การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของลำไยเถา

STUDY ON SURFACE STERILIZATION AND PLANT GROWTH REGULATORS EFFICIENCY OF PLANT REGENERATION OF *Dimocarpus scandens* (WINIT & KERR) BOONSUK & CHANTAR (LAMYAI-THAO)

อังสิมา จิตต์เวทย์กุล

ANGSIMA JITWETKUL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2568

KMITL-2025-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON SURFACE STERILIZATION AND PLANT GROWTH REGULATORS EFFICIENCY OF PLANT REGENERATION OF *Dimocarpus scandens* (WINIT & KERR) BOONSUK & CHANTAR (LAMYAI-THAO)

ANGSIMA JITWETKUL

A THESIS SUBMITTED IN FULLFILLMENT 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

2025

KMITL-2025-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของลำไยเถา
ชื่อนักศึกษา	อังสิมา จิตต์เวทย์กุล
รหัสประจำตัว	62605064
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำไยเถา (*Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar) ตั้งแต่ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ การชักนำต้นอ่อนจากเมล็ด การชักนำยอดจากตาข้าง การเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสจากใบ การชักนำรากจากยอด เพื่อการอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชชนิดนี้อย่างยั่งยืน ผลการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชทั้งเมล็ด ใบ และตาข้าง แสดงให้เห็นว่า การใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ antibiotic-antimycotic, PPM, cefotaxime และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 พร้อมการเขย่าแบบต่อเนื่อง สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมีประสิทธิภาพสูงสุดให้ผลการปนเปื้อนต่ำเพียงร้อยละ 24 อัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 76 และมีอัตราการงอกร้อยละ 50 ขณะที่การฟอกใบและตาข้างมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 80 และ 73 ตามลำดับ ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินต่อการชักนำต้นอ่อนจากเมล็ด พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด โดยมีการเกิดยอดร้อยละ 73.33 และมีความยาวยอดเฉลี่ย 40.07 มิลลิเมตร ขณะที่ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดรองลงมาเหลือร้อยละ 70 แต่ยอดมีขนาดใหญ่และแข็งแรงมากกว่า BA อย่างชัดเจน การชักนำยอดจากตาข้างภายใต้การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่ให้ผลดีที่สุด โดยมีอัตราการเกิดยอดสูงสุดร้อยละ 80 และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.33 ยอดต่อชิ้นตาข้าง พร้อมความยาวยอดเฉลี่ย 18.59 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม พบว่าการเพาะเลี้ยงในระยะยาวอาจส่งผลให้ยอดมีอาการซีด เหลือง หรือใบร่วง ผลการทดลองการชักนำแคลลัสจากใบของลำไยเถาแสดงให้เห็นว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุดที่ร้อยละ 20 รองลงมาได้แก่ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลร้อยละ 13.33 โดยชุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมที่ไม่เติมสารใด ๆ ให้ผลการเกิดแคลลัสต่ำสุดที่ร้อยละ 6.67 ผลการทดลองการชักนำรากจากชิ้นส่วนยอด พบว่า IBA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกระตุ้นการเกิดราก โดยให้ร้อยละการเกิดรากสูงสุดถึงร้อยละ 50 และจำนวนรากเฉลี่ย 3 รากต่อชิ้นยอด ขณะที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยต่ำกว่า แต่ให้ความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดที่ 3.5 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่างานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จในการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำไยเถา ตั้งแต่การฟอกฆ่าเชื้อ การชักนำต้นอ่อน ยอด แคลลัส และราก สามารถประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์พืชพื้นถิ่นที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในอนาคต

คำสำคัญ : การชักนำแคลลัส การชักนำเมล็ด การชักนำยอด การชักนำราก ลำไยเถา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Study on Surface Sterilization and Plant Growth Regulators Efficiency of Plant Regeneration of *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar (Lamyai-Thao)
Student Name	Miss Angsima Jitwetkul
Student ID	62605064
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2025
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

This study aimed to establish an efficient in vitro propagation protocol for *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar, an economically and ecologically significant indigenous plant species. The research focused on optimizing sterilization, seedling and axillary shoot induction, callus formation from leaf explants, and root induction for sustainable propagation and germplasm conservation. A sterilization procedure incorporating mercuric chloride, antibiotic-antimycotic agents, Plant Preservative Mixture (PPM), cefotaxime, and Tween-20 under continuous agitation effectively minimized microbial contamination. Seed sterilization yielded the highest success, with only 24% contamination, 76% survival, and 50% germination. Survival rates for sterilized leaves and axillary buds were 80% and 73%, respectively. For seedling induction, 1.0 mg/L BA resulted in the highest shoot formation (73.33%) with an average shoot length of 40.07 mm. Although 0.5 mg/L GA_3 induced slightly lower shoot formation (70%), the shoots were more robust. Axillary bud culture on MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA achieved optimal results (80% shoot induction; 1.33 shoots/explant; 18.59 mm. shoot length), though extended culture caused shoot etiolation and leaf abscission. Callus induction was most effective with 0.5 mg/L 2,4-D, producing callus in 20% of explants, followed by 1.0 mg/L (13.33%), with the control showing minimal response (6.67%). Root induction was maximized

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

with 2.0 mg/L IBA, yielding roots in 50% of explants with an average of three roots per shoot. While 1.5 mg/L IBA produced fewer roots, it resulted in the greatest root length (3.5 mm.). These findings demonstrate the successful development of a comprehensive tissue culture system for *D. scandens*, facilitating large-scale propagation and sustainable conservation.

Keywords: Callus induction, Seed induction, Shoot induction, Root induction, *Dimocarpus scandens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของลำไยเถา ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาเป็นอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษาและความช่วยเหลือ ตลอดจนการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่งในการดำเนินการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีการศึกษา 2562 ถึงปีการศึกษา 2563 ประเภททุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษา และผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการยกระดับเศรษฐกิจและสังคมรายตำบลแบบบูรณาการ (1 ตำบล 1 มหาวิทยาลัย) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ที่ได้มอบโอกาสและสนับสนุนค่าเล่าเรียนในการดำเนินการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์แก่การทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนที่ได้สนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยเป็นอย่างสูงในข้อบกพร่องและความผิดพลาดนั้น และผู้เขียนหวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจศึกษาในเรื่องนี้ หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้เขียนต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวอังสิมา จิตต์เวทย์กุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลทั่วไปของลำไยเถา	4
2.1.1 การจัดจำแนกอนุกรมวิธาน	4
2.1.2 ลำไยเถา	4
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	6
2.2.1 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	6
2.2.2 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	8
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
2.3.1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช	10
2.3.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด	10
2.3.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ	10
2.3.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง	11
2.3.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	12
2.3.2.1 การชักนำเมล็ด	12
2.3.2.2 การชักนำแคลลัส	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.2.3 การชักนำยอด ชักนำราก..... 14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 16
3.1 วัสดุและอุปกรณ์..... 16
3.1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา..... 16
3.1.2 สารเคมี..... 16
3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ..... 16
3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรดด่าง..... 16
3.1.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงพืช..... 16
3.1.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช..... 17
3.1.2.4.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)..... 17
3.1.2.4.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)..... 17
3.1.2.4.3 สารในกลุ่มจิบเบอร์เรลลิน (gibberellin)..... 17
3.1.3 อุปกรณ์และภาชนะ..... 17
3.1.4 เครื่องมือวิทยาศาสตร์..... 18
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 18
3.2.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง..... 18
3.2.1.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด..... 18
3.2.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ..... 19
3.2.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง..... 20
3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นต้นอ่อน..... 21
3.2.3 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดยอด..... 22
3.2.4 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำใบให้เกิดแคลลัส..... 22
3.2.5 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก..... 22
3.2.6 วิธีการทางสถิติ..... 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	24
4.1 ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	24
4.1.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด	24
4.1.2 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ	26
4.1.3 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง	27
4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นต้นอ่อน	29
4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอด	33
4.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส	37
4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก	39
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	42
5.1 สรุปผลการวิจัย	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ประวัติผู้เขียน	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา..... 9

3.1 แสดงความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่าในการฟอกฆ่าเชื้อขั้นตอนแรกของแต่ละสูตรการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดลำไยเถาทั้ง 7 สูตร..... 19

3.2 ตารางแสดงความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่าในการฟอกฆ่าเชื้อขั้นตอนแรกของแต่ละสูตรการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างทั้ง 6 สูตร..... 21

4.1 แสดงร้อยละการปนเปื้อน อัตราการรอดชีวิตและร้อยละการงอกของสูตรที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดลำไยเถาทั้ง 7 สูตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์..... 25

4.2 แสดงร้อยละการปนเปื้อนและอัตราการรอดชีวิตของสูตรที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ..... 27

4.3 แสดงร้อยละการปนเปื้อนและอัตราการรอดชีวิตขอสูตรที่ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง ลำไยเถาทั้ง 6 สูตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์..... 28

4.4 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอด และจำนวนรากเฉลี่ยหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่สริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 31

4.5 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 35

4.6 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะปลอดแสงเป็น ระยะเวลา 12 สัปดาห์..... 39

4.7 แสดงร้อยละการเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะของต้นที่เป็นพุ่มและรอเลื้อยของลำไยเถา (ก) กิ่งที่มีใบและผล (ข) ลักษณะของใบลำไยเถา (ค) ลักษณะผลลำไยเถา (ง) ลักษณะเมล็ดลำไยเถา (จ) 5

4.1 แสดงลักษณะเมล็ดที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ (ก) ลักษณะของเมล็ดที่ปล่อยสารฟินอลลิกเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน (ข) ลักษณะของเมล็ดที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตามรอยแตกของเมล็ดที่กำลังเกิดการงอก (ค)ลักษณะของเมล็ดที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หลังการฟอกและปนเปื้อนมากขึ้นเมื่อเมล็ดเริ่มมีรอยแตกของการงอก..... 26

4.2 แสดงลักษณะชิ้นส่วนบนของลำไยเถาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก) ลักษณะชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิต (ข) ลักษณะชิ้นส่วนใบที่ไม่รอดชีวิต กลายเป็นสีน้ำตาลหลังฟอกฆ่าเชื้อ..... 27

4.3 แสดงลักษณะชิ้นส่วนตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว และทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก) ลักษณะชิ้นส่วนตาข้างที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไม่เกิดการปนเปื้อน (ข) ลักษณะชิ้นส่วนตาข้างที่ปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์..... 29

4.4 แสดงลักษณะยอดที่จากเมล็ดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ที่ให้ลักษณะยอดดีที่สุด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) GA3 0.5 มก./ล. (ค) BA 1.0 (ง) mT 0.5 มก./ล. (จ) kinetin 0.5 มก./ล. (ฉ) TDZ 0.5 มก./ล..... 33

4.5 แสดงลักษณะยอดลำไยเถาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ก-ข) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ค) BA 0.5 มก./ล. (ง) BA 1.0 มก./ล. (จ) mT 0.5 มก./ล. (ฉ) mT 1.0 มก./ล. (ช) kinetin 0.5 มก./ล. (ซ) kinetin 1.0 มก./ล. (ฌ) TDZ 0.5 มก./ล. (ญ) TDZ 1.0 มก./ล. 37

4.6 แสดงลักษณะการเกิดแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะปลอดแสงเป็น ระยะเวลา 12 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) 2,4-D 0.5 มก./ล. (ค) 2,4-D 0.5 มก./ล. 39

4.7 แสดงลักษณะการเกิดรากหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ (ก) IBA 2 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ข) IAA 1 มก./ล. ระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ค) IBA 2 มก./ล. ระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ง) IBA 2 1.5 มก./ล. ระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
BAP, BA	6-Benzylaminopurine
GA_3	Gibberellic acid
$HgCl_2$	Mercuric chloride
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
Kn	Kinetin
MS	Murashige and Skoog medium
*m*T	*M*eta-Topolin
NAA	Naphthaleneacetic acid
PPM	Plant Preservative Mixture
TDZ	Thidiazuron
WPM	Woody Plant Medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ลำไยเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Sapindaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus longan* Lour. จัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถส่งออกไปจำหน่ายในต่างประเทศทั้งในรูปของผลสดและที่แปรรูปแล้ว เช่น อบแห้ง แช่แข็ง และลำไยบรรจุกระป๋อง ซึ่งทำรายได้ในแต่ละปีถึงหลายพันล้านบาท ลำไยเป็นผลไม้ที่ให้พลังงานสูง โดยในเนื้อของลำไยมีน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส รวมทั้งแร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างธาตุฟอสฟอรัส แคลเซียม และเหล็ก เป็นต้น ในทางการแพทย์แผนจีนโบราณ ได้มีการใช้ลำไยแห้งทำเป็นยา เพื่อช่วยบำรุงเลือด ประสาท กำลัง และหัวใจ จึงเหมาะกับผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ โดยประเทศผู้ผลิตลำไยที่สำคัญของโลก ได้แก่ จีน เวียดนาม และไต้หวัน แล้วยังมีการเริ่มปลูกในออสเตรเลียตอนเหนือ สหรัฐอเมริกา ฟิลิปปินส์ พม่า และอินโดนีเซีย แต่ยังไม่เป็นที่ต้องการนัก (พงศักดิ์ และรำไพพรรณ, 2542) ในประเทศไทยมีการปลูกลำไยหลากหลายพันธุ์ที่มีความสำคัญในเศรษฐกิจ เช่น ลำไยกะโหลก พันธุ์ดอ พันธุ์ชมพู พันธุ์แห้ว และพันธุ์เบี้ยวเขียว นอกจากนั้นยังมีลำไยที่ไม่นิยมนำมารับประทานแต่นิยมนำมาปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับมากกว่าอย่างลำไยเถาหรือลำไยเครือ (พาวิน และคณะ, 2547)

ลำไยเถาหรือลำไยเครือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดชลบุรี และมักปลูกไว้เพื่อใช้เป็นไม้ประดับ ในอดีตเคยเป็นที่รู้จักในชื่อ *Dimocarpus longan* var. *obtusus* มีชื่อพ้องทางวิทยาศาสตร์ว่า *Euphoria scandens* Winit & Kerr, 1941 (Boonsuk and Chantaranothai, 2017) มีทรงพุ่มแผ่กว้างและกระจายออกอย่างสวยงาม โดยมีขนาดตั้งแต่ระดับกลางไปจนถึงใหญ่ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่อาจมีขนาดของต้นได้ถึง 10-12 เมตร มียอดที่สูง มีลักษณะลำต้นเลื้อยคล้ายเถาวัลย์ ผลของลำไยเถาค่อนข้างกลม เปลือกบางมีสีน้ำตาลอ่อน เนื้อมีสีขาวขุ่น มีกลิ่นหอม เมล็ดมีสีดำเข้มและมันสวยและกลมโต ด้วยเหตุนี้ลำไยเถาจึงเหมาะที่จะปลูกเป็นไม้ประดับ (วิริยา และจตุพร, 2561)

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับชีพลักษณ์ของลำไยต้น (Pham และคณะ, 2015) การศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของสารสกัดจากเมล็ดลำไยแห้ง (Panyathep และคณะ, 2013) การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกลำไย (Hsieh และคณะ, 2008) และเริ่มมีการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาและการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์แยม (วิริยา และจตุพร, 2561) อย่างไรก็ตามยังไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวกับลำไยเถามากนัก ประกอบกับเป็นพืชท้องถิ่นที่มีการกระจายพันธุ์ไม่มากในภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเพิ่มปริมาณของลำไยเถาและยังเป็นการอนุรักษ์พืชท้องถิ่นอีกด้วย เมื่อสามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น จึงจะสามารถนำมาต่อยอดเพื่อการศึกษาในด้านอื่นได้ เช่น การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำไยเถาในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในส่วนเมล็ดใบและตาข้างของลำไยเถา

1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นต้นอ่อน

1.2.3 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอด

1.2.4 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส

1.2.5 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ลำไยเถา *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา นำเมล็ด ใบ และตาข้าง ศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม โดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) หรือเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ร่วมกับสารป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ในความเข้มข้นและช่วงเวลาที่แตกต่างกัน หลังการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในกลุ่มไซโตไคนิน ออกซินหรือจิบเบอเรลลินต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นต้นใหม่ การชักนำตาข้างให้เกิดยอด การชักนำใบให้เกิดแคลลัส และการชักนำยอดให้เกิดรากโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้องค์ความรู้และเทคนิคที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ รวมถึงสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการชักนำเมล็ดให้เกิดต้นอ่อน ตาข้างให้เกิดยอด ใบให้เกิดแคลลัส และยอดให้เกิดราก เติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมออกปลูกสู่ธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 เป็นแนวทางในการอนุรักษ์และเพิ่มปริมาณพืชพื้นถิ่นที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจและคุณค่าทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของลำไยเถา

2.1.1 การจัดจำแนกอนุกรมวิธาน

Kingdom: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Sapindales

Family: Sapindaceae

Genus: *Dimocarpus* Lour.

Species: *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar

(ที่มา: https://www.gbif.org/en/)

2.1.2 ลำไยเถา

ลำไยเถาหรือลำไยเครือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar อยู่ในวงศ์ Sapindaceae เป็นพืชท้องถิ่นที่พบได้ในภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดชลบุรี เดิมทีมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus longan* var. *obtusus* จนกระทั่งมีงานวิจัยได้ศึกษาและรายงานเกี่ยวกับลักษณะความคล้ายคลึงและอาจมีการทับซ้อนกันในทางอนุกรมวิธานของลำไย จึงได้มีการพิจารณาศึกษาลักษณะสัณฐานของลำไย 3 สายพันธุ์ใหม่อีกครั้ง ได้แก่ *Dimocarpus cinereus* (Radlk.) Boonsuk & Chantar, *Dimocarpus longan* Lour. และ *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar (Boonsuk and Chantaranothai, 2017) ลำไยเถามีลักษณะเป็นไม้รอเลื้อยหรือเป็นพุ่ม (รูปที่ 2.1 ก) เปลือกต้นมีสีน้ำตาลแดง ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก รูปขอบขนานหรือรูปไข่ ปลายใบเว้าหรือกลม ผิวใบด้านบนเรียบ ท้องใบมีขนสั้น ดอกออกเป็นช่อ มีสีขาวหรือเหลืองนวล มีกลิ่นที่หอม ออกดอกระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงกันยายน ผลมีรูปร่างกลม เปลือกแข็งสีน้ำตาล ภายในมีเมล็ด 1 เมล็ด ลักษณะกลมสีดำเข้มและมันวาว ซึ่งจะติดผลในเดือนมีนาคมถึงพฤศจิกายน

ใบของลำไยเถา เป็นใบย่อยแต่ละใบที่แยกออกจากก้านสองข้างของแกนกลางคล้ายขนนก มีความยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร ใบยอดมี 2-3 คู่ แตกออกตรงข้ามหรือสลับกับใบย่อย รูปร่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของใบอาจแตกต่างกันออกไป มีทั้งรูปวงรีไปจนถึงรูปหอกที่ปลายใบ ฐานของใบค่อนข้างกว้าง ขอบใบเป็นคลื่นและมีเส้นแตกออกจากเส้นกลางใบค่อนข้างมาก (รูปที่ 2.1 ค)

ช่อดอก มีการแตกก้านดอกออกเป็นแขนงจากก้านที่แตก ช่อดอกจะเกิดจากตาดอกบริเวณปลายกิ่ง แต่ก็สามารถเจริญจากตาข้างของกิ่งได้ ดอกมีสีขาวหรือเหลืองนวล มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกประมาณ 6-8 มิลลิเมตร และมีดอกอยู่ 3 ชนิด คือ ดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและดอกกระเทย รวมอยู่ในช่อเดียวกัน โดยดอกตัวผู้จะมีเป็นจำนวนมากที่สุด รองลงมาเป็นดอกตัวเมีย ส่วนดอกกระเทยจะพบได้ค่อนข้างน้อย

ผล เกิดจากช่อของดอกทางปลายกิ่ง (รูปที่ 2.1 ข) ลักษณะค่อนข้างกลม เปลือกมีสีน้ำตาลและมีลักษณะเป็นตุ่มแบน ๆ (รูปที่ 2.1 ง) เนื้อของลำไยเถามีสีขาวขุ่น มีรสหวาน ภายในมีเมล็ดเดียวเป็นสีดำเข้ม ผิวมันและรูปร่างกลม ด้านบนของเมล็ดมีบริเวณวงกลมสีขาวลักษณะคล้ายตา (รูปที่ 2.1 จ) (แสงทอง และคณะ, 2559; วิริยา, 2560)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นที่เป็นพุ่มและรอเลื้อยของลำไยเถา (ก) กิ่งที่มีใบและผล (ข) ลักษณะของใบลำไยเถา (ค) ลักษณะผลลำไยเถา (ง) ลักษณะเมล็ดลำไยเถา (จ)
(ที่มา: ภาพถ่ายโดย อังสิมา จิตต์เวทย์กุล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุก ๆ ส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะสำเร็จหรือไม่นั้น อาจต้องทดลองนำส่วนต่าง ๆ ของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อเจริญที่นำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด ปลายราก เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่น ๆ เช่น ส่วนของเปลือกชั้นใน ส่วนไส้ ใบ ดอก ผล เมล็ด เป็นต้น ในปัจจุบัน ได้มีการนำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาประยุกต์ใช้ในงานหลากหลายสาขาวิชา เช่น พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์ของเซลล์ พันธุวิศวกรรมด้านพืช สรีรวิทยาของพืช ชีวเคมี ชีวโมเลกุล เซลล์วิทยา โรคพืช พฤกษศาสตร์ และเภสัชศาสตร์ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ คือ การขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืช การผลิตพืชปราศจากโรค การเก็บรักษาพันธุ์พืชและการผลิตสารทุติยภูมิ เป็นต้น ซึ่งข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น สามารถนำเนื้อเยื่อเจริญจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นแคลลัส และสามารถผลิตต้นพันธุ์พืชได้ปริมาณมากและรวดเร็ว สามารถเก็บรวบรวมพันธุ์พืชต่าง ๆ ไว้ในขวดทดลองในห้องปฏิบัติการโดยใช้พื้นที่ไม่มาก สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้น สารอาหาร สามารถเพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลาไม่จำกัดฤดูกาล ต้นพืชที่ได้จะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ และยังใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไม่สามารถงอกได้ตามปกติในธรรมชาติ ส่วนข้อเสีย คือ การใช้งบประมาณที่ค่อนข้างสูง และสิ้นเปลืองเนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์ เครื่องแก้ว สารเคมี และเครื่องมือต่าง ๆ หลายชนิด ต้องมีห้องที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ และยังต้องอาศัยผู้ชำนาญพิเศษในการปฏิบัติงาน ต้นใหม่ที่ได้อาจมีขนาดเล็กกว่าต้นพืชปกติ มีโอกาสเกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรม และพืชหลายชนิดยังมีปัญหาที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (อนุรักษ์, 2550)

2.2.1 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืช ถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ชิ้นส่วนของพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอมบริโอ อับเรณู ตาข้าง และดอก เป็นต้น จะต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านี้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพราะว่าในสภาพธรรมชาติ จะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ อย่างเช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส แพร่กระจายอยู่ทั่ว ๆ ไป เชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่งผลให้อาหารเน่าเสีย เนื้อเยื่อพืชไม่สามารถเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้และจะตายลงในท้ายที่สุด ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ฉะนั้น การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นการทำให้ชิ้นส่วนพืชปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยการใช้สารเคมี จะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายจากการที่เซลล์นั้นถูกทำลาย และถูกขัดขวางหรือทำลายการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์นั่นเอง ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อนั้นมีหลายชนิด เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) สารปฏิชีวนะ เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจในการตัดสินใจเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ คือ มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ ออกฤทธิ์รวดเร็ว มีความสามารถในการละลายได้ดี มีความคงสภาพ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ สำคัญที่สุดจะต้องไม่เป็นอันตรายต่อทั้งมนุษย์และชิ้นส่วนของพืช (อนุรักษ์, 2550)

2.2.2 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อชิ้นส่วนของพืช ชนิดของพืชรวมไปถึงสายพันธุ์ของพืชตามแต่ละชนิดนั้น ๆ โดยส่วนมากนิยมใช้อาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiated) มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมากและยังไม่มีการจัดรูปแบบที่แน่นอน เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของพืชส่วนใหญ่ ทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่น ๆ แคลลัสเหล่านี้ ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็ง ที่อย่างน้อยประกอบด้วยสารประกอบ อนินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง แม้พืชอาจจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อน แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่าและมีลักษณะเป็น seldom autotrophic ซึ่งก็คือโดยปกติไม่ได้สังเคราะห์อาหารเองเป็นหลัก จึงต้องการทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง (รังสฤษฎ์, 2540)

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละสูตร จะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามชื่อของผู้ที่คิดค้นสูตรอาหารนั้น เช่น White (1943) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ Murashige และ Skoog (1962) ค้นพบสูตร MS เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ Linsmaier และ Skoog (1965) ค้นพบอาหารสูตร LS หรือจะเป็น Lloyd และ McCown (1980) ค้นพบสูตร WPM เป็นสูตรที่ให้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็ง เป็นต้น เมื่อนำมาวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ของอาหารจะพบว่ามีสารอนินทรีย์ ที่เป็นแร่ธาตุหลักอย่างธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ไนโตรเจน (N) ออกซิเจน (O) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) มีความต้องการในปริมาณ 25-60 มิลลิโมล หรืออาจมากกว่า 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนธาตุอาหารรอง เช่น ธาตุเหล็ก (Fe) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) และโบรอน (B) พืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารจะเป็นพวากคาร์โบไฮเดรต อย่างเช่นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ใช้เป็นแหล่งพลังงานแก่เนื้อเยื่อพืช มีวิตามินที่หลากชนิดที่ทำให้พืชมีการพัฒนาและเจริญเติบโต มีกรดอะมิโนเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และที่สำคัญคือ สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชชนิดต่าง ๆ ที่พืชสร้างได้เองและมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น (อนุรักษ์, 2550)

2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติได้ในปริมาณเล็กน้อย แต่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช โดยมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ การออกดอก การสุกของผล และการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโตหลักที่ได้รับการศึกษามากที่สุดมีอยู่ 5 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน แอบไซซิกแอซิด และเอทิลีน ซึ่งแต่ละชนิดมีหน้าที่เฉพาะตัวและสามารถทำงานร่วมกันหรือขัดแย้งกันได้ขึ้นอยู่กับสภาวะของพืช

1) ออกซิน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีบทบาทหลักในการกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์โดยเฉพาะบริเวณยอดและราก มีส่วนช่วยในการกำหนดทิศทางการเจริญของพืชผ่านกระบวนการเบนเข้าหาแสงและการตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วง ออกซินผลิตจากเนื้อเยื่อปลายยอดและปลายราก แล้วลำเลียงไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชเพื่อควบคุมการเติบโตในจุดที่เหมาะสม

2) จิบเบอเรลลิน เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญของลำต้นโดยการยืดตัวของเซลล์และการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ยังเร่งการงอกของเมล็ดในบางชนิด ส่งเสริมการออกดอกและเพิ่มขนาดของผลไม้ จิบเบอเรลลินถูกผลิตขึ้นในยอดอ่อน เมล็ด และอวัยวะที่กำลังพัฒนา และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มผลผลิตในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด

3) ไซโตไคนิน ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการแตกตาข้าง โดยทำงานร่วมกับออกซินในการควบคุมความสมดุลระหว่างการเจริญของรากและยอด นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการชะลอความแก่ของใบ และช่วยให้พืชคงความเขียวสดได้นานขึ้น ไซโตไคนินส่วนใหญ่ถูกสร้างในรากและลำเลียงไปยังส่วนยอดเพื่อกระตุ้นการเจริญในบริเวณต่าง ๆ

4) แอบไซซิกแอซิด หรือ ABA เป็นสารควบคุมที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญเติบโต ช่วยให้พืชเข้าสู่ภาวะพักตัว เช่น การหยุดการงอกของเมล็ดหรือตา และยังมีบทบาทสำคัญในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมการปิดปากใบเมื่อพืชเผชิญกับภาวะขาดน้ำ ทำให้พืชสามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ถือเป็นสารควบคุมที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันความเครียดของพืชโดยตรง

5) เอทิลีน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียวที่อยู่ในรูปของก๊าซ มีบทบาทสำคัญในการเร่งการสุกของผลไม้ การร่วงของใบ ดอกและผล รวมถึงกระตุ้นการออกดอกในพืชบางชนิด เอทิลีนสามารถผลิตได้จากหลายส่วนของพืช โดยเฉพาะผลไม้ที่ใกล้สุกหรือพืชที่ได้รับบาดเจ็บ ทำให้มีความสำคัญทางการเกษตรอย่างยิ่งในด้านการควบคุมคุณภาพของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้งห้าชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการกำกับทิศทางของการเจริญเติบโต พัฒนาการ และการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมของพืชอย่างซับซ้อน ความเข้าใจในกลไกการทำงานของสารเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการประยุกต์ใช้ในด้านเกษตรกรรม และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายและเก็บรักษาในที่ที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 (รังสฤษฎ์, 2540) ต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ตัวทำละลาย	การเก็บ
ออกซิน	Indole-3-acetic acid (IAA)	1N NaOH	0 °C
(auxins)	Indole butyric acid (IBA)	1N NaOH	0-5 °C
	Naphthaleneacetic (NAA)	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
กลุ่มไซโตไคนิน	N_6-Benzyladenine (BA)	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
(cytokinins)	Kinetin	1N NaOH	0 °C
	Zeatin	1N NaOH	0 °C
	N_6-isopentenyl adenine (2iP)	1N NaOH	0 °C
สารควบคุมการ	Paclobutrazol, abscissic acid (ABA)	1N NaOH	0 °C
เจริญเติบโตอื่น ๆ	Gibeberellic acid (GA)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	Picloram	0.2M KOH	0 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

EtOH = Ethanol alcohol

NaOH = Sodium hydroxide

KOH = Potassium hydroxide

N = Normality

M = Molarity

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.3.1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

2.3.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด

Younesikelaki และคณะ (2016) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดของ *Althaea officinalis* หรือ Marshmallow เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Malvaceae ที่มีถิ่นกำเนิดในยุโรปและเอเชีย โดยเน้นพัฒนาเทคนิคการฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดและการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ต้นอ่อนที่ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และมีอัตราการงอกที่ดี โดยทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ และเมอร์คิวริกคลอไรด์ ในความเข้มข้นและช่วงเวลาต่าง ๆ รวมถึงศึกษาผลของการเติมซูโครสในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผลการทดลองพบว่า การใช้ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการฆ่าเชื้อ โดยมีร้อยละการปนเปื้อนต่ำสุด 17.33 พร้อมรักษาอัตราการงอกให้อยู่ในระดับเหมาะสม ในขณะที่การแช่เมล็ดในน้ำกลั่น (control) ถึงแม้จะให้ร้อยละการงอกสูงสุด 80 แต่มีการปนเปื้อนสูงถึงร้อยละ 85.33 นอกจากนี้ การเติมซูโครสในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อกลับส่งผลเสียต่อการงอกและการพัฒนาของต้นอ่อน ซึ่งอาจเกิดจากแรงดันออสโมติกหรือการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ สรุปได้ว่า การใช้ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที เป็นวิธีการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเมล็ด *A. officinalis* ในสภาพปลอดเชื้อ และควรหลีกเลี่ยงการเติมซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะเริ่มต้น เพื่อเพิ่มอัตราการงอกและคุณภาพของต้นอ่อนให้ดียิ่งขึ้น

2.3.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ

Thomas and Maseena (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นพืช *Cardiospermum halicacabum Linn.* พืชสมุนไพรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในวงศ์ Sapindaceae เพื่อพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนพืชอย่างรวดเร็วผ่านการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนตาข้าง ที่มีความยาวประมาณ 2–3 เซนติเมตร และใบอ่อนที่มีอายุ 15–20 วัน เป็นตัวอย่างในการทดลอง โดยนำมาล้างด้วยน้ำประปาจากนั้นใช้สารละลาย Savlon ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจากบริษัทจอห์นสัน แอนด์ จอห์นสัน ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการแช่เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที ตามด้วยการแช่ในสารละลาย เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วจึงนำมาใช้ในการทดลอง ผลการทดลองพบว่า การใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบได้สูงสุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงถึงร้อยละ 96 นอกจากนี้ การใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ถึงร้อยละ 90 ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีในระดับต่ำของฮอร์โมนดังกล่าว แคลลัสที่ได้ถูกย้ายไปยังอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA หรือ Kinetin ในความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4–2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ/หรือใช้ร่วมกับ IAA ในช่วงความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าการเติม IAA ร่วมกับ BA หรือ Kinetin มีผลเพิ่มอัตราการเกิดยอดและแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญ โดยสูตรที่ให้ผลดีที่สุดคือ Kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้สูงสุดถึง 28 ยอดต่อชิ้นแคลลัส ในส่วนของการชักนำให้เกิดราก ใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งสูตร เสริมด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าร้อยละ 91 ของยอดสามารถพัฒนารากได้สำเร็จภายในระยะเวลา 45 วัน โดยมีจำนวนเฉลี่ย 4.2 รากต่อยอด ต้นอ่อนที่มีรากและยอดสมบูรณ์เมื่อย้ายปลูกลงดินสามารถปรับตัวและเติบโตได้ดี โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 90

2.3.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง

Ahmed (2022) ศึกษาและนำตาข้างของ *Dimocarpus longan* หรือ ลำไย ที่เก็บจากต้นแม่พันธุ์ที่ปลูกอยู่ในสถานีวิจัย Alkanater Alkhayria และนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนตัวอย่างสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาวะปลอดเชื้อ เริ่มต้นด้วยการนำชิ้นส่วนตาข้างมาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง จากนั้นทำการฆ่าเชื้อเบื้องต้นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งเพื่อขจัดสารตกค้างของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ขั้นตอนสุดท้ายในการฟอกฆ่าเชื้อ คือ การแช่ในเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนพืชที่สะอาดและพร้อมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขั้นตอนถัดไปอย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 2ip โดยพบว่า 2ip ในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นการเกิดยอดเฉลี่ยได้ 4.0 ยอดต่อชิ้นสำหรับการสร้างยอดโดยตรงจากใบ ทำโดยเพาะเลี้ยงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ หรือ Zeatin พบว่า TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดตาใหม่จากใบได้สูงถึงร้อยละ 76 ซึ่งตาเหล่านี้สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์เมื่อนำไปเลี้ยงต่ออาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี GA_3 ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถสร้างรากได้ดีเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งสูตร ที่เติม IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและมีร้อยละการรอดชีวิต 70 เมื่อนำออกปลูกสู่ธรรมชาติ

2.3.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.3.2.1 การชักนำเมล็ด

Al-Namazi และคณะ (2020) ศึกษาต้น *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) ซึ่งเป็นที่แพร่หลายในพื้นที่ภูเขาทางตะวันตกเฉียงใต้ของราชอาณาจักรซาอุดีอาระเบีย เป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางยาสำหรับผู้คนในประเทศซาอุดิอาระเบีย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบว่าเมล็ดของ *D. viscosa* มีการพักตัวของเมล็ดหรือไม่ เช่น เปลือกหุ้มเมล็ดที่ไม่สามารถทนน้ำได้ และหากเป็นเช่นนั้นจะมีวิธีการใด ที่จะทำลายการพักตัวและมีปัจจัยใดที่จะส่งเสริมการงอกได้ จึงทำการทดลองโดยการแช่เมล็ดในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น เป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำเดือด 10 นาที และสัมผัสกับ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที หลังจากนั้นจะถูกบ่มที่อุณหภูมิคงที่จาก 5 ถึง 35 องศาเซลเซียส ภายใต้ช่วงแสงนาน 12 ชั่วโมงหรือในที่มืดต่อเนื่องและบันทึกการงอก การตรวจสอบความทนต่อความเค็มโดยการบ่มเมล็ดที่มีกรดในความเข้มข้นต่าง ๆ ของ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในที่ที่มีแสงและอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เมล็ดที่ไม่ผ่านทดสอบมีการงอกต่ำถึงร้อยละ 30 คือ เมล็ดที่ถูกแช่อยู่ในน้ำเดือดหรือสัมผัสกับ 50 องศาเซลเซียสทั้งหมด และสำเร็จถึงร้อยละ 91 เมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมล็ดพันธุ์นี้มีการพักตัวทางกายภาพซึ่งสามารถถูกทำลายได้

Mohamad และคณะ (2022) ศึกษาขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพในการผลิตต้น *Paulownia hybrid* และ *Paulownia tomentosa* ในปริมาณมากโดยใช้เมล็ดเป็นตัวอย่างทดลองในหลอดทดลอง โดยทดสอบความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ BA หรือ Kinetin ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของ BA หรือ Kin เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ความยาวของยอดกลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 1 หรือ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้จำนวนยอดสูงสุด 9.13 และ 9.25 ยอดตามลำดับ หลังจากผ่านการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในด้านความยาวยอด 3.23 เซนติเมตร ต่อมาการเสริม IBA หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 1.0–1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้จำนวนรากเพิ่มขึ้นและมีความยาวรากสูงสุด ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า การเสริมด้วย IBA มีประสิทธิภาพมากกว่า NAA ในการกระตุ้นการเกิดราก สำหรับทั้งสองพันธุ์ การทดลองในส่วนของการปรับสภาพต้นกล้า ได้ทดสอบการใช้ส่วนผสมของดิน peat moss และ sand ในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1:2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าต้นกล้า Paulownia สามารถรอดชีวิตได้สำเร็จ ในส่วนผสมดินที่มี peat moss:sand อัตราส่วน 1:2 โดยส่วนผสมนี้ยังทำให้ต้นกล้ามีความสูงและจำนวนใบเพิ่มขึ้นอีกด้วย

Karunarathna และคณะ (2023) ศึกษาการพักตัวและการเพิ่มจำนวนจากเมล็ด *Madhuca longifolia* (Koenig) J.F. Macb. var. *longifolia* เป็นพันธุ์ไม้ป่าที่มีศักยภาพสูงในการฟื้นฟูป่าในเขตพื้นที่แห้งของศรีลังกา ปัญหาหลักในการเพาะปลูกพืชชนิดนี้ คือ ฤดูกาลในการผลิตเมล็ดและการขาดแคลนการผลิตต้นกล้า วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือการหาข้อมูลเกี่ยวกับการพักตัวของเมล็ด *M. longifolia* โดยทำการทดสอบเมล็ดด้วยสาร GA_3, โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3), น้ำกลั่น และการขูดเปลือกเมล็ด ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งในด้านอัตราการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าในสภาวะธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จากผลการทดลองพบว่า เมล็ดที่ขูดเปลือกแล้ว มีอัตราการงอกที่สูง หลังจากผ่านไป 28 วัน และมีร้อยละการงอกที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งในสภาวะที่มีแสงร้อยละ 90.00 และในที่มืดร้อยละ 85.45 สภาวะที่มืดมีผลกระตุ้นการงอกอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 7 วันแรกหลังการเพาะปลูก การเจริญเติบโตของยอดที่สูงที่สุดเกิดจากการแช่ด้วย GA_3, KNO3 และ DW โดยมีความยาวยอดที่ 8.3, 8.6 และ 8.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่การเกิดรากไม่ได้รับผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้สารที่กล่าวไปข้างต้น ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากเมล็ด ทำโดยนำเมล็ดมาขูดเปลือกและผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งสูตร ที่เสริมด้วย BAP ในความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการงอกที่ดีที่สุดเกิดขึ้นในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งสูตรที่เสริมด้วย BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ถึงร้อยละ 77.71 ซึ่งสูงกว่าอาหารสังเคราะห์สูตรอื่น ๆ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมล็ดของ *M. longifolia* มีการพักตัวในระดับที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ด้วยการขูดเปลือกเมล็ด และช่วยกระตุ้นการงอกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.3.2.2 การชักนำแคลลัส

Asthana และคณะ (2017) ศึกษาโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสและการพัฒนาของแคลลัสในระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของประคำดีควาย (*Sapindus trifoliatus*) ซึ่งเป็นต้นไม้ที่สำคัญและมีค่าในอุตสาหกรรมสบู่และสมุนไพร ในการทดลอง ได้ทำการชักนำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสจากกลีบเลี้ยง โดยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 2, 4-D และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรของ Kin พร้อมทั้งศึกษาการวางให้ผิวของกลีบเลี้ยงสัมผัสกับอาหารในด้านที่แตกต่างกัน พบว่าส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดแคลลัส จากนั้นย้ายลงบนอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมที่เสริมด้วย 2, 4-D และ Kin เช่นเดิม เพื่อแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานของแคลลัสทีละขั้นตอน ต่อมาทำการย้ายลงบนอาหารที่มี l-glutamine โครงสร้างของแคลลัสเริ่มพัฒนาเป็นลักษณะของ globular จากนั้นย้ายไปที่อาหาร MS ที่มี 200 มิลลิกรัมต่อลิตรของ l-glutamine แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงจาก globular ไปเป็น heart shape ไปจนถึงระยะ mature การศึกษาครั้งนี้ได้เผยให้เห็นถึงการพัฒนาระยะต่าง ๆ และสุดท้ายนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อที่จะให้พัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์

2.3.2.3 การชักนำตาข้างและชักนำราก

Hiregoudar และคณะ (2003) ศึกษาประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนพืช *Feronia limonia* (L.) Swingle ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Rutaceae โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BAP, kinetin และ TDZ ผลการทดลองพบว่า อัตราการเกิดยอดสูงสุดอยู่ที่ 11.33 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริม BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองโดยใช้ชิ้นส่วนใบ พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้เฉลี่ย 7.33 ยอดต่อชิ้น บนอาหารที่เติม BAP ในความเข้มข้นเดียวกัน การเพิ่มจำนวนยอดสามารถทำได้อย่างต่อเนื่องโดยการนำเนื้อเยื่อเดิมมาเพาะเลี้ยงซ้ำ ซึ่งช่วยให้เกิดยอดใหม่ได้มากถึง 20–32 ครั้ง ภายในระยะเวลา 5 เดือน จากเนื้อเยื่อชิ้นเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเพิ่มจำนวนพืชในระยะยาวจากแหล่งเนื้อเยื่อเดียว สำหรับการชักนำให้เกิดราก ใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งสูตร เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ร้อยละ 83.3 ของยอดที่เกิดขึ้นใหม่สามารถพัฒนารากได้สำเร็จ ต้นอ่อนที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์จะถูกนำมาปรับสภาพในสภาพเรือนเพาะชำก่อนนำไปปลูกในธรรมชาติ

Fajinmi และคณะ (2014) ศึกษา *Coleonema album* พืชสมุนไพรที่มีกลิ่นหอมและนิยมใช้เป็นไม้ประดับ มีความต้องการสูงในตลาดยาแผนโบราณทั้งในและต่างประเทศ ได้ดำเนินการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนพืชชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเน้นการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ รวมถึงการเปรียบเทียบระหว่าง *m*T กับ BA, kinetin และ TDZ ในการทดลองได้ใช้ไซโตไคนินแต่ละชนิดในระดับความเข้มข้น 0.5-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาผลต่อการเพิ่มจำนวนของยอดจากปลายยอดพืช ทั้งนี้ยังมีการทดลองเสริมออกซินร่วมกับไซโตไคนินในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อประเมินผลต่อการกระตุ้นการแตกยอด ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาแสดงให้เห็นว่า การใช้ BA, *m*T มีผลในการเพิ่มจำนวนยอดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ KIN โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ *m*T ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงถึง 14.5 ยอด นอกจากนี้ การเสริมออกซินร่วมกับ *m*T ที่ความเข้มข้นเหมาะสม ยังสามารถกระตุ้นการแตกยอดให้เพิ่มขึ้นได้มากยิ่งขึ้น โดยพบว่ามีจำนวนยอดสูงสุดถึง 18 ยอด และยอดที่ได้มีลักษณะแข็งแรง ในขั้นตอนสุดท้าย ยอดที่พัฒนาได้ถูกนำไปชักนำให้เกิดรากโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการรอดชีวิตหลังการปรับสภาพและย้ายปลูกสำเร็จสูงถึงร้อยละ 70

Faissal และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ต้น *Ruta graveolens* Linn. โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจากต้นที่มีอายุ 4 เดือน เพื่อเพิ่มจำนวนต้นในหลอดทดลอง ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ซึ่งเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตจากกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BA, Kinetin, และ 2iP รวมถึงการใช้ร่วมกับสารออกซินต่าง ๆ เช่น IAA, IBA, และ NAA ผลการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการเกิดยอดสูงสุดที่ร้อยละ 27.6 โดยได้จำนวนยอดเฉลี่ย 9.4 ยอด และความยาวยอดเฉลี่ย 4.3 เซนติเมตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในระยะเวลาเดียวกัน การเพิ่ม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้จำนวนยอดที่ได้เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 12.6 ยอด และอัตราการเกิดยอดสูงสุดที่ร้อยละ 71 หลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 4 สัปดาห์ สำหรับการชักนำให้เกิดราก สามารถทำได้ดีบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งสูตรที่เสริม IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ต้นอ่อนพัฒนาใบจำนวน 5–7 ใบ พร้อมรากที่แข็งแรงหลังจากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ จากนั้นต้นกล้าที่ได้ถูกนำไปปรับสภาพใน Soilrite™ และมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 80 สามารถนำไปปลูกในธรรมชาติได้สำเร็จ

Jiafu และคณะ (2000) ได้นำชิ้นส่วนยอดของลำไย หรือ *D. longan* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA หรือ 2ip สำหรับชิ้นส่วนใบอ่อนของยอดใหม่ถูกเพาะเลี้ยงบนบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ TDZ, Zeatin และ GA_3 ใช้สำหรับการยืดตัวของยอด ส่วน IBA และ NAA ใช้สำหรับการสร้างราก ผลการทดลองพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2ip 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการกระตุ้นให้เกิดยอด ได้ถึง 4 ยอด และจำนวนยอดที่เกิดขึ้นได้มากที่สุด พบได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริมด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดเหล่านี้พัฒนาเป็นต้นไม้ที่ยาวที่สุดเมื่อใช้ GA_3 ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกิดรากได้ดีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ครึ่งสูตร ที่เสริมด้วย IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร้อยละ 70 ถูกปรับสภาพและออกปลูกได้สำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างลำไยเถาจาก รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ. ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม โดยตัวอย่างดังกล่าวได้มาจากจังหวัดราชบุรี

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- น้ำยาล้างจาน (detergent)
- เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95
- เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)
- โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)
- สารลดแรงตึงผิว (tween-20)
- Plant Preservative Mixture (PPM); Plant Cell Technology
- Nystatin Suspension; Sigma Life Science
- Antibiotic Antimycotic Solution (100×); Sigma Life Science
- Cefotaxime; Nida Pharma Incorporation Co., Ltd.
- น้ำกลั่น (distilled water)

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรดด่าง

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- ไฮโดรคลอริกซ์ (HCL)

3.1.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงพืช

- อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS, 1962); Phytotech
- น้ำตาลทรายซูโครส
- ผงวุ้นเจลแลน กัม (Gellan gum); Phytotech
- น้ำกลั่น (Distilled water)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.1.2.4.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)

- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); Phytotech
- Indole-3-butyric acid (IBA); Phytotech
- Indole-3-acetic acid (IAA); Phytotech

3.1.2.4.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)

- 6-benzlyaminopurine (BAP หรือ BA); Phytotech
- Thidiazuron (TDZ); Phytotech
- *meta*-Topolin (*m*T); Phytotech
- 6-furfurylaminopurine (Kinetin); Phytotech

3.1.2.4.3 สารในกลุ่มจิบเบอร์เรลลิน (gibberellin)

- Gibberellin acid (GA_3); Phytotech

3.1.3 อุปกรณ์และภาชนะ

- ช้อนตักสารเคมี (Spectula)
- แท่งแก้วคนสาร
- บีกเกอร์ (Beaker); Kartell
- กระบอกตวง (Cylinder); Vit Lab
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- ปิเปต (Pipet)
- จุกลมยาง
- หลอดทดลอง
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- จานแก้ว (Petri dish); ANUMBRA
- กรรไกร
- มีดผ่าตัด (Knives); Dura
- ปากคีบ (Forceps); AMICO Germany stainless
- อลูมิเนียมฟอยล์ (Alumenium Foil)
- ไฟแช็ค
- ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (Balance); AG204, Metler Toledo
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave); SX-500, Tomy kogyo Co.Ltd
- ไมโครเวฟ (Microwave oven)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส (Refrigerator)
- เครื่องเขย่า (Shaker); Innova 2000, New Brunswick Scientific
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow); Faster BHA 48
- ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier Calipers14); Labnet
- ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- ทิปขนาดต่าง ๆ (tip); Quality Scientific Plastics
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer); Scientific Industries

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่าง

3.2.1.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด

นำผลลำไยเถามาล้างด้วยน้ำประปาเพื่อชำระล้างฝุ่นและสิ่งสกปรก จากนั้นปอกเปลือกแยกเนื้อออกจากเมล็ด และนำเมล็ดไปล้างซ้ำอีกครั้งเพื่อเตรียมใช้ในการทดลอง โดยมีการออกแบบชุดการทดลองจำนวน 7 สูตร โดยแต่ละสูตรจะใช้ความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยดัดแปลงมาจากการทดลองของ Younesikelaki และคณะ (2016) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ด โดยใช้สารฆ่าเชื้อหลากหลายชนิดในความเข้มข้นและระยะเวลาการเขย่าที่แตกต่างกัน ตามรายละเอียดในตารางที่ 3.1 โดยการทดลองทั้งหมดเมล็ดจะถูกเขย่าในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำไปแช่ในสารฆ่าเชื้อตามที่ระบุในตารางที่ 3.1 ร่วมกับสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ สาร antibiotic antimycotic, PPM และ cefotaxime อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 จำนวน 3 หยด ขั้นตอนนี้จะถูกทำซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที โดยไม่ใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์หรือโซเดียมไฮโปคลอไรด์ จากนั้นเมล็ดจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้เวลาล้าง 5 นาที ทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้การเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ภายหลังการฆ่าเชื้อ นำเมล็ดเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MS มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชที่ 5.6-5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวันและปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เก็บผลการทดลองโดยบันทึกข้อมูลร้อยละการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นหลังการฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงไปแล้ว (สมการที่ 3.1) อัตราการรอดชีวิตโดยที่เมล็ดไม่กลายเป็นสีน้ำตาล (สมการที่ 3.2) และร้อยละการงอกของเมล็ด (สมการที่ 3.3) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

ตารางที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ในการฟอกฆ่าเชื้อขั้นตอนแรกของแต่ละสูตรการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดลำไยเถาทั้ง 7 สูตร

สูตรการฟอกฆ่าเชื้อ	สารฟอกฆ่าเชื้อในขั้นตอนแรก	ระยะเวลา (นาที)
1	0.1% $HgCl_2$	10
2	0.1% $HgCl_2$	20
3	0.2% $HgCl_2$	10
4	0.2% $HgCl_2$	20
5	0.3% $HgCl_2$	20
6	2% NaOCl	20
7	4% NaOCl	20

3.2.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ

นำใบของลำไยเถามาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา ตัดแต่งใบให้มีขนาดที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้น้ำยาล้างจานถูกอย่างเบา ๆ ด้วยมือแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดจนกว่าน้ำยาล้างจานจะออกจนหมด แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยดัดแปลงวิธีการฟอกฆ่าเชื้อมาจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เมื่อล้างสะอาดแล้วนำมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสูตรที่ 1 และ เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสูตรที่ 2 ร่วมกับสาร antibiotic antimycotic 0.2 เปอร์เซ็นต์, PPM, Cefotaxime, Nystatin อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 20 จำนวน 3 หยด นำไปเขย่าที่เครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทำซ้ำอีกครั้งโดยปราศจากเมอร์คิวริกคลอไรด์ และนำไปเขย่าต่ออีกเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำมาล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้การเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังเสร็จสิ้นขั้นการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ตากชิ้นส่วนใบให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ ภายหลังการฆ่าเชื้อ ชิ้นส่วนใบจะถูกตัดแต่งให้มีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เก็บผลการทดลองโดยบันทึกข้อมูลร้อยละการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (สมการที่ 3.1) และอัตราการรอดชีวิต (สมการที่ 3.2) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

3.2.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง

ชิ้นส่วนตาข้างของลำไยเถา เก็บจากต้นที่มีสุขภาพแข็งแรงโดยต้องไม่มีบาดแผลหรือความเสียหายใด ๆ นำมาล้างด้วยน้ำประปาเพื่อขจัดฝุ่นและคราบสิ่งสกปรก จากนั้นดำเนินการทดลองจำนวน 6 สูตร โดยดัดแปลงสารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาจากการทดลองของ Younesikelaki และคณะ (2016) และความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อจากงานวิจัยของ Ahmed, (2022) มาปรับใช้ให้เหมาะสมกับบชิ้นส่วนตาข้าง ตามตารางที่ 3.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง ในขั้นตอนแรก นำมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารฆ่าเชื้อที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.2 พร้อมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ สาร antibiotic antimycotic, PPM และ cefotaxime อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ Tween-20 จำนวน 3 หยด ขั้นตอนดังกล่าวนี้ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยไม่ใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น ชิ้นส่วนตาข้างจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดยทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อสิ้นสุดกระบวนการฆ่าเชื้อจะนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชที่ 5.6-5.8 เติมเจลแลนกัม ที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวันและปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการเก็บผลการทดลองโดยบันทึกข้อมูลร้อยละการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น (สมการที่ 3.1) อัตราการรอดชีวิต (สมการที่ 3.2) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ในการฟอกฆ่าเชื้อขั้นตอนแรกของแต่ละสูตรการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างทั้ง 6 สูตร

สูตรการฟอกฆ่าเชื้อ	สารฟอกฆ่าเชื้อในขั้นตอนแรก	ระยะเวลา (นาที)
1	0.1% $HgCl_2$	10
2	0.1% $HgCl_2$	20
3	0.2% $HgCl_2$	10
4	0.2% $HgCl_2$	20
5	2% NaOCl	10
6	4% NaOCl	10

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนของจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนเมล็ด /ใบ/ตาข้างที่ปนเปื้อน}}{\text{จำนวนเมล็ด/ใบ/ตาข้างทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{อัตราการรอดชีวิตของเมล็ด/ใบ/ตาข้าง} = \frac{\text{จำนวนเมล็ด /ใบ/ตาข้างที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนเมล็ด/ใบ/ตาข้างทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{ร้อยละการงอกของเมล็ด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกทั้งหมด}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นต้นอ่อน

ทำการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่นและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA mT Kinetin และ TDZ และในกลุ่มจิบเบอเรลลิน คือ GA_3 โดยมีความเข้มข้นที่ 0 0.5 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชที่ 5.6-5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อได้อาหารแล้วนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวันและปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ เก็บผล และบันทึกผลการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอดที่เกิด วัดความยาวยอดและความยาวรากด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ นำผลที่ได้มาคำนวณจำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย (สมการที่ 3.4) อัตราการเกิดยอดจากเมล็ด (สมการที่ 3.5) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เกิดยอด

ทำการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่นและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA mT Kinetin และ TDZ โดยมีความเข้มข้นที่ 0 0.5 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชที่ 5.6-5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อได้อาหารแล้ว นำตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อและปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ เก็บผลและบันทึกผลการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนยอดที่เกิด วัดความยาวยอดด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ นำผลที่ได้มาคำนวณจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย (สมการที่ 3.4) และอัตราการเกิดยอด (สมการที่ 3.5) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 ถึง 8 สัปดาห์

3.2.4 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำใบให้เกิดแคลลัส

ทำการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ความเข้มข้นที่ 0 0.5 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชที่ 5.6-5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อได้อาหารแล้ว นำชิ้นส่วนใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มืด และควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ เก็บผล และบันทึกผลการทดลองทุก ๆ 4 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนการเกิดแคลลัส นำผลที่ได้มาคำนวณอัตราการเกิดแคลลัส (สมการที่ 3.5) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 ถึง 12 สัปดาห์

3.2.5 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก

ทำการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่นและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA และ IBA โดยมีความเข้มข้นที่ 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชที่ 5.6-5.8 เติมเจลแลนกัมที่ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 นาที เมื่อได้อาหารแล้ว นำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อและปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ เก็บผลและบันทึกผลการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ บันทึกจำนวนรากที่เกิดและวัดความยาวรากด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ นำผลที่ได้มาคำนวณจำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย (สมการที่ 3.4) และอัตราการเกิดราก (สมการที่ 3.5) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

$$\text{ความยาวยอด/รากเฉลี่ย} = \frac{\text{จำนวนยอด /รากที่เกิด}}{\text{จำนวนตาข้าง/ยอด/เมล็ดทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{อัตราการการเกิดยอด/แคลลัส/ราก} = \frac{\text{จำนวนยอด /แคลลัส/รากที่เกิด}}{\text{จำนวนตาข้าง/เมล็ด/ใบ/ยอดทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.6 วิธีการทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) CRD โดยแต่ละการทดลอง จะทำการทดลองเดียวกัน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวน 10 ชิ้น และสำหรับการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก จะมีซ้ำละ 5 ชิ้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

4.1.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด

จากการศึกษาผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดลำไยเถา โดยใช้วิธีการฟอกทั้งหมด 7 สูตร หลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดโดยสูตรที่ 4 เป็นวิธีที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีอื่น ๆ ตามผลการฟอกฆ่าเชื้อที่แสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งทำโดย นำเมล็ดมาเขย่าในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำไปแช่ในเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ สาร antibiotic antimycotic, PPM และ cefotaxime อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และสารลดแรงตึงผิว Tween-20 จำนวน 3 หยด เขย่าเป็นเวลานาน 20 นาที ขั้นตอนนี้จะถูกทำซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที โดยไม่ใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ จากนั้น เมล็ดจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้เวลาล้าง 5 นาที ทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้การเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบการปนเปื้อนร้อยละ 24 อัตราการรอดชีวิตร้อยละ 76 และร้อยละการงอก 50 ในขณะที่ สูตรที่ 5 พบร้อยละการปนเปื้อนเพียง 16 อัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 84 แต่ให้ผลร้อยละการงอกที่ต่ำเพียงร้อยละ 6 เท่านั้น สูตรการฟอกฆ่าเชื้อสูตรที่ 5 จึงไม่เหมาะสม และยังพบอีกว่าการใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ ให้ผลดีกว่าการใช้ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ โดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อได้ทำการดัดแปลงจาก Younesikelaki และคณะ (2016) ที่ได้ทำการทดลองประสิทธิภาพของการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด *A. officinalis* โดยเปรียบเทียบการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อระหว่างเมอร์คิวริกคลอไรด์กับ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดลำไยเถาการใช้ เมอร์คิวริกคลอไรด์ จะเหมาะสมกว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เนื่องจากพบการปล่อยสารฟินอลลิกมาก นอกจากนั้นผลของการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดในทุกวิธียังคงพบปัญหาของการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา หลังทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนเมล็ดเริ่มมีรอยปริแตกหรือเริ่มมีการงอก บริเวณรอยแตกนั้นจะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ออกมาจากภายในเมล็ด ดังรูปที่แสดงใน 4.1 (ข) และ (ค) ทำให้การงอกนั้นถูกขัดขวาง โดยเชื้อจุลินทรีย์และเป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดในภายหลัง นอกจากนั้นเมล็ดยังมีการปล่อยสารฟินอลลิก โดนสังเกตจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นจะมีสีน้ำตาลและจะมีสารน้ำตาลเข้มมากขึ้นเมื่อผ่านไปเพียง 3 วัน หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด ดังรูปที่ 4.1 (ก) จึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารอีกครั้งหลังทำการ

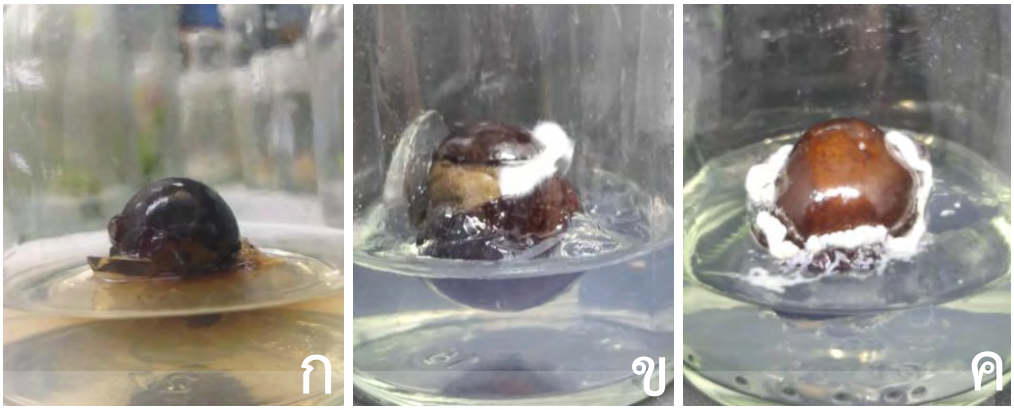
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว 3 วันและเปลี่ยนอีกครั้งเมื่อครบ 7 วัน หรือ 1 สัปดาห์ สำหรับการงอกของเมล็ดลำไยเถา จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.1 มีร้อยละของการงอกที่ค่อนข้างต่ำ นอกจากอุปสรรคที่พบจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์แล้ว ลักษณะของเมล็ดและการพักตัวของเมล็ดมีผลต่อการงอกด้วยเช่นกัน เมล็ดของลำไยเถามีลักษณะที่ค่อนข้างกลมสม่ำเสมอ ผิวมันวาวและมีความเข็ง จึงต้องทำการกรีดบริเวณเนื้อเยื่อสีขาวของเมล็ดซึ่งมีลักษณะแข็งให้เกิดเป็นเสมือนรอยปริแตก เพื่อให้น้ำ อาหาร หรือความชื้นสามารถเข้าสู่ภายในเมล็ดได้ ดังเช่นการทดลองของ Karunarathna และคณะ (2023) ที่ได้ทำการขูดเปลือกเมล็ด *Madhuca longifolia* (Koenig) J.F. Macb. var. *longifolia* เพื่อช่วยให้มีการงอกที่ดีขึ้น นอกจากนั้นหลังทำการกรีดเมล็ดลำไยเถาให้มีรอยแตกแล้ว นำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาผ่านขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ ยังช่วยให้เมล็ดงอกได้เร็วขึ้นอีกด้วย ดังเช่น จากงานวิจัยของ Al-Namazi และคณะ (2020) ที่ได้ศึกษาวิธีการทำลายการพักตัวของเมล็ด โดยการแช่เมล็ดในกรดซัลฟิวริก แช่ในน้ำเดือดรวมไปถึงการบ่มเมล็ด เป็นต้น

ตารางที่ 4.1 แสดงร้อยละการปนเปื้อน อัตราการรอดชีวิตและร้อยละการงอกของสูตรที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดลำไยเถาทั้ง 7 สูตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

สูตรในการฟอกฆ่าเชื้อ	จำนวนเมล็ด	จำนานต้น (ร้อยละการปนเปื้อน)	อัตราการรอดชีวิต	ร้อยละการงอก
1	30	22(74)	26	14
2	30	19(64)	36	14
3	30	11(36)	67	37
4	30	7(24)	76	50
5	30	5(16)	84	6
6	30	12(40)	60	40
7	30	9(30)	70	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะเมล็ดที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์
(ก) ลักษณะของเมล็ดที่ปล่อยสารฟินอลลิกเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน
(ข) ลักษณะของเมล็ดที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตามรอยแตกของเมล็ดที่กำลังเกิดการงอก
(ค) ลักษณะของเมล็ดที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หลังการฟอกและปนเปื้อนมากขึ้นเมื่อเมล็ดเริ่มมีรอยแตกของการงอก

4.1.2 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ

จากการศึกษาผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบลำไยเถา โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 2 สูตร หลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยดัดแปลงวิธีการมาจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จากตารางที่ 4.2 พบว่าสูตรที่ 1 เป็นวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ดีกว่า สูตรที่ 2 โดยสูตรที่ 1 หลังทำความสะอาดชิ้นส่วนใบในเบื้องต้นแล้ว นำมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสาร antibiotic antimycotic 0.2 เปอร์เซ็นต์, PPM, Cefotaxime, Nystatin อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 20 จำนวน 3 หยด นำไปเขย่าที่เครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทำซ้ำอีกครั้งโดยปราศจากเมอร์คิวริกคลอไรด์ และนำไปเขย่าต่ออีกเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำมาล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้การเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่ามีร้อยละการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เพียง 20 และมีร้อยละการรอดชีวิต 80 ใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อยังมีสุขภาพที่ดี พบว่ายังมีสีเขียว อาจมีรอยไหม้สำน้ำตาลเล็กน้อยที่ขอบใบ รูปที่ 4.2 (ก) ในขณะที่สูตรที่ 2 มีร้อยละการปนเปื้อนเท่ากันกับสูตรที่ 1 แต่มีร้อยละการรอดชีวิตที่น้อยกว่า เนื่องจากการใช้ เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ อาจมีความเข้มข้นที่มากเกินไปจนเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืชทำให้เกิดการบาดเจ็บ สังเกต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากหลังการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ จะมีลักษณะของสีน้ำตาลเกิดขึ้น ดังรูปที่ 4.2 (ข) การที่เนื้อเยื่อถูกทำลายจะเป็นอุปสรรคในการเจริญเติบโต ซึ่งในงานวิจัยของ Thomas and Maseena (2006) ได้ทำการเลือกใช้ เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของ *C. halicacabum* Linn. เพื่อใช้ในการทดลองด้วยเช่นกัน นอกจากนั้นก่อนทำการฟอกฆ่าเชื้อยังได้มีการนำไปเขย่าในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาเพียง 15 วินาที เนื่องจากสารฟอกฆ่าเชื้อที่มีความเข้มสูงจะต้องลดเวลาในการให้สารได้สัมผัสกับชิ้นส่วนน้อยลง เนื่องจากหากใช้เวลาที่นานจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชนั้นได้รับความเสียหายไปด้วยและส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ 4.2 แสดงร้อยละการปนเปื้อนและอัตราการรอดชีวิตของสูตรที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบลำไยเถาทั้ง 2 สูตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

สูตรการฟอกฆ่าเชื้อ	จำนวนใบ	จำนวนใบที่ปนเปื้อน (ร้อยละการปนเปื้อน)	ร้อยละการรอดชีวิต
1	30	6(20)	80
2	30	6(20)	50

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะชิ้นส่วนบนของลำไยเถาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์
(ก) ลักษณะชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิต
(ข) ลักษณะชิ้นส่วนใบที่ไม่รอดชีวิต กลายเป็นสีน้ำตาลหลังฟอกฆ่าเชื้อ

4.1.3 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง

จากการศึกษาผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างลำไยเถา โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 6 สูตร หลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า สูตรที่ 1 เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง โดยในขั้นตอนแรก นำมาเขย่าในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารฆ่าเชื้อเมอร์คิวริกคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.1 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับสารฟอกฆ่าเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ สาร antibiotic antimycotic, PPM และ cefotaxime อย่างละ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ Tween-20 จำนวน 3 หยด ขั้นตอนดังกล่าวนี้ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยไม่ใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น ชิ้นส่วนตาข้างจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดยทุกขั้นตอนดำเนินการภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที มีร้อยละการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 27 และมีร้อยละการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 73 ลักษณะชิ้นส่วนตาข้างที่มีสุขภาพที่ดี จะมีลักษณะสีเขียวและกำลังจะเกิดยอดได้ ดังรูปที่ 4.3 (ก) ในส่วนของสูตรการฟอกอื่น ๆ จะพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ดังรูปที่ 4.3 (ข) ในปริมาณที่มาก และยังมีการไหลของยางเกิดขึ้นอีกด้วย ซึ่งเป็นการขัดขวางการเจริญเติบโตของตาข้าง ทั้งยังมีร้อยละการปนเปื้อนที่สูงกว่าสูตรที่ 1 และ 2 โดยมีการปนเปื้อนมากที่สุดพบได้ในสูตรที่ 3 มีร้อยละการปนเปื้อนสูงถึงร้อยละ 70 และมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำสุดเพียงร้อยละ 30 เมื่อสังเกตร้อยละการปนเปื้อนของสูตรที่ 1 กับ 2 จะพบว่ามีร้อยละการปนเปื้อนที่เท่ากันแต่อัตราการรอดชีวิตของสูตรที่ 2 ให้ผลการทดลองที่ต่ำกว่า เนื่องจากในสารฆ่าเชื้อเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์มีความเข้มข้นที่สูงเกินไปและสร้างความเสียหายต่อชิ้นส่วนตาข้าง แต่ในทางกลับกันจากงานวิจัยของ Ahmed (2022) ที่ได้นำตาข้างของ *D. longan* หรือ ลำไย โดยใช้ทั้งเมอร์คิวริกคลอไรด์และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างกลับมีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อ อาจเป็นเพราะว่าแม้จะเป็นลำไยเหมือนกัน แต่สายพันธุ์ของลำไยที่แตกต่างกันมีผลทำให้ต้องปรับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อให้เหมาะสมตามสายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิดอีกด้วย

ตารางที่ 4.3 แสดงร้อยละการปนเปื้อนและอัตราการรอดชีวิตขอสูตรที่ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างลำไยเถาทั้ง 6 สูตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

สูตรการฟอกฆ่าเชื้อ	จำนวนตาข้าง	จำนวนตาข้างที่ปนเปื้อน (ร้อยละการปนเปื้อน)	อัตราการรอดชีวิต
1	30	8(27)	73
2	30	8(27)	68
3	30	16(53)	47
4	30	14(47)	64
5	30	21(70)	30
6	30	18(60)	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะชิ้นส่วนตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว และทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์
(ก) ลักษณะชิ้นส่วนตาข้างที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไม่เกิดการ ปนเปื้อน
(ข) ลักษณะชิ้นส่วนตาข้างที่ปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นต้นอ่อน

จากการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดลำไยเถาให้เกิดต้นอ่อน โดยนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ซึ่งเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA, mT, Kinetin และ TDZ รวมถึงในกลุ่มจิบเบอเรลลิน คือ GA_3 ในช่วงความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมล็ดก่อนการเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะของผิวที่แข็ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไป 1 สัปดาห์ เมล็ดจะมีการพองโต มีเปลือกที่นิ่มขึ้น บริเวณส่วนสีขาวของเมล็ดเริ่มมีรอยปริแตก เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 จะเริ่มมีการแทงรากออกมาก่อนแล้วจึงตามด้วยยอด จากผลการทดลองตามที่แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เมล็ดเกิดต้นอ่อน โดยในสูตรที่เสริม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดสูงถึงร้อยละ 73.33 และความยาวยอดเฉลี่ย 40.07 มิลลิเมตร รองลงมาคือการใช้ GA_3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้อัตราการเกิดยอดที่ร้อยละ 70 และความยาวยอดเฉลี่ย 35.17 มิลลิเมตร ส่วนสารในกลุ่มไซโตไคนินอื่น ๆ ได้แก่ *m*T, Kinetin และ TDZ แสดงผลที่ต่ำกว่าทั้งในด้านอัตราการเกิดยอดและความยาวยอดเฉลี่ย อาจมีผลกระตุ้นที่ไม่เหมาะสมหรือมีผลข้างเคียงที่ทำให้การเจริญเติบโตของพืชไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง แล้วยังพบอีกว่าจำนวนยอดและจำนวนรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะได้ 1 ยอด และ 1 รากในทุกสูตรอาหาร เมื่อนำมาพิจารณาในเชิงลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเมื่อให้เมล็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.4 ก) เป็นตัวควบคุม ยอดที่เกิดจากการใช้ GA_3 มีลักษณะ อวบ หนา และแข็งแรง (รูปที่ 4.4 ข) ในขณะที่ยอดจากการใช้ BA มีลักษณะ ผอมยาว ใบมีขนาดเล็ก (รูปที่ 4.4 ค) และเป็นในลักษณะเช่นเดียวกันกับใน *m*T, Kinetin และ TDZ ดังรูปที่ 4.4 ง, จ และ ฉ ความแตกต่างนี้สะท้อนถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิด GA_3 เป็นฮอร์โมนในกลุ่มจิบเบอเรลลิน ซึ่งมีหน้าที่หลักในการ กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation) และ ส่งเสริมการเจริญเติบโตทางลำต้น เมื่อเซลล์พืชได้รับ GA_3 จะเกิดการขยายขนาด ทำให้ยอดที่พัฒนาขึ้นมีลักษณะอวบหนาและสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่ายอดที่เกิดจาก GA_3 มีลักษณะเนื้อเยื่อแข็งแรงกว่ากลุ่มไซโตไคนิน ในขณะที่ BA ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของไซโตไคนิน มีบทบาทสำคัญในการ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ (cell division) และ การแตกยอด (shoot induction) ทำให้เมล็ดสามารถพัฒนายอดได้ในปริมาณมาก แต่ขนาดของยอดจะค่อนข้างเล็กและมีลักษณะเรียวยาว เนื่องจากไม่ได้เกิดการขยายตัวของเซลล์อย่างเต็มที่ ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Murashige and Skoog (1962) ที่ระบุว่าสารไซโตไคนินมีแนวโน้มในการส่งเสริมการแตกยอดในปริมาณมากแต่ไม่ส่งเสริมการขยายขนาดเซลล์เท่ากับจิบเบอเรลลิน ผลการทดลองยังสอดคล้องกับ Mohamad และคณะ (2022) ที่ได้ทำการศึกษา *Paulownia* hybrid และ *Paulownia tomentosa* โดยใช้เมล็ดเป็นตัวอย่างของการทดลอง เมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น ความยาวของยอดกลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อมี BA ในระดับที่เหมาะสม พืชจะสามารถพัฒนายอดใหม่ได้ดี แต่หากมีในระดับสูงเกินไป การแบ่งเซลล์อาจเกิดแบบกระจุกตัว โดยเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้น แต่มีขนาดเล็กและไม่ยืดตัว ส่งผลให้ยอดที่เกิดขึ้น สั้นและหนา แต่ไม่ยาว โดยกลไกนี้ยังสอดคล้องกับคำอธิบายของ Taiz and Zeiger (2010) ซึ่งระบุว่า การเจริญเติบโตของยอดพืชขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างการแบ่งเซลล์ (cytokinin action) และการยืดตัวของเซลล์ (gibberellin action) หากมีไซโตไคนินมีปริมาณสูงเกินไป จะเกิดการแบ่งเซลล์แบบสะสมแต่ขาดการขยาย ทำให้ยอดสั้นลงอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอด และจำนวนรากแฉลี่ยหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	ร้อยละการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/เมล็ด)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/เมล็ด)
control	60.00	1	10.33 ^{g} ±0.30	1
GA_3 0.5	70.00	1	35.17^{ab} ± 0.79	1
GA_3 1	60.00	1	32.37^{b} ± 0.66	1
GA_3 2	46.67	1	21.40^{c} ± 0.63	1
GA_3 3	46.67	1	15.77^{e} ± 0.26	1
GA_3 4	40.00	1	14.29^{e} ± 0.36	1
GA_3 5	30.00	1	12.34^{f} ± 0.34	1
BA 0.5	66.67	1	25.67^{bc} ± 0.81	1
BA 1	73.33	1	40.07^{a} ± 0.34	1
BA 2	60.00	1	21.46^{c} ± 0.65	1
BA 3	43.33	1	16.23^{e} ± 0.33	1
BA 4	30.00	1	15.51^{e} ± 0.29	1
BA 5	23.33	1	11.33^{f} ± 0.81	1
*m*T 0.5	46.67	1	21.84^{c} ± 0.40	1
*m*T 1	56.67	1	29.16^{b} ± 0.46	1
*m*T 2	53.33	1	19.71^{cd} ± 0.55	1
*m*T 3	23.33	1	15.52^{d} ± 0.50	1
*m*T 4	20.00	1	14.07^{f} ± 0.33	1
*m*T 5	20.00	1	11.93^{f} ± 0.36	1
kinetin 0.5	73.33	1	19.72^{c} ± 0.76	1
kinetin 1	66.67	1	22.97^{c} ± 0.56	1
kinetin 2	46.67	1	17.64^{d} ± 0.34	1

***หมายเหตุ** [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

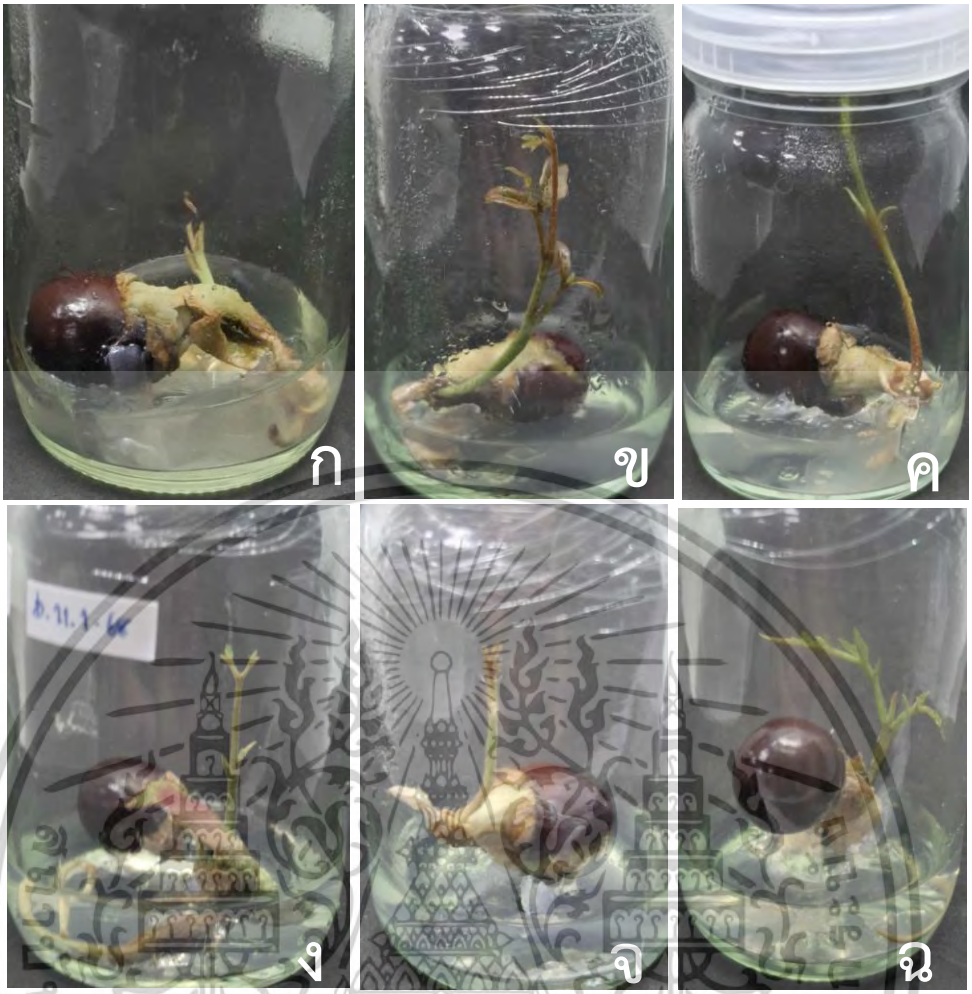
ตารางที่ 4.4 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอด และจำนวนรากแฉลี่ยหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ต่อ)

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	ร้อยละการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/เมล็ด)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/เมล็ด)
kinetin 3	20.00	1	$14.82^{e} \pm 0.39$	1
kinetin 4	20.00	1	$13.69^{e} \pm 0.37$	1
kinetin 5	10.00	1	$11.36^{f} \pm 0.34$	1
TDZ 0.5	53.33	1	$19.63^{cd} \pm 0.33$	1
TDZ 1	60.00	1	$20.70^{c} \pm 0.47$	1
TDZ 2	36.67	1	$17.12^{d} \pm 0.50$	1
TDZ 3	26.67	1	$14.94^{f} \pm 0.35$	1
TDZ 4	20.00	1	$12.83^{f} \pm 0.37$	1
TDZ 5	13.33	1	$10.91^{g} \pm 0.31$	1

***หมายเหตุ** [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะยอดที่จากเมล็ดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ที่ให้ลักษณะยอดดีที่สุด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) GA_3 0.5 มก./ล. (ค) BA 1.0 (ง) *m*T 0.5 มก./ล. (จ) kinetin 0.5 มก./ล. (ฉ) TDZ 0.5 มก./ล.

4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอด

การทดลองศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA, mT, kinetin และ TDZ ต่อการชักนำตาข้างของลำไยเถาให้เกิดยอด โดยนำตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตข้างต้นในช่วงความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดในการชักนำการเกิดยอดจากตาข้าง โดยมีอัตราการเกิดยอดสูงที่สุดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 80 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นตาข้าง 1.33 ยอด และมีความยาวยอดเฉลี่ย 18.59 มิลลิเมตร รองลงมาเป็นอาหารสังเคราะห์ที่เสริมด้วย mT ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้อัตราการเกิดยอดร้อยละ 70 จำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอด และความยาวยอดเฉลี่ย 17.67 มิลลิเมตร ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า BA ที่ความเข้มข้นเหมาะสมสามารถกระตุ้นการเจริญของยอดจากตาข้างของลำไยเถาได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินอื่น ๆ ที่ทดลองในครั้งนี้ พิจารณาลักษณะของยอดที่เกิดจากตาข้าง ดังรูปที่ 4.5 ก ถึง ญ เมื่อนำสูตรอาหารที่ดีที่สุดในแต่ละสูตรมาเปรียบเทียบกัน จะพบว่า การชักนำตาข้างให้เกิดยอดจะชักนำได้ดีเมื่อมีความเข้มข้นที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต รูปที่ 4.5 ก และ ข สูตรอาหาร BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ยอดที่หนา ดูแข็งแรง และมีใบเกิดขึ้น ดังรูปที่ 4.5 ค ในขณะที่ยอดที่ได้จากสูตรอาหารอื่น ๆ รูปที่ 4.5 ง, จ, ฉ, ช, ซ, ฌ และ ญ จะเป็นยอดที่เล็ก สีของยอดเป็นสีเขียวอ่อน ยอดไม่เป็นรูปเป็นร่าง คือ ลักษณะยอดที่ได้นั้นมีความหงิกหงอ ไม่ตั้งตรง อาจเป็นเพราะลำไยเถาเป็นไม้เลื้อย ลักษณะจึงเกิดเป็นเช่นนี้ มีแคลลัสเกิดขึ้นในทุก ๆ สูตรอาหารแต่เมื่อเวลาผ่านไปจะกลายเป็นสีน้ำตาลเกาะอยู่รอบ ๆ ฐานของตาข้าง เช่นรูปที่ 4.5 ฌ และ ญ จะพบสีน้ำตาลปกคลุมขึ้นมาจนมิดตาข้างเดิม และจากผลการทดลอง ไม่เป็นไปตามงานวิจัยของ Jiafu และคณะ (2000) ที่ได้นำชิ้นส่วนยอดของลำไย หรือ *D. longan* พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2ip ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการกระตุ้นให้เกิดยอด ได้ถึง 4 ยอด และจำนวนยอดที่เกิดขึ้นได้มากที่สุด พบได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริมด้วย TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังใช้ GA_3 ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมอีกด้วย อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน การเลือกใช้ตำแหน่งชิ้นส่วนตัวอย่างในการทดลอง และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่างกลุ่มไซโตไคนินและจิบเบลเรลริลจึงได้ผลที่แตกต่างกัน ในขณะที่ Faissal และคณะ (2018) ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ต้น *Ruta graveolens* Linn. โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายเพื่อเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการเกิดยอดสูงสุด หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในระยะเวลาเดียวกัน การเพิ่ม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้จำนวนยอดที่ได้เพิ่มขึ้น และจำนวนการเกิดยอดก็เพิ่มขึ้นตามอีกด้วย นอกจากนั้น งานวิจัยของ Fajinmi และคณะ (2014) ที่ทำการศึกษา *Coleonema album* เปรียบเทียบระหว่าง *m*T กับ BA, kinetin และ TDZ ทั้งนี้ยังมีการทดลองเสริมออกซินร่วมกับไซโตไคนินในความเข้มข้นที่เหมาะสม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การใช้ BA, *m*T มีผลในการเพิ่มจำนวนยอดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ KIN และการเสริมออกซินร่วมกับ *m*T ที่ความเข้มข้นเหมาะสม ยังสามารถกระตุ้นการแตกยอดให้เพิ่มขึ้นได้มากยิ่งขึ้นมากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียว และจากการทดลองลักษณะของยอดที่ได้ มีลักษณะยาว เกิดใบอ่อน 2-3 ใบหรืออาจมีมากกว่า แต่เมื่อเพาะเลี้ยงหลังผ่านไป 4 สัปดาห์ จะเกิดการร่วงของใบ ยอดที่เขียวกลับเริ่มมีสีซีดเหลืองซึ่งอาจเป็นผลมาจาก การสะสมของ BA ในเนื้อเยื่อมากเกินไป ส่งผลให้การแบ่งเซลล์และการขยายตัวของเนื้อเยื่อถูกกระตุ้นมากจนเกินไป ทำให้เกิดความเครียดต่อพืช หรืออาจเนื่องจากความพร่องของธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริมในสูตร MS ที่ใช้ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของยอดที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจากการกระตุ้นของไซโตไคนิน ดังเช่น Denkova และคณะ (2020) ศึกษาผลของการเพิ่มระดับไซโตไคนินของ *Arabidopsis thaliana* โดยการเพิ่มความเข้มข้นของไซโตไคนิน เช่น BA เพื่อศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงของการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม การเจริญเติบโต และการตอบสนองต่อความเครียดในพืช

ตารางที่ 4.5 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	ร้อยละการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วนตาข้าง)	ความยาวยอด (มิลลิเมตร)
0	70.00	1	9.37 [f] ±0.35
BA 0.5	80.00	1.33	18.59[a] ± 0.42
BA 1	80.00	1	16.55[b] ± 0.37
BA 2	77.67	1	16.12[b] ± 0.28
BA 3	63.33	1	15.31[bc] ± 0.37
BA 4	60.00	1	14.42[c] ± 0.31
BA 5	60.00	1	11.96[e] ± 0.30
*m*T 0.5	66.67	1	17.13[ab] ± 0.34
*m*T 1	70.00	1	17.67[ab] ± 0.32
*m*T 2	56.67	1	15.06[bc] ± 0.41
*m*T 3	46.67	1	14.98[c] ± 0.29
*m*T 4	43.37	1	13.73[d] ± 0.37
*m*T 5	40.00	1	12.03[e] ± 0.34

***หมายเหตุ** [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

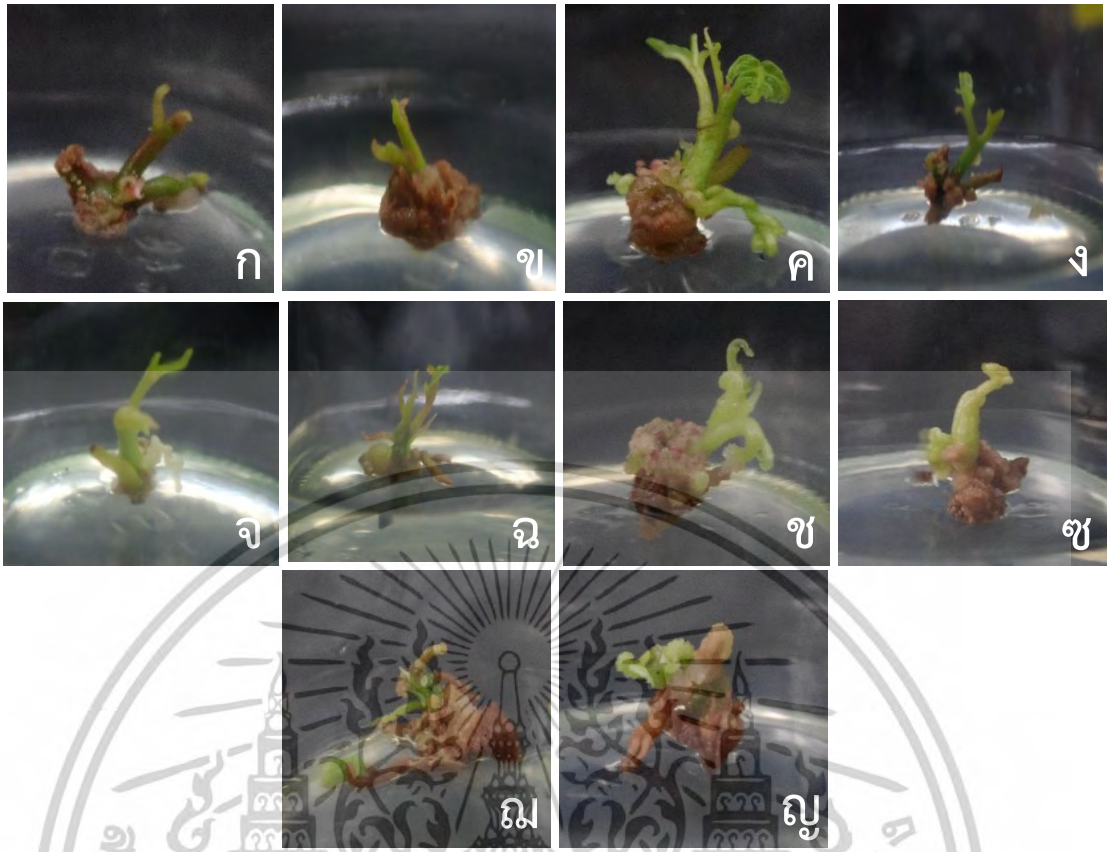
ตารางที่ 4.5 แสดงร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ต่อ)

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	ร้อยละการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วนตาข้าง)	ความยาวยอด (มิลลิเมตร)
kinetin 0.5	73.33	1	16.26^{b} ± 0.34
kinetin 1	56.67	1	16.09^{b} ± 0.29
kinetin 2	53.33	1	14.86^{c} ± 0.35
kinetin 3	50.00	1	14.12^{c} ± 0.34
kinetin 4	46.67	1	13.76^{d} ± 0.36
kinetin 5	43.37	1	11.36^{e} ± 0.28
TDZ 0.5	76.67	1	15.91^{b} ± 0.29
TDZ 1	53.33	1	15.54^{bc} ± 0.32
TDZ 2	53.33	1	15.07^{bc} ± 0.37
TDZ 3	46.67	1	13.83^{d} ± 0.39
TDZ 4	40.00	1	13.10^{d} ± 0.33
TDZ 5	37.67	1	12.46^{e} ± 0.35

***หมายเหตุ** [1/]ค่าเฉลี่ย ± SE

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะยอดลำไยเถาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์
(ก-ข) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ค) BA 0.5 มก./ล. (ง) BA 1.0 มก./ล. (จ) *m*T 0.5 มก./ล. (ฉ) *m*T 1.0 มก./ล. (ช) kinetin 0.5 มก./ล. (ซ) kinetin 1.0 มก./ล. (ฌ) TDZ 0.5 มก./ล. (ญ) TDZ 1.0 มก./ล.

4.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส

จากการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของลำไยเถา โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ในช่วงความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นการเกิดแคลลัส โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงถึงร้อยละ 20 แคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีที่ขาวนวล ออกไปทางเหลือง ดังรูปที่ 4.6 ข รองลงมาคือสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้อัตราการเกิดแคลลัสที่ร้อยละ 13.33 ในขณะที่อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตให้ผลการเกิดแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงร้อยละ 6.67 และความเข้มข้นอื่น ๆ ตั้งแต่ 2 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดังผลที่แสดงใน ตาราง 4.6 การเกิดแคลลัสจะเกิดขึ้นแกนกลางของใบโดยทั้ง 3 สูตรอาหารจะให้ลักษณะการเกิดแคลลัสเป็นไปในทางเดียวกัน รูปที่ 4.6 ก ถึง ค ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.5–1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ใบให้กลายเป็นแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Faramayuda และคณะ (2021) ที่รายงานว่า การใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสจากใบของเงาะ (*Nephelium lappaceum L.*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยแคลลัสที่ได้มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและมีลักษณะเนื้อเยื่อสมบูรณ์ นอกจากนี้ Prakash และคณะ (2004) ยังพบว่าการใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของ *Curcuma amada Roxb.* ได้ดี แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่สอดคล้องกันในพืชหลายชนิด ซึ่งตอบสนองต่อ 2,4-D ในช่วงความเข้มข้นต่ำ โดยเกิดการแบ่งเซลล์อย่างเหมาะสม ในขณะที่ความเข้มข้นสูงอาจยับยั้งการเจริญหรือก่อให้เกิดเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ แต่ไม่สอดคล้องกับ Asthana และคณะ (2017) ที่ทำการศึกษาการพัฒนาของแคลลัสในระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของประคำดีควาย (*Sapindus trifoliatus*) ในการทดลอง ได้ทำการชักนำให้เกิดแคลลัสจากกลีบเลี้ยง โดยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 2, 4-D และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรของ Kin พร้อมทั้งศึกษาการวางให้ผิวของกลีบเลี้ยงสัมผัสกับอาหารในด้านที่แตกต่างกัน พบว่าส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดแคลลัส และจากการทดลองเนื่องจากใบของลำไยเถา มีลักษณะผิวของใบที่แข็ง อาจเป็นอุปสรรคในการพัฒนาให้ไปเป็นแคลลัสหรือช่วงของความเข้มข้นอาจยังไม่เหมาะสม จึงได้ร้อยละของการเกิดแคลลัสที่ค่อนข้างต่ำ โดยลักษณะของแคลลัสที่ได้มีปริมาณน้อยและมีสีเหลืองซีด ซ้ำยังใช้เวลาในการชักนำที่ค่อนข้างนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงอัตราการเกิดแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะปลอดแสงเป็น ระยะเวลา 12 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	จำนวนชิ้นส่วนใบ	อัตราการเกิดแคลลัส
0	30	2 (6.67)
2,4-D 0.5	30	6 (20.00)
2,4-D 1	30	4 (13.33)
2,4-D 2	30	0
2,4-D 3	30	0
2,4-D 4	30	0
2,4-D 5	30	0

รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะการเกิดแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะปลอดแสงเป็น ระยะเวลา 12 สัปดาห์
(ก) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต
(ข) 2,4-D 0.5 มก./ล.
(ค) 2,4-D 0.5 มก./ล.

4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก

จากผลการทดลองที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการเกิดรากจากชิ้นส่วนยอดพบว่า สูตรอาหารที่เสริม IBA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลดีที่สุด โดยมีอัตราการเกิดรากสูงถึงร้อยละ 50 และจำนวนรากเฉลี่ย 3 ราก ในขณะที่สูตรที่เสริม IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีความยาวรากเฉลี่ยที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาวที่สุด แต่มีจำนวนรากเฉลี่ยที่น้อยกว่า และให้ผลที่ดีกว่า IAA ผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากบทบาทของ IBA ที่ช่วยกระตุ้นการพัฒนาเซลล์และการสร้างรากโดยการเพิ่มการแบ่งเซลล์ในรากและการขยายขนาดของเซลล์ในระยะที่รากเริ่มพัฒนา งานวิจัยของ Jiafu และคณะ (2000), Mohamad และคณะ (2022) และ Fajinmi และคณะ (2014) ที่ใช้ IBA ในความเข้มข้นต่ำก็พบผลลัพธ์ที่คล้ายกัน โดยในบางกรณีพบว่า IBA ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากได้ดีกว่า เนื่องจากความเข้มข้นสูงอาจทำให้มีการกระตุ้นที่มากเกินไป ส่งผลให้เกิดความเครียดต่อพืชและมีผลกระทบต่อการพัฒนาเซลล์หรือการเจริญเติบโตของรากได้ การใช้ความเข้มข้นต่ำของ IBA เช่น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในบางกรณีอาจช่วยลดความเครียดในพืชและส่งผลให้เกิดรากที่ยาวและแข็งแรงมากขึ้น แต่การลดความเข้มข้นลงจะทำให้การกระตุ้นการสร้างรากเป็นไปได้อย่างค่อยเป็นค่อยไป และอาจช่วยลดผลกระทบจากการกระตุ้นที่มากเกินไปในทางกลับกัน IBA ที่ความเข้มข้นสูง เช่น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจกระตุ้นการเกิดรากได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่จำนวนรากอาจไม่ได้สูงที่สุดเพราะอาจเกิดการกระตุ้นที่มากเกินไปในขั้นตอนการพัฒนาของราก ซึ่งทำให้รากเติบโตไม่เต็มที่หรือออกมาไม่สมบูรณ์ การเปรียบเทียบ IBA กับ IAA พบว่า จากงานวิจัยของ Nowakowska และ Pacholczak (2015) ศึกษาผลของออกซิน ต่อการเกิดรากของพืชในวงศ์ Fabaceae โดยเน้นไปที่การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อกระตุ้นการเกิดรากในชิ้นส่วนการปักชำของพืชในวงศ์นี้ อธิบายว่า IAA แม้ว่าจะสามารถกระตุ้นการเกิดรากได้ในบางกรณี แต่มีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า IBA โดยอาจเกิดจากการที่ IAA ถูกย่อยสลายได้เร็วในเซลล์และไม่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่ากับ IBA นอกจากนี้ IAA อาจถูกทำลายได้ง่ายจากเอนไซม์ต่าง ๆ ในเซลล์พืช ซึ่งอาจทำให้ผลลัพธ์ที่ได้ไม่เหมือนกับการใช้ IBA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงร้อยละการเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่สริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	ร้อยละการเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ยอด)	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
0	0	0	0
IAA 0.5	0	1	0
IAA 1	25.00	1	1
IAA 1.5	0	1	0
IAA 2	0	1	0
IBA 0.5	0	1	0
IBA 1	0	1	0
IBA 1.5	50.00	2	3.5
IBA 2	50.00	3	3

รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะการเกิดรากหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

(ก) IBA 2 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

(ข) IAA 1 มก./ล. ระยะเวลา 2 สัปดาห์

(ค) IBA 2 มก./ล. ระยะเวลา 4 สัปดาห์

(ง) IBA 2 1.5 มก./ล. ระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำไยเถา (Dimocarpus scandens (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar) โดยเน้นกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช การชักนำต้นอ่อนจากเมล็ด การชักนำยอดจากตาข้าง การนำแคลลัสจากใบ และการชักนำการเกิดรากจากยอด เพื่อใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชชนิดนี้อย่างยั่งยืน ผลการทดลองพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดโดยใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2% ร่วมกับสาร antimicrobial ต่าง ๆ ได้แก่ antibiotic-antimycotic, PPM, cefotaxime และ Tween-20 ให้ประสิทธิภาพสูงสุด โดยให้ร้อยละการปนเปื้อนเพียง 24 อัตราการรอดชีวิตร้อยละ 76 และอัตราการงอกร้อยละ 50 เมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่เกิดความเสียหาย ทั้งนี้ การกรีดเปลือกเมล็ดบางส่วนก่อนเพาะเลี้ยงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการงอกได้ เนื่องจากลำไยเถามีเปลือกเมล็ดที่แข็งและผิวมันวาว ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการดูดซึมน้ำและสารอาหาร ในส่วนของใบและตาข้าง การฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1% ร่วมกับสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ให้ผลใกล้เคียงกัน โดยใบมีร้อยละการปนเปื้อนต่ำที่สุดที่ร้อยละ 20 และมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 80 ใบที่ได้มีสีเขียวสมบูรณ์ ไม่มีอาการไหม้จากสารเคมี ส่วนตาข้างมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 73 แม้จะมีร้อยละการปนเปื้อนสูงกว่าเล็กน้อย แต่ยังถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับการชักนำต้นอ่อนจากเมล็ด พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน โดยเฉพาะ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดในด้านการกระตุ้นการแตกยอด โดยมีอัตราการเกิดยอดร้อยละ 73.33 และความยาวยอดเฉลี่ย 40.07 มิลลิเมตร ขณะที่ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลรองลงมา ร้อยละ70% แต่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดให้มีลักษณะอวบหนา แข็งแรงกว่ายอดที่ได้จาก BA ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันระหว่างฮอร์โมนสองชนิด คือ BA ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ ขณะที่ GA_3 ส่งเสริมการยืดตัวของเซลล์ การชักนำยอดจากตาข้าง พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้ถึงร้อยละ 80 มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.33 ยอดต่อชิ้น และความยาวยอดเฉลี่ย 18.59 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม พบว่าการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องด้วยความเข้มข้นของ BA ดังกล่าวอาจส่งผลให้เกิดอาการซีดเหลืองและใบร่วงในภายหลัง ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมของไซโตไคนินในเนื้อเยื่อหรือการขาดธาตุอาหารรอง อาการดังกล่าวบ่งชี้ถึงความจำเป็นในการปรับสูตรอาหารในระยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงต่อ เช่น การลดความเข้มข้นของไซโตไคนิน หรือการเสริมธาตุอาหารเพื่อสมดุลการเจริญเติบโตของยอดที่ชักนำได้ ในส่วนของการชักนำแคลลัสจากใบ พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุดที่ร้อยละ 20 รองลงมาคือความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลที่ร้อยละ 13.33 ส่วนความเข้มข้นที่สูงกว่า 2.0–5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะสีเหลืองซีด ปริมาณน้อย และต้องใช้เวลาชักนำนาน อาจเนื่องมาจากลักษณะทางกายภาพของใบลำไยเถาที่มีผิวใบแข็ง ทำให้การเหนี่ยวนำแคลลัสเป็นไปได้ยาก สุดท้าย ในการศึกษาการชักนำการเกิดรากจากยอด พบว่า IBA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด โดยมีอัตราการเกิดรากร้อยละ 50 และจำนวนรากเฉลี่ย 3 รากต่อชิ้นยอด ขณะที่ IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้จะให้จำนวนรากน้อยกว่า แต่ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 3.5 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ IAA พบว่า IBA มีประสิทธิภาพดีกว่าอย่างชัดเจน ซึ่งอาจเป็นเพราะ IBA มีความคงตัวในเนื้อเยื่อพืชมากกว่า และสามารถกระตุ้นการพัฒนาระบบรากได้มีประสิทธิภาพมากกว่า IAA ที่สลายตัวได้ง่าย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การชักนำแคลลัสที่ใช้เวลานานถึง 12 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ยาวนานเกินไปจึงควรศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพิ่มเติมรวมไปถึงศึกษาลักษณะใบของลำไยเถาเพื่อค้นหาวิธีการชักนำแคลลัสให้เร็วยิ่งขึ้น

5.2.2 ในการศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ควรทำการศึกษาสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกัน 2 กลุ่มเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างออกไปมากขึ้นและเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลำไยเถา

5.2.3 ในการชักนำให้เกิดราก ควรให้ได้ปริมาณที่มากกว่านี้เพื่อนำไปศึกษาสูตรอาหารอื่น ๆ เพื่อให้ได้ปริมาณที่มากขึ้นสำหรับการออกปลูกสู่ธรรมชาติ

5.2.4 ปัจจัยการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ยังเกิดการปนเปื้อนเป็นเพราะการเก็บรักษาเมล็ดก่อนนำมาทำการทดลอง เมื่อทำการเก็บเกี่ยวผลมาแล้วควรทำการทดลองทันที ไม่ควรปล่อยเมล็ดไว้ข้ามวัน อันเองมาจากเป็นลำไยเป็นผลไม้ ซึ่งมีการเน่าเสียเกิดขึ้นได้ แม้จะนำไปแช่ในตู้เย็นก็ยังเป็นปัจจัยส่งผลต่อการงอกและการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้

5.2.5 ควรมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นแม่และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของลำไยเถา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พาวิน มะโนชัย, ยุทธนา เขาสุเมรุ, ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2547. **เทคโนโลยีการผลิตลำไย**. กรุงเทพฯ : วารสารเคหการเกษตร

พาวิน มะโนชัย, วรินทร์ สุทนต์, จิรนันท์ เสนานาญ และจำนง ศรีจันทร์. 2550. การพัฒนารูปแบบการตัดแต่งกิ่งและควบคุมทรงพุ่มให้ได้ลำไยต้นเตี้ยเพื่อลดต้นทุนการผลิต. โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ : การพัฒนาเทคโนโลยีเหมาะสมเพื่อการลด ต้นทุนและเพิ่มราคาผลผลิตสำหรับการผลิตลำไยในเชิงพาณิชย์. แพร่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์ ดุษฎี ณ ลำปาง และรำไพพรรณ อภิชาตพงศ์ชัย. 2542. **ลำไย: ไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรม.** พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : โรงพิมพ์มิ่งเมือง

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค.** พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงทพฯ : สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม ฝ่ายโรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิริยา นิตย์ธีรานนท์. 2560. **การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบจากสารสกัดเมล็ดลำไยเถา.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ตะวันออก.

วิริยา นิตย์ธีรานนท์ และจตุพร อรุณกมลศรี. 2561. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมล็ดลำไยเถาและการนำไปใช้ใน ผลิตภัณฑ์แยมลำไยเถา. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 46(2) : 219-227.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : วี.เจ.พริ้นติ้ง

Ahmed M.E.a.E. 2022. *In vitro* propagation for conservation and genetic fidelity of the near threatened *Dimocarpus longan* plant. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 20: 130-145.

Al-Namazi A., Al-Ammari B., Davy A. and Al-Turki T. 2020. Seed dormancy and germination in *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) from south-western Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 34 : 188-199.

Asthana, P., Rai, M.K. and Jaiswal, U. 2017. Somatic embryogenesis from sepal explants in *Sapindus trifoliatus*, a plant valuable in herbal soap industry. *Industrial Crops and Products*. 100 : 228–235.

Boonsuk, B. and Chantaranothai, P. 2017. Notes on the *Dimocarpus Longan* (Sapindaceae) Complex. *Novon. A Journal for Botanical Nomenclature*. 25 : 134-138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Denkova, M., Penick, A., Rollick, J., and Doležal, K. 2020. Elevated cytokinin activity triggers transcriptional changes and affects growth and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*. 39(5) : 635–649.

Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple "F" test. Biometrics. 11 : 1–42.

Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A. A. and Qahtan, A. A. 2017. Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of Ruta graveolens using shoot tip meristems. Saudi Journal of Biological Sciences, 25(2) : 273–277.

Fajinmi.O.O, Amoo.S.O., Finnie.J.F., Staden Van. 2014. Optimization of *in vitro* propagation of *Coleonema album*, a highly utilized medicinal and ornamental plant. *South African Journal of Botany.* 94 : 9-13.

Faramayuda, F., Elfahmi, E., and Astuti, W. W. 2021. Analysis of Secondary Metabolites in Callus Cultures of Rambutan *Nephelium lappaceum L*.. Agric. 33(1) : 13–22.

Galán-Ávila, A., García-Fortea, E., Prohens, J., and Herraiz, F. J. 2020. Development of a direct *in vitro* plant regeneration protocol from *Cannabis sativa L.* seedling explants: Developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants. *Frontiers in Plant Science.* 11 : 645-660.

GBIF | Global Biodiversity Information Facility. 2017. *Dimocarpus scandens* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก : https://www.gbif.org/species/9789566

Hiregoudar L.V., Murthy H.N., Hema B.P., Hahn E.J. and Paek K.Y. 2003. Multiple shoot induction and plant regeneration of *Feronia limonia (L.) Swingle*. *Scientia Horticulturae.* 98 : 357–364.

Hsieh, M.C., Shen, Y.J., Kuo, Y.H. and Hwang, L.S. 2008. Antioxidative activity and active components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flower extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 : 7010-7016.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Jiafu, W., and Bizhu, H. 2000. *In vitro* culture of longan shoots tips. *Journal of Fujian Agricultural University*. 29(1) : 23-26.

Karunarathna, H.G.M.K., Eeswara, J.P. and Iqbal, M.C.M. 2023. Effect of seed treatments on seed germination and seedling growth of *Madhuca longifolia* var. *longifolia* ("Mee"). *Tropical Agricultural Research.* 34 : 188-199.

Konar, S., Adhikari, S., Karmakar, J., Ray, A., and Bandyopadhyay, T. K. 2019. Evaluation of subculture ages on organogenic response from root callus and SPAR based genetic fidelity assessment in the regenerants of *Hibiscus sabdariffa L*. *Industrial Crops and Products.* 135 : 321–329.

Linsmaier, E. M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 18(1) : 100–127.

Lloyd, G. and McCown, B.H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society*. 30 : 421–427.

Mohamad, M.E., Awad, A.A., Majrashi, A., Abd Esadek, O.A., El-Saadony, M.T., Saad, A. M. and Gendy, A.S. 2022. *In vitro* study on the effect of cytokines and auxins addition to growth medium on the micropropagation and rooting of *Paulownia* species (*Paulownia hybrid* and *Paulownia tomentosa*). *Saudi Journal of Biological Sciences.* 29 : 1598-1603.

Murashige, T. and Skoog, F 1962. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant*. 15 : 473-797.

Nowakowska, K. and Pacholczak, A. 2015. The effect of auxins on the rooting of cuttings in several species of Fabaceae. *Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW Horticulture and Landscape Architecture*. 36 : 13–20.

Panyathep, A., Chewonarin, T., Taneyhill, K., Vinitketkumnuen, U. and Surh, Y. 2013. Inhibitory effects of dried longan (*Euphoria longana* Lam.) seed extract on invasion and matrix metalloproteinases of colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 61 : 3631-3641.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Pham, V., Herrero, M. and Hormaza, J. 2015. Phenological growth stages of longan (*Dimocarpus longan*) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae.* 189 : 201-207.

Rehman, S. and Park, I. 2000. Effect of scarification, GA, and chilling on the germination of goldenrain-tree (*Koelreuteria paniculata* Laxm.) seeds. *Scientia Horticulturae.* 85 : 319-324.

Taiz, L., and Zeiger, E. 2010. ***Plant physiology* (4th ed.)**. Sinauer Associates.

Thomas, T.D. and Maseena E. 2006. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. *Scientia Horticulturae*. 108 : 332–336.

Viriya Nitteranon. 2018. Anti-inflammatory, antioxidant and quinone reductase inducing effects of Lumyai Thao (*Dimocarpus longan* var. *obtusus*) seed extract. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*. 4 : 29-35.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmülling, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(18) : 10487–10492.

White P.R. (1943). ***A Handbook of Plant Tissue Culture***. The Jacques Catlell Press, Lancaster, Pa.

Younesikelaki, F.S., Ebrahimzadeh, M.H., Kiani Desfardi, M., Banala, M., Marka, R., and Nanna, R.S. 2016. Optimization of seed surface sterilization method and *in vitro* seed germination in *Althaea oicinalis (L.)* - an important medicinal herb. *Indian Journal of Science and Technology*. 9 : 1-6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอังสิมา จิตต์เวทย์กุล
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 4 มิถุนายน พ.ศ 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 53 ซอยเสรีไทย 79 ถนนเสรีไทย แขวงคันนายาว เขตคันนายาว จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10230
ประวัติการศึกษา	(2562) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.31 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2567) วิทยาศาสตรมาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาสำหรับหลักสูตรปริญญาโท เป็นระยะเวลาไม่เกิน 2 ปี ผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการยกระดับเศรษฐกิจและสังคมรายตำบลแบบบูรณาการ (1 ตำบล 1 มหาวิทยาลัย) เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ผลงานทางวิชาการ

Jitwetkul, A., Poeaim, A. Pongtongkam, P., Chareonsap, P. P. and Poeaim, S. 2025. Plant regeneration of *Dimocarpus scandes* (Winit & Kerr) Boonsuk & Chantar. (Lamyai-Thao) by tissue culture technique. *International Journal of Agricultural Technology*. 21(3) : 870-890

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้