การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของต้นชิงชัน ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

STUDY ON OPTIMIZATION FOR *IN VITRO* PROPAGATION OF *Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain BY PLANT TISSUE CULTURE

สิริวรรณ นนทศิลา

SIRIWAN NONTHASILA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2567
KMITL-2024-SC-M-020-036

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON OPTIMIZATION FOR *IN VITRO* PROPAGATION OF *Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain BY PLANT TISSUE CULTURE

SIRIWAN NONTHASILA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2024

KMITL-2024-SC-M-020-036

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	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของต้นชิงชัน ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสิริวรรณ นนทศิลา
รหัสนักศึกษา	63605050
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชได้แก่ เมล็ด และข้อ การชักนำให้เกิดยอดจากเมล็ด การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด และชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติ การชักนำให้เกิดราก การนำต้นอ่อนออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก และการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมจากต้นชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้อชนิดอื่นๆ พบว่าชิ้นส่วนเมล็ดมีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 100 และการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (NaClO) ความเข้มข้นร้อยละ 15 ร่วมกับสารฟอกฆ่าเชื้อชนิดอื่นๆ พบว่า ชิ้นส่วนข้อมีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 100 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และ WPM (Woody Plant Medium, 1981) ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS มีร้อยละการงอกของเมล็ดสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 100 เพาะเลี้ยงต่อไปให้ครบ 4 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมเพื่อให้ต้นอ่อนมีลักษณะที่สมบูรณ์แข็งแรง แล้วจึงทำการตัดเอาเฉพาะชิ้นส่วนข้อมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP *m*T และ GA_3 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดลักษณะยอดที่เหมาะสมต่อการนำยอดที่ได้ไปชักนำให้เกิดรากต่อไป โดยมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 26.16 มิลลิเมตร การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP *m*T และ GA_3 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดลักษณะยอดที่เหมาะสมต่อการนำยอดที่ได้ไปชักนำให้เกิดรากต่อไป โดยมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 27.26 มิลลิเมตร จากนั้นนำยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด และยอดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA และ IBA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า IAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากมากที่สุด (ร้อยละ 90 และ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ) และมีความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 31.13 และ 38.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยนำลักษณะต้นอ่อนที่สมบูรณ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปรับสภาพและออกปลูกในวัสดุปลูกที่เหมาะสมที่สุดคือ การใช้พีทมอสร่วมกับเพอร์ไลท์ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ตัวอย่างมีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 80 สำหรับตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat, ISSR) ระหว่างต้นเริ่มต้น และต้นชิงชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 9 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน ไม่คลุมเครือ และไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 9 ไพรเมอร์ พบว่ามีขนาดของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 200 ถึง 2600 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกตัวอย่าง (monomorphic band) เป็นจำนวน 75 แถบ ค่าเฉลี่ยของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเท่ากับ 8.33 แถบ และค่าร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเท่ากับ 100

คำสำคัญ : เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ความแปรผันทางพันธุกรรม ต้นชิงชัน ตระกลูถั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Study on Optimization for *In Vitro* Propagation of *Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain by Plant Tissue Culture
Student Name	Miss Siriwan Nonthasila
Student ID	63605050
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2024
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

Study on the optimal conditions for sterilization of plant parts including seeds and nodes, induction of shoots from seeds, induction of shoots from node segments from seeds and node segments from naturally growing plants, induction of roots, transplantation of plantlets to external environmental conditions, and examination of genetic variation in *Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain. Sterilization of seed parts with 0.2% mercuric chloride ($HgCl_2$) combined with other disinfectants resulted in a 100% survival rate for the seed parts. Similarly, sterilizing node segments with 15% sodium hypochlorite (NaClO) combined with other disinfectants resulted in a 100% survival rate for the node segments. Induction of shoots from seed segments cultured on different concentrations of MS (Murashige and Skoog, 1962) and WPM (Woody Plant Medium, 1981) media showed that the ½ MS medium resulted in the highest seed germination rate of 100%. The seedlings were further cultured in the same medium for 4 weeks to develop healthy seedlings. Subsequently, only the node segments were excised and cultured on MS medium containing varying BAP *m*T and GA_3 concentrations. It was found that BAP at a concentration of 1 mg/L induced the optimal shoot characteristics for further root induction, with an average shoot length of 26.16 mm.

The induction of shoots from nodal explants was achieved by cultured on MS media containing BAP *m*T and GA_3 at 1 2 3 4 and 5 mg/L concentrations. After 8 weeks of cultivation, it was found that shoots developed using BAP at a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

concentration of 3 mg/L. The shoots that developed using BAP had a healthy appearance, straight stems, and well-spread leaves. The percentage of shoot formation was 100%, and the average shoot length was 27.26 mm. In the study of shoot induction from nodes originating from seeds and nodes from natural sources, both shoots were cultured on ¼ MS medium containing IAA at 0.75 mg/L. It was observed that shoots from both plant samples exhibited good growth in the same direction. The highest percentages of root formation were 90 and 80, respectively, with maximum average root lengths of 31.13 mm and 38.03 mm. Subsequently, the rosewood seedlings were transplanted into the natural environment using two types of materials: peat moss and perlite. The highest survival percentage observed was 80.

The genetic variation of rosewood plants was examined using ISSR molecular markers with 9 primers. It was observed that the DNA bands could be clearly and unambiguously separated, and no polymorphisms were detected. By amplifying the DNA with these 9 primers, the size of DNA fragments ranged from 200 to 2600 bp, resulting in 75 DNA bands that were consistent across all samples (monomorphic bands). The mean number of identical DNA bands was 8.33 , and the percentage of monomorphic bands was 100%.

Keywords: *Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain, Fabaceae, Genetic variation, ISSR, Plant tissue culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของต้นชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช” ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณา และความช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และสนับสนุนในทุกๆด้าน รวมทั้งรับให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาในยามที่เจอปัญหาขณะทำวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการแก้ไขข้อบกพร้องต่างๆ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม ทั้งให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาในยามที่เจอปัญหาขณะทำการทดลอง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และคณะครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้มอบความรู้ให้แก่ข้าพระเจ้า และบุคลากร เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยา ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการจัดทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ บิดา มารดา และครอบครัวอันเป็นที่รักและเคารพ ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาโดยตลอด และขอบคุณนายนรวิชญ์ ฐิติเจริญรักษ์ และนายณัฐวรรธน์ จิโรชน์ธิกุล ที่เป็นผู้ให้พลังแรงใจในยามที่รู้สึกท้อแท้ และเหนื่อยล้าทั้งสองท่านให้กำลังใจที่ดีเสมอมา ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ไม่มากก็น้อยต่อทุกท่านที่สนใจ หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งที่ขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

นางสาวสิริวรรณ นนทศิลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัยของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ข้อมูลทั่วไปของต้นชิงชัน	3
2.1.1 อนุกรมวิธานของชิงชัน	3
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นชิงชัน	3
2.1.3 การปลูก และการดูแลรักษา	4
2.1.4 ประโยชน์ของชิงชัน	5
2.2 กฎหมายว่าด้วยการป่าไม้ของต้นชิงชัน	6
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.3.1 ขั้นตอนหลักในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	7
2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	8
2.3.3 การเตรียมชิ้นส่วนพืช การฟอกฆ่าเชื้อ และการผ่าตัดเนื้อเยื่อ	10
2.3.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	10
2.4 การสกัดดีเอ็นเอจากพืช	11
2.5 เครื่องหมายโมเลกุล	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 16
2.6.1 การฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืช..... 16
2.6.2 การชักนำให้เกิดยอด และการเจริญเป็นต้นใหม่..... 16
2.6.3 การชักนำให้เกิดราก..... 17
2.6.4 การออกปลูกต้นกล้าสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก..... 18
2.6.5 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม..... 19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 20
3.1 ชิ้นส่วนพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง..... 20
3.2 สารเคมี..... 20
3.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 20
3.2.2 สารใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อพืช..... 20
3.2.3 สารใช้ในการสกัดดีเอ็นเอพืชและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ..... 21
3.3 อุปกรณ์..... 21
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 23
3.4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน.. 23
3.4.1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด..... 23
3.4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ..... 24
3.4.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอก และการเจริญของชิ้นส่วนเมล็ด..... 26
3.4.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่เหมาะสมในการชักนำยอด..... 26
3.4.3.1 ชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด..... 26
3.4.3.2 ชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติ..... 27
3.4.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก..... 28
3.4.5 การปรับสภาพต้นอ่อนชิงชันออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก..... 28
3.4.6 การศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม..... 29
3.4.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ..... 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.6.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	30
3.4.6.3 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเทคนิคไอเอสเอสอาร์(inter-simple sequence repeat : ISSR)	31
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	34
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน	34
4.1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด	34
4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ	35
4.2 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญของชิ้นส่วนเมล็ด	36
4.3 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์	38
4.3.1 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด	38
4.3.2 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ	41
4.4 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากอย่างสมบูรณ์	47
4.5 ผลการศึกษาการออกปลูกต้นอ่อนชิงชันสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก	53
4.6 ผลการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	59
5.1 สรุปผลการวิจัย	59
5.2 ข้อเสนอแนะ	60
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	65
ภาคผนวก ก	66
ภาคผนวก ข	68
ประวัติผู้เขียน	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงรหัสตัวอย่าง และแหล่งที่มาของใบอ่อนชิงชัน ที่นำมาวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์.....	31
3.2	แสดงชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์.....	32
3.3	แสดงองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์สำหรับ 1 ตัวอย่าง.....	32
3.4	แสดงสภาวะในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 และ UBC844.....	33
3.5	แสดงสภาวะในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC814 UBC834 UBC8 UBC855 และ UBC880.....	33
4.1	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	34
4.2	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	35
4.3	ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเมล็ด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS และ WPM ที่มีปริมาณแตกต่างกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	37
4.4	ผลการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	39
4.5	ผลการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์..	43
4.6	ผลการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.7	แสดงผลร้อยละการเกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	49
4.8	ผลการชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	50
4.9	แสดงผลร้อยละการเกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	51
4.10	ผลการชักนำให้เกิดรากจากยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการ เจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	52
4.11	แสดงผลร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนหลังจากย้ายออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกหลอดทดลองของต้นชิงชัน หลังจากออกปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.	53
4.12	แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับตรวจสอบตัวอย่างพืชเริ่มต้นจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืชเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100.....	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นชิงชัน (ก) ต้นชิงชัน (ข) ใบของต้นชิงชัน (ค) ผลของต้นชิงชัน (ง) เมล็ดของต้นชิงชัน (จ) ดอกของต้นชิงชัน	4
2.2	การแสดงแผนภาพของเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์.....	14
2.3	ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	15
4.1	แสดงลักษณะชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชันจากการฟอกฆ่าเชื้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก) ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (ข) ปนเปื้อนเชื้อรา และ (ค) ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์.....	36
4.2	แสดงลักษณะการชักนำให้เกิดต้นอ่อนชิ้นส่วนเมล็ดของต้นชิงชัน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ WPM ที่มีชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์สูตรที่แตกต่างกัน(ก) อาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ข) อาหารสังเคราะห์สูตร ½ WPM เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ค) ลักษณะต้นอ่อนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS นำไปใช้ในการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อที่เกิดจากเมล็ด เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	37
4.3	กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	40
4.4	กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	40
4.5	แสดงการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชัน การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ (ก-จ) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ช) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย GA_3 ความ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ช) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.6	กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	44
4.7	การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) mT ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) GA3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
4.8	กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP mT และ GA3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์	46
4.9	การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ก) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) *m*T ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	46
4.10	กราฟเปรียบเทียบความยาวรากเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	49
4.11	การชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) อาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) อาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.12	กราฟเปรียบเทียบความยาวรากเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	51
4.13	การชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) อาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) อาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	52
4.14	ลักษณะของต้นกล้าชิงชันที่ออกปลูกสู่สภาวะธรรมชาติด้วยวัสดุปลูกชนิดพีทมอสผสมกับเพอร์ไลท์ (ก) 2 สัปดาห์ และ (ข) 4 สัปดาห์.....	54
4.15	แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชิงชันตัวอย่างต้นเริ่มต้น และตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่เวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 UBC844 UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 และ UBC880 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp.....	56
4.16	แสดงแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชเริ่มต้นชิงชันจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืชเริ่มต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 UBC844 UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 และ UBC880 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp.....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
BAP	6-Benzylaminopurine
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
GA_3	Gibberellic acid
$HgCl_2$	เมอร์คิวริกคลอไรด์
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indolebutyric acid
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
NaOCl	สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์
MS	อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)
*m*T	*Meta*-topolin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPM	Plant Preservative Mixture
TBE buffer	Tris-Borate-EDTA buffer
TE buffer	Tris- EDTA buffer
WPM	อาหารสังเคราะห์สูตร Woody Plant Medium (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ต้นชิงชันเป็นพืชที่กำเนิดในประเทศไทย กัมพูชา เวียดนาม พม่า และลาว ถูกระบุชนิดพันธุ์ไว้ในต้นไม้ประเภท "ใกล้สูญพันธุ์" ระบุอยู่ใน Vietnam Red Data Book (2007) และ IUCN Red list (1998) มีรายชื่ออยู่ใน CITES ภาคผนวก II ว่าด้วยการจัดการพันธุ์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ มีค่า และหายาก ซึ่งได้รับการคุ้มครองตามกฎหมายภายในประเทศและขอความร่วมมือประเทศภาคีสมาชิกให้ช่วยดูแลการนำเข้า โดยจะต้องมีหนังสือรับรองการส่งออกจากประเทศถิ่นกำเนิดให้ถูกต้องชัดเจนเท่านั้น ไม่ติดข้อกฎหมายควบคุมการตัดสามารถนำเข้าปลูกและตัดส่งออกได้ ปัจจุบันไม้ชิงชันถูกนำมาใช้ทางการค้าในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อย่างแพร่หลาย เพราะเป็นพันธุ์ไม้ที่มีคุณค่าอย่างมากและหนึ่งในพันธุ์ไม้ที่มีราคาแพงที่สุดในโลก มีลวดลายที่สวยงาม มีความแวววาวและกลิ่นหอม เนื้อไม้ละเอียดเหนียว มีความแข็งแรงทนทานและชักเงาได้ดี มีน้ำมันในตัว นิยมนำมาใช้ในการทำเครื่องเรือน เครื่องใช้ ทำสิ่งประดิษฐ์ งานแกะสลัก และมีความเชื่อว่าเป็นไม้มงคล (Winfield. *et al.* 2016) ทำให้ไม้ชิงชันประสบปัญหากับจำนวนประชากรที่ลดลงอย่างมาก ทางสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อม (Environmental Protection Agency -EPA) หรือ "อีพีเอ" ในปี 2016 จึงระบุว่า "ในเชิงพาณิชย์ไม้ชิงชันใกล้สูญพันธุ์" (EIA. 2016) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการแพทย์แผนไทยเพื่อรักษาแผลเรื้อรัง สารสกัดหยาบของต้นชิงชันมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น ผลต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ เป็นต้น (Deesamer. *et al.* 2007)

การขยายพันธุ์ต้นชิงชันในธรรมชาตินั้นส่วนใหญ่ขยายพันธุ์โดยเมล็ด แต่การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดอาจทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากต้นพ่อแม่ คุณภาพของเมล็ดและช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวได้มีการคลาดเคลื่อนไปจากฤดูกาล จึงทำให้เมล็ดมีลักษณะฝ่อและลีบ ไม่เหมาะต่อการนำมาขยายพันธุ์ ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงเล็งเห็นว่าการนำชิ้นส่วนข้อของพืชนอกเหนือจากเมล็ดมาทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะทำให้ประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงและทำให้ได้พืชจำนวนมากในเวลาอันสั้น นอกจากนี้ผู้ทำการทดลองได้มีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นชิงชัน ทั้งในด้านสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช ชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมของต้นชิงชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน
2. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน
3. เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชัน
4. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมของต้นชิงชัน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ผู้ทดลองได้เริ่มจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชบริเวณผิวตัวอย่างโดยที่ส่งผลกระทบหรือสร้างความเสียหายให้แก่พืชตัวอย่างน้อยที่สุดและในการทดลองครั้งนี้ผู้ทำการทดลองได้ใช้ตัวอย่างจากเมล็ดและข้อที่มีตาข้าง ทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากเมล็ด การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ และการชักนำให้เกิดราก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ จนกระทั่งถึงการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมของต้นชิงชัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน
2. ทราบชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน
3. สามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้าชิงชันได้มากขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
4. ได้ต้นกล้าชิงชันที่สมบูรณ์แข็งแรงเหมาะสมต่อการนำพืชออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมให้เกิดการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นต่อไป
5. ได้ต้นกล้าชิงชันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ไม่เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของต้นชิงชัน

2.1.1 อนุกรมวิธานของชิงชัน (Barstow. *et al*. 2022)

ต้นชิงชันมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain. ชื่อสามัญ Blackwood, Rosewood, Tamalin

Kingdom : Plantae

Phylum : Tracheophytes

Class : Magnoliopsida

Order : Fabales

Family : Fabaceae

Genus : *Dalbergia*

Species : *Dalbergia oliveri*

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นชิงชัน

ต้นชิงชันนี้เป็นต้นไม้ประจำจังหวัดหนองคายอีกด้วย ซึ่งต้นชิงชันนี้จะทำการขยายพันธุ์โดยเมล็ด เป็นไม้กลางแจ้ง ส่วนใหญ่อยู่ในป่าดิบแล้ง หรือป่าเบญจพรรณทั่วไป โดยสามารถเจริญเติบโตได้ดีกับดินทุกชนิดในทุกภาคของประเทศไทย, ลาว และพม่า ยกเว้นในภาคใต้ของไทยเท่านั้นที่ไม่สามารถกระจายพันธุ์ของชิงชันได้ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าต้นชิงชันมักจะเจริญอยู่ร่วมกับไม้ไผ่และไม้สักหรือในป่าเต็งรังด้วย

ต้นชิงชันเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 15–25 เมตร และมีเปลือกสีน้ำตาลอมเทา โดยมักจะมีกะเทาะล่อนเป็นแว่นหรือเป็นแผ่นขนาดเล็ก ดังรูปที่ 2.1 (ก) ใบชิงชันมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ โดยมีใบประกอบย่อยอยู่ 11-17 ใบ ก้านใบยาว 3-5 เซนติเมตร ใบมีลักษณะยาวรี รูปขอบขนานแกมรูปหอก ดังรูปที่ 2.1 (ข) ดอกชิงชันมีลักษณะเป็นดอกแบบช่อ (inflorescence) ที่มักจะเรียงรายกันในรูปแบบของช่อดอกไม้แบบที่มีก้านดอกเล็กๆ แยกจากก้านใหญ่ (raceme) ดอกมีขนาดเล็กสีขาวอมม่วง มักจะมีช่วงเดือนที่ออกดอกอยู่ในช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม ดังรูปที่ 2.1 (จ) ผลเป็นฝักแบน แผ่เป็นปีกยาว ลักษณะเป็นรูปรีหรือรูปขอบขนาน มีความกว้างประมาณ 3-3.5 เซนติเมตร และความยาวประมาณ 8-17 เซนติเมตร ดังรูปที่ 2.1 (ค) ส่วนมากในแต่ละฝักจะมีเมล็ดเพียงเมล็ดเดียว ซึ่งเมล็ดจะมีลักษณะคล้ายกับรูปไต จะมีสีน้ำตาล ฝักโดยส่วนใหญ่จะออกในช่วงของเดือนพฤษภาคมไปจนถึงกันยายน ดังรูปที่ 2.1 (ง) (กาญจนา, 2563) ระบบนิเวศของต้นชิงชันพบได้ในป่าหลากหลายประเภททั้งป่าปฐมภูมิและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป่าทุติยภูมิ ป่าดิบ ป่ากึ่งป่าดิบ และป่ากึ่งผลัดใบ และส่วนใหญ่มักพบตามลำธาร ในพื้นที่ที่มีความสูงใกล้กับระดับน้ำทะเล จนถึง 500 เมตร ต้นชิงชันเป็นไม้เฉพาะพื้นที่ และชอบดินที่อุดมสมบูรณ์ (Barstow. M. *et.al.* 2022)

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นชิงชัน (ก) ต้นชิงชัน (ข) ใบของต้นชิงชัน (ค) ผลของต้นชิงชัน (ง) เมล็ดของต้นชิงชัน (จ) ดอกของต้นชิงชัน (อ้างอิงรูป : https://www.nparks.gov.sg, https://rptree.royalparkrajapruek.org https://uforest.org, https://natureloveyou.sg, https://www.nparks.gov.sg และ https://uforest.org)

2.1.3 การปลูก และการดูแลรักษา

ต้นชิงชัน ไม้ชนิดนี้ไม่ควรเพาะชำกลางแจ้ง เนื่องจากเป็นไม้ที่ต้องการร่มเงาในช่วงแรกของการเจริญเติบโต ในช่วงแรกหลังจากการย้ายชำควรรดน้ำเช้าและเย็น และมีการรดน้ำเสริมในวันที่มีอากาศร้อนจัด หลังจากกล้าไม้ตั้งตัวได้จึงลดปริมาณการให้น้ำลง กล้าไม้ชิงชันจะโตถึงขนาดที่สามารถย้ายปลูกได้ เมื่ออายุ 6 เดือน โดยจะมีความสูงประมาณ 30-40 เซนติเมตร หากพื้นที่ที่จะนำไปปลูกแล้งจัด ก็ควรจะทำการเก็บกล้าไม้ไว้ปลูกในฤดูฝนต่อไป นอกจากนี้ยังนิยมเพาะด้วยเมล็ด โดยการนำเมล็ดไปแช่ในน้ำร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส จากนั้นทิ้งไว้ให้น้ำเย็น โดยแช่ไว้เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ให้สังเกตดูว่าเมล็ดจะงอกออกมาภายในเวลา 10-12 วัน จากนั้นนำไปปลูกที่ดินที่เราต้องการ ซึ่งจะต้องพรวนดินเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่ดิน และใส่ปุ๋ยในปริมาณที่เหมาะสม ก่อนจะนำเมล็ดไปปลูกลงดิน แล้วฝังกลบให้มิด โดยทั่วไปต้นกล้าของชิงชันจะใช้เวลาเจริญเติบโตภายในเวลา 6 เดือน จะมีความสูงประมาณ 35-45 เซนติเมตร จากนั้นสามารถนำไปลงดินที่อื่นได้ การให้ปุ๋ยหลังจากกล้าไม้ที่ปลูกตั้งตัวได้แล้ว ควรใส่ปุ๋ยเพื่อเร่งการเจริญเติบโตให้เร็วขึ้น โดยการใส่ปุ๋ยสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15-15-15 หรือ 20-20-20 ประมาณ 1 ช้อนชาต่อต้น ไม้ชิงชันจะขึ้นอยู่ที่ที่อุณหภูมิใต้ร่มไม้สูงสุดระหว่าง 40-43 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดระหว่าง 4.4-7.2 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำฝนระหว่าง 875-2,000 มม.ต่อปี เกิดในบริเวณพื้นดินที่มีการระบายน้ำดีและในพื้นที่ที่มีความสูงใกล้กับระดับน้ำทะเลจนถึง 500 เมตร จากระดับน้ำทะเล

ปัญหาเรื่องโรคและแมลงมักพบได้บ่อยในระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่นโรคเน่าคอดิน ซึ่งเป็นปัญหาที่พบมาก รวมถึงการโจมตีของแมลงด้วงหนวดยาวซึ่งมักจะเข้าทำลายลำต้นและวางไข่ในช่วงฤดูหนาว สำหรับการแก้ไขปัญหานี้สามารถใช้วิธีการฉีดพ่นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง เช่น ไดเมทโอเอต หรืออะโซดริน เพื่อป้องกันการทำลายของแมลงและรักษาความสมบูรณ์ของต้นพืชชิงชังในระยะเจริญเติบโตของมันได้เต็มที่ ดังนั้นการจัดการด้วยวิธีการฉีดพ่นสารเคมีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมปัญหาด้านโรคและแมลงในช่วงนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีประสิทธิผลอย่างยั่งยืน แต่ควรทำการฉีดพ่นสารอย่างมีความระมัดระวังเพื่อป้องกันความเสียหายต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ด้วยดังเดิม การทำแนวกันไฟเป็นมากมายที่ช่วยลดความเสี่ยงจากไฟไหม้ ไม้ชิงชันเป็นไม้ที่มีความทนทานต่อไฟ แม้จะทนไฟไหม้เล็กน้อยได้ แต่หากมีไฟไหม้รุนแรงอาจทำให้การเจริญเติบโตของต้นชิงชังชะงัก และส่งผลให้เกิดแผลตามลำต้นได้ ในช่วงปีแรกถึงปีที่สองของการปลูก ควรทำแนวกันไฟที่กว้างประมาณ 6-8 เมตร รอบๆ แปลงปลูกเพื่อป้องกันการลุกลามของไฟที่อาจเกิดจากเรือนยอดที่เริ่มชิดกัน นอกจากนี้ยังช่วยให้การควบคุมไฟไหม้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและลดความเสี่ยงในการเกิดอุบัติเหตุไฟไหม้ได้ในอนาคต (กรมป่าไม้, 2563)

2.1.4 ประโยชน์ของชิงชัน

1. ต้นชิงชันเป็นต้นไม้ที่ผู้คนนิยมปลูกมาก ทำให้มีคนหาซื้อกันเป็นจำนวนมากโดยที่ต้นชิงชันมีความสูงประมาณ 40-50 เซนติเมตร จะจำหน่ายอยู่ที่ราคาประมาณ 30-80 บาท นิยมขายต้นกล้า เนื่องจากเมื่อโตในระดับหนึ่ง จะเคลื่อนย้ายยากขึ้น จากข้อมูลของกรมป่าไม้ระบุว่า ไม้ชิงชันเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ จัดเป็นไม้ผลัดใบที่อยู่ในวงศ์เดียวกับประดู่ ด้วยลักษณะภายนอกของไม้ชิงชันที่ดูสวยงาม จึงนิยมนำไปทำเป็นเครื่อนเรือน เครื่องดนตรีและเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ปัจจุบันไม้ชิงชันที่มีอายุมากและคุณภาพดีมีมูลค่าสูงมาก

2. ทางเศรษฐกิจ มีการแนะนำเกษตรกรใช้พื้นที่รกร้าง เนินลาด และริมถนน ในการปลูกต้นพะยูงไหหลำ ซึ่งสามารถเพิ่มทรัพยากรทางเศรษฐกิจในชนบทด้วยการปลูกต้นไม้หายากด้วยราคาสูงถึง 10,000 หยวน

3. การใช้งานด้านภูมิทัศน์ สามารถนำมาจัดสวนเป็นไม้ประดับ เพื่อให้ร่มเงาแก่บ้านเรือนหรือพื้นที่สาธารณะทำให้มีระบบนิเวศที่ดี มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการปรับปรุงคุณภาพสิ่งแวดล้อม ที่อยู่อาศัยสำหรับผู้อยู่อาศัยและการส่งเสริมสุขภาพกายและสุขภาพจิตที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กฎหมายว่าด้วยการป่าไม้ของต้นชิงชัน

ป่าไม้ ดิน น้ำ แร่ธาตุมีความสำคัญอย่างมากกับการดำรงชีวิตอยู่ของสิ่งมีชีวิตในโลกนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมนุษย์ เพราะเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มนุษย์นำมาใช้ในชีวิตประจำวัน แต่เนื่องจากมีการนำทรัพยากรธรรมชาติดังกล่าวมาใช้อย่างฟุ่มเฟือย จนทำให้ทรัพยากรป่าไม้ลดลงอย่างมากและก่อให้เกิดความไม่สมดุลในระบบนิเวศ (ecosystem) ดังนั้นเพื่อเป็นการชะลอการลดลงของทรัพยากรธรรมชาติ กฎหมายจึงกำหนดให้มีการควบคุมการทำไม้และคุ้มครองพื้นที่ป่า ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพ ทั้งนี้เพื่อรักษาป่าไม้และคุ้มครองสภาพแวดล้อมให้มีสภาพที่ดีและคงอยู่ถึงรุ่นลูกรุ่นหลานต่อไป

ไม้หวงห้ามประเภท ก ได้แก่ ไม้พะยูง ไม้สัก ไม้กระพี้เขาควาย ไม้ชิงชัน ไม้ยาง เป็นต้น เป็นไม้ที่ห้ามตัดเอง ต้องได้รับอนุญาตกับทางการเสียก่อน ถึงจะดำเนินการได้ ไม่ว่าต้นไม้เหล่านั้น จะขึ้นอยู่ที่ใดในผืนแผ่นดินประเทศไทยก็ตาม หรือปลูกไว้ในบริเวณที่ของตนเอง หรือจะทำอะไร กับไม้ก็ตาม เช่น ตัด ฟัน โค่น เลื่อย ถอน ขุด เป็นต้น ถ้าหากฝ่าฝืนมีความผิด มีโทษจำคุก 1 – 20 ปี และถูกปรับตั้งแต่ 50,000 บาท ถึง 2,000,000 บาท โดยการทำไม้จะเป็นความผิดต่อเมื่อได้ทำไม้หวงห้ามในพื้นที่ป่าโดยไม่ได้รับอนุญาต หากเป็นการทำไม้ซึ้งกระทำลงในที่ดินที่ไม่ใช่ป่า กล่าวคือเป็นที่ดินที่เอกชนมีกรรมสิทธิ์ (ownership) หรือสิทธิครอบครองการทำไม้นั้นก็ไม่ต้องขออนุญาตแม้ไม้ที่ทำนั้นจะเป็นไม้ประเภทหรือชนิดเดียวกันกับไม้หวงห้ามที่ขึ้นอยู่ในป่าก็ตาม เว้นแต่ไม้ที่ขึ้นอยู่ในที่ดินเอกชนั้นนเป็นชนิด ไม้สัก ไม้ยาง ไม้ชิงชัน ไม้เก็ดแดง ไม้อีเม่ง ไม้พะยูงแกลบ ไม้กระพี้ ไม้แดงจีน ไม้ขะยุง ไม้ชิก ไม้กระซิก ไม้กระซิบ ไม้พะยูง ไม้หมากพลูตั๊กแตน ไม้กระพี้เขาควาย ไม้เก็ดดำ ไม้อีเฒ่าและไม้เก็ดเขาควาย ตามมาตรา 7 กำหนดไว้ว่า ไม่ว่าขึ้นอยู่ณ ที่ใดก็ตามกฎหมายถือว่าเป็นไม้หวงห้ามประเภท ก. ทั้งสิ้น ดังนั้น หากเอกชนผู้เป็นเจ้าของที่ดิน (Owner of a Piece of Land) นั้นจะดำเนินการกับไม้ดังกล่าว ต้องขออนุญาตในการทำไม้กับพนักงานเจ้าหน้าที่ก่อนเสมอ ดังนั้นจึงถือว่าไม้ทั้ง 18 ชนิด ไม่ว่าจะขึ้นที่ใดในราชอาณาจักรแม้ในที่ดินที่เอกชนมีกรรมสิทธิ์หรือสิทธิครอบครองก็ตาม การตัดโค่น หรือการกระทำด้วยประการใดๆ กับไม้จะต้องขออนุญาตจากพนักงานเจ้าหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยการป่าไม้ทุกครั้ง ผู้เป็นเจ้าของทรัพย์สิน (ownership) ไม่สามารถดำเนินดำเนินการได้อย่างเป็นอิสระเสรีตามหลักกฎหมายแพ่งและพาณิชย์ในเรื่องกรรมสิทธิ์หรือสิทธิครอบครอง เพราะบทบัญญัติมาตรา 7 แห่งพระราชบัญญัติป่าไม้พุทธศักราช 2484 หากจะนำไปใช้ประโยชน์หรือแม้แต่กระทำด้วยประการใดๆเพียงเล็กน้อย เช่น การฟัน การตัดแต่งกิ่ง การตัดทำฟืน เป็นต้น ต้องตกอยู่ภายใต้บังคับแห่งพระราชบัญญัติป่าไม้พุทธศักราช 2484 พิจารณาแล้วจะเห็นได้ว่า ไม้หวงห้ามตามมาตรา 7 แห่งพระราชบัญญัติป่าไม้ฯ อาจสร้างปัญหาให้กับเอกชนอย่างมากที่ไม่อาจจัดการกับทรัพย์สินของตนได้ หากไม่มีการแก้ไขปัญหาดังกล่าวแล้ว ในอนาคตอาจทำให้ไม้หวงห้ามทั้ง 18 ชนิดต้องสูญพันธุ์ นอกจากนี้ ยังเป็นการกระทบต่อสิทธิของประชาชนในเรื่องกรรมสิทธิ์หรือสิทธิครอบครองอีกด้วย และประการที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การกำหนดไม้หวงห้ามประเภท ก. ไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยป้องกันการลักลอบตัดไม้ทำลายป่าแต่อย่างใด แต่สิ่งที่รัฐควรควรทำเพื่อการรักษาป่าไม้และพันธุ์ไม้ของประเทศไทยไว้ คือ การส่งเสริมให้ประชาชนปลูกป่าไม้ ซึ่งควรยกเลิกการควบคุมไม้หวงห้ามประเภท ก. ในที่ดินกรรมสิทธิ์หรือหรือสิทธิครอบครองของปัจเจกชนเพื่อสร้างอนาคตทางเศรษฐกิจให้กับประเทศชาติ เพราะประเทศต่างๆ ยังมีความต้องการสินค้าที่มาจากผลผลิตจากป่าไม้ตามธรรมชาติอีกจำนวนมาก (ษชาดา, 2560)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่ได้มีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1902 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Haberlandt เป็นคนแรกที่ได้พยายามเอาเซลล์จากใบของพืชมาเพาะเลี้ยง โดยมีแนวคิดว่าเซลล์เพียงเซลล์เดียวนี้จะสามารถพัฒนาเจริญไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ แต่ปรากฏว่าประสบความสำเร็จเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ เนื่องจากเซลล์ดังกล่าวแยกมาจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งเพาะเลี้ยงยาก และเวลานั้นยังไม่รู้จักการใช้ฮอร์โมยเร่งการเจริญเติบโตของพืช แต่อย่างไรก็ตามแนวคิดของ Haberlandt ได้เป็นพื้นฐานให้นักวิทยาศาสตร์รุ่นต่อๆ มาพยายามพัฒนาเทคนิคนี้ จนกระทั่งปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เจริญก้าวหน้าไปอย่างมาก สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายและเป็นที่สนใจของคนทั่วไป (ธัญญา, 2554)

2.3.1 ขั้นตอนหลักในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แบ่งขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็น 5 ขั้นตอน หลัก ดังนี้

1. **ขั้นตอนการเตรียมต้นแม่พันธุ์ (preparative stage)** มุ่งเน้นการเพาะเลี้ยงต้นแม่พันธุ์ (stock plant) ที่ต้องการขยายพันธุ์ โดยเน้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีความสะอาด ซึ่งสามารถควบคุมโรคและแมลงได้ในโรงเรือน เพื่อให้ได้ต้นแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพและสมบูรณ์ อาจจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนสภาพรอบด้านให้กับต้นแม่พันธุ์ เพื่อจะได้ต้นแม่พันธุ์ที่สะอาดและสมบูรณ์เต็มที่ ในขั้นตอนนี้อาจจะมีการปรับเปลี่ยนสภาพรอบด้านให้กับต้นแม่พันธุ์ เพื่อศึกษาผลของแสง คือ ผลของจำนวนชั่วโมงแสง (photoperiod) และผลของคุณภาพของแสง (light spectrum, light intensity) ผลของอุณหภูมิต่อการพักตัว (dormancy) ของพืช และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ในสภาพภายนอกก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงใต้สภาพปลอดเชื้อ การปรับเปลี่ยนเหล่านี้ช่วยให้ต้นแม่พันธุ์มีความพร้อมในการขยายพันธุ์ต่อไปได้อย่างประสิทธิภาพ
2. **ขั้นตอนเริ่มต้น (initiation stage)** เตรียมชิ้นส่วนของพืชที่พร้อมใช้งาน โดยในขั้นตอนการเตรียมต้นแม่พันธุ์ จะทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจติดอยู่กับผิวพืช จากนั้นจะทำการผ่าตัดเนื้อเยื่อของพืชในสภาพที่ปลอดเชื้อภายในตู้เพาะเลี้ยง เพื่อนำเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงต่อในขั้นตอนต่อไป โดยการเลี้ยงนี้จะใช้อาหารสังเคราะห์ที่ได้ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จนกว่าจะได้ต้นพืชที่มีคุณภาพตามที่ต้องการเพื่อใช้ในขั้นตอนถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ (multiplication) ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณทำเมื่อเนื้อเยื่อพืชในขั้นตอนที่ 2 โตพอสมควรแล้ว จะทำการเพิ่มปริมาณโดยการตัดแบ่งเนื้อเยื่อของออกเป็นชิ้นและแยกไปเลี้ยงในอาหารใหม่ เรียกว่า การตัดแบ่ง (subcultures) ทำการตัดแบ่งไปได้เรื่อย ๆ จนกว่าจะได้ปริมาณที่ต้องการ

4. ขั้นตอนการชักนำ ให้เกิดราก (root induction) ต้นกล้ามีปริมาณตามจำนวนที่ต้องการแล้วจะทำการชักนำให้ออกราก และเลี้ยงจนเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่แข็งแรงสมบูรณ์

5. ขั้นตอนการเตรียมความพร้อมให้กับต้นกล้า ก่อนทำการย้ายออกนอกห้องปฏิบัติการและการย้ายออกสู่โรงเรือนอนุบาล (Acclimatization)ส่วนมากต้นกล้าในขวดที่ทำการย้ายออกสู่สภาพภายนอกขวดมักมีร้อยละการรอดต่ำ เพราะถูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และถูกเลี้ยงในสภาพที่แสงและอุณหภูมิค่อนข้างต่ำกว่าสภาพภายนอกมาก ดังนั้นก่อนการการย้ายออกนอกขวดเพาะจึงต้องมีการเพิ่มความเข้มแสง ปรับ อุณหภูมิ พอต้นกล้ามีความพร้อมแล้วก็ทำการย้ายออกนอกขวดนำไปเลี้ยงในโรงเรือนต่อไป (อารยา, 2545)

2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พืชต้องการธาตุอาหารเป็นปัจจัยหลักในขบวนการทำงานต่างๆ เพื่อเสริมสร้างการเจริญเติบโตเนื้อเยื่อพืชก็มีความต้องการธาตุอาหารในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน เนื้อเยื่อของพืชมีความต้องการปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตตามชนิด หรือแม้แต่เนื้อเยื่อพืชที่มาจากส่วนต่างกัน เช่น เมล็ด ใบ ลำต้น ก็มีความต้องการปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันไปเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกันมากมาย เพื่อให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด เช่น สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS) สูตราอาหารของ White อย่างไรก็ดีสูตรอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบดังนี้

1. ประเภทของอาหาร

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 ประเภท คือ อาหารแข็ง (solid medium) กับอาหารเหลว (liquid medium) อาหารแข็งใช้วุ้น (agar) ในการปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็ง ความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดี คือร้อยละ 0.8 ของปริมาตรอาหารทั้งหมด ส่วนอาหารเหลวเนื้อเยื่อจะจมหรือแขวนลอยอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มในอาหารเหลวตลอดเวลา เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจถูกคนที่ความเร็ว 100 - 160 รอบต่อนาที เพื่อช่วยในการหายใจของพืช

2. ส่วนประกอบของอาหาร

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ด้วยกันหลายสูตร เช่น Murashigi and Skoog (MS) สำหรับเพาะเลี้ยงพืชทั่วไป และ Vacin and Went (WV) เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ เป็นต้น และมักมีชื่อเรียกตามผู้คิดค้นสูตรอาหารขึ้นมา ซึ่งผู้นำไปใช้อาจมีการดัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมกับงานต่อไป อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบไปด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 สารอนินทรีย์ ได้แก่ ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียม และแมกนีเซียม ส่วนธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ (micro nutrients) ได้แก่ เหล็ก คลอรีน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โบรอน และ โมลิบดีนัม

2.2 สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds) ได้แก่ สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะน้ำตาล มีความจำเป็นต่อการเจริญของพืชอย่างมาก เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้ว หรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำ น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ น้ำตาลซูโครส (sucrose)

2.3 วิตามิน พืชตามธรรมชาติสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ทุกชนิด แต่พืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองต้องการวิตามินเพิ่ม วิตามินที่ใช้ เช่น วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 5 (pantothenic acid) วิตามินเอ็ม (folic acid) และวิตามินบี 2 (riboflavin)

2.4 กรดอะมิโน เช่น กลูตามีน (glutamine) แอสพาราจีน (asparagine) อะดีนีน (adenine) ไกลซีน (glycine)

2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ใช้กันมาก คือ กลุ่มออกซินที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid) จะถูกทำลายโดยแสงและเอนไซม์ IAA oxidase ซึ่งพบสูงในเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ดังนั้นการเติม IAA จึงต้องใช้ความเข้มข้นสูง 1-30 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงนิยมใช้กลุ่มออกซินที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้ในปริมาณที่คือ 0.001-10 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่น IBA (3-indolebutyric acid) NAA (1-naphthaleneacetic acid) CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) 2,4-D (2,4 Dichlorophe- noxynacetic acid) และกลุ่มไซโทไคนินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มาจากธรรมชาติ เช่น zeatin และกลุ่มที่มาจากการสังเคราะห์ เช่น kinetin (6-furfuryla- minopurine) BAP (6-benzylaminopurine) BA (6-benzyladenine) ส่วนจิบเบอร์เรลลินใช้ในบาง กรณี เช่น การเลี้ยงปลายยอด

2.6 สารที่ได้จากธรรมชาติ สารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ กล้วยหอมบด สารสกัดจากยีสต์ และสารสกัดจากมอลต์

2.7 ตัวทำให้สารแข็ง เนื้อเยื่อส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารแข็ง ตัวทำให้สารแข็ง เช่น วุ้นและเจลไรต์ (gelrite) เจลไรต์ช่วยทำช่วยให้ต้นพืชตั้งอยู่บนอาหารได้ สำหรับสูตรอาหารที่ไม่ได้ใส่วุ้นต้องมีการเพิ่มอากาศให้ชิ้นส่วนได้สัมผัสอากาศอย่างเพียงพอ

2.8 สารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีการเติมสารอินทรีย์อื่นเพื่อวัตถุประสงค์บางประการ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ กล้วยบด เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตละพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช แต่อาหารเหล่านี้มีไม่รู้ส่วนประกอบที่แน่นอน ดังนั้นการใช้สารเหล่านี้จึงอาจให้ผลที่ไม่คงที่ นอกจากนี้ยังมีการเติมผงถ่าน (activated charcoal) ในความเข้มข้นความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.2-0.3 เพื่อช่วยในการดูดซับสารพิษและสารประกอบบางอย่างที่เนื้อเยื่อขับออกมา เช่น สารฟีนอลิก และยังมีส่วนช่วยทำให้ pH คงที่ แต่มีข้อเสียคือผงถ่านจะไปดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใส่ลงไปในอาหารด้วยทำให้ประสิทธิภาพของสารควบคุมการเจริญเติบโตลดลง การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชช้ากว่าปกติ

2.3.3 การเตรียมชิ้นส่วนพืช การฟอกฆ่าเชื้อ และการผ่าตัดเนื้อเยื่อ

1. การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนของพืชสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้หลังจากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ขึ้นอยู่กับอายุหรือระยะเวลาของพืชที่นำมาเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงควรเลือกที่เป็นข้อปลายยอด ตายอด ตาข้าง เนื่องจากจะสามารถชักนำยอดได้จำนวนมาก

2. เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืชเพื่อทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดโรค เป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชไม่ให้มามีผลยับยั้งการเจริญและพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช เมื่อเลือกส่วนของพืชที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้แล้วตามความต้องการให้ตัดแต่งชิ้นส่วนพืชให้มีขนาดที่เหมาะสม นำมาทำการล้างทำความสะอาด โดยการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อเพื่อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อเยื่อพืช

3. การผ่าตัดเนื้อเยื่อพืช การตัดชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเลี้ยง เริ่มจากต้องนำชิ้นส่วนพืชมาล้างน้ำให้สะอาด และตัดส่วนที่ไม่ต้องการใช้ออกให้มากที่สุด นำชิ้นส่วนพืชที่ล้างแล้วมาตัดให้มีขนาดพอประมาณ แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตามขั้นตอน จากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดตามต้องการ นำไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาดและรูปร่างของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงขึ้นอยู่กับลักษณะวัตถุประสงค์และความพอใจของผู้ปฏิบัติงาน

4. การย้ายพืชออกจากขวด เมื่อพืชเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้วจะทำการย้ายพืชออกจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อปลูกในกระถาง ควรใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของทรายผสมขุยมะพร้าว หรือทรายผสมถ่านแกลบ อัตราส่วน 1 : 1 ระมัดระวังอย่าให้รากขาดหรือเสียหาย ล้างเศษวุ้นที่ติดอยู่ที่บริเวณรากออกให้หมดเพื่อไม่ให้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ นำต้นที่ล้างแล้วจุ่มด้วยยากันราก่อนปลูกลงในภาชนะที่ใส่วัสดุปลูกไว้ใน ระยะแรกต้องควบคุมสภาพ แวดล้อมให้เหมาะสม เช่น ความชื้น แสง อุณหภูมิ เมื่อต้นเจริญเติบโตแข็งแรงแล้วจึงย้ายออกปลูกในสภาพปกติต่อไป

2.3.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. งานด้านการขยายพันธุ์ (Clonal propagation) การผลิตกล้าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถ ผลิตกล้าได้เป็นปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น ต้นทุนการผลิตต่ำ ใช้พื้นที่ตลอดจนแรงงานน้อยกว่าการเตรียมกล้าจากเมล็ด นอกจากนี้คุณภาพของกล้าที่ผลิตได้มีความสม่ำเสมอกัน จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ผลิตพืชในเชิงการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. งานด้านการปรับปรุงพันธุ์ (Crop improvement) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการขยายพันธุ์โดย ไม่อาศัยเพศวิธีหนึ่ง ที่สามารถถ่ายทอดลักษณะเดิมของแม่ไม้มายังรุ่นลูกได้ ดังนั้นจึงเหมาะในการนำมาใช้กับงานการผลิตกล้าที่ต้องการคงลักษณะเด่นของแม่ไม้ไว้ สำหรับการสร้างสวนผลิตเมล็ดพันธุ์ หรือการปลูกป่าโดยตรง การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศให้ผลตอบแทน (gain) มากกว่าการขยายพันธุ์โดยเมล็ด

3. งานด้านการสร้างสายพันธุ์ (Breeding) เพื่อใช้ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) การสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว (haploid) หรือหลายชุด (polyploid) สร้างพืชลูกผสม ทั้งในสกุลเดียวกันและต่างสกุล และยังเป็นเครื่องมือในการสร้างสายพันธุ์แท้ (pure line) ได้อีกด้วย

4. การคัดเลือกสายพันธุ์ (Selection) การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกสายพันธุ์ทั้งทางตรงและทางอ้อม เป็นต้นว่า การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อม เช่น สายพันธุ์ทนเค็ม สายพันธุ์ทนแล้ง สายพันธุ์ทนโรคและแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัดทั้งพื้นที่แรงงาน ตลอดจนเงินทุน

5. การผลิตพืชปราศจากโรค (Disease-free plant) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้สำหรับการผลิตพืชปราศจากโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัสซึ่งยากแก่การกำจัดให้หมดไปจากชิ้นส่วนพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายยอด (apical meristem) หรือเนื้อเยื่อจากคัพภะ ซึ่งเป็นส่วนของพืชที่ปลอดไวรัสเนื่องจากการเคลื่อนย้ายของไวรัสไปสู่ส่วนต่างๆ ของพืชจะอาศัยทางท่อน้ำและท่ออาหาร แต่ในส่วนของปลายยอด และเนื้อเยื่อคัพภะไม่มีโครงสร้างเหล่านี้อยู่ พืชที่ปราศจากโรคนอกจากมีความแข็งแรงและให้ผลผลิตสูงขึ้นแล้ว ยังเหมาะสำหรับการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชอีกด้วย ซึ่งปัจจุบันค่อนข้างที่จะเคร่งครัดกับปัญหาโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่ติดมากับเมล็ด

6. การเก็บรักษาพันธุ์ (Preservation) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้สำหรับงานการเก็บรักษาพันธุ์พืช หรือการอนุรักษ์พันธุ์ได้เป็นอย่างดี การเก็บรักษาท่อนพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย แรงงาน และพื้นที่ได้มาก และยังสามารถใช้เก็บท่อนพันธุ์ได้ในระยะยาวโดยเก็บในสภาพอุณหภูมิต่ำที่ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งเรียกว่า cryopreservation วิธีนี้ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบันโดยเฉพาะการทำ gene bank

2.4 การสกัดดีเอ็นเอจากพืช

ปัจจุบันวิทยาการทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีการพัฒนาก้าวหน้าไปมาก โดยเฉพาะการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular technique) มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยกับพืชในด้านต่างๆ อาทิเช่น การปรับปรุงพันธุ์ การจำแนกและตรวจสอบพันธุ์ เป็นต้น การใช้เทคนิคเหล่านี้ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม (genetic material) ในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นขั้นตอนการสกัดแยกดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างยิ่ง วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิต มีหลายวิธีด้วยกันแตกต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หรือแม้แต่ในพืชต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่แตกต่างกันไป ซึ่งวิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากพืชสามารถเตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ใบ ลำต้น ราก เมล็ด และเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น เพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เพื่อการศึกษาวิจัยในด้านต่างๆ นั้น โดยมีหลักการและขั้นตอนวิธีการ ดังนี้

1. การทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) โดยการทำให้ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา โดยใช้สารพวก detergent ได้แก่ sodium dodecyl sulfate (SDS) โดย SDS จะเข้าไปละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อเซลล์และเยื่อนิวเคลียส รวมทั้งจับกับโปรตีนพวก hydrophobic protein ทำให้เซลล์แตกปลดปล่อยองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือต่างๆ น้ำตาล อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ ออกมาในสารละลาย การผสมในขั้นนี้จึงต้องระวังไม่เขย่าหรือคน สารละลายแรงเกินไป

2. การย่อยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (Deproteinization) ออกจากดีเอ็นเอ โดยใช้ protease และ RNase จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform บางครั้งอาจเติมเกลือ sodium chloride หรือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีน

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนโดยใช้ iso-propanol เข้มข้นร้อยละ 70 หรือ absolute ethanol (แช่เย็น) เนื่องจาก ethanol มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ ดังนั้นเมื่อเติม ethanol ลงไป ethanol จะลอยอยู่ด้านบนและละลายในน้ำได้ดีกว่าดีเอ็นเอมาก จึงไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่จับกับดีเอ็นเออยู่ ทำให้ดีเอ็นเอจับตัวกันเองแล้วตกตะกอนเป็นสีขาวอยู่ก้นหลอด อาจเติมเกลือ sodium acetate ด้วย เพื่อให้เกิด dehydrate water ออกจากสายดีเอ็นเอ จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำหรือ TE buffer และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (กรมวิชาการเกษตร, 2563)

โดยงานวิจัยในครั้งนี้มุ่งแน่นไปที่การใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชด้วยวิธี Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) ซึ่งเป็นสารประกอบ detergent ที่มีประจุบวก สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และจับโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนหลังจากทำให้เซลล์แตกและบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ CTAB ที่ 65 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนได้ด้วย isopropanol หรือ ethanol ในบางกรณีจะเห็นการตกตะกอนเป็นลักษณะขาวขุ่น สามารถแยกดีเอ็นเอออกได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงให้ดีเอ็นเอตกตะกอนหรือใช้แท่งแก้วงอเกี่ยวดีเอ็นเอขึ้นมา จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการกำจัด RNA, polysaccharides, polyphenols และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีวิธีสกัดดีเอ็นเออีกหลายวิธี เช่น วิธี potassium acetate/SDS เป็นการตกตะกอนรวมกันของโปรตีน และ polysaccharides ใน potassium acetate ที่มีความเข้มข้นสูงในสารละลาย SDS วิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเป็นต้องสกัดสารประกอบอินทรีย์ออก แต่เป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอน ซึ่งใช้เวลามากกว่าการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ CTAB หรือการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งมีอยู่หลายบริษัทให้เลือกใช้ อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีใดก็ตามขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อพืช ชนิดของพืชและวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้

2.5 เครื่องหมายโมเลกุล

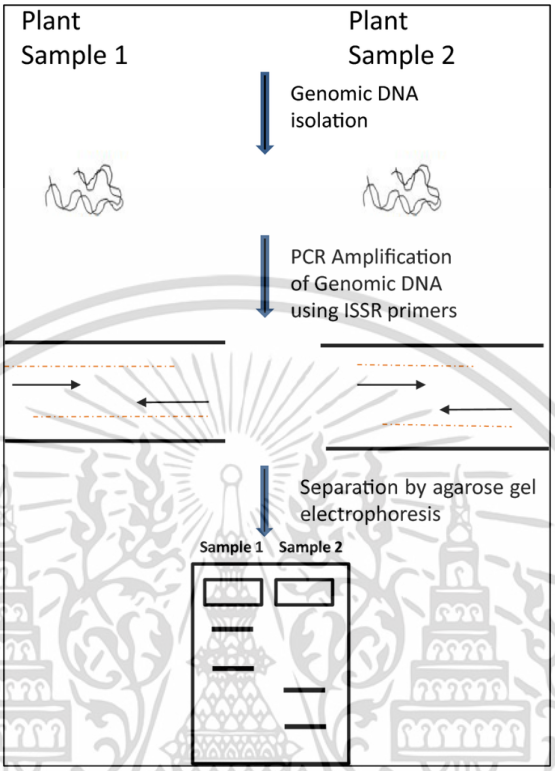
เครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอมีประโยชน์หลายด้าน เช่น ด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งได้แก่ การตรวจสอบความบริสุทธ์ของสายพันธุ์ การคัดเลือกลูกผสม เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในการระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมหรือ ความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic variation) และการรักษาโรค

เครื่องหมาย (Marker) คือ สิ่งบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ซึ่งแบ่งเครื่องหมายออกเป็นหลายระดับ ได้แก่ เครื่องหมายระดับสัณฐานวิทยา ระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งระดับโปรตีนและระดับดีเอ็นเอถือเป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุล แต่เครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอสามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้มากกว่าเครื่องหมายระดับโปรตีน จึงได้รับความนิยมมากกว่า และสำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) คือชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่สามารถเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่สนใจนั้นๆ ได้ ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายประเภท เช่น เครื่องหมายชนิดอาร์เอฟแอลพี (Restriction fragment length polymorphism (RFLP)), เครื่องหมายชนิดเอเอฟแอลพี (Amplified fragment length polymorphism (AFLP)), เครื่องหมายชนิดอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA (RAPD)), เครื่องหมายชนิดเอสเอสอาร์ (Simple sequence repeat (SSR)), เครื่องหมายชนิดเอสเอ็นพี (Single nucleotide polymorphism (SNP)) และเครื่องหมายชนิดไอเอสเอสอาร์ (Inter-simple sequence repeat (ISSR))

โดยงานวิจัยในครั้งนี้มุ่งแน่นไปที่การใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม ดังรูปที่ 2.2 เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซททาไลต์ (microsatellite) 2 ตำแหน่ง ไมโครแซททาไลต์คือ ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อกันในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วย 1-6 นิวคลีโอไทด์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและส่วนใหญ่พบในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) ซึ่งความผันแปรจำนวนซ้ำ ของไมโครแซททาไลต์ในจีโนมสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างของ สิ่งมีชีวิต เทคนิค ISSR นี้ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบส หลักการคือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์เป็นไมโครแซททาไลต์และเติมนิวคลีโทด์คัดเลือก โดยไพรเมอร์จะจับเข้ากับไมโครแซททาไลต์ 2 ตำแหน่งใกล้ ๆ กัน แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นระหว่างไมโครแซททาไลต์ 2 ตำแหน่งนั้น ซึ่งเรียกชิ้นดีเอ็นเอนี้ว่า ไอเอสเอสอาร์ โดยข้อดีของเทคนิคนี้คือ ทำได้ง่าย รวดเร็วและราคาไม่สูงมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนข้อเสียคือ เป็นเครื่องหมายที่แสดงถึงการข่มแบบสมบูรณ์ (complete dominant) (บุญดิศย์, 2560)



รูปที่ 2.2 การแสดงแผนภาพของเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์
(อ้างอิงรูป: https://www.researchgate.net)

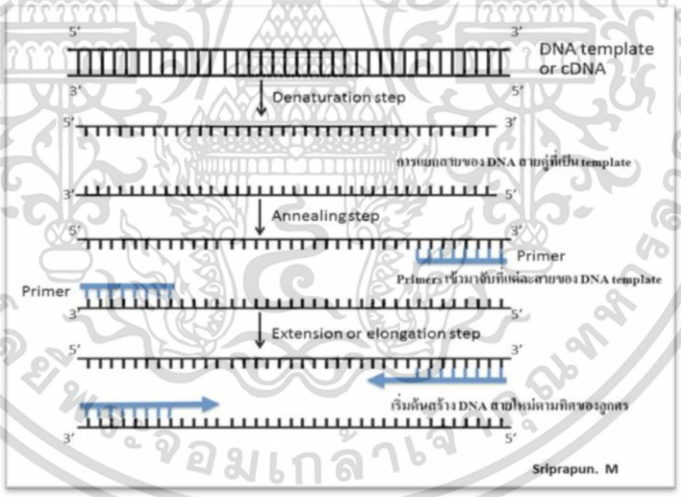
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR) ในขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์ ดังรูปที่ 2.3 ดีเอ็นเอหนึ่งโมเลกุลจะถูกเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากโดยอาศัยพื้นฐานของปฏิกิริยาจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ดังนั้นในปฏิกิริยาของพีซีอาร์จึงเป็นการนำเอาองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆ ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ คือ ไพรเมอร์ ดีเอ็นเอต้นแบบ หน่วยนิวคลิโอไทด์ dNTPs (deoxynucleotide triphosphate) และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสมาใส่ในหลอดทดลอง แล้วปรับระดับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ในหนึ่งรอบของกระบวนการของพีซีอาร์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย

1. **การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติ (Denaturing)** เป็นขั้นตอนที่เพิ่มอุณหภูมิขึ้นสูงถึง 91-95 องศาเซลเซียส ทำให้ DNA template 2 สายที่ เกี่ยวพันกันเป็นเกลียว (double helix) แยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายนี้จะกลายเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) ขั้นตอนนี้อุณหภูมิจะถูกปรับให้ลดลงทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายสายเดี่ยวจับกับไพรเมอร์ที่ใส่ลงไปในปฏิกิริยา ไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายสายเดี่ยวแต่ละสาย การจับของไพรเมอร์ทั้งสองทำให้ปลาย 3′ ของไพรเมอร์หันเข้าหากัน ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแต่ละสายเกิดขึ้นระหว่างไพรเมอร์ทั้งสอง อุณหภูมิที่ใช้ในการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบขึ้นอยู่กับลำดับเบสและความยาวของไพรเมอร์ และระดับของความจำเพาะที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะผันแปรระหว่างประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส ขึ้นกับลำดับเบสของไพรเมอร์

3. การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (Extension) เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบ แล้วสร้างต่อจากไพรเมอร์ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ทนความร้อนมาช่วยในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ และมี dNTP สำหรับสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ไพรเมอร์จะถูกสร้างในทิศ 5’ ไป 3’ และลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่จะเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (กิตติพัฒน์, 2557)



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
(อ้างอิงรูป: https://www.mtc.or.th)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องการ

2.6.1 การฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืช

ประพันธ์ และคณะ (2557) ศึกษาการขยายพันธุ์จากชิ้นส่วนต่างๆของต้นพะยูงไทย *Dalbergia cochinchinensis* โดยการนำชิ้นส่วนตาข้างทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารซักฟอกไฮเตอร์ (Sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 และน้ำซันไลต์ 1-2 หยด โดยใช้เวลาที่แตกต่างกันคือ 10 15 และ 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนพืชความยาว 1-2 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าชิ้นส่วนพืชมีการปนเปื้อนประมาณ ความเข้มข้นร้อยละ 8-16 และจะตายเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นและเวลาเพิ่มขึ้น การใช้ไฮเตอร์ความเข้มข้นความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จึงให้ประสิทธิภาพดีที่สุด มีการพัฒนาของตาข้างแตกยอดมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 95

อภิสรา (2564) ได้ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองโดยต้นที่นำมาทดลองคือ ถั่วลิสงเกากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook และ Ecoturf พบว่าเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.18 เสริมด้วย antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไปเพียง 1 สัปดาห์ พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 90 และ 100 ตามลำดับ

พชร (2565) ได้ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองโดยต้นที่นำมาทดลองคือ *Dalbergia cochinchinensis* Pierre พบว่าเมื่อฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ร่วมกับสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ชิ้นส่วนเมล็ดรอดชีวิตร้อยละ 70 และการฟอกฆ่าเชื้อข้อจากต้นในธรรมชาติ พบว่าเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ชิ้นส่วนข้อไม่มีการปนเปื้อน

2.6.2 การชักนำให้เกิดยอด และการเจริญเป็นต้นใหม่

Pradhan. *et al.* (1998) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์ต้นประดู่ลาย *Dalbergia sissoo* Roxb โดยทำการขยายพันธุ์จากชิ้นส่วนข้อบริเวณใบเลี้ยง (Cotyledonary node) ที่ต้นเกิดจากเมล็ดในระยะเวลา 1 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA Kn 2iP หรือ TDZ พบว่า BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดสูงถึงร้อยละ 99 และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงสุดเท่ากับ 7.9 ยอด โดยความเข้มข้นของไซโทไคนินที่สูงกว่าระดับที่เหมาะสมจะทำให้จำนวนยอดลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งการเพิ่มจำนวนยอดจะจากการนำเอาชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง มาทำการเพาะเลี้ยงซ้ำหลายๆซ้ำ โดยแต่ละซ้ำจะมีจำนวนยอดประมาณ 2–3 ยอด ดังนั้นจึงได้ยอดเพิ่มถึง 60-70 ยอด ในระยะเวลา 6 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Joshi. *et al.* (2003) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์ต้นประดู่ลาย *Dalbergia sissoo* Roxb ด้วยชิ้นส่วนข้อ โดยการนำชิ้นส่วนข้อล้างผ่านน้ำประปาเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก จากนั้นล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 5-8 หยด เขย่าเบาๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ต่อมาทำการฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ จากนั้นนำมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ MS และ B5 ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช BAP ความเข้มข้น 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงชนิดเดียว และร่วมกับ IAA หรือ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงสุดเท่ากับ 8.04 ยอด และพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS มีอัตราการงอกของยอดสูงกว่า B5

Kapildev. *et al.* (2020) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากต้นแบล็คแกรม *Vigna mungo* (L.) Hepper จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยพบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนข้อบริเวณใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดสูงที่สุดเท่ากับ 32 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 6.4 เซนติเมตร ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ จากนั้นนำยอดที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำการยืดให้ยอดยาวขึ้นพบว่ามีความยาวที่เพิ่มมากขึ้นเท่ากับ 11.2 เซนติเมตร ลักษณะยอดที่ได้สมบูรณ์แข็งแรงเหมาะต่อการนำไปชักนำรากต่อไป

2.6.3 การชักนำให้เกิดราก

Luna. *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดรากที่สมบูรณ์ของต้น *Ilex dumosa* จัดเป็นกลุ่มพืชที่มีศักยภาพสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งทางการแพทย์สมุนไพร อาหาร ไม้ประดับ หรือเชื้อเพลิง โดยทำการคัดเลือกยอดที่มีความยาว 10-15 มิลลิเมตร โดยแบ่งการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน และตามด้วยขั้นตอนที่ 2 เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ¼ MS ประกอบด้วยแคดาเวรีน (cadaverine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นใหม่ที่เกิดขึ้นสมบูรณ์แข็งแรง เหมาะต่อการนำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก

Balaraju. *et al.* (2011) ได้ทำการชักนำยอดให้เกิดรากของต้นจันทน์แดง *Pterocarpus santalinus* L. โดยทำการคัดเลือกยอดที่เจริญเติบโตจากชิ้นส่วนข้อ โดยมีความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร และมีใบประมาณ 4-5 ใบ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ IAA IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปยังอาหารสังเคราะห์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากสูงที่สุดเท่ากับ 60

Shinde. *et al.* (2016) ทำการชักนำยอดให้เกิดรากที่สมบูรณ์ของต้น *Artemisia nilagirica* var. *nilagirica* เป็นต้นไม้ที่เจริญอยู่บนภูมิภาคที่เป็นเนินเขาของประเทศอินเดีย โดยทำการคัดเลือกยอดที่มีความยาว 2-3 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ และ ½ MS ประกอบด้วย IAA IBA และ NAA พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 83.33 และมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 58.66 รากต่อยอด

Yadav. *et al.* (2016) ทำการชักนำยอดให้เกิดรากที่สมบูรณ์ของต้นกระถินณรงค์ *Acacia auriculiformis* โดยทำการคัดเลือกยอดที่มีความยาว 3-4 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้รากที่แข็งแรงเหมาะสมต่อการนำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก

2.6.4 การออกปลูกต้นกล้าสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก

Husain and Shahzad (2007) ได้ทำการคัดเลือกต้นอ่อนที่มีระบบรากสมบูรณ์แข็งแรงของต้นประดู่อินเดีย *Pterocarpus marsupium* Roxb. (Fabaceae) นำออกจากหลอดทดลอง และล้างด้วยน้ำประปาเบาๆ เพื่อนำวุ้นออกจากรากให้สะอาด จากนั้นย้ายลงกระถ่างที่มีส่วนผสมของ พีทมอส และเพอร์ไลท์ ในอัตราส่วน 3 : 1 คุมต้นกล้าด้วยถุงพลาสติกและปรับสภาพเช่นเดียวกับสภาวะในหลอดทดลองประมาณ 3 สัปดาห์ ทำการรดด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS สลับกับน้ำประปา หลังจากนั้นนำถุงพลาสติกที่คุมต้นกล้าออก และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพให้ต้นกล้าเคยชินกับสภาวะแวดล้อม แล้วจึงนำต้นกล้าย้ายลงกระถางที่ประกอบด้วยดินปกติ และเลี้ยงไว้ในโรงเรือนต่อไป

Noor. *et al.* (2009) ได้ทำการคัดเลือกต้นอ่อนที่มีระบบรากสมบูรณ์แข็งแรงของต้นกระถิน *Leucaena leucocephala* (Fabaceae) นำมาล้างด้วยน้ำประปาเพื่อนำวุ้นที่ติดรากออก จากนั้นย้ายลงถ้วยพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของขุยมะพร้าวและคุมด้วยถุงพลาสติกและปรับสภาพเช่นเดียวกับสภาวะในหลอดทดลองประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการตัดถุงพลาสติกที่คุมบริเวณมุมบนทั้งสองข้าง และเมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ จึงนำถุงคุมออกแล้วย้ายต้นกล้าลงกระถ่างที่มีส่วนผสมของทรายและดิน ในอัตราส่วน 1 : 1 และย้ายไปอยู่ในโรงเรือนเพื่อปรับสภาพให้ชินกับสภาวะแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.5 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม

Ginwal. *et al.* (2010) ศึกษาการสกัดดีเอ็นเอของต้นประดู่ลาย (*Dalbergia sissoo* Roxb) ด้วยวิธี Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) โดยใช้ใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและใบจากต้นโตเต็มวัยมาทำการทดสอบ วิธีการนี้จะใช้การบดผสมด้วย CTAB buffer, โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (PVP) และคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform : Isoamyl alcohol) สกัดด้วยสภาวะอุณหภูมิที่ปรับเปลี่ยนไป โดยอุณหภูมิที่ปรับเปลี่ยนไปนั้นเกี่ยวข้องกับการใช้โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน ที่มีความเข้มข้นเพิ่มเป็นสองเท่า (ร้อยละ 2 เปลี่ยนเป็น ร้อยละ 4) และเพิ่มระยะเวลาการบ่มจาก 30 นาที เปลี่ยนเป็น 40 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 76 เวลาจาก 30 นาที เปลี่ยนเป็น 45 นาที ผลที่ได้คือมีดีเอ็นเอประมาณ 100 ถึง 400 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบ 100 มิลลิกรัม โดยจีโนมิกดีเอ็นเอจะถูกวิเคราะห์ผ่านเทคนิค RAPD และ ISSR จึงสรุปได้ว่าวิธีการสกัดนี้ช่วยให้สามารถวิเคราะห์โมเลกุลของดีเอ็นเอ จากการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันของต้นประดู่ลาย

Ahmad. *et al.* (2020) ตรวจสอบความเที่ยงตรงทางพันธุกรรมของประดู่อินเดีย *Pterocarpus marsupium* Roxb เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่ามีความเหมือนต่างกับต้นเริ่มต้นหรือไม่ โดยทำการสุ่มต้นอ่อนที่มีอายุ 3 เดือน ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองคือ ISSR จำนวน 24 ไพรเมอร์ ซึ่งมีทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC818 UBC825 UBC827 UBC834 UBC836 UBC839 UBC841 UBC847 UBC849 และ UBC855 ที่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอโมโนมอร์ฟิกได้อย่างชัดเจน ไม่คลุมเครือ และไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม อุณหภูมิของการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 36.3 – 54.6 องศาเซลเซียส พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 60 แถบ ค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 6 แถบ โดยไพรเมอร์ UBC 841 มีแถบดีเอ็นเอมากที่สุดเท่ากับ 9 แถบ และไพรเมอร์ UBC 818 มีแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดเท่ากับ 4 แถบ

Ahmad. *et al.* (2020) ตรวจสอบความเที่ยงตรงทางพันธุกรรมของต้นประดู่อินเดีย *Pterocarpus marsupium* Roxb เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่ามีความเหมือนต่างกับต้นเริ่มต้นหรือไม่ โดยทำการสุ่มต้นออ่อนที่มีอายุ 3 เดือน ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองคือ ISSR จำนวน 15 ไพร์เมอร์ พบว่ามีทั้งหมด 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC866 UBC873 UBC876 UBC878 UBC880 และ UBC891 ที่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอโมโนมอร์ฟิกได้อย่างชัดเจน ไม่คลุมเครือ และไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม อุณหภูมิของการจับของ ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 44.5 – 54.6 องศาเซลเซียส พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 35 แถบ ค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 4.38 แถบ โดยไพรเมอร์ UBC 881 มีแถบดีเอ็นเอมากที่สุดเท่ากับ 6 แถบ และไพรเมอร์ UBC 873 มีแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดเท่ากับ 3 แถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ชิ้นส่วนพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ชิ้นส่วนเมล็ดและข้อจากต้นชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog, 1962 (MS)
- อาหารสังเคราะห์สูตร Woody Plant Medium (Lloyd and McCown, 1981)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 6-benzylaminopurine (BAP)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช *Meta*-topolin (*m*T)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช Gibberellin (GA_3)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช Indole-3-acetic acid (IAA)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช Indole-3-butyric acid (IBA)
- น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
- Crystal agar gel G180 จากบริษัท Central gel

3.2.2 สารใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อพืช

- เมอร์คิวริกคลอไรด์ (Mercuric (II) chloride : $HgCl_2$)
- โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium hypochlorite : NaOCl)
- สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แบคทีเรีย (plant Preservative Mixture : PPM)
- ยาปฏิชีวนะต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (cefotaxime)
- ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (antibiotic antimycotic solution)
- เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95
- สารลดแรงตึงผิว (tween-20)
- ยากันรา (carbendazim)
- น้ำกลั่น (distillrd water)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 สารใช้ในการสกัดดีเอ็นเอพืชและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- สารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ 2X CTAB buffer
- สารละลายสกัดดีเอ็นเอชนิด β-mercaptoethanol
- สารละลายสกัดดีเอ็นเอชนิด Proteinase K
- สารละลายสกัดดีเอ็นเอชนิด Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1)
- สารละลายสกัดดีเอ็นเอชนิด 10% CTAB
- สารละลายสกัดดีเอ็นเอชนิด Isopropanol
- สารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ TE buffer
- สารละลายสกัดดีเอ็นเอชนิด RNase A
- ไพรเมอร์ (Primer)
- จีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ชนิด *Taq* PCR buffer
- Deoxynucleotides (dNTPs: dATP dTTP dGTP dCTP)
- *Taq* DNA polymerase
- สีย้อมดีเอ็นเอ
- GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- GeneRuler 100 kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- น้ำกลั่นปราศจากไอออน
- สารที่ใช้เตรียมอะกาโรสเจล (Agarose gel)
- สารละลายบัฟเฟอร์อิเล็กโทรโฟเรซิส 0.5X TBE buffer
- สารละลายบัฟเฟอร์อิเล็กโทรโฟเรซิส 1X TBE buffer
- สารละลายบัฟเฟอร์อิเล็กโทรโฟเรซิส 10X TBE buffer
- กรดบอริก (boric acid)
- ทริสเบส (Tris base-)

3.3 อุปกรณ์

- เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้ความดัน (autoclave)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler หรือ PCR machine)
- เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์ (ต่อ)

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometers)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (water distriller)
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (bottle)
- หลอดพลาสติกไครโอ (cryotube)
- กล่องเก็บความเย็น (cryo box)
- ไมโครปิเปตทิปปลายตัด (micropipette tip)
- จานแก้ว (petri dish)
- กรรไกรตัดกิ่งไม้ (secateurs)
- กระบอกตวง (cylinder)
- ไมโครปิเปต (micropipettes)
- ช้อนตักสาร (spatula)
- ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen container)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ไมโครเวฟ (microwave oven)
- ถุงมือกันความร้อน (heat resistant gloves)
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซสเซียส
- ไซริ้ง (syringe)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- บีกเกอร์ (beaker)
- มีดผ่าตัด (knife)
- กรรไกร (scissors)
- ปากคีบ (forceps)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
- ทิปขนาดต่างๆ (tip)
- แล็คสำหรับวางอุปกรณ์ (racks)
- กระบอกฉีดน้ำ (foggy spray)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์ (ต่อ)

- โกร่ง
- หลอดขนาดบรรจุขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
- เครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator
- กระดาษทิชชู่ (tissue paper)
- พาราฟิล์ม (parafilm)
- เครื่องวัดเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier calipers)

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน

3.4.1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด

วิธีที่ 1 นำเมล็ดชิงชันมาล้างผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที 1 ครั้ง และแล้วจึงย้ายชิ้นส่วนเมล็ดลงในน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของสารละลาย antibiotic ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วิธีที่ 2 นำเมล็ดชิงชันมาล้างผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที 1 ครั้ง และแล้วจึงย้ายชิ้นส่วนเมล็ดลงในน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 0.08 กรัม สารละลาย antibiotic ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วิธีที่ 3 นำเมล็ดชิงชันมาล้างผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที 1 ครั้ง และแล้วจึงย้ายชิ้นส่วนเมล็ดลงในน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาณ 0.16 กรัม สารละลาย antibiotic ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด

$$\text{ร้อยละการรอดจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่รอดจากการปนเปื้อน}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.1)$$

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ปนเปื้อน}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.2)$$

3.4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ

วิธีที่ 1 นำชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชันมาผ่านน้ำประปา 15 นาที เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกเบื้องต้นก่อน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนข้อลงในสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วยน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 1 ครั้ง แล้วจึงย้ายชิ้นส่วนข้อลงในน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีส่วนผสมสารละลาย antibiotic ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 3 หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วิธีที่ 2 นำชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชันมาผ่านน้ำประปา 15 นาที เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกเบื้องต้นก่อน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนข้อลงในสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วยน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 1 ครั้ง แล้วจึงย้ายชิ้นส่วนข้อลงในน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 3 หยด เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างออกด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง หลังจากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.08 กรัม สารละลาย antibiotic ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 3 หยด เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วิธีที่ 3 นำชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชันมาผ่านน้ำประปา 15 นาที เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกเบื้องต้นก่อน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนข้อลงในสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วยน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 1 ครั้ง แล้วจึงย้ายชิ้นส่วนข้อลงในน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 3 หยด เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างออกด้วยน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 1 ครั้ง หลังจากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.08 กรัม สารละลาย antibiotic ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย cefotaxime ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 3 หยด เขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันบันทึกผลการทดลองหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ

$$\text{ร้อยละการรอดจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนข้อที่รอดจากการปนเปื้อน}}{\text{จำนวนข้อทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนข้อที่ปนเปื้อน}}{\text{จำนวนข้อทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.4.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญของชิ้นส่วนเมล็ด

การศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญของชิ้นส่วนเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และ WPM (Lloyd and McCown, 1981) ที่ความเข้มข้น ½ และ 1 เท่าของอาหารสังเคราะห์สูตรปกติ ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร คริสตัลเจล 8.0 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างได้ 5.8 ± 0.02 และสภาวะการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำซ้ำละ 10 เมล็ด

$$\text{ร้อยละการงอกของเมล็ด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.4.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมในการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์

3.4.3.1 ชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมใน การชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชันบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร คริสตัลเจล 8.0 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างได้ 5.8 ± 0.02 และสภาวะการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 15 นาที และประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินที่แตกต่างกัน ได้แก่ BAP, *m*T และ GA_3 ความเข้มข้น 1 2 และ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการย้ายชิ้นส่วนพืช (Subculture) ทุก 4 สัปดาห์ และบันทึกผลทุกๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนข้อที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนข้อทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{ความยาวยอดเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมความยาวยอดที่เกิดจากข้อ}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \quad (3.7)$$

3.4.3.2 ชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติ

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมใน การชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชันบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ครีสตัลเจล 8.0 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างได้ 5.8 ± 0.02 และสภาวะการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 15 นาที และประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินที่แตกต่างกัน ได้แก่ BAP, *m*T และ GA_3 ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการย้ายชิ้นส่วนพืช (Subculture) ทุก 4 สัปดาห์ และบันทึกผลทุกๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนข้อที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนข้อทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\text{ความยาวยอดเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของความยาวยอดที่เกิดจากข้อ}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \quad (3.9)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมในการชักนำชิ้นส่วนยอดให้เกิดรากอย่างสมบูรณ์

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมในการชักนำยอดให้เกิดราก โดยคัดเลือกยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ที่เกิดจากข้อที่เกิดจากเมล็ดและข้อจากต้นเริ่มต้น เพาะเลี้ยงลงในอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร คริสตัลเจล 8.0 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างได้ 5.8 ± 0.02 และสภาวะการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ IAA และ IBA ความเข้มข้น 0 0.5 0.75 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการย้ายชิ้นส่วนพืช (Subculture) ทุก 4 สัปดาห์ และบันทึกผลทุกๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

$$\text{ร้อยละการเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.10)$$

$$\text{จำนวนรากเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนรากที่เกิดจากยอด}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \qquad (3.11)$$

$$\text{ความยาวรากเฉลี่ย} = \frac{\text{ผลรวมของความยาวราก}}{\text{จำนวนรากที่เกิดทั้งหมด}} \qquad (3.12)$$

3.4.5 การปรับสภาพต้นอ่อนชิงชันออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก

ขั้นตอนการนำต้นใหม่ออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกก็เป็นสิ่งสำคัญเช่นเดียวกัน โดยคัดเลือกต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีลักษณะของต้นและรากที่สมบูรณ์ แข็งแรง นำมาล้างวุ้นที่ติดมากับตัวอย่างพืชจากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงออกให้หมด จากนั้นนำตัวอย่างมาแช่ในน้ำผสมยากันราความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งวัสดุที่ใช้ในการเริ่มต้นการออกปลูกคือ ดิน และพีทมอสกับเพอร์ไลท์ ผสมในอัตราส่วน 1:1 และทำการคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรู จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องที่ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงและที่มืด 8 ชั่วโมงต่อวัน โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส รดด้วยน้ำที่ผสมอาหารสังเคราะห์สูตร 1/8 MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการเปิดถุงพลาสติกออกและย้ายต้นอ่อนมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง รดน้ำตามปกติ จากนั้นเก็บผลการทดลองเมื่อครบ 4 สัปดาห์ โดยออกปลูกในแต่ละวัสดุปลูก คือดิน 10 ต้น และพีทมอสกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพอร์ไลท์ 10 ต้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 29

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.13)$$

3.4.6 การศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม

3.4.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนต้นเริ่มต้นในธรรมมชาติของต้นชิงชัน และสุ่มตัวอย่างพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นชิงชันในหลอดทดลองได้แก่ ใบอ่อนต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ นำมาอย่างละ 1 ตัวอย่าง และใบอ่อนต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงวิธีจาก Doyle และ Doyle (1987) โดยนำใบอ่อนจากต้นเริ่มต้นและใบอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาล้างทำความสะอาด ตากให้แห้ง แล้วนำตัวอย่างใบอ่อนชิงชันตัดเป็นชิ้นเล็กๆ พอประมาณ ใส่ในโกร่งที่ผ่านการแช่เย็น ทำการบดตัวอย่างใบให้ละเอียด จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอชนิด 2XCTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร β-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วตักตัวอย่างใบที่บดไว้ใส่ลงในหลอดทดลอง พันหลอดด้วยพาราฟิล์ม และกลับหลอดไปมา นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุกๆ 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที และเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอกอลฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พร้อมทั้งกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติมสารละลาย CTAB เข้มข้นร้อยละ 10 ในโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอกอลฮอล์ (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พร้อมกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อีกครั้งเพื่อทำให้ดีเอ็นเอสะอาดมากขึ้น เมื่อครบเวลาทำการดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติมไอโซโพรพานอลที่เย็นจัดลงในหลอดโดยปริมาณ 1 : 1 ของส่วนใสที่ดูดได้ เช่น ตัวอย่างพืช 500 ไมโครลิตร : ไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร เป็นต้น แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอส่วนล่างไว้ และคว่ำหลอดเพื่อซับน้ำที่ค้างอยู่ออก จากนั้นเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัดปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง พร้อมคว่ำหลอดซับบนกระดาษทิชชูให้แห้ง แล้วนำหลอดที่มีดีเอ็นเอตากให้แห้งในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม Tris-EDTA (TE) buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.4.6.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

จากนั้นทำการตรวจสอบผลคุณภาพ และการวัดปริมาณดีเอ็นเอ ได้โดยการตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส และคำนวณหาความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เริ่มจากการเตรียมอะกาโรสเจลให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการใช้ เช่น เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำการชั่งอะกาโรสเจล 0.4 กรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายให้สารละลายใสในเครื่องไมโครเวฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเทใส่ถาดเจล (gel tray) พร้อมหวี (combs) ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว และนำเจลมาใส่ใน chamber เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสที่เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5XTBE จนท่วมเจล จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอหยอดลงในหลุมเจล โดยให้ตัวอย่างดีเอ็นเอปรมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 3X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เทียบกับ DNA marker ขนาด 1 kb ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการตั้งค่าเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เปิดเครื่องแล้วรอจนครบเวลาจึงนำเจลไปแช่ในเอธิเดียมโบรไมด์ในที่มืด 10 นาที จากนั้นย้ายลงไปแช่ในน้ำกลั่นอีก 10 นาที เมื่อครบเวลานำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation System พร้อมบันทึกผล

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำโดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 3 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 297 ไมโครลิตร (dilution factor คือ 100) จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ดังสมการที่ (3.14) และวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอใช้อัตราของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 คำนวนณดังสมการที่ (3.15)

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/µl)} = OD_{260} \times 100 \text{ ng/ml} \times \text{dilution factor} \quad (3.14)$$

$$\text{ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ (ng/µl)} = \frac{\mathbf{OD260}}{\mathbf{OD280}} \quad (3.15)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงรหัสตัวอย่าง และแหล่งที่มาของใบอ่อนชิงชัน ที่นำมาวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

ตัวอย่างใบอ่อนต้นชิงชัน	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา
ใบอ่อนชิงชันจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติ	MP-Do	ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 4 สัปดาห์	Do4	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 8 สัปดาห์	Do8	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 12 สัปดาห์	Do12	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 1	Do12-1	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 2	Do12-2	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 3	Do12-3	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 4	Do12-4	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 5	Do12-5	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 6	Do12-6	ห้องปฏิบัติการ
ใบอ่อนชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 7	Do12-7	ห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ 1/ ต้นชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ จากการสุ่มตัวอย่าง
2/ ต้นชิงชันเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 1 ถึง 7 ได้ทำการสุ่มตัวอย่างพืชที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

3.4.6.3 การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat : ISSR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อที่ 3.4.5.1 รหัสตัวอย่าง (MP-Do Do4 Do8 Do12 และ Do12-1 ถึง Do12-7) มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814 UBC824 UBC825 UBC834 UBC836 UBC844 UBC847 UBC855 และ UBC880 แสดงดังตารางที่ 3.2 โดยองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงดังตารางที่ 3.3 และสภาวะที่ใช้ในขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3.4 และ 3.5 โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของใบอ่อนต้นเริ่มต้นในธรรมมชาติของต้นชิงชัน และสุ่มตัวอย่างพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นชิงชันในหลอดทดลองได้แก่ ใบอ่อนต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ (Do4 Do8 และ Do12) นำมาอย่างละ 1 ตัวอย่าง ที่ทำการสกัดและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วนำมาตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชรหัส Do4 Do8 และ Do12 ไม่มีความแตกต่างกัน จึงสุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (Do12-1 ถึง Do12-7) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์อีกครั้ง

ตารางที่ 3.2 แสดงชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Ahmad. *et al.* 2020)

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
1	UBC814	5’-CTCTCTCTCTCTCTCTA-3’
2	UBC824	5’-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3’
3	UBC825	5’-ACACACACACACACACT-3’
4	UBC834	5’-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3’
5	UBC836	5’-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3’
6	UBC844	5’-CTCTCTCTCTCTCTCTRC-3’
7	UBC847	5’-CACACACACACACACARC-3’
8	UBC855	5’-ACACACACACACACACYT-3’
9	UBC880	5’-GGAGAGGAGAGGAGA-3’

ตารางที่ 3.3 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์สำหรับ 1 ตัวอย่าง (Ahmad. *et al.* 2020)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Template DNA	200 ng	100 ng	1
Standard *Taq* Reaction Buffer	10X	1X	2.5
dNTPs	100 mM	1.25 mM	4
Taq Polymerase	5000U	1U	0.2
Primer	100 pmol	10 pmol	1
H_2O			16.3
ปริมาตรรวม			25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 แสดงสภาวะในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 และ UBC844 (Ahmad. *et al.* 2020)

เงื่อนไขปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	1 นาที	40 รอบ
Annealing	50	1 นาที	
Extension	72	2 นาที	
Final Extension	72	10 นาที	1

ตารางที่ 3.5 แสดงสภาวะในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 และ UBC880 (Ahmad. *et al.* 2020)

เงื่อนไขปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	1 นาที	40 รอบ
Annealing	45	1 นาที	
Extension	72	2 นาที	
Final Extension	72	10 นาที	1

หลังจากนั้นจึงนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 3X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ด้วยแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 2 ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (VC 100 bp) จากนั้นทำการตั้งค่าเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เปิดเครื่องแล้วรอจนครบเวลาจึงนำเจลไปแช่ในเอธิเดียมโบรไมด์ในที่มืด 10 นาที จากนั้นย้ายลงไปแช่ในน้ำกลั่นอีก 10 นาที เมื่อครบเวลานำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation

$$\text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}} \text{ X } 100 \qquad (3.16)$$

$$\text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}} \text{ X } 100 \qquad (3.17)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้นชิงชัน

4.1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนเมล็ดของต้นชิงชัน โดยทำการคัดเลือกชิ้นส่วนเมล็ดที่สมบูรณ์ และไม่แก่จนเกินไป เริ่มต้นการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) ความเข้มข้นร้อยละ 1 หลังจากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 และ 0.2 ร่วมกับ antibiotic cefotaxime และ Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที สารทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นเป็นสารที่สามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยที่ไม่ส่งผลเสียต่อชิ้นส่วนเมล็ดที่นำมาทำการทดลอง หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 และ 0.1 มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 40 และ 60 ตามลำดับ ซึ่งมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย จากผลการทดลองข้างต้นจะพบว่าวิธีที่ 2 มีร้อยละการรอดชีวิตสูงกว่าวิธีที่ 1 ดังนั้นจึงได้มาพัฒนาเป็นวิธีที่ 3 โดยใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 พบว่าชิ้นส่วนเมล็ดมีร้อยละการรอดชีวิตสูงสุดที่ร้อยละ 100 โดยไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	จำนวนเมล็ด	ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์	ร้อยละการรอดชีวิต
วิธีที่ 1	30	18 (60)	12 (40)
วิธีที่ 2	30	12 (40)	18 (60)
วิธีที่ 3	30	0	30 (100)

หมายเหตุ [1]/ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ

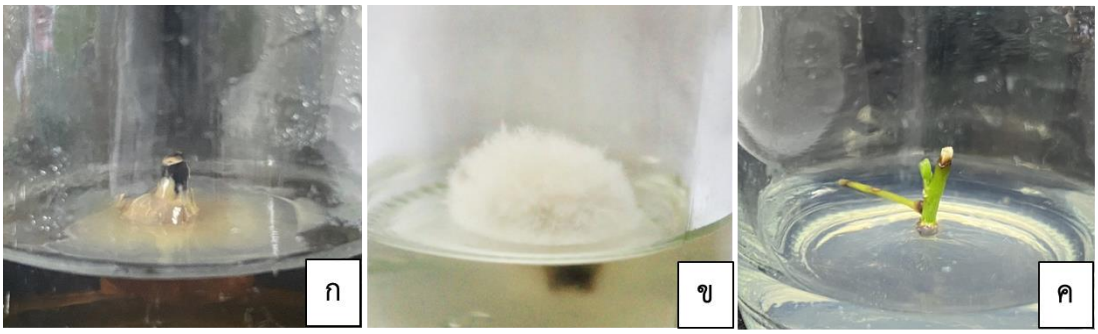
จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน โดยทำการคัดเลือกชิ้นส่วนข้อความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร ที่มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่เกิดโรค และไม่แก่จนเกินไปมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 2 สัปดาห์ จากการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีที่ 1 ที่ประกอบด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช (carbendazim) จากนั้นย้ายไปยังน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของ antibiotic cefotaxime และ Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นความเข้มข้นร้อยละ 0.1 มีร้อยละการปนเปื้อนร้อยละ 80 ซึ่งปนเปื้อนทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะต่อการนำมาฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ ทำให้มีการพัฒนาจากวิธีที่ 1 เป็นวิธีที่ 2 และ 3 โดยวิธีที่ 2 มีการเพิ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 และย้ายไปยังน้ำปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับ antibiotic cefotaxime และ Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่าร้อยละการปนเปื้อนเท่ากับ 30 ซึ่งยังคงมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในข้อท่อลำเลียงของพืช ที่ไหลออกมาสู่อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง แสดงดังรูปที่ 4.1 ทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 70 ส่วนวิธีที่ 3 นั้น มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นความเข้มข้นร้อยละ 15 และเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับสารละลาย antibiotic cefotaxime และ Plant Preservative Mixture (PPM) เป็นความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เจากการทดลองพบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด เนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และมีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 100 แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยที่ชิ้นส่วนข้อยังมีลักษณะที่สมบูรณ์แข็งแรงและมีสีเขียวสด บริเวณที่มีสีน้ำตาลที่เกิดจากการฟอกฆ่าเชื้อ มีพื้นที่ไม่เกิน 1 ใน 3 ของชิ้นส่วนข้อ ไม่ดำหรือตาย สามารถนำไปชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตไปเป็นยอดที่สมบูรณ์ต่อไปได้

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	จำนวนข้อ	ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์	ร้อยละการรอดชีวิต
วิธีที่ 1	30	24 (80)	6 (20)
วิธีที่ 2	30	9 (30)	11 (70)
วิธีที่ 3	30	0	30 (100)

หมายเหตุ [1]/ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชันจากการฟอกฆ่าเชื้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (ข) ปนเปื้อนเชื้อรา และ (ค) ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

4.2 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญของชิ้นส่วนเมล็ด

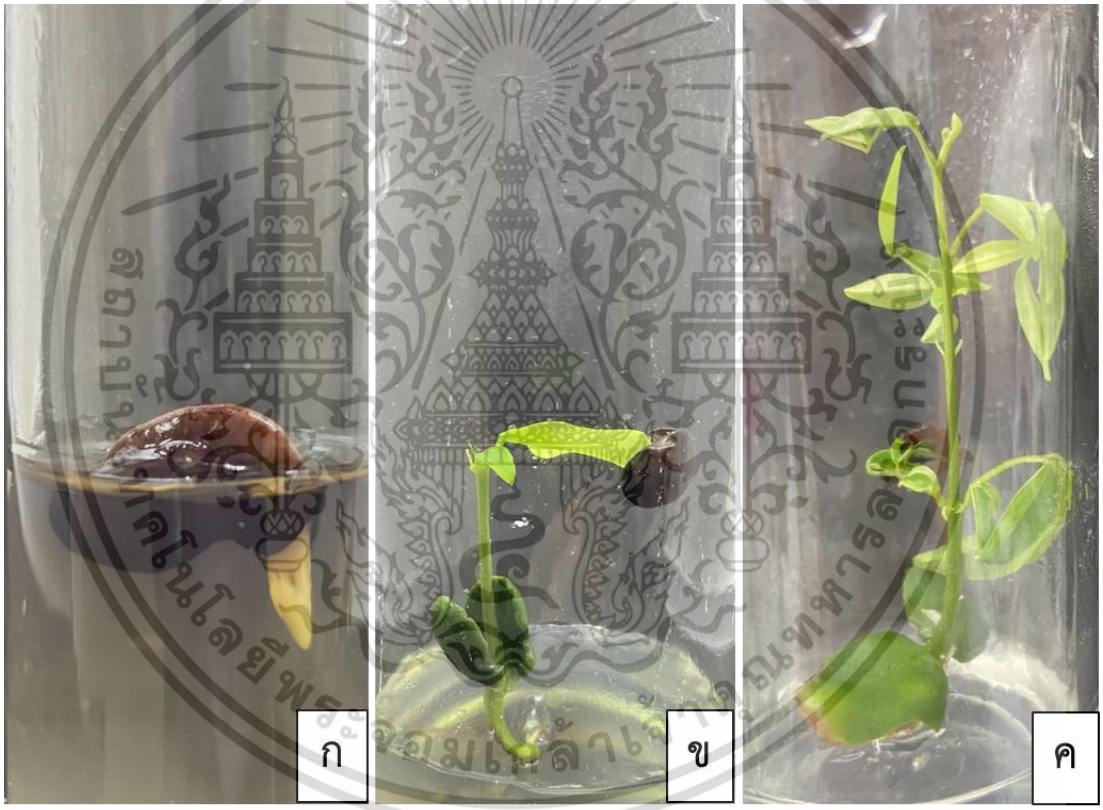
จากการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเมล็ดของต้นชิงชัน ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS MS ½ WPM และ WPM เมื่อเวลาภายไป 1 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ทุกสูตร เริ่มมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงจากเดิม โดยเมล็ดมีความพองเต่งและอิ่มน้ำ สามารถสังเกตเห็นการเจริญเติบโตและการพัฒนาของยอดใหม่จากทุกสูตรอาหาร ที่เริ่มมีการงอกของรากแรกเกิด (radical) ซึ่งเป็นส่วนของเอ็มบริโอภายในเมล็ดที่งอกลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงตามแรงโน้มถ่วงโลก โดยจะทำการเก็บผลร้อยละการงอกต่อเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดครบ 2 สัปดาห์ สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า เมื่อมีรากงอกออกมาจากเมล็ดเพียงเล็กน้อย จะถือว่าเมล็ดสามารถพัฒนาต่อไปได้ โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดในอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS เมื่อครบ 2 สัปดาห์ ให้ร้อยละการงอกของเมล็ดสูงที่สุดเท่ากับ 100 แสดงดังตารางที่ 4.3 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้เปลือกหุ้มใบเลี้ยงหลุดออกและลำต้นยืดตรง สมบูรณ์ แข็งแรง สามารถนำไปทำการทดลองเพื่อชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์ต่อไปได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (ค) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Koné. *et al.* (2015) ได้อธิบายไว้ว่าการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนเมล็ดโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดต่อการเจริญและพัฒนาเป็นยอดใหม่โดยไม่จำเป็นต้องใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และในส่วนของการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร WPM พบว่าต้นอ่อนมีลักษณะของลำต้นสั้น ทำให้ตำแหน่งข้อมีจำนวนน้อย จึงเป็นสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำเมล็ดให้เจริญเป็นต้นอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเมล็ด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS และ WPM ที่มีปริมาณแตกต่างกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ชนิดอาหารสังเคราะห์	จำนวนเมล็ด	ร้อยละการงอกของเมล็ด
½ MS	30	30 (100)
MS	30	24 (80)
½ WPM	30	15 (50)
WPM	30	12 (40)

หมายเหตุ [1]/ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะการชักนำให้เกิดต้นอ่อนชิ้นส่วนเมล็ดของต้นชิงชัน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ WPM ที่มีชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์สูตรที่แตกต่างกัน

(ก) อาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ข) อาหารสังเคราะห์สูตร ½ WPM เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ค) ลักษณะต้นอ่อนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS นำไปใช้ในการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อที่เกิดจากเมล็ด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์

4.3.1 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ด

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์จากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชัน โดยการนำต้นอ่อนชิงชันที่เจริญจากเมล็ดมีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ทำการตัดเอาเฉพาะชิ้นส่วนข้อที่แข็งแรงเท่านั้น มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP *m*T และ GA_3 ที่ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกผลทุกๆ 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง การชักนำให้เกิดยอดด้วยการใช้ GA_3 และ BAP ให้ความยาวของยอดที่สูงกว่าการใช้ *m*T ในทุกความเข้มข้น แสดงดังตารางที่ 4.4 โดยลักษณะยอดที่เกิดจากการใช้ BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 100 และให้ความยาวของยอดเฉลี่ยเท่ากับ 9.91 มิลลิเมตร มีลักษณะยอดตั้งตรง มีสีเขียว ใบมีการแผ่ขยายออก และในส่วนของการใช้ GA_3 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 100 และให้ความยาวของยอดเฉลี่ยเท่ากับ 16.02 มิลลิเมตร แต่ลักษณะยอดมีสีเขียวอ่อนอมเหลือง ผอมบาง ไม่แข็งแรง แสดงดังรูปที่ 4.5 (ก-ง) ซึ่งยอดที่เกิดจากการชักนำด้วยชิ้นส่วนข้อเพียง 4 สัปดาห์ ยังมีลักษณะที่ไม่เหมาะสมต่อการนำไปทดลองให้ขั้นต่อๆไป จึงทำการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องอีก 4 สัปดาห์

หลังจากการทดลองการชักนำให้เกิดยอดผ่านไปเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าความยาวของยอดที่เกิดจากการใช้ GA_3 และ BAP ยังคงมีความยาวของยอดที่สูงกว่าการใช้ *m*T โดยยอดที่เกิดจากการใช้ GA_3 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวของยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 36.02 มิลลิเมตร แต่เมื่อยิ่งมีการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่นานมากขึ้น ลักษณะลำต้นที่ได้ยิ่งไม่สมบูรณ์ เรียวเล็ก ไม่แข็งแรง ไม่มีใบเกิดขึ้นและมีลำต้นมีสีเขียวอ่อนอมเหลือง ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Fráguas. *et al.* (2004) อธิบายไว้ว่าลักษณะยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตัวอย่างพืชบนอาหารที่ประกอบด้วย GA_3 ถึงแม้จะมีความยาวยอดที่ดีที่สุด แต่ยอดที่เกิดขึ้นนั้นไม่สมบูรณ์ ผอมบาง ปลายยอดมีลักษณะคล้ายกับการไหม้เกิดขึ้น และในส่วนของการใช้ BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวของยอดเฉลี่ยเท่ากับ 26.16 มิลลิเมตร โดยลักษณะยอดสมบูรณ์แข็งแรง ลำต้นยืดตรง ใบกางแผ่ออกกว้างชัดเจน ยอดที่เกิดขึ้นมีสีเขียวสด ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Vipranarayana. *et al.* (2012) อธิบายไว้ว่า BAP มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดที่ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโทไคนินชนิดอื่นๆ และถึงแม้ว่าจะมีความยาวเฉลี่ยที่ต่ำกว่าการใช้ GA_3 อย่างไรก็ตามลักษณะยอดที่ทำการชักนำโดยการใช้ BAP ก็มีลักษณะที่ดีและเหนือกว่า พร้อมที่จะนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป แสดงดังรูปที่ 4.5 (จ-ซ) สำหรับการใช้ *m*T ทุกความเข้มข้น มีลักษณะใบแผ่ขยายออก ใบไม่ร่วง เกิดแคลลัสบริเวณฐานจำนวนมาก แต่ยอดที่เกิดขึ้นค่อนข้างสั้น มีความฉ่ำน้ำ ซึ่งเป็นลักษณะยอดที่ไม่ดี จึงได้ทำการเลือกใช้ BAP เป็นชนิดที่ดีที่สุดเพียงเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

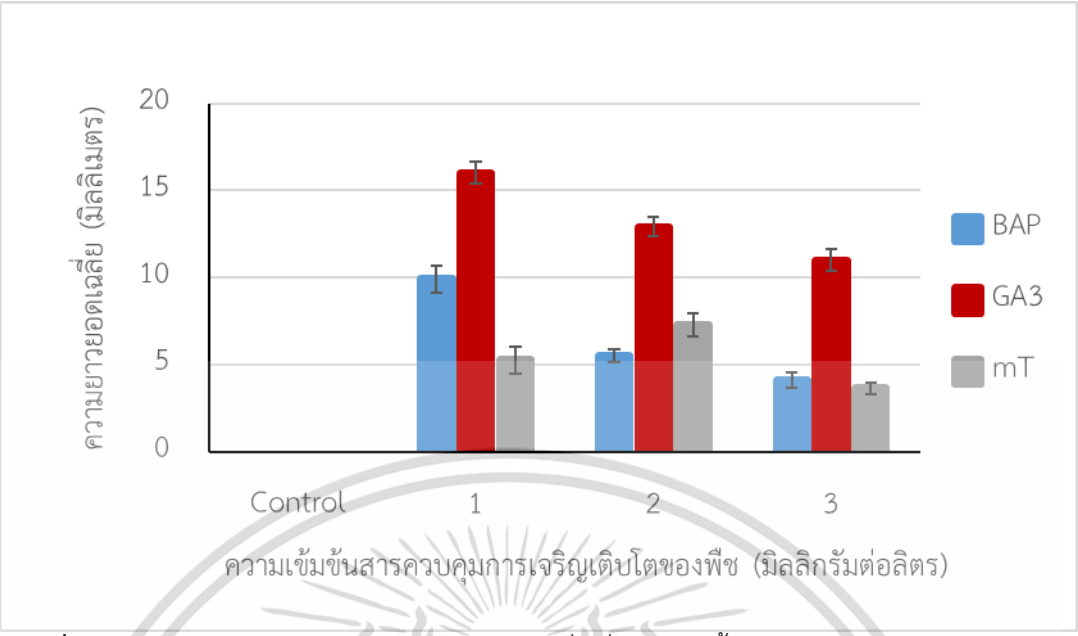
ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนข้อ	ร้อยละการเกิดยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	Control		15	0	$0.00^{i} \pm 0.00$
4 สัปดาห์	BAP	1.0	15	100	$9.91^{d} \pm 0.77$
		2.0	15	66.67	$5.52^{f} \pm 0.36$
		3.0	15	53.33	$4.13^{g} \pm 0.45$
	GA_3	1.0	15	100	$16.02^{a} \pm 0.61$
		2.0	15	86.67	$12.90^{b} \pm 0.56$
		3.0	15	100	$10.99^{c} \pm 0.61$
	*m*T	1.0	15	60	$5.26^{f} \pm 0.78$
		2.0	15	40	$7.30^{e} \pm 0.66$
		3.0	15	20	$3.63^{h} \pm 0.34$
	Control		15	20	$3.99^{i} \pm 0.47$
8 สัปดาห์	BAP	1.0	15	100	$26.16^{b} \pm 0.83$
		2.0	15	66.67	$16.30^{e} \pm 0.85$
		3.0	15	66.67	$11.29^{f} \pm 0.93$
	GA_3	1.0	15	100	$36.02^{a} \pm 0.61$
		2.0	15	86.67	$22.90^{c} \pm 0.54$
		3.0	15	100	$20.99^{d} \pm 0.61$
	*m*T	1.0	15	60	$8.47^{g} \pm 0.66$
		2.0	15	60	$11.17^{f} \pm 0.79$
		3.0	15	40	$6.15^{h} \pm 0.51$

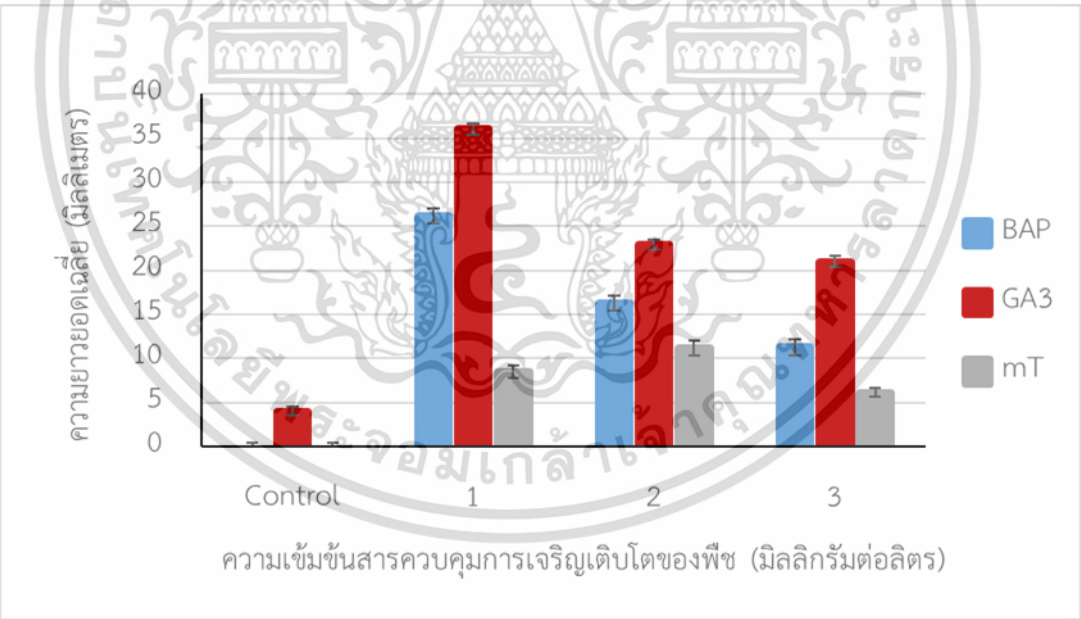
หมายเหตุ [1]/ ค่าเฉลี่ย ± SE ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

[2]/ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's โดยวิเคราะห์แยกกันระหว่าง 4 และ 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

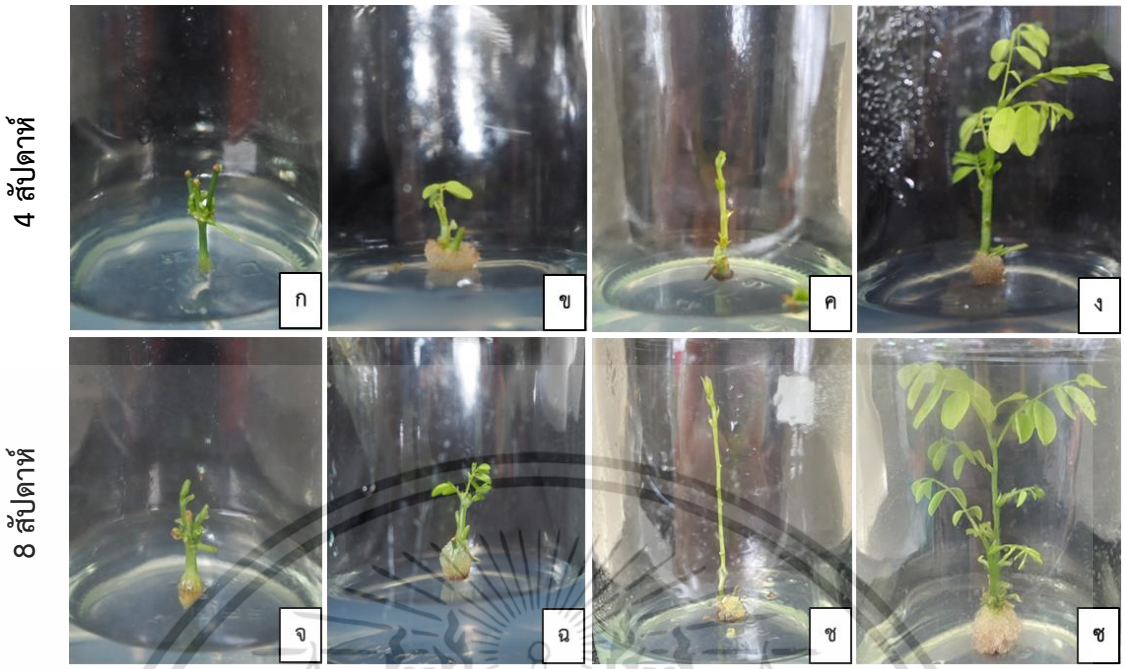


รูปที่ 4.3 กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.4 กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์
(ก-จ) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต
(ข-ฉ) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค-ช) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย GA_3 ความ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ง-ซ) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3.2 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นของต้นชิงชันให้เกิดยอด โดยทำการคัดเลือกข้อที่มีความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร และเป็นชิ้นส่วนข้อที่ไม่แก่หรือไม่อ่อนจนเกินไป ทำการฟอกฆ่าเชื้อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BAP *m*T และ GA_3 ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงและบันทึกผลการทดลองทุก 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าในการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง ความยาวของยอดที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชัน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าการชักนำให้เกิดยอดด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด GA_3 และ BAP ให้ความยาวของยอดที่สูงกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชชนิด *m*T โดยการใช้ BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 86.67 และ 100 และความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 18.23 และ 21.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งลักษณะยอดที่เกิดจากการใช้ BAP มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง ลำต้นตั้งตรง มีสีเขียวและใบกางแผ่ออกกว้างชัดเจน และถึงแม้การใช้ GA_3 จะมีร้อยละการเกิดยอด และความยาวยอดเฉลี่ยที่สูงกว่าการใช้ BAP แต่ลักษณะยอดที่ปรากฏจากการใช้ GA_3 นั้น มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์แข็งแรง ยอดที่ได้ผอมบาง ไม่มีใบเกิดขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.7 และสำหรับชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด *m*T มีร้อยละการเจริญเติบโตของยอดและความยาวของยอดเฉลี่ยต่ำในทุกความเข้มข้น และนอกจากนี้ยังมีการเกิดของแคลลัสจับกันหลวมๆ ที่ฐานข้อ โดยการทดลอง 4 สัปดาห์แรกยอดที่เกิดยังไม่เหมาะสมต่อการนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป จึงทำการทดลองต่อไปอีก 4 สัปดาห์

หลังจากการทดลองการชักนำให้เกิดยอด ผ่านไปเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ความยาวของยอดที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าความยาวของยอดที่เกิดจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด GA_3 และ BAP ยังคงมีความยาวของยอดที่สูงกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด *m*T แสดงดังตารางที่ 4.6 โดยการใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเจริญเติบโตของยอดเท่ากับ 100 และมีความยาวของยอดเฉลี่ยเท่ากับ 27.26 มิลลิเมตร ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่สมบูรณ์แข็งแรง ใบกางแผ่ออกกว้างชัดเจน และยอดมีสีเขียว ในส่วนของการใช้ GA_3 พบว่าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 41.25 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามแม้ว่าการใช้ GA_3 จะให้ความยาวยอดสูงที่สุด แต่ลักษณะยอดที่ปรากฏนั้น มีลักษณะที่ไม่แข็งแรง ลำต้นผอมบาง ไม่มีการพัฒนาของใบ ปลายยอดมีสีเขียวอ่อนอมน้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้ยอดเกิดการไหม้ และโอกาสรอดชีวิตต่ำ ไม่เหมาะสมต่อการนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป แสดงดังรูปที่ 4.9 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ พชร (2022) อธิบายไว้ว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย GA_3 ถึงแม้จะให้ความยาวยอดที่มากที่สุด แต่พบว่ายอดที่ได้มีลักษณะที่ผอมบาง สีเขียวอ่อน และปลายยอดมีอาการไหม้เกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้น และในส่วนของการใช้ *m*T พบว่ามีความยาวยอดเฉลี่ยต่ำในทุกความเข้มข้น โดยมีลักษณะยอดสั้น แคระแกร็น ไม่ยืดยาว และมีลักษณะยอดและใบที่ฉ่ำน้ำ เปราะ กรอบ ซึ่งทำให้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ไม่เหมาะสมอย่างมากต้องการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของต้นชิงชัน จึงได้ทำการเลือกให้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BAP เพียงชนิดเดียวในการชักนำยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

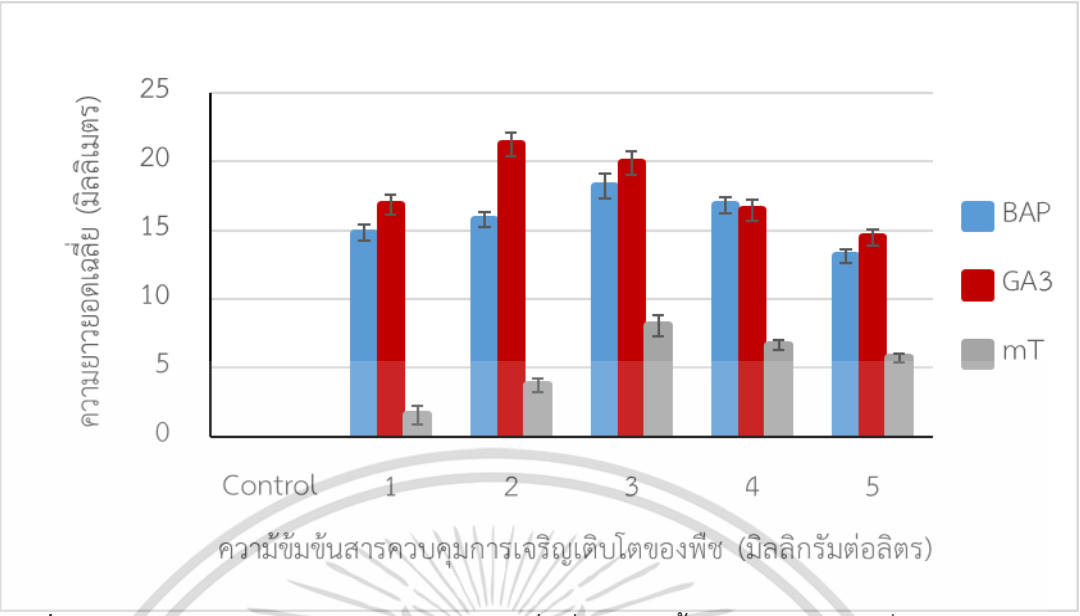
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนข้อ	ร้อยละการเกิดยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Control		15	0	$0.00^{m} \pm 0.00$
BAP	1.0	15	66.67	$14.82^{f} \pm 0.55$
	2.0	15	53.33	$15.77^{e} \pm 0.50$
	3.0	15	86.67	$18.23^{c} \pm 0.92$
	4.0	15	60	$16.84^{d} \pm 0.58$
	5.0	15	66.67	$13.12^{g} \pm 0.50$
GA_3	1.0	15	100	$16.85^{d} \pm 0.71$
	2.0	15	100	$21.25^{a} \pm 0.83$
	3.0	15	100	$19.90^{b} \pm 0.85$
	4.0	15	100	$16.47^{d} \pm 0.79$
	5.0	15	100	$14.49^{f} \pm 0.59$
*m*T	1.0	15	40	$3.59^{l} \pm 0.65$
	2.0	15	53.33	$3.72^{k} \pm 0.47$
	3.0	15	40	$8.06^{h} \pm 0.77$
	4.0	15	60	$6.65^{i} \pm 0.37$
	5.0	15	20	$5.71^{j} \pm 0.34$

หมายเหตุ 1/ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

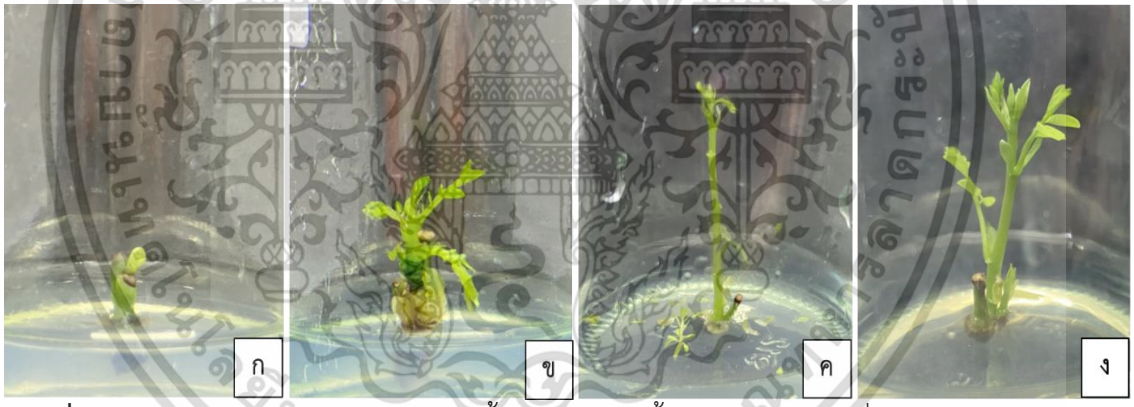
2/ ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3/ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.7 การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

(ข) *m*T ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ง) BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

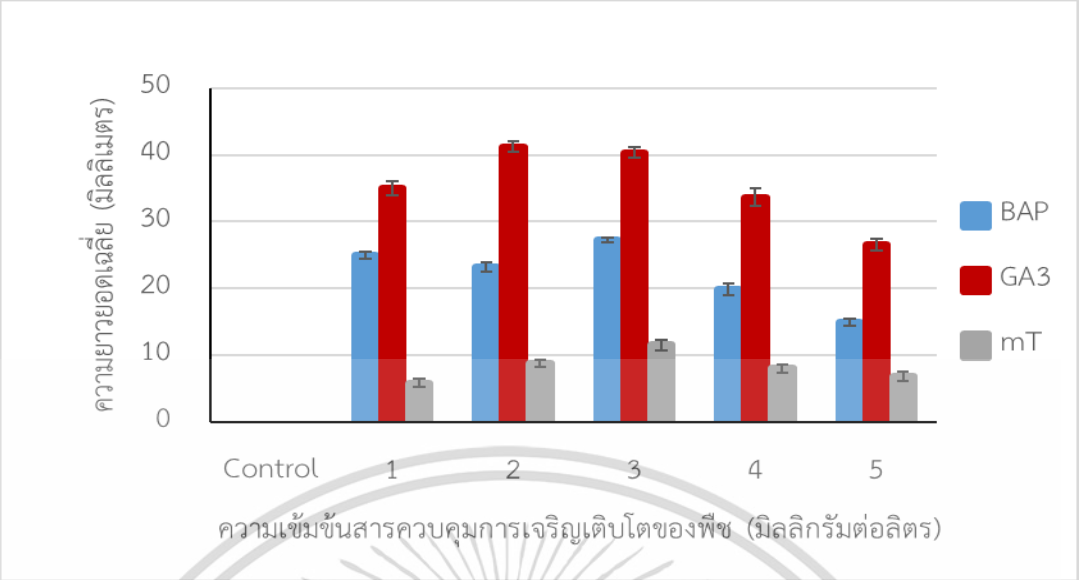
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนข้อ	ร้อยละการเกิดยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Control		15	0	0.00^{p} ± 0.00
BAP	1.0	15	86.67	24.97^{g} ± 0.54
	2.0	15	80	23.23^{h} ± 0.74
	3.0	15	100	27.26^{e} ± 0.43
	4.0	15	66.67	19.89^{i} ± 0.89
	5.0	15	80	14.97^{j} ± 0.59
GA_3	1.0	15	100	34.98^{c} ± 1.11
	2.0	15	100	41.25^{a} ± 0.83
	3.0	15	100	40.31^{b} ± 0.78
	4.0	15	100	33.68^{d} ± 1.38
	5.0	15	100	26.56^{f} ± 0.81
*m*T	1.0	15	40	5.89^{o} ± 0.60
	2.0	15	53.33	8.79^{l} ± 0.52
	3.0	15	40	11.53^{k} ± 0.82
	4.0	15	60	8.05^{m} ± 0.62
	5.0	15	20	6.86^{n} ± 0.70

หมายเหตุ [1/] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ข้อ

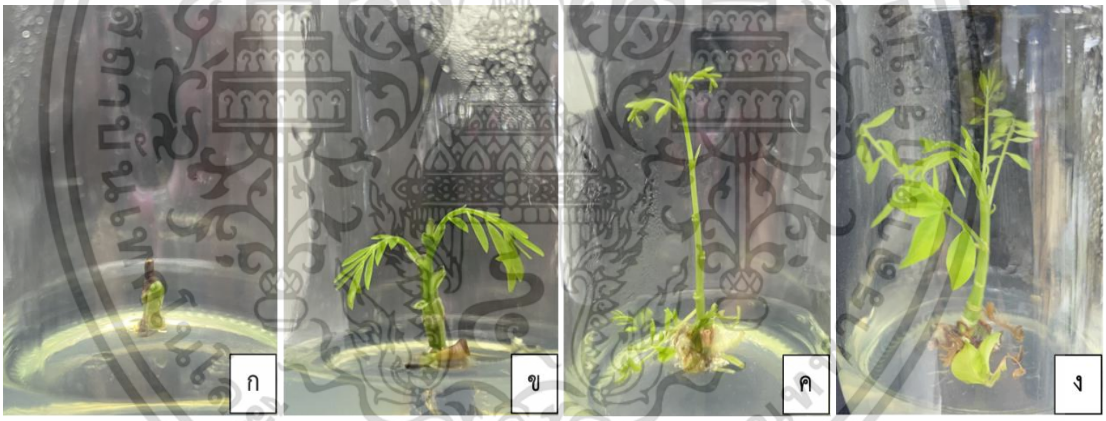
[2/] ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[3/] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.9 การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP *m*T และ GA_3 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์
(ก) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต
(ข) *m*T ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค) GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ง) BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากอย่างสมบูรณ์

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากอย่างสมบูรณ์ โดยนำชิ้นส่วนยอดที่เกิดจากเมล็ดชิงชันที่ลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองในครั้งนี้ มีการเลือกใช้ความเข้มข้นดังที่กล่าวข้างต้น เนื่องจากในช่วงระยะเวลาแรกเริ่มของการทดลอง ได้มีการใช้ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้นเพียง 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำชิ้นส่วนยอดให้เกิดรากของต้นชิงชัน เมื่อทำการเปรียบเทียบทั้งสองความเข้มข้น พบว่าการใช้ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลลัพธ์ที่ดีทั้งลักษณะของราก จำนวนราก และความยาวราก จึงทำการลดความเข้มข้นของ IAA และ IBA ลงเป็น 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองให้เห็นความชัดเจนมากยิ่งขึ้น และเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนยอดที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IBA ในทุกๆ ความเข้มข้นมีลักษณะรากที่ไม่สมบูรณ์แข็งแรง รากมีขนาดเส้นเล็กและสั้น สีของรากค่อนข้างน้ำตาลคล้ายอาการไหม้ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากที่สุดสำหรับการใช้ IBA คือ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 10.01 มิลลิเมตร จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุดอยู่ที่ 3.2 รากต่อยอด จากผลการทดลองถึงแม้จะพบการเจริญเติบโตของรากค่อยข้างมาก แต่เมื่อนำออกปลูกลงบนวัสดุปลูก พบว่าร้อยละการรอดชีวิตต่ำ ลักษณะของลำต้นที่ออกปลูกเน่าเปื่อย อาจเนื่องมาจากระบบรากไม่สมบูรณ์ส่งผลให้ต้นอ่อนไม่เกิดการพัฒนาและตายในที่สุด แสดงดังรูปที่ 4.11 (ก) แต่เมื่อใช้ IAA ในทุกความเข้มข้น พบว่าถึงจำนวนรากที่เจริญเติบโตจะน้อยกว่าการใช้ IBA แต่ลักษณะของรากที่ปรากฏค่อนข้างดี โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากที่สุดสำหรับการใช้ IAA คือความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ให้ร้อยละการเกิดรากมากที่สุดเท่ากับ 90 แสดงดังตารางที่ 4.7 และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ พบว่ามีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 31.13 มิลลิเมตร แสดงดังตารางที่ 4.8 โดยลักษณะรากที่ปรากฏคือ มีรากสมบูรณ์แข็งแรง ขนาดรากใหญ่ เกิดรากแขนงและมีรากฝอยขนาดเล็กๆ ออกมาเป็นจำนวนมาก เมื่อทำการนำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกหลอดทดลองลักณะของต้นอ่อนชิงชันมีการเจริญเติบโตที่ดี รากและลำต้นไม่เน่าเปื่อย แสดงดังรูปที่ 4.11 (ข) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Borthakur. *et al.,* (2012) อธิบายไว้ว่าเมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย IAA มีร้อยละการเกิดรากดีที่สุด เมื่อมีความเข้มข้นที่เหมาะสมไม่ต่ำหรือสูงจนเกินไป หากมีความเข้มข้นที่สูงจนเกินไปการยืดยาวของรากก็จะลดลงเช่นกัน ในขณะที่ใช้ IBA ทุกความเข้มข้นพบว่ามีร้อยละการเกิดราก และความยาวรากน้อยกว่าการใช้ IAA โดยลักษณะรากที่ปรากฏ จะมีขนาดเล็กและสั้น งอกออกมาจากลำต้น นอกจากนี้งานวิจัยของ พชร (2565) ทำการศึกษาการชักนำยอดของต้นพะยูงไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*Dalbergia cochinchinensis*) ให้เกิดรากที่สมบูรณ์ การใช้ IAA ลักษณะรากมีขนาดใหญ่แตกออกมาจากลำต้น และในแต่ละรากที่มีขนาดใหญ่ยังมีรากฝอยขนาดเล็กๆ ออกมาจำนวนมาก และรากมีลักษณะที่ยืดหยุ่นกว่ารากที่ได้จากการใช้ IBA

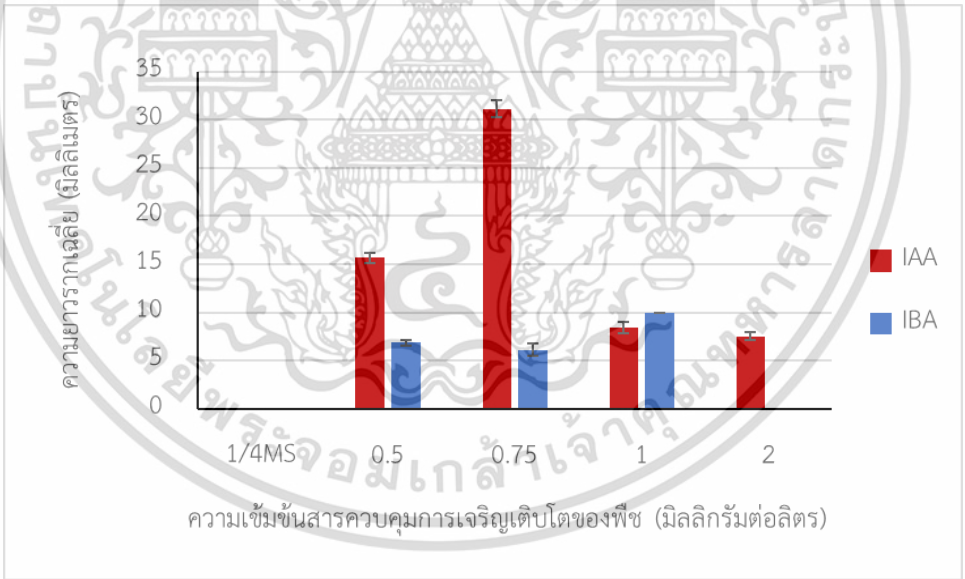
จากการศึกษาการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากอย่างสมบูรณ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นของต้นชิงชันบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีความคลายคลึงกับการชักนำยอดให้เกิดรากจากชิ้นส่วนข้อที่เกิดจากเมล็ด โดยการทดลองในครั้งนี้มีการเลือกใช้ความเข้มข้นดังที่กล่าวข้างต้น เนื่องจากในช่วงระยะเวลาแรกเริ่มของการทดลอง ได้มีการใช้ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้นเพียง 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำชิ้นส่วนยอดให้เกิดรากของต้นชิงชัน เมื่อทำการเปรียบเทียบทั้งสองความเข้มข้น พบว่าการใช้ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลลัพธ์ที่ดีทั้งลักษณะของราก จำนวนราก และความยาวราก จึงทำการลดความเข้มข้นของ IAA และ IBA ลงเป็น 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองให้เห็นความชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากที่สุดสำหรับการใช้ IAA คือความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 80 แสดงดังตารางที่ 4.9 และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ พบว่ามีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 38.03 มิลลิเมตร และมีจำนวนรากสูงที่สุดเท่ากับ 3.30 รากต่อยอด แสดงดังตารางที่ 4.10 โดยลักษณะรากที่ปรากฏคือ มีรากแก้วขนาดใหญ่และมีรากแขนงเล็กๆ ออกจำนวนมาก แสดงดังรูปที่ 4.13 (ข) ดังนั้นการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA จึงเหมาะสมต่อการชักนำรากจากยอดมากที่สุด เพราะเนื่องจากต้นอ่อนชิงชันมีร้อยละรอดชีวิตและสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อทำการนำออกปลูกด้วยวัสดุที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงร้อยละการเกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนยอด	ร้อยละการเกิดราก
¼ MS (Control)		10	0
IAA	0.5	10	60
	0.75	10	90
	1.0	10	50
	2.0	10	40
IBA	0.5	10	40
	0.75	10	70
	1.0	10	20
	2.0	10	0

หมายเหตุ 1/ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ยอด



รูปที่ 4.10 กราฟเปรียบเทียบความยาวรากเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

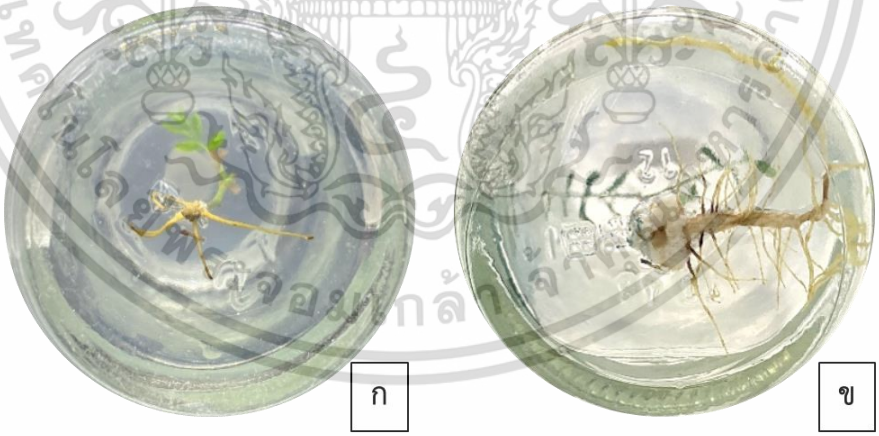
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ผลการชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนยอด	จำนวนรากเฉลี่ย/ยอด	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
¼ MS (Control)		10	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.00^{h} \pm 0.00$
IAA	0.5	10	$1.70^{b} \pm 0.95$	$15.65^{b} \pm 0.50$
	0.75	10	$1.80^{b} \pm 0.42$	$31.13^{a} \pm 0.85$
	1.0	10	$2.10^{b} \pm 0.32$	$8.41^{d} \pm 0.57$
	2.0	10	$1.70^{b} \pm 0.48$	$7.53^{e} \pm 0.37$
IBA	0.5	10	$1.10^{c} \pm 0.32$	$6.85^{f} \pm 0.65$
	0.75	10	$2.10^{b} \pm 0.32$	$6.13^{g} \pm 0.86$
	1.0	10	$3.20^{a} \pm 0.63$	$10.01^{c} \pm 0.73$
	2.0	10	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.00^{h} \pm 0.00$

หมายเหตุ [1]/ ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงจากการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ยอด

[2]/ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.11 การชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากเมล็ดต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหาสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

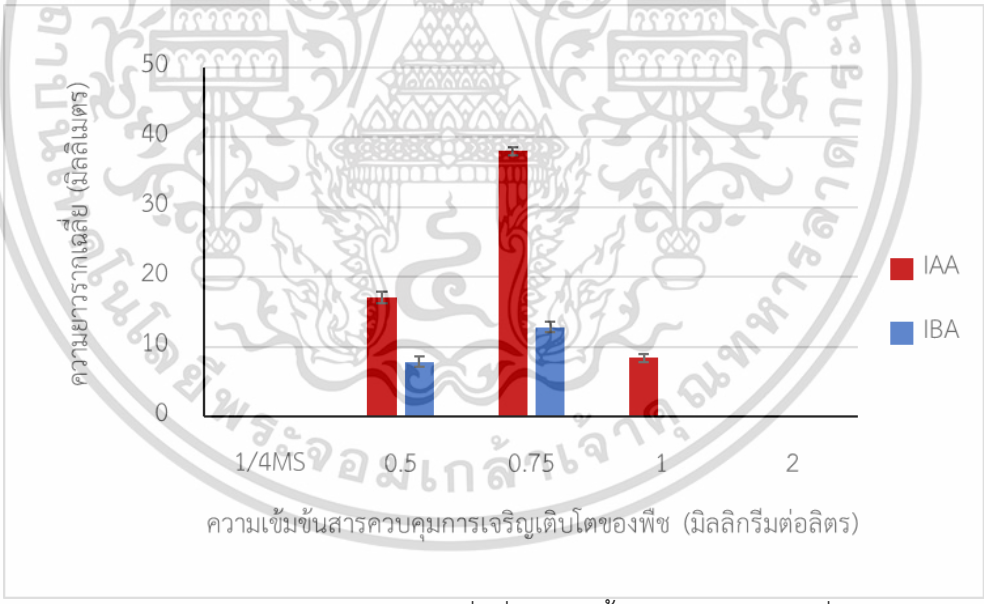
(ข) IAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงผลร้อยละการเกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา เป็นเวลา 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนยอด	ร้อยละการเกิดราก
¼ MS (Control)		10	0
IAA	0.5	10	40
	0.75	10	80
	1.0	10	20
	2.0	10	0
IBA	0.5	10	0
	0.75	10	50
	1.0	10	60
	2.0	10	0

หมายเหตุ 1/ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ยอด



รูปที่ 4.12 กราฟเปรียบเทียบความยาวรากเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

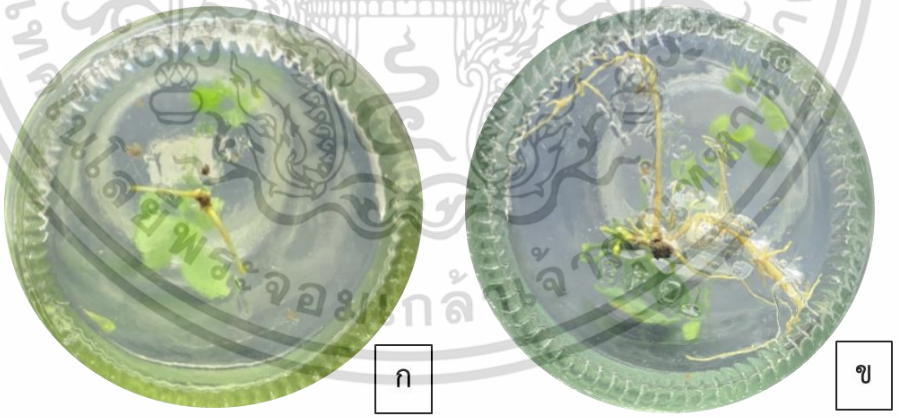
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลการชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนยอด	จำนวนราก เฉลี่ย/ยอด	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
¼ MS (Control)		10	0.00^{d} ± 0.00	0.00^{f} ± 0.00
IAA	0.5	10	2.30^{b} ± 0.48	17.05^{b} ± 0.76
	0.75	10	3.30^{a} ± 0.46	38.03^{a} ± 0.61
	1.0	10	2.10^{b} ± 0.32	8.41^{d} ± 0.57
	2.0	10	0.00^{f} ± 0.00	0.00^{f} ± 0.00
IBA	0.5	10	1.40^{c} ± 0.52	7.83^{e} ± 0.77
	0.75	10	1.50^{c} ± 0.53	12.81^{c} ± 0.69
	1.0	10	0.00^{d} ± 0.00	0.00^{f} ± 0.00
	2.0	10	0.00^{d} ± 0.00	0.00^{f} ± 0.00

หมายเหตุ [1]/ ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงจากการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ยอด

[2]/ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P≤ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.13 การชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน เพาะเลี้ยงบนอาหาสังเคราะห์สูตร ¼ MS ที่ประกอบด้วย IAA และ IBA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ข) IAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาการออกปลูกต้นอ่อนชิงชันสู่สภาวะแวดล้อมภายนอก

นำต้นอ่อนของต้นชิงชันที่มีลักษณะลำต้นแข็งแรง และมีระบบรากที่สมบูรณ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในทุกการทดลองดังที่กล่าวมาข้างต้น มาทำการออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ และเนื่องจากต้นกล้าที่ได้นั้นเมื่อนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงแล้ว มีลักษณะที่อ่อนแอและยังไม่สามารถเจริญในธรรมชาติได้ทันที จึงต้องมีการนำไปปรับสภาพก่อนออกปลูก ซึ่งวัสดุที่ใช้ในการเริ่มต้นการออกปลูกคือ ดิน และพีทมอสผสมกับเพอร์ไลท์ ผสมในอัตราส่วน 1:1 พบว่าการใช้พีทมอสผสมกับเพอร์ไลท์ เป็นวัสดุในการปรับสภาพต้นอ่อนที่ให้ร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 80 แสดงดังตารางที่ 4.11 โดยลักษณะของต้นกล้าค่อนข้างแข็งแรง ทั้งลำต้นและใบมีลักษณะสีเขียวเข้ม แสดงดังรูปที่ 4.14 และมีจำนวนใบที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Husain and Shahzad (2007) ได้ทำการคัดเลือกต้นกล้าที่มีระบบรากสมบูรณ์แข็งแรงของต้นประดู่อินเดีย ย้ายลงกระถ่างที่มีส่วนผสมของพีทมอสและเพอร์ไลท์ ปรับสภาพเช่นเดียวกับสภาวะในหลอดทดลองประมาณ 3 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนมีการรอดชีวิตมาก และในส่วนของการใช้ดินเพียงอย่างเดียวใช้การปรับสภาพต้นอ่อน มีร้อยละการรอดชีวิตเพียง 40 ซึ่งต่ำกว่าการใช้พีทมอสผสมกับเพอร์ไลท์ และลักษณะต้นอ่อนอ่อนแอ ใบร่วงและลำต้นเน่าตาย อาจเนื่องมาจากดินมีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำ ทำให้มีการสะสมน้ำมาจนเกินไป ส่งผลทำให้รากเน่าเปื่อยและต้นอ่อนเมื่อออกปลูกโอกาสในการรอดชีวิตต่ำ ซึ่งสอดคลองกับงานวิจัยของ พชร (2565) ศึกษาการนำต้นอ่อนพะยูงไทย (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ให้ร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนที่ค่อนข้างน้อยเนื่องจากการใช้ดินและวัสดุที่มีส่วนผสมของดิน ทำให้วัสดุปลูกค่อนข้างหนาแน่น เกิดการสะสมน้ำและความชื้นค่อนข้างมาก ต้นอ่อนที่นำออกปลูกที่มีลักษณะที่อ่อนแออยู่แล้ว เมื่อสัมผัสดินจึงทำให้รากและลำต้นเน่าเปื่อย ส่งผลให้โอกาสการรอดชีวิตของต้นอ่อนที่นำออกปลูกน้อยลง จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าการใช้พีทมอสผสมกับเพอร์ไลท์เป็นวัสดุในการปรับสภาพต้นอ่อนที่นำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกหลอดทดลอง เป็นวัสดุปลูกที่เหมาะสมสำหรับการทดลองในครั้งนี้ เนื่องจากให้ร้อยละของการรอดชีวิต เมื่อเทียบกับการใช้ดินเป็นวัสดุปลูกเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.11 ผลร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนหลังจากย้ายออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกหลอดทดลองของต้นชิงชัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

วัสดุปลูก	จำนวนต้นอ่อน	จำนวนต้นอ่อนที่รอดชีวิต (ต้น)	ร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อน
ดิน	10	6	40
พีทมอส(1) : เพอร์ไลท์(1)	10	12	80

หมายเหตุ [1/] ทำการทดลองซ้ำ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้นอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.14 ลักษณะของต้นอ่อนชิงชันที่นำออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกหอลดทดลองด้วยวัสดุปลูกชนิดพีทผสมกับเพอร์ไลท์ เป็นเวลา (ก) 2 สัปดาห์ และ (ข) 4 สัปดาห์

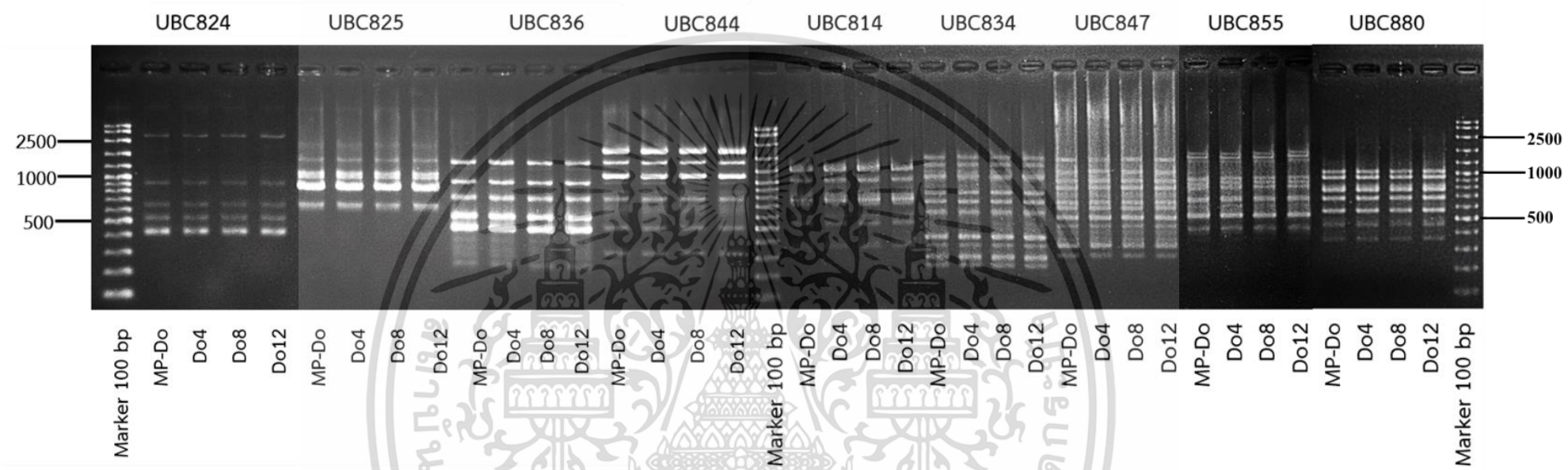
4.6 ผลการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม

ผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ UBC814 UBC824 UBC825 UBC834 UBC836 UBC844 UBC847 UBC855 และ UBC880 กับตัวอย่างต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชันเพาะเลี้ยง (MP-Do) และสุ่มตัวอย่างพืชจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่เวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ (Do4 Do8 และ Do12) อย่างละ 1 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ระยะเวลาแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับต้นเริ่มต้นในธรรมชาติ พบว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่เวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันทุกไพรเมอร์ และลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีการแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ไม่ซ้อนทับกันในทุกๆ ไพรเมอร์ แสดงดังรูปที่ 4.15 จึงอธิบายได้ว่าตัวอย่างพืชต้นชิงชันที่สุ่มจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ไม่ส่งผลให้แถบดีเอ็นเอเกิดความแตกต่างกัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์เพียงเวลาเดียว ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ได้แก่ Do12-1 Do12-2 Do12-3 Do12-4 Do12-5 Do12-6 และ Do12-7 มาทำการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ เพื่อยืนยันผลการทดลองครั้งด้วยไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ เช่นเดียวกันกับการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ทำการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ มีการแยกกันอย่างชัดเจน การซ้อนทับของแถบดีเอ็นเอน้อย ด้วยเหตุนี้จึงสามารถที่จะนับจำนวนของแถบดีเอ็นเอ และขนาดของแถบดีเอ็นเอได้อย่างง่ายดาย โอุณหภูมิของการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) ที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ตรวจสอบกับไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 และ UBC844

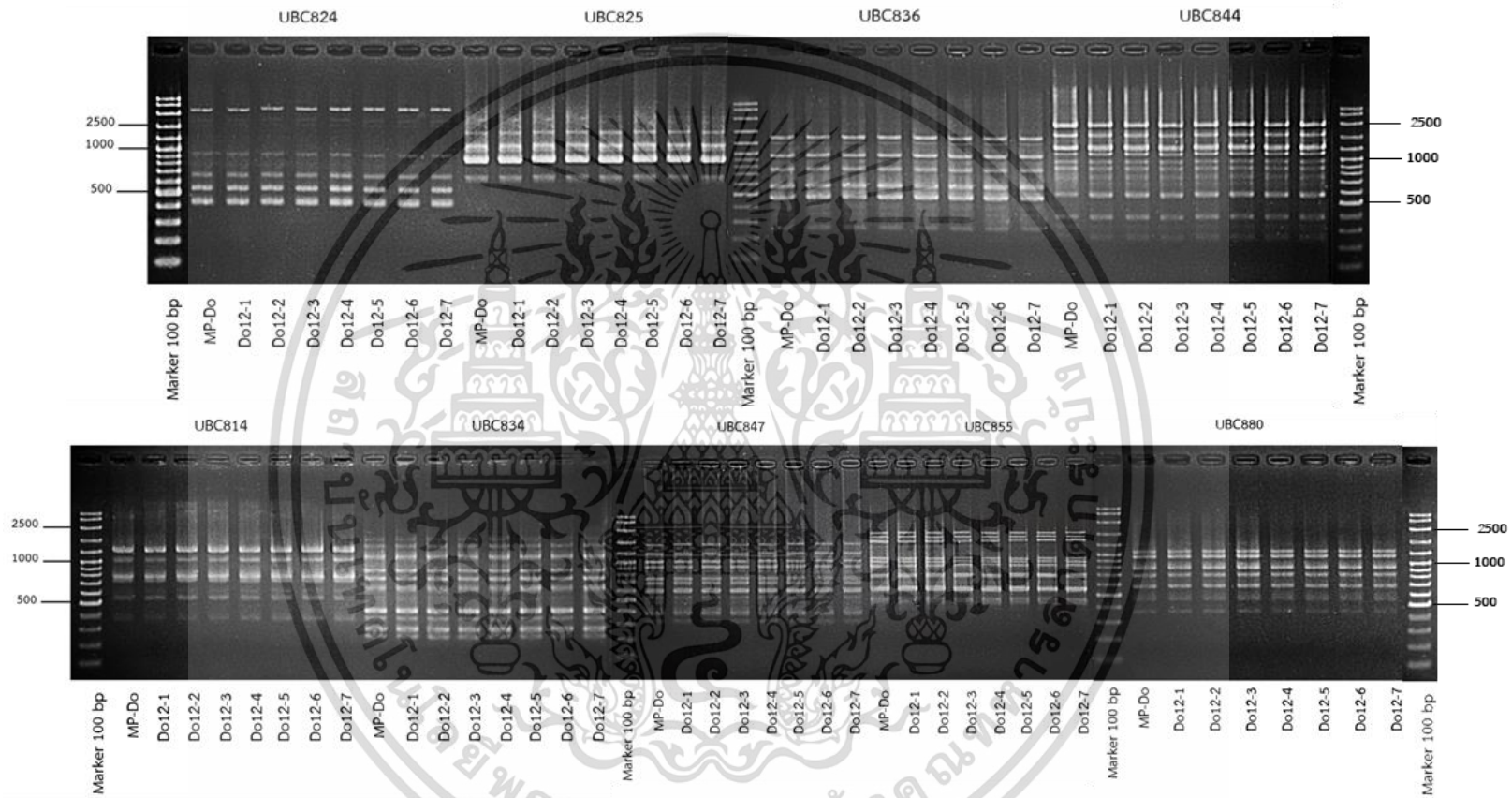
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และที่อุณหอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ใช้ตรวจสอบกับไพรเมอร์ UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 และ UBC880 แถบดีเอ็นเอที่แสดงอย่างชัดเจนมีทั้งหมด 75 แถบ ค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 8.33 แถบ มีขนาดของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 200 ถึง 2600 คู่เบส ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) คิดเป็นร้อยละ 0 และพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic band) คิดเป็นร้อยละ 100 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์ ดังรูปที่ 4.16 และตารางที่ 4.12 โดยไพรเมอร์ทั้งหมดที่นำมาทำการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอเอสเอสอาร์ มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Ahmad. *et al.* (2020) ที่ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Pterocarpus marsupium* Roxb. โดยทำการสุ่มต้นอ่อนที่มีอายุ 3 เดือน ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองคือ ISSR จำนวน 24 ไพรเมอร์ พบว่ามีทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ ที่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอโมโนมอร์ฟิกได้อย่างชัดเจน ไม่คลุมเครือ และไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ UBC818 UBC825 UBC827 UBC834 UBC836 UBC839 UBC841 UBC847 UBC849 และ UBC855 โดยอุณหภูมิของการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 36.3–54.6 องศาเซลเซียส พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 60 แถบ ค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 6 แถบ โดยทุกไพรเมอร์มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic band) นอกจากนี้งานวิจัยของ Ahmad. *et al.* (2020) ยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม สำหรับการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของต้น *Pterocarpus marsupium* Roxb. โดยทำการสุ่มต้นออ่อนที่มีอายุ 3 เดือน ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองคือ ISSR จำนวน 15 ไพร์เมอร์ พบว่ามีทั้งหมด 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC866 UBC873 UBC876 UBC878 UBC880 และ UBC891 ที่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอโมโนมอร์ฟิกได้อย่างชัดเจน ไม่คลุมเครือ และไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม อุณหภูมิของการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 44.5–54.6 องศาเซลเซียส พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 35 แถบ ค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 4.38 แถบโดยทุกไพรเมอร์มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชิงชันตัวอย่างต้นเริ่มต้น และตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่เวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 UBC844 UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 และ UBC880 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp



รูปที่ 4.16 แสดงแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชเริ่มต้นชิงชันจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืชเริ่มต้นชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 UBC844 UBC814 UBC834 UBC847 UBC855 และ UBC880 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับตรวจสอบตัวอย่างพืชเริ่มต้นจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างพืชเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน	ร้อยละแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน	ร้อยละแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน
UBC814	5’-CTCTCTCTCTCTCTCTA-3’	400-1600	6	0	100	0
UBC824	5’-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3’	450-2600	5	0	100	0
UBC825	5’-ACACACACACACACACT-3’	650-2250	5	0	100	0
UBC834	5’-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3’	250-2000	11	0	100	0
UBC836	5’-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3’	250-1750	9	0	100	0
UBC844	5’-CTCTCTCTCTCTCTCTRC-3’	200-2250	12	0	100	0
UBC847	5’-CACACACACACACACARC-3’	310-1900	11	0	100	0
UBC855	5’-ACACACACACACACACYT-3’	500-2400	9	0	100	0
UBC880	5’-GGAGAGGAGAGGAGA-3’	390-1100	7	0	100	0
รวม			75	0		
ค่าเฉลี่ย			8.33	0		

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดและข้อของต้นชิงชัน โดยส่วนของเมล็ดนั้นวิธีฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองคือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารชนิดต่างๆ ร่วมกับเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ตัวอย่างพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้มีร้อยละการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 100 โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติคือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารชนิดต่างๆ ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 ตัวอย่างพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้มีร้อยละการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 100 โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญเป็นต้นอ่อนจากชิ้นส่วนเมล็ด พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดในอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ให้ร้อยละการงอกของเมล็ดสูงที่สุดเท่ากับ 100 และในส่วนของการศึกษาชนิดและความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์จากชิ้นส่วนข้อจากเมล็ดของต้นชิงชัน พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดสมบูรณ์แข็งแรง ลำต้นยืดตรง ใบกางแผ่ออกกว้างชัดเจน ยอดและใบที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้ม สามารถอยู่รอด และเจริญไปเป็นยอดที่แข็งแรงเหมาะต่อการนำไปใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป การศึกษาชนิดและความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์จากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดสมบูรณ์แข็งแรง ลำต้นยืดตรง ใบกางแผ่ออกกว้างชัดเจน ยอดและใบที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้ม สามารถอยู่รอด เจริญไปเป็นยอดที่แข็งแรงเหมาะต่อการนำไปใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป สำหรับการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากอย่างสมบูรณ์ โดยนำยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนจากเมล็ด และยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อจากต้นเริ่มต้นในธรรมชาติของต้นชิงชัน พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼MS ที่เสริมด้วย IAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะรากที่ปรากฏคือ มีรากสมบูรณ์ รากแก้วขนาดใหญ่ และมีรากแขนงเล็กๆ ออกจำนวนมาก ให้ผลการเกิดรากและการรอดชีวิตของต้นอ่อนหลังออกปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกหลอดทดลองได้ดีที่สุด จากนั้นนำต้นกล้าออกปลูกด้วยพีทมอสกับเพอร์ไลท์ ผสมในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุในการปรับสภาพต้นอ่อนมีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 80 โดยลักษณะของต้นกล้าค่อนข้างแข็งแรง ทั้งลำต้นและใบมีลักษณะสีเขียวเข้ม และมีจำนวนใบที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ด้วยไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp พบว่า ต้นชิงชันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเมื่อครบเวลา 12 สัปดาห์ แถบดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างกันในทั้ง 9 ไพรเมอร์ ที่นำมาตรวจสอบ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาระยะเวลาการเก็บตัวอย่างพืชที่ใช้การเพาะเลี้ยงในขั้นตอนต่างๆ ตามฤดูกาลในแต่ละชิ้นส่วนตัวอย่าง เพราะฤดูกาลอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอย่างพืช

5.2.2 ควรศึกษาการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบของต้นชิงชัน หากทำขั้นตอนนี้ได้อาจได้ผลผลิตเพิ่มมากยิ่งขึ้นในอนาคต

5.2.3 สำหรับการศึกษาวัสดุการนำต้นกล้าชิงชันออกปลูก ควรศึกษาให้หลากหลายกว่านี้ เนื่องจากที่ศึกษาอยู่น้อยเกินไปอาจมีวัสดุที่เหมาะสมมากกว่า เพื่อเปรียบเทียบผลลัพธ์ที่ดียิ่งขึ้น

5.2.4 ควรศึกษาไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ให้มากยิ่งขึ้น รวมทั้งควรศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลให้หลากหลายมากขึ้น และควรเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้มากกว่า 12 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มความแม่นยำต่อการตรวจสอบและเพื่อยืนยันว่าไม่เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชิงชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา จันทร์สิงห์. 2563. ชิงชัน. **ฐานข้อมูลท้องถิ่น จังหวัดกำแพงเพชร-ตาก.** กำแพงเพชร : สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร. หน้า 1.

กรมวิชาการเกษตร. 2563. การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว. กรุงเทพฯ : **สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ**

ธัญญา ทะพิงค์แก. 2554. **การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.facagri.cmru.ac.th.

บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์, ศศิภาวรรณ มาชะนา, จิราพร จรอนันต์, นภัสสร ฉันทธำรงศิร และบัลลังก์ เนื่องแสง. 2560. “การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ องค์ประกอบทางเคมี และลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) และหลุมพอทะเล (Intsia bijuga) ในพื้นที่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ.” หน้า 15. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

ประพันธ์ ผู้กฤตยาคามี, วิโรจน์ ครองกิจศิริ, กรกฎ สายแวว และวิภารัตน์ จีนเมง่. 2557. **การพัฒนาเทคนิควนวัฒนวิธีเพื่อเพิ่มผลผลิตสวนป่าไม้พะยูง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://forprod.forest.go.th.

พชร สุภาพาส. 2565. “ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre)” หน้า 43. กรุงเทพฯ. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ษชาดา ศรประสม. 2560. “ปัญหากฎหมายเกี่ยวกับระบบการบริหารจัดการป่าไม้ ตามกฎหมายป่าไม้ ศึกษากรณี สภาพพื้นที่ป่าไม้ แผนงานป่าไม้ และการจำกัดสิทธิในทรัพย์สินที่เป็นไม้หวงห้ามในที่ดินของเอกชน.” หน้า 110-135. **สารนิพนธ์นิติศาสตรมหาบัณฑิต กลุ่มวิชากฎหมายมหาชน**. คณะคณะนิติศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีปทุม.

อารยา หงส์เพชร และปทิตตา เทียนส่องใจ. 2545. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช”. วารสารกรมวิทยาศาสตร์ ปีที่ 50 ฉบับที่ 160. หน้า 1. กรุงเทพฯ. **กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม**.

อภิสรา ผลจัด. 2564. “อิทธิพลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเกา (*Arachis glabrata*)”. หน้า 36-40. กรุงเทพฯ. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ahmad, A., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A.A., Abdel-Salam, E.M., Qahtan, A.A. and Faisal, M., 2020. "Gibberellic acid and thidiazuron promote micropropagation of an endangered woody tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using *in vitro* seedlings". *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture (PCTOC)*. (144): 449-462.

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.

Borthakur, A., Das, S.C., Kalita, M.C. and Sen, P., 2012. "An in vitro plant regeneration system for conservation of the leguminous tree *Albizzia chinensis* (Osbeck) Merr". *Adv App Sci Res*. (3): 1727-1732.

Barstow, M., Boshier, D., Bountithiponh, C., Changtragoon, S., Gaisberger, H., Hartvig, I., Hung, H., Jalonen, R., Kanchanarak, T., Mackay, J., Ping, H., Thammavong, B., Theilade, I., Tran, T., Win, P. and Zheng, Y. 2022. "*Dalbergia oliveri.*" *The IUCN Red List of Threatened Species*. 2022: 2307-8235.

Balaraju, K., Agastian, P., Ignacimuthu, S. and Park, K. 2011." A rapid in *vitro* propagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using shoot tip explants". *Acta Physiologiae Plantarum*. (33): 2501-2510.

Das, P., Samantaray, S., Rout, G.R. and Roberts, A.V. 1997." *In vitro* somatic embryogenesis of *Dalbergia sissoo* Roxb. a multipurpose timber-yielding tree". *Plant Cell Reports*. (16): 578-582.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue". *Phytochemical Bulletin*. (19): 11-15.

Fráguas, C. B., Pasqual, M., Dutra, L. F. and Cazetta, J. O. 2004. "Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) 'roxo de valinhos' plants". *In Vitro Cell. Dev-Pl*.(40): 471-474.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Hartvig, I., Czako, M., Kjær, E.D., Nielsen, L.R. and Theilade, I. 2015. "The use of DNA barcoding in identification and conservation of rosewood (*Dalbergia* spp.)". *PLoS One*, 10(9): e0138231.

Husain, M.K., Anis, M. and Shahzad, A. 2008. "*In vitro* propagation of a multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants". *Acta Physiologiae Plantarum.* (30): 353-359.

Joshi, I., Bisht, P., Sharma, V.K. and Uniyal, D.P. 2003." Studies on effect of nutrient media for clonal propagation of superior phenotypes of *Dalbergia sissoo* Roxb. through tissue culture". *Silvae Genetica.* 52(3-4): 143-147.

Kapildev, G., Chinnathambi A., Sivanandhan G., Rajesh M., Jeyaraj M., Selvaraj N., Alharbi SA. and Ganapathi A. 2020. "Meta-Topolin and β-cyclodextrin enhance multiple shoot and root production in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper". *Indian Journal of Experimental Biology.* (58): 314-322.

Koné, M., Koné, T., Silué, N., Soumahoro, A.B. and Kouakou, T.H. 2015. "*The Scientific World Journal.* 2015: 2-6.

Luna, C., Sansberro, P., Mroginski, L. and Tarragó, J. 2003. "Micropropagation of *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) from nodal segments in a tissue culture system". *Biocell.* 27(2): 205-212.

Lloyd, G. and McCown, B. H. 1981. "Woody Plant Medium (WPM) a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species". *Hort. Sci*., 16:453-453.

Murashike, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Journal of Plant Physiology*. (15) :473-497.

Pradhan, C., Kar, S., Pattnaik, S. and Chand, P. K. 1998. "Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes". *Plant Cell Reports*. (18): 122-126.

Shinde, S., Sebastian, J.K., Jain, J.R., Hanamanthagouda, M.S. and Murthy, H.N. 2016. "Efficient *in vitro* propagation of *Artemisia nilagirica* var. *nilagirica* (Indian wormwood) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants". *Physiology and Molecular Biology of Plants*. (22): 595-603.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Vipranarayana, S., Prasad, T.N.V.K.V. and Damodharam, T. 2012. “*In vitro* seed germination and induction of enhanced shoot multiplication in *Pterocarpus santalinus* Linn. f: An endemic medicinal plant of Seshachalam hills, Tirumala”. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*. 9(2): 118.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. อาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and skoog, 1962)

ตารางที่ 5.1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium Nitrate	1650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride·$6H_2O$	0.025
Cupric Sulfate·$5H_2O$	0.025
$Na_2EDTA·2H_2O$	37.26
Ferrous Sulfate·$7H_2O$	27.8
Magnesium Sulfate Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate·H_2O	16.9
Potassium Iodine	0.83
Potassium Nitrate	1900
Potassium Phosphate, Monobasic	170
Sodium Molybdate(VI)·$2H_2O$	0.25
Zinc Sulfate·$7H_2O$	8.6
Glycine	2.0
Myo-Inositol	100
Nicotinic Acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหารสังเคราะห์สูตร WPM (McCOWN and LLOYD, 1981)

ตารางที่ 5.2 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร WPM

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium Nitrate	400
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	72.5
Calcium Nitrate	386
Cupric Sulfate·5H_2O	0.25
Na_2EDTA·2H_2O	37.3
Ferrous Sulfate·7H_2O	27.85
Magnesium Sulfate Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate·H_2O	22.3
Molybdic Acid (Sodium Salt)·2H_2O	0.25
Potassium Sulfate	990
Potassium Phosphate, Monobasic	170
Zinc Sulfate·7H_2O	8.6
Glycine	2.0
Myo-Inositol	100
Nicotinic Acid	0.5
Pyridoxine	0.5
Thiamine	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 5X TBE buffer (1,000 มิลลิลิตร)

- Tris ($C_4H_{11}NO_3$-Base)	54	กรัม
- Boric acid	27.5	กรัม
- EDTA	37.3	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร

2. การเตรียม 1X TBE buffer (1,000 มิลลิลิตร)

- 5X TBE buffer	200	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์	800	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเดียวกันโดยมีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

3. การเตรียม 0.5X TBE buffer (500 มิลลิลิตร)

- 1X TBE buffer	250	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์	250	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเดียวกันโดยมีปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร

4. การเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2 (40 มิลลิลิตร)

- อะกาโรสเจล	0.4	กรัม
- 1X TBE buffer	40	มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปหลอมละลายโดยใช้ไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่จึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้แข็งประมาณ 30 นาที

5. การเตรียม 1.25 mM dNTPs (200 ไมโครลิตร)

- 100 mM dATP	2.5	ไมโครลิตร
- 100 mM dCTP	2.5	ไมโครลิตร
- 100 mM dGTP	2.5	ไมโครลิตร
- 100 mM dTTP	2.5	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นปราศจากไอออน	190	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเดียวกันโดยมีปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณปริมาตรสารเคมี

ตัวอย่างการคำนวณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

การเตรียมคำนวณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นสารละลายเริ่มต้น

V_1 คือ ปริมาตรสารละลายเริ่มต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นสารละลายสุดท้าย

V_2 คือ ปริมาตรสารละลายสุดท้ายที่ต้องการ

แทนค่า $1\ mg/\mu L \times V_1 = 0.5\ mg/L \times 500\ mL$

$V_1 = (0.5\ mg/L \times 500\ mL) / 1\ mg/\mu L$

$V_1 = 0.25\ mL \times 1000\ \mu L$

$V_1 = 250\ \mu L$

ดังนั้น ดูดสารละลายสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้สารละลายมีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ

การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 599.06 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นสารละลายเริ่มต้น

V_1 คือ ปริมาตรสารละลายเริ่มต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นสารละลายสุดท้าย

V_2 คือ ปริมาตรสารละลายสุดท้ายที่ต้องการ

แทนค่า $599.06\ ng/\mu L \times V_1 = 200\ ng/\mu L \times 1\ \mu L$

$V_1 = (200\ ng/\mu L \times 1\ \mu L) / 599.06\ ng/\mu L$

$V_1 = 0.33\ \mu L$

ดังนั้น ดูดสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 0.33 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน 0.67 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้สารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย dNTPs

การเตรียมสารละลาย dNTPs ที่ประกอบด้วยสารละลาย dATP dTTP dGTP และ dCTP ผสมกันให้มีปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์

สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นสารละลายเริ่มต้น

V_1 คือ ปริมาตรสารละลายเริ่มต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นสารละลายสุดท้าย

V_2 คือ ปริมาตรสารละลายสุดท้ายที่ต้องการ

แทนค่า $100\ mM \times V_1 = 1.25\ mM \times 200\ \mu L$

$V_1 = (1.25\ mM \times 200\ \mu L) / 100\ mM$

$V_1 = 2.5\ \mu L$

ดังนั้น ดูดสารละลาย dATP dTTP dGTP และ dCTP อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน 190 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย dNTPs ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสิริวรรณ นนทศิลา
วัน เดือน ปีเกิด	วันพุธที่ 2 เดือน กรกฎาคม พ.ศ 2540
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 47/691 ซอยนิมิตใหม่ 40 ถนนนิมิตใหม่ แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา รหัสไปรษณีย์ 10510
ประวัติการศึกษา	(2563) วิทยาศาตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2567) วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาสำหรับหลักสูตรระดับปริญญาโท เป็นระยะเวลาไม่เกิน 2 ปี
ประชุมงานวิชาการ	นำเสนอผลงานวิจัย (Oralpresentation) ในหัวข้อ “Study on optimization for *in vitro* propagation of *Dalbergia oliveri* by plant 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

Nonthasila, S., Pongtongkam, P., Chareonsap, P. P., Poeaim, A. and Poeaim, S. (2024). Study on optimization for *in vitro* propagation of *Dalbergia oliveri* by plant tissue culture. International Journal of Agricultural Technology 20(2):643-65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้