็ดของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(ก) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด

4.3.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากต้นแม่พันธุ์ให้เกิดราก

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากต้นแม่พันธุ์ให้เกิดราก โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการเกิดรากสั้นที่สุด โดยเริ่มมีรากเกิดขึ้นในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ พบว่า มีร้อยละการเกิดรากสูงที่สุดเท่ากับ 93.33มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 2.800±1.014 รากต่อชิ้นยอด และมีระยะเวลาการงอกของรากเฉลี่ยเท่ากับ 9.643±0.842 (รูปที่ 4.8 ข) สำหรับการเสริมด้วย IBA ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า พบว่า การเสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีรากเกิดขึ้นเช่นกัน แต่ใช้ระยะเวลาในการเริ่มเกิดรากนานกว่า มีร้อยละการเกิดรากและจำนวนรากต่ำกว่าการเสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) (ตารางที่ 4.8) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ismail. *et. al*. (2011) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดของต้น *Clitoria ternatea* L. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำมากเกินไป ตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากและจำนวนรากต่อยอดที่ต่ำ จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาชักนำให้เกิดราก สำหรับ การเสริมด้วย IBA ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงมากเกินไป ตัวอย่างเช่น มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลต่อการเจริญของราก โดยจะยับยั้งการเจริญของราก ทำให้รากเกิดช้า มีร้อยละการเกิดต่ำ และลักษณะของรากไม่แข็งแรง ดังนั้นการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำให้เกิดรากจะต้องเสริมที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อพืชชนิดนั้นๆ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Agarwal. *et al*. (2014) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำยอดให้เกิดรากของต้น *Alhagi maurorum* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการชักนำให้เกิดราก เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Kasthurirengan. *et al.* (2013) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นจามจุรี (*Samanea saman*) ว่า การเสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากสูงที่สุด นอกจากนี้พบว่าการเสริมด้วย IBA สามารถชักนำการเจริญของรากได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินชนิดอื่นๆ และได้รับการรายงานถึงการส่งเสริมการเจริญของรากในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในพืชกลุ่มไม้เนื้อแข็งตระกูลถั่ว (Fabaceae) เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Prakash. *et al.* (2006) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น *Pterocarpus santalinus* L. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่ความเข้มข้นที่สูง จะส่งผลให้เกิดแคลลัสบริเวณฐานของยอด และยับยั้งการเจริญของราก ทำให้ไม่มีรากเกิดขึ้น และการเสริมด้วย IBA มีประสิทธิภาพในการชักนำการเกิดรากมากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Reddy and Saritha (2023) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของต้น *Indigofera barberi* Gamble ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการเสริมด้วย IBA ที่ความเข้มข้นต่ำหรือสูงมากเกินไป จะทำให้ยับยั้งการเกิดราก ส่งผลทำให้ไม่มีการเกิดรากขึ้น สำหรับระยะเวลาการงอกของราก โดยชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก มีผลต่อระยะเวลาการงอกของราก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Berhera and Thirunavoukkrasu (2006) ได้รายงานไว้ว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดรากของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้น *Desmodium gangeticum* (L.) DC ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่าการเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่ความเข้มข้นที่สูง จะส่งผลให้เกิดแคลลัสบริเวณฐานของยอด และทำให้รากที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อย และการเจริญเติบโตของรากไม่ดี และพบว่าการเสริมด้วย IBA มีประสิทธิภาพสำหรับการชักนำให้เกิดรากสำหรับพืชที่ยากต่อการเกิดราก และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการเสริมด้วย IBA และ IAA พบว่า IBA มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดรากมากกว่า IAA เนื่องจากใช้เวลาในการเกิดราก 6 ถึง 8 วัน เมื่อเทียบกับ IAA ซึ่งใช้เวลาในการเกิดราก 10 ถึง 12 วัน ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากมีผลต่อพืชอย่างยิ่ง จะต้องอยู่ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมพืชจึงสามารถเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.8 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากข้อของต้นแม่พันธุ์ให้เกิดรากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวน (ยอด)	จำนวนยอดที่เกิดราก (ยอด)	ร้อยละการเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย	ระยะเวลาการงอกของรากเฉลี่ย (วัน)
IBA	0	15	0	0.00	0.000^{c} ± 0.000	0.000^{c} ± 0.000
	0.25	15	8	53.33	1.000^{b} ± 0.756	15.909^{b} ± 0.944
	0.5	15	11	73.33	1.467^{b} ± 1.060	13.455^{b} ± 0.934
	0.75	15	14	93.33	2.800^{a} ± 1.014	9.643^{a} ± 0.842
	1.0	15	0	0.00	0.000^{c} ± 0.000	0.000^{c} ± 0.000

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงการนับจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่ได้ มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 รากที่เกิดจากการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อต้นแม่พันธุ์ของไม้แดง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(ง) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(จ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ฉ) การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด

4.4 การศึกษาการปรับสภาพและออกปลูกต้นกล้าของไม้แดงสู่สภาวะแวดล้อม

จากการศึกษาโดยนำต้นกล้าของไม้แดงที่ประกอบไปด้วย ยอด ใบ และรากที่สมบูรณ์ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาวะหลอดทดลอง และใช้วัสดุปลูก ได้แก่ ดินและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยขั้นตอนดังข้อที่ 3.8.5 หลังจากออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้าที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อของเมล็ดไม้แดง มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 66.67 สำหรับต้นกล้าที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อของเมล็ดไม้แดง มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 77.78 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อภิสรา (2564) ได้รายงานไว้ว่า การปรับสภาพและออกปลูกต้นกล้าของต้น *Arachis glabrata* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยแช่ในสารป้องกันเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 15 ถึง 20 นาที และลงปลูกในกระถางพลาสติกที่มีวัสดุปลูก ได้แก่ ดินและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 พบว่าหลังจากออกปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต้นกล้ามีความแข็งแรงสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เช่นเดียวกันกับรายงานวิจัยของ พชร (2565) รายงานไว้ว่า การปรับสภาพและออกปลูกต้นกล้าของต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พะยูงไทย ที่มีวัสดุปลูกได้แก่ ดินและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75 เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Hasancebi. *et al*. (2010) ศึกษาวิธีการออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพของต้น *Astragalus chrysochlorus* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยปลูกในกระถางพลาสติกที่มีวัสดุปลูก ได้แก่ ดินและเพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูโดยรอบ และทำการรดด้วยอาหารเหลว สูตร ¼MS ทุกๆ 4 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 2 สัปดาห์ ทำการเปิดถุงพลาสติกออก และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 10 สัปดาห์ พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 77 เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Parveen. *et al*. (2010) การศึกษาวิธีการออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพของต้น *Cassia siamea* Lam. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยนำต้นกล้าปลูกลงในกระถางขนาดเล็กที่ประกอบด้วยดินและเพอร์ไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูโดยรอบ ทำการรดด้วยอาหารเหลวสูตร ¼MS ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำถุงพลาสติกออก พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 85 ซึ่งวัสดุปลูกเพอร์ไลท์ หรือหินภูเขาไฟ ซึ่งเป็นวัสดุปลูกอินทรีย์ที่ช่วยอุ้มน้ำให้นความชื้นแก่ดินได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fascella (2009) ได้รายงานไว้ว่า การปลูกต้นไม้ที่เสริมด้วยวัสดุปลูกเพอร์ไลท์ มีส่วนช่วยให้ต้นไม้มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น และมีปริมาณน้ำมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นและมีโครงสร้างที่แข็งแรงเพิ่มขึ้น และสามารถดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น ดังนั้นการเสริมด้วยวัสดุปลูกที่เหมาะสมกับพืชชนิดนั้นๆ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและผลผลิตในระยะเวลาที่สั้นขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเสริมสร้างระบบรากที่แข็งแรงให้แก่พืช ทำให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Ionela. *et al*. (2022) ได้รายงานไว้ว่า การปรับสภาพต้นกล้าในสภาวะหลอดทดลองหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อออกปลูกกสู่สภาวะแวดล้อม เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากจะต้องเลือกใช้วัสดุปลูกที่เหมาะสม ควบคุมความชื้นของดินได้ดี และปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ต้นกล้าจึงจะสามารถรอดชีวิต และเจริญเติบโตต่อไปได้ โดยพบว่าการใช้วัสดุปลูกเพอร์ไลท์สามารถช่วยควบคุมความชื้นได้ดี และเหมาะสมกับพืชหลายชนิด ทั้งนี้การเลือกใช้วัสดุปลูกที่เหมาะสมมาช่วยเสริมในการปรับสภาพเพื่อออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อม มีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้ต้นกล้าที่ทำการเพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตต่อไปในสภาวะแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.9 การออกปลูกต้นกล้าไม้แดงสู่สภาวะแวดล้อม ด้วยวัสดุปลูกดินและเพอร์ไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(ก) ต้นกล้าจากการชักนำชิ้นส่วนข้อของเมล็ดไม้แดง

(ข) ต้นกล้าจากการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นแม่พันธุ์ไม้แดง

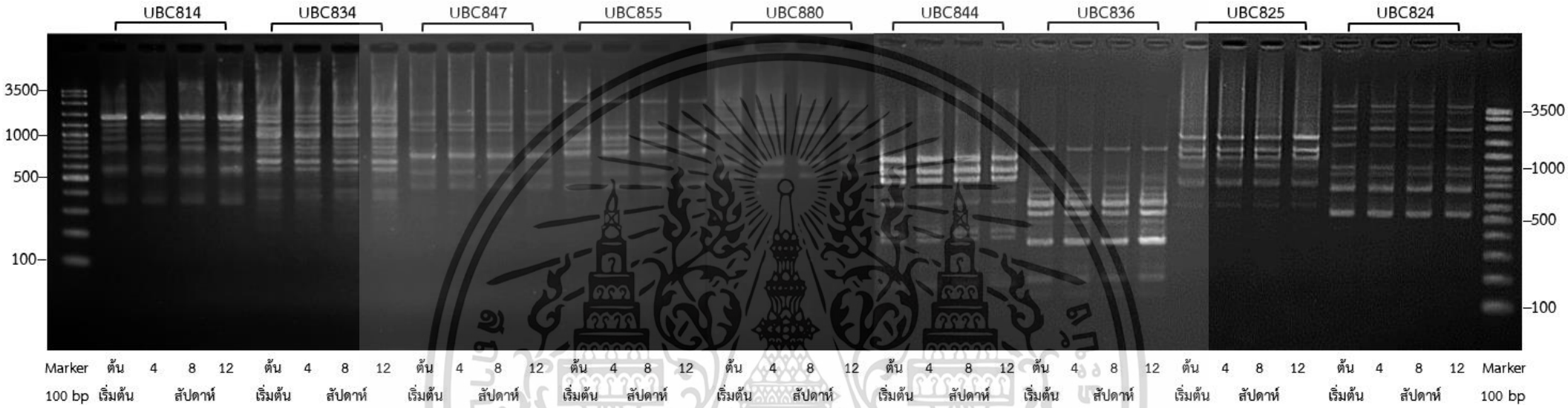
4.5 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

จากการศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ทั้งหมด 9 ไพร์เมอร์ สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ของตัวอย่างไม้แดงต้นเริ่มต้น จำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างในสภาวะปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำการเกิดยอด โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างในสภาวะปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำการเกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ อายุ 12 สัปดาห์ โดยถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ตัวอย่าง ผลการทดลอง พบว่า พืชแต่ละช่วงอายุทั้ง 4 8 และ 12 สัปดาห์ ทั้ง 9 ไพรเมอร์ เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 pb พบว่า ช่วงอายุพืชที่ต่างกันของไม้แดงในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความ

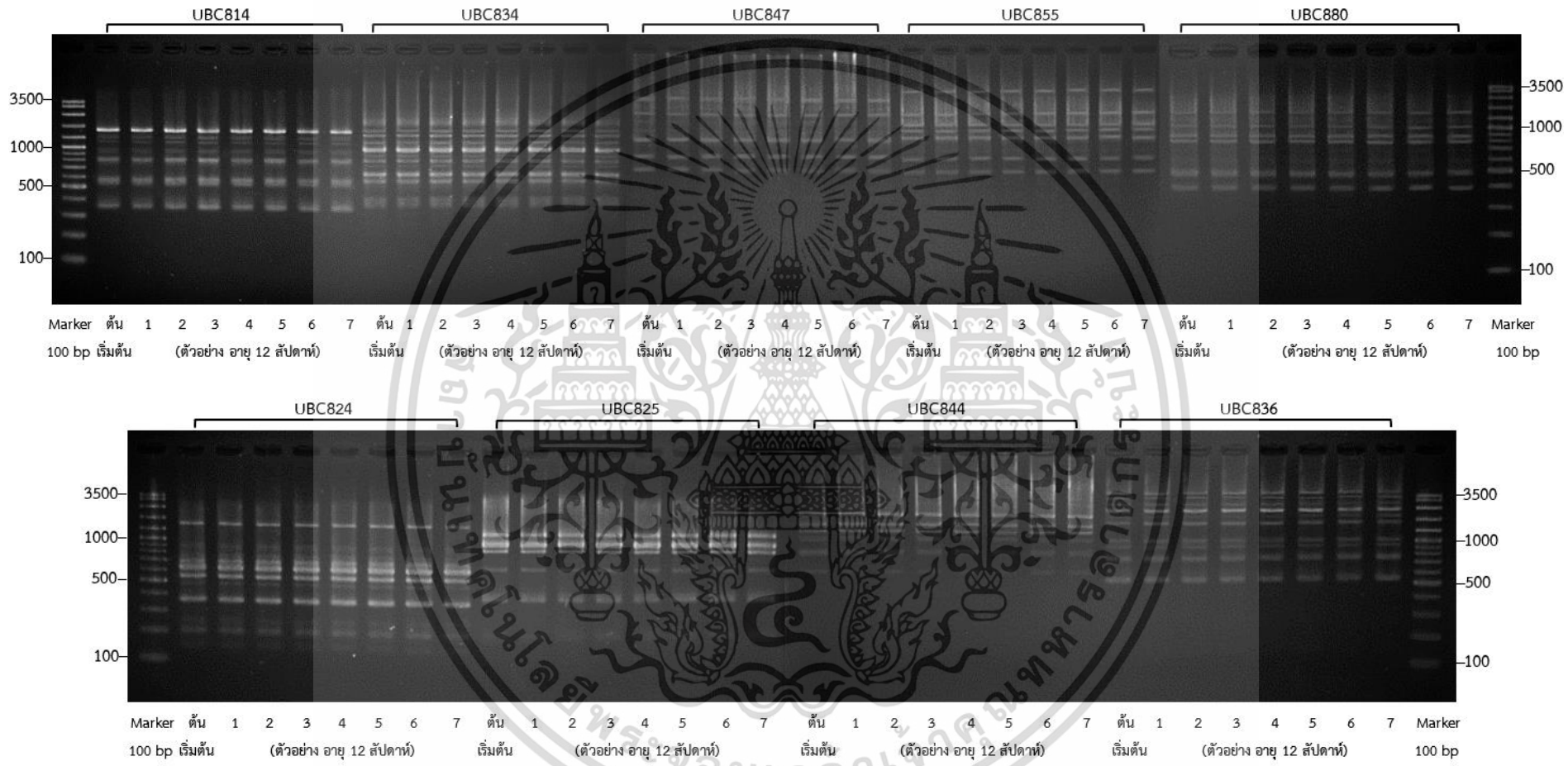
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.10 ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการทดสอบ โดยนำตัวอย่างไม้แดงต้นเริ่มต้น จำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างในสภาวะปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำการเกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ อายุ 12 สัปดาห์ โดยถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 7 ตัวอย่าง ผลการทดลอง ทั้ง 9 ไพรเมอร์ พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างเกิดขึ้นทั้งหมดในตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ ผลดังรูปที่ 4.11 และดังตารางที่ 4.9 โดยมีขนาดของแถบดีอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 200-3500 bp มีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 59 และมีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างเฉลี่ยเท่ากับ 6.56 มีร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างเท่ากับ 100 และไม่พบจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง และร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจึงเท่ากับ 0 (ดังตารางที่ 4.9) ซึ่งแสดงถึงตัวอย่างชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 12 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นเริ่มต้นของไม้แดงไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Agarwal. *et. al.* (2014) ได้รายงานไว้ว่า การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้น *Alhagi maurorum* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 6 ไพรเมอร์ และตัวอย่างพืชที่เพาะเลี้ยงจำนวน 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นเริ่มต้น จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยพบว่ามี 2 ไพรเมอร์ที่ตรงกับที่ทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ที่แสดงผลการทดสอบพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างกันทั้งหมด ได้แก่ UBC824 และ UBC844 ซึ่งพืชที่เพาะเลี้ยงผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงไม่มีความแปรผันทางทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับต้นเริ่มต้น เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Ahmad. *et al.* (2020) ได้รายงานไว้ว่า การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Pterocarpus marsupium* Roxb. ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 8 ไพรเมอร์ และตัวอย่างพืชที่เพาะเลี้ยงจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยพบว่ามี 1 ไพรเมอร์ที่ตรงกับที่ทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ที่แสดงผลการทดสอบพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างกันทั้งหมด ได้แก่ UBC880 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ahmad. *et al.* (2021) ได้รายงานไว้ว่า การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Pterocarpus marsupium* Roxb. ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จากการทดลองพบว่า มี 10 ไพรเมอร์ และตัวอย่างพืชที่เพาะเลี้ยงจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยพบว่ามี 6 ไพรเมอร์ที่ตรงกับที่ทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ที่แสดงผลการทดสอบพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างกันทั้งหมด ได้แก่ UBC814 UBC825 UBC834 UBC836 UBC847 และ UBC855 ซึ่งพืชที่เพาะเลี้ยงผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับต้นเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แถบดีเอ็นเอของไม้แดงต้นเริ่มต้น และในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 4 8 และ 12 สัปดาห์ อย่างละ 1 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 UBC880 UBC844 UBC836 UBC825 และUBC824 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp



รูปที่ 4.11 แถบดีเอ็นเอของไม้แดงต้นเริ่มต้น จำนวน 1 ตัวอย่าง และในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 UBC880 UBC824 UBC825 UBC844 และUBC836 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp

ตารางที่ 4.9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์สำหรับตัวอย่างพืชเริ่มต้นจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืชเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่าง	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง	ร้อยละแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่าง	ร้อยละแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง
UBC814	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTA-3'	350-1800	7	0	100	0
UBC824	5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3	550-3500	9	0	100	0
UBC825	5'-ACACACACACACACACT-3'	600-2100	6	0	100	0
UBC834	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	350-1800	8	0	100	0
UBC836	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3'	200-1750	6	0	100	0
UBC844	5'-CTCTCTCTCTCTCCTC-3'	375-1100	5	0	100	0
UBC847	5'-CACACACACACACACARC-3'	425-2000	5	0	100	0
UBC855	5'-ACACACACACACACACYT-3'	425-2500	7	0	100	0
UBC880	5'-GGAGAGGAGAGGAGA-3'	375-1750	6	0	100	0
รวม			59	0	100	0
เฉลี่ย			6.56			

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของไม้แดงพบว่าวิธีการที่ฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อต่างๆ ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สูงที่สุด และปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของไม้แดงในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อต่างๆ ร่วมกับเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดสีน้ำตาลไหม้ของชิ้นส่วนข้อสูงที่สุด และปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดไม้แดง พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด สำหรับการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดสำหรับชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ไม้แดง พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด สำหรับการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนของเมล็ด และชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ไม้แดงให้เกิดราก พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดราก และจำนวนรากสูงที่สุด สำหรับการศึกษาการปรับสภาพและออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อม โดยการใช้วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน และ เพอร์ไลท์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีความเหมาะสมสำหรับการออกปลูกต้นกล้าของไม้แดงสู่สภาวะแวดล้อม พบว่าต้นกล้าที่เกิดจากการชักนำชิ้นส่วนข้อของเมล็ด และชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่พันธุ์ มีร้อยละการรอดชีวิตสูงและต้นกล้าสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ สำหรับการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ทั้ง 9 ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp พบว่าตัวอย่างพืชเริ่มต้นของไม้แดงที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 12 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นเริ่มต้นของไม้แดง ไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด จะต้องควบคุมขนาดและลักษณะของชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ความอ่อนและความแก่ของข้อที่นำมาชักนำการเกิดยอดให้มีความเท่ากันมากขึ้น เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างต้นที่ทำการศึกษามีขนาดเล็ก ทำให้มีจำนวนข้อไม่มาก จึงจำเป็นที่จะนำมาศึกษาทั้งหมดโดยไม่ได้คัดเลือกลักษณะความอ่อนแก่ของข้อ

2. การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด ในกลุ่มไซโทไคนินชนิดอื่นๆ ให้มีความหลายหลายมากขึ้น เพื่อเปรียบเทียบผลลัพธ์ที่มีความชัดเจนมากขึ้น

3. การศึกษาการชักนำการเกิดราก อาจจะต้องศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินชนิดอื่นๆ เพื่อให้มีความหลายหลายมากขึ้น เพื่อเปรียบเทียบผลลัพธ์ที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

4. การศึกษาการปรับสภาพและออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อม อาจจะต้องเปรียบเทียบกับวัสดุปลูกที่มีความแตกต่างต่างกันมากยิ่งขึ้น เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างในการศึกษามีปริมาณน้อย จึงไม่สามารถศึกษาเพิ่มเติมได้ ซึ่งควรจะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบผลลัพธ์ที่ดียิ่งขึ้น

5. การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของไม้แดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ เป็นวิธีการที่เหมาะสม ซึ่งในอนาคตควรจะศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ที่หลากหลายกว่าการศึกษาครั้งนี้ และตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น รวมทั้งควรตรวจสอบในพืชที่เพาะเลี้ยงที่ระยะเวลานานกว่า 12 สัปดาห์ อาทิเช่น มากกว่า 6 ถึง 12เดือน เพื่อยืนยันความไม่แปรผันทางพันธุกรรมที่ดียิ่งขึ้น เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาในระยะเวลาไม่นาน ผลของความแปรผันของสารพันธุกรรมจึงมีโอกาสเกิดขึ้นต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2566. **การกำหนดราคาไม้สำหรับเงินอากรส่งออก**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.customs.go.th

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2556. **ต้นไม้แดง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : www.dnp.go.th

เกษตรตำบล. 2559. **ประโยชน์ของไม้แดง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.kasettambon.com

จงรักษ์ จารุเนตร และ นิพนธ์ วิสารทานนท์. **การฉีดพ่นสารป้องกันเชื้อรา**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://kukr.lib.ku.ac.th

จำนรรจ์ เพียรอนุรักษ์. 2559. **การเก็บและจัดการเมล็ดไม้**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.forest.go.th

ชาลี ลัทธิ วรพงษ์ ลีพรหมมา ชวิน เป้าอารีย์ และ สุรเดช สุทธาวาทิน. 2527. **งานไม้**. กรมอาชีวศึกษา.

ณัฏฐากร เสมสันทัด. 2552. **สารฟอกฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงพืช**. คู่มือการฝึกอบรมหลักสูตรการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ป่า. สำนักงานวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

ธนากร วงษศา อภินันท์ ลิ้มมงคล และ อนุพันธ์ กงบังเกิด. 2551. **การสกัดดีเอ็นเอวิธี CTAB**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.thaiscience.info

ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2555. **การหาตำแหน่งยีนและการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช**. เอกสารประกอบการสอนวิชา Molecular Biology in Crop Improvement. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญวงศ์ ไทยอุตส่าห์. 2554. **การจัดประเภทตามการอายุเจริญของไม้**. เอกสารประกอบการบรรยายวิชา 01311511: ภาพรวมทรัพยากรป่าไม้และสิ่งแวดล้อม: การจัดการสวนป่าเพื่อผลผลิตไม้ โครงการปริญญาโท สาขาวิชาการบริหารทรัพยากรป่าไม้ และสิ่งแวดล้อมภาคพิเศษคณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พชร สุภาพาส. 2565. “ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พนิดา รุ่งรัตนกุล. 2561. **ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://forprod.forest.go.th

พะยอม โคเบลลี่. 2558. **คาร์เบนดาซิม (CARBENDAZIM)**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.thaipan.org

พรพรต ลิ้มประเสริฐ. 2560. **บทนำจีโนมของมนุษย์**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://meded.psu.ac.th

เมดไทย. 2563. **สรรพคุณและประโยชน์ของต้นไม้แดง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://medthai.com

วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต. 2559. **พัฒนาการของยาปฏิชีวนะกลุ่มเซฟาโลสปอริน**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://pharmacy.hcu.ac.th

ศุภชัย นุชิต. 2564. “การจัดการเมล็ดพันธุ์ไม้ป่าเศรษฐกิจเพื่อผลิตกล้าไม้คุณภาพ.” ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการป่าไม้ สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง. 2561. **ไม้แดง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.forest.go.th

สมาคมธุรกิจรับสร้างบ้าน. 2566. **คุณสมบัติของไม้แดงสำหรับงานก่อสร้าง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://hba-th.org

สรรณ์ญา กระสังข์. 2563. **การเพาะเมล็ดไม้แดง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.blockdit.com

สุดารัตน์ หอมหวน. 2553. **ลักษณะของไม้แดง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://apps.phar.ubu.ac.th

สำนักเศรษฐกิจการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2563. **ต้นไม้แดง พันธุ์ไม้เศรษฐกิจต้นไม้ประจำจังหวัดตาก**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.forest.go.th

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. เทคโนโลยีชีวภาพพืช. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ : หจก. วี. เจ. พริ้นติ้ง

อรรถพล เจริญชันษา. 2561. **ไม้เศรษฐกิจ 58 ชนิด**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.dokbiaonline.com

อภิสรา ผลจัด. 2564. “อิทธิพลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเถา (*Arachis glabrata*).” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อารักษ์ ธีรอำพน และ มารินา เกตทัต-คาร์น. 2555. “ความแปรปรวนทางพันธุกรรมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแตงเทศและแตงไทย จากเทคนิค ISSR.” โครงการวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

Agarwal, T. Gupta, A. K. Patel, A. K. and Shekhawat, N. S. 2014. “Micropropagation and validation of genetic homogeneity of *Alhagi maurorum* using SCoT, ISSR and RAPD markers.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 120 : 313–323.

Ahmad, A. Anis, M. Khanam, M. N. and Alatar, A. A. 2020. “Direct shoot organogenesis from shoot tip explants of a highly medicinal valued tree *Pterocarpus marsupium* Roxb.” *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*. 56 : 670–681.

Ahmad, A. Ahmad, Anis, M. Alatar, A. A. Abdel-Salam, E. M. Qahtan, A. A. and Faisal, M. 2021.“Gibberellic acid and thidiazuron promote micropropagation of an endangered woody tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using *In Vitro* seedlings.” Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 144 : 449-462.

Ahmad, N. Khan, M. R. Shah, S. H. Zia, M. A. Hussain, I. Muhammad, A. and Ali, G. M. 2020. “An efficient and reproducible tissue culture procedure for callus Induction and multiple shoots regeneration in groundnut (*Arachis hypogaea* L.).” *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 30(6) : 1540-1547.

Anita, D. D. Sridhar, K. R. and Bhat, R. 2009. “Diversity of fungi associated with mangrove legume *Sesbania bispinosa* (Jacq.) W. Wight (Fabaceae).” *Livestock Research for Rural Development*. 21(5) : 1-15.

Bahar, F. G. Bayraktar, M. and Gurel, A. 2020. “Effect of different media, cytokinins and explant types on *In Vitro* propagation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivar ‘Kalender’.” *European Journal of Science and Technology*. 19 : 449-459.

Berhera, A. and Thirunavoukkarasu, M. 2006. “*In Vitro* micropropagation of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. through nodal explants.” *Indian Journal of Plant Physiology*. 11(1) : 83-88.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bertsouklis, K. Naksi, K. and Aretaki, P. E. 2023. "*In Vitro* germination and regeneration of *Senna artemisioides*, a valuable leguminous ornamental shrub." *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 51(1) : 12992.

Bianco, L. 2014. "Rhizobial infection in *Adesmia bicolor* (Fabaceae) roots." *Archives of Microbiology*. 196 : 675–679.

Boga, A. Ram, B. and Reddy, G. R. S. 2012. "Effect of benzyl amino purine and gibberellic acid on *In Vitro* shoot multiplication and elongation of *Dalbergia latifolia* Roxb.: an important multipurpose tree." *Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 2(1) : 597-602.

Bouzdoudi, B. E. Saidi, R. Ansari, Z. N. E. Kbiach, M. L. E. Martin, P. Badoc, A. and Lamarti, A. 2017. "Micropropagation of Carob (*Ceratonia silique* L.) through adventitious buds of Immature embryonic cotyledons." *American Journal of Plant Sciences*. 8 : 2180-2195.

Chitdacha, R. Boonma, P. Rotduang, P. and Ramasoot, S. 2018. "Propagation of *Moringa oleifera* Lam. by tissue culture technique." *Wichcha Journal*. 37(2).

Choudhary, K. Jakhar, M. L. Aparna. Kumar, R. and Jat, H. M. 2017. "*In Vitro* regeneration in callus culture of Gliricidia [*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.]." *International Journal of Pure and Applied Bioscience*. 5(5) : 40-47.

Chowdhury, K. H. Chowdhury, R. Hasan, M. Uddin, M. J. Hasan, Z. Nasrin, S. and Reza, A. S. M. A. 2021. *Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub. "Leaves ameliorates Inflammation and pain in experimental mice and computer-aided model." *Walailak Journal of Science and Technology*. 18(5) : 22197.

Danilova, S. A. and Dolgikh, Y. I. 2004. "The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture" *Russian Journal of Plant Physiology*. 51(4) : 559–562.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Daud, N. H. Jayaraman, S. and Mohamed, R. 2012. "An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture." *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 20(2) : 55-58.

Dodake, S. S. Jadhav, A. S. Pawar, S. V. and Magar, N. M. 2020. "Surface sterilization protocol for nodal and Inter node explants of Kankoda (*Momordica dioica* Roxb.)." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(12) : 2907-2915.

Fascella, G. 2009. "Long-term culture of cut Rose Plants in Perlite-based substrates." *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 3(1) : 111-116.

Fernan des, E. G. Valerio, H. M. Duarte, K. L. R. Capuchinho, L. M. N. and Fagundes, M. 2018. "Fungi associated with *Copaifera oblongifolia* (Fabaceae) seeds: occurrence and possible effects on seed germination." *Acta Botanica Brasilica*. 33(1) : 179-182.

Gamborg, O. L. Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells." *Experimental Cell Research*. 50(1) : 151-158

Gbadamosi, A. E. and Shaibu, B. 2013. "Influence of the phytohormones on the *In-Vitro* regeneration in *Senna alata* (Linn)." *Academia Journal of Biotechnology*. 1(3) : 041-045.

Gupta, S. Kachhwaha, S. Kothari, S. L. and Jain, R. 2020. "Synergistic effect of cytokinins and auxins enables mass clonal multiplication of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.): a wonder." *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 56 : 458-469.

Hakim, L. Islam, M. R. Mamun, A. N. K. Ahmed, G. and Khan, R. 2010. "Clonal propagation of Carob (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae)." *Bangladesh Journal of Botany*. 39(1) : 15-19.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hasancebi, S. Kara, N. T. Cakir, O. and Ari, S. 2010. “Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae).” *Turkish Journal of Botany*. 35 : 203-210.

Hernandez-Garcia, A. Ambriz-Parra, E. Lopez-Albarran, P. Leon, J. C. and Salgado-Garciglia, R. 2021. “*In Vitro* propagation from axillary buds of the endangered tree *Dalbergia congestiflora* Pittier (Fabaceae).” *Plant Biotechnology*. 38 : 409–414.

Indravathi, G. and Pullaiah, T. 2013. “*In Vitro* propagation studies of *Albizia amara* (Roxb.) Boiv.” *African Journal of Plant Science*. 7(1) : 1-8.

Ionela, R. Popescu, A. Hoza, D. Isac, V. and Oprea, M. I. 2022. “*In Vitro* rooting and acclimatization ex vitro of *Aronia melanocarpa* cv. 'Nero'.” *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 26(1) : 17-22.

Jaiswal, N. Verma, Y. and Misra, P. 2021. “High frequency *In Vitro* callogenesis and plant regeneration of *Glycyrrhiza glabra* L.” *Vegetos*. 34 : 495-504.

Jaiswal, S. Choudhary, M. Arya, S. and Kant, T. 2015. “Micropropagation of adult tree of *Pterocarpus marsupium* Roxb. using nodal explants.” *Journal of Plant Development*. 22 : 21-30.

Kanjanawattanawong, K. Singbumrung, N. Rianthong, T. and Wamaedeesat, R. 2019. “*ITS2* nucleotide sequence analysis and cleaned culture production of *Butea monosperma* var. lutea.” *Princess of Naradhiwas University Journal*. 12(1) : 173-184.

Kasthurirengan, S. Xie, L. Li, C. H. Fong, Y. K. and Hong, Y. 2013. “*In Vitro* propagation and assessment of genetic stability of micropropagated *Samanea saman* (rain tree) using microsatellite markers.” *Acta Physiologiae Plantarum*. 35 : 2467–2474.

Kumar, D. Sengar, R. S. Yadav, M. K. Pooranchand. Singh, G. and Gupta, S. 2019. “Evaluation of sterilant effect on *In-Vitro* culture establishment in sugarcane variety co 0118.” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 8(7) : 1226-1233.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kuria, M. W. Ngumi, V. W. Machua, J. M. Odee, D. W. and Njenga, P. K. 2012. "Regeneration of the East African greenheart, *Warburgia ugandensis* (Sprague) through tissue culture." *African Journal of Biotechnology*. 11(26) : 6832-6838.

Lloyd, G. and McCown, B. 1980. "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture."*The International Plant Propagators Society*. 30(5) : 421-427.

Marod, D. Sangwanit, U. Danrad, N. and Panuthai, S. 2017. "Leaf litter decomposition rates in the mixed deciduous forest at maeklong watershed research station, Kanchanaburi province." *Journal of Tropical Forest Research*. 1(2) : 21-32.

Minipara, D. Dhaduk, H. Patil, G. Narayanan, S. and Kumar, S. 2019. "Identification of best surface sterilization treatment and control of endophytic bacterial contamination in *Annona squamosa* L." *International Journal of Plant and Soil Science*. 29(6) : 1-10.

Mishra, A. K. Singh, J. and Tiwari, K. N. 2019. "*In Vitro* regeneration of *clitoria ternatea* (L.) from nodal explant." *International Journal on Emerging Technologies*. 10(1) : 35-41.

Mo, X.C. and Wangsomnuk, P.P. 2021. "A modified non-liquid nitrogen protocol for extraction of high-quality genomic DNA from the inner bark tissues of *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae)." *Genetics and Molecular Research*. 20 (2).

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Plant Physiology*. 15 : 473-497.

Neliyati, N. Lizawati, L. and Zulkarnain, Z. 2019. "The evaluation of sterilization protocol for sprout explants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture." *Journal of Physics*. 1402(3).

Nunez, J. E. Quiala, E. Feria, M. Mestanza, S. and Teanga, S. 2017. "*In Vitro* propagation of *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz from axillary buds of selected trees." *Biotecnologia Vegetal*. 17(2) : 67-75.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Okoroafor, U. E. 2022. “Microbial contamination in plant tissue culture and elimination strategies.” *Nigeria Agricultural Journal*. 53(2) : 348-355.

Oliveira, L. C. Rodrigues, D. C. and Hopkins M. J. G. 2017. “The effects of leaf age on the quality of DNA extracted from *Parkia* R.Br. (Fabaceae) occurring in the Central Amazon.” *Scientia Amazonia*. 6(2) : 22-28.

Padmanabhan, P. Shukla, M. R. Sullivan, J. A. and Saxena, P. K. 2017. “Iron supplementation promotes *In Vitro* shoot induction and multiplication of *Baptisia australis*.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 129 : 145-152.

Parveen, S. and Shahzad, A. 2010. “TDZ–induced high frequency shoot regeneration in *Cassia sophera* Linn. via cotyledonary node explants.” Physiology and Molecular Biology of Plants. 16(2) : 201-206.

Parveen, S. and Shahzad, A. 2014. “Factors affecting *In Vitro* plant regeneration from cotyledonary node explant of *Senna sophera* (L.) Roxb.- A highly medicinal legume.” *African Journal of Biotechnology*. 13(3) : 413-422.

Parveen, S. Shahzad, A. and Saema, S. 2010 “*In Vitro* plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam.,a leguminous tree of economic importance.” *Agroforest System*. 80 : 109-116.

Pavese, V. Ruffa, P. Abba, S. Costa, R. L. Corredoira, E. Marinoni, D. T. and Botta, R. 2022. “An *In Vitro* protocol for propagating *Castanea sativa* Italian cultivars.” *MDPI Journal*. 11.

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.

Phong, D.T. Hien, V.T.T. Thanh, T. T. V. and Tang, D.V. 2011. “Comparison of RAPD and ISSR markers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) genotypes in Vietnam.” *Genetics and Molecular Research*. 10 (4) : 2382-2393

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Plant Tissue Culture Supplies by SAC SCI-ENG. 2016. PPM™ (Plant Preservative Mixture). [Online]. Available : https://www.plantcelltechnology.com

Prakash, E. Rao, P. S. S. V. K. T. J. V. S. and Meru, E. S. 2006. "Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants." *Journal of The Japanese Forest Society*. 11 : 329-335.

Rajabudeen, E. Ganthi, A. S. Sivasubramanian, S. and Subramanian, M. P. S. 2014. "*In Vitro* regeneration of *Indigofera viscosa* Lam." *Journal of Bio-Science*. 22 : 53-58.

Ramirez, I. Dorta, F. Cuadros-Inostroza, A. and Pena-Cortes, H. 2012. "Callus induction and plant regeneration of *Ulex europaeus*." *Electronic Journal of Biotechnology*. 15(4).

Ramli, S. Bunrathep, S. Tansaringkarn, T. and Ruangrungs, N. 2008. "Screening for free radical scavenging activity from ethanolic extract of *Mimosaceous* plants endemic to Thailand." *Journal of Health Research*. 22(2) : 55-59.

Reddy, G. S. and Saritha, K. V. 2023. "Effect of modified MS medium on *In Vitro* propagation of *Indigofera barberi* gamble an endemic hepatoprotective, recalcitrant medicinal plant of Seshachalam biosphere reserve." *Vegetos*.

Reichel, R. C. and Boonyaputthipong, C. 2021. "Nature integrated architectural design: construction of a Habitabletree house in Khon Kaen." *International Journal of Building, Urban, Interior and Landscape Technology*. 17.

Saidi, R. Rahmouni, S. Ansari, Z. N. E. Maouni, A. Badoc, A. and Lamarti, A. 2019. "Effect of cytokinins on the micropropagation of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) through Shoot tip culture." *American Journal of Plant Sciences*. 10 : 1469-1481.

Shaheen, A. Ali, M. Ahmad, N. Dewir, Y. H. El-Hendawy, S. and Gawad, A. M. A. 2020. "Micropropagation of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) by using intermediate nodal explants." *Chilean Journal of Agricultural Research*. 80(3) : 326-333.

Sharma, U. Kataria, V. and Shekhawat. N. S. 2017. "*In Vitro* propagation, ex vitro rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam. a leguminous tree with medicinal values." *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 23 : 969-977.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Srinivas, K. and Sundarapandian, S. 2018. “Biomass and carbon stocks of trees in tropical dry forest of East Godavari region, Andhra Pradesh, India.” *Geology, Ecology, and Landscapes*. 3(2) : 114–122.

Uddin, M. S. Nasirujjaman, K. Zaman, S. and Reza, M. A. 2005. “Regeneration of multiple shoots from different explants viz. shoot tip, nodal segment and cotyledonary node of *In Vitro* grown seedlings of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne.” *Biotechnology*. 4(1) : 35-38.

Vats, S. and Kamal, R. 2014. “Flavonoids and antioxidant activity of different plant parts and callus culture of *Cassia occidentalis* L.” *Current Bioactive Compounds*. 10(3) : 201-206

Yahya, R. T. 2020. “Morphological and physiological response of *Lupinus albus* plants tissues for treatment to zinc oxide nanoparticle.” *Plant Archives*. 20(1) : 3465-3468.

Yahya, M. F. Hassan, N. H. Abdullah, N. and Wahid, M. S. A. 2020. “Direct shoot regeneration of *Tectona grandis* (Teak) for production of planting material.” *International Journal of Agriculture, Forestry and Plantation*. 10 : 398-403.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1.1 การเตรียม 10% CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 10% CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร CTAB ปริมาณ 10 กรัม ละลายด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน และนำไปว่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 การเตรียม 2X CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 2X CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียม Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 8.0 NaCl 5 โมลาร์ และสารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) ละลายในน้ำ จากนั้นผสมสาร CTAB ปริมาตร 2 กรัม Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 กรัม ละลายด้วย Tris-Base 1 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลาย NaCl 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA 0.5โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.3 การเตรียมสารละลาย Tris-EDTA (TE) buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

เตรียมสารละลาย TE buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยการผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 การเตรียมสารละลาย 10X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer

เตรียมสารละลาย 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร Tris-base ปริมาณ 108 กรัม Boric acid ปริมาณ 61.83 กรัม และ EDTA ปริมาณ 9.305 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.5 การเตรียมสารละลาย dNTPs ปริมาตร 100 ไมโครลิตรการเตรียมสารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยผสมสารละลาย GATP, ACTP, GTP และ dITP ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารปริมาตรละ 1.25 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่นปราศจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอออน ปริมาตร 95 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1.อาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and skoog, 1962)

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แสดงดัง ตารางที่ 5.1

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_20$	440
$MgSO_4.7H_20$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_20$	22.3
$ZnSO_4.5H_20$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_20$	0.25
$CuSO_4.5H_20$	0.025
$CoCl_2.H_20$	0.025
$FeSO_4.7H_20$	27.85
$Na_2EDTA.2H_20$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

1. ชั่งอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์สูตร MS ปริมาณ 4.43 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร นำมาละลายในน้ำกลั่น
2. ใส่สารคบคุมการเจริญเติบโตตามความเข้มข้นที่ต้องการ คำนวณได้จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$
3. ปรับปริมาตรของอาหารด้วยน้ำกลั่น
4. ปรับค่า pH ของอาหารให้เท่ากับ 5.8
5. ใส่ผงวุ้น Crytal Agar Gel 0.8 กรัมต่อลิตร
6. ให้ความร้อนแก่อาหารเพื่อให้ผงวุ้นละลาย
7. บรรจุอาหารใส่ขวดแก้ว หรือ หลอดทดลอง ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร
8. นึ่งฆ่าเชื้อความดันสูงอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
9. นำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื่อไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลียงนาน 2-3 วัน เพื่อสังเกตการปนเปื้อนในอาหารก่อนการนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวศศิวิมล ปั้นอุดม
วัน เดือน ปีเกิด	วันพฤหัสบดี ที่ 25 เดือนกันยายน พ.ศ. 2540
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 36/2 หมู่ที่ 8 ซอยวัดปากบ่อ ตำบลบางกระเจ้า อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร 74000
ประวัติการศึกษา	(2563) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.25 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2567) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดย สำนักบริหารงานวิจัยและนวัตกรรมพระจอมเกล้าลาดกระบัง (KMITL Research and Innovation Services (KRIS)) (สัญญาเลขที่ KREF016312) สำหรับหลักสูตรปริญญาโท ตลอดระยะเวลา 2 ปี
งานประชุมทางวิชาการ	นำเสนอผลงานวิจัย (Oral presentation) ในหัวข้อ “Micropropagation of Ironwood (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) by tissue culture.” งานประชุมวิชาการ The 11th International Conference on the Integration of Science and Technology for Sustainable Development 2024 (11th ICIST 2024) ณ เมือง Chennai ประเทศ India ระหว่างวันที่1-3 กุมภาพันธ์ 2567

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รางวัลที่ได้รับ	รางวัลการนำเสนอผลงานวิจัย (First prize in oral presentation) ในหัวข้อ “Micropropagation of Ironwood (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) by tissue culture.” งานประชุมวิชาการ The 11th International Conference on the Integration of Science and Technology for Sustainable Development 2024 (11th ICIST 2024) ณ เมือง Chennai ประเทศ India ระหว่างวันที่1-3 กุมภาพันธ์ 2567

ผลงานทางวิชาการ

Panudom, S. Pongtongkam, P. Chareonsap, P. P. Poeaim, A. and Poeaim, S. 2024. “Micropropagation of Ironwood (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) by tissue culture.” *International Journal of Agricultural Technology*. 20(2) : 679-696.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้