การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการชักนาให้เกิดยอดและแคลลัส ในการขยายพันธุ์ส้มโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

THE OPTIMIZATION OF SHOOT MULTIPLICATION AND CALLUS INDUCTION ON *In vitro* PROPAGATION OF *Citrus maxima* Merr.

ศุภณัฐ ประคองทรัพย์
สิทธิเมธ ร่มโพธิ์
สุมน สิตกมล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสในการขยายพันธุ์ส้มโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

THE OPTIMIZATION OF SHOOT MULTIPLICATION AND CALLUS INDUCTION ON *In vitro* PROPAGATION OF *Citrus maxima* Merr.

T149422

ศุภณัฐ ประคองทรัพย์
สิทธิเมธ ร่มโพธิ์
สุมน สิตกมล

b.12885423
i.
เลขหมู่
ลงทะเบียน 149422
วัน.เดือน.ปี 8 ธ.ค. 2561

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

THE OPTIMIZATION OF SHOOT MULTIPLICATION AND CALLUS INDUCTION ON *In vitro* PROPAGATION OF *Citrus maxima* Merr.

SUPPANUT PRAKONGSUB
SITTIMATE ROMPHO
SUMON SITTAKAMOL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสในการขยายพันธุ์ส้มโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ The Optimization of Shoot Multiplication and Callus Induction on *In vitro* Propagation of *Citrus maxima* Merr.		
ชื่อนักศึกษา	นายศุภณัฐ	ประคองทรัพย์	รหัสนักศึกษา 55051180
	นายสิทธิเมธ	ร่มโพธิ์	รหัสนักศึกษา 55051194
	นางสาวสุมน	สิตกมล	รหัสนักศึกษา 55051206
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสในการขยายพันธุ์ส้มโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ		
ชื่อนักศึกษา	นายศุภณัฐ	ประคองทรัพย์	รหัสนักศึกษา 55051180
	นายสิทธิเมธ	ร่มโพธิ์	รหัสนักศึกษา 55051194
	นางสาวสุมน	สิตกมล	รหัสนักศึกษา 55051206
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม		

บทคัดย่อ

การศึกษาความเหมาะสมของการขยายพันธุ์ต้นส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ทับทิมสยาม สายพันธุ์ขาวทองดี และสายพันธุ์มือ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง และใบ พบว่าการใช้สารเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเซฟโฟแซน ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 ไมโครลิตร ได้ผลดีที่สุดสำหรับตาข้าง และใบ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 77.11 และ 86.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการชักนำการเกิดยอดใหม่จากตาข้างของส้มโอ 3 สายพันธุ์พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดสูงที่สุด คือ 40 20 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี และสายพันธุ์มือเท่านั้น โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงที่สุด คือ 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับอัตราการงอกของเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม และสายพันธุ์ขาวทองดี พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญของเมล็ดสูงที่สุด คือ 12.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสำหรับการชักนำยอดอ่อนจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีให้เกิดราก พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดรากได้ดีที่สุด คือ 37.5 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส ตาข้าง ใบ เมล็ด ราก ส้มโอ

Title	The Optimization of Shoot Multiplication and Callus Induction on *In vitro* Propagation of *Citrus maxima* Merr.		
Students	Mr. Suppanut	Prakongsub	Student ID 55051180
	Mr. Sittimate	Rompho	Student ID 55051194
	Miss Sumon	Sittakamol	Student ID 55051206
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim		

Abstract

The optimization for 3 species (Tubtim siam, Tong dee Buddha's hand) of *Citrus maxima* Merr. (Pomelo) *in vitro* propagation is reported too. When 0.1% mercuric chloride ($HgCl_2$) and 100 µL of 250 mg/L cefozan were used as surface sterilizing agent showed the maximum bud and leaf survival rate (77.11% and 86.79 respectively). The maximum shoot proliferation rate of 3 species (40%, 20% and 37.5% respectively) from lateral bud was observed on MS medium supplemented with 3 mg/L BA. Then, leaf culture on 1 mg/L 2,4-D showed the best callus induction rate of 2 species Tong dee and Buddha's hand (35% and 40%) Moreover, the maximum seed germination rate of 2 species Tubtim siam and Tong Dee (12.5% and 50%) was observed on 2 mg/L BA. Finally, the maximum root of shoot derived from Tong Dee seed induction rate (37.5%) was observed from 3 mg/L IBA.

Keywords : callus , *Citrus maxima* Merr. , *In vitro* propagation , lateral bud , leaf , root , seed

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงงานพิเศษหัวข้อเรื่อง การศึกษาความเหมาะสมของการชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสในการขยายพันธุ์ส้มโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ถ้าหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจาก ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในด้านต่างๆ ที่มีประโยชน์ ตลอดจนช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาแก่โครงงานพิเศษนี้ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ ที่ร่วมเป็นคณะกรรมการในการสอบ และคำแนะนำในการจัดทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และผู้ดูแลห้องปฏิบัติการ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ อำนวยความสะดวก และให้คำแนะนำสำหรับการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโทภาคชีววิทยา สำหรับคำแนะนำ คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

และสิ่งสำคัญที่ขาดไม่ได้เลยนั่นคือ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง เพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ศุภณัฐ ประคองทรัพย์
สิทธิเมธ ร่มโพธิ์
สุมน สิตกมล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) 3
2.1.1 อนุกรมวิธานของส้มโอ 3
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 3
2.1.3 พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าและลักษณะประจำพันธุ์ 4
2.1.4 พันธุ์ส้มโอที่ใช้ในการศึกษา 5
2.1.5 การขยายพันธุ์ส้มโอ 7
2.1.6 ประโยชน์ของส้มโอ 7
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 8
2.2.1 ส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง 8
2.2.2 การปรับสภาพชิ้นส่วนพืชก่อนเพาะเลี้ยง 9
2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส 9
2.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส 9
2.3.2 เอ็มบริโอเจเนซิส 10
2.4 การเพาะเลี้ยงตาข้าง 10
2.5 สารอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 11
2.5.1 ธาตุอาหารจำพวกอนินทรีย์ 11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.2 ธาตุอาหารจำพวกอินทรีย์ 11
2.5.3 วุ้น 13
2.5.4 สารอื่นๆ 14
2.6 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืช 14
2.7 ประโยชน์และการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้ 15
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย 21
3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา 21
3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ 21
3.2.1 สารเคมี 21
3.2.2 อุปกรณ์ 22
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 23
3.3.1 การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของใบ และตาข้าง จากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) 23
3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนของตาข้าง จากส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดยอดใหม่ 24
3.3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนใบของส้มโอ ทั้ง 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดแคลลัส 24
3.3.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเอ็มบริโอของส้มโอ ทั้ง 2 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม และขาวทองดี) ให้เกิดการงอก 25
3.3.5 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดอ่อนจากเมล็ด ส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีให้เกิดราก 25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 27
4.1 การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของใบ และตาข้าง จากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) 27
4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนของตาข้าง จากส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดยอดใหม่ 29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนใบของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดแคลลัส 33

4.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดของส้มโอทั้ง 2 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม และขาวทองดี) ให้เกิดการงอก 36

4.5 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดอ่อนจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีให้เกิดราก 39

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 43

5.1 สรุปผลการวิจัย 43

5.2 ข้อเสนอแนะ 44

เอกสารอ้างอิง 46

ภาคผนวก 49

ภาคผนวก ก 50

ภาคผนวก ข 51

ภาคผนวก ค 52

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตาข้างจากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ 28

4.2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบจากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ 28

4.3 จำนวนการเกิดยอดใหม่ และความยาวเฉลี่ยของยอดใหม่ จากชิ้นส่วนของตาข้างส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม และขาวทองดี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ 30

4.4 จำนวนการเกิดยอดใหม่ และความยาวเฉลี่ยของยอดใหม่ จากชิ้นส่วนของตาข้างของส้มโอสายพันธุ์มือ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ 31

4.5 แสดงจำนวนการเกิดแคลลัส และขนาดเฉลี่ยของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบส้มโอ 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งสูตร MS ในระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ 34

4.6 จำนวนการงอก ความยาวเฉลี่ยของราก และยอดจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ 36

4.7 จำนวนการงอก ความยาวเฉลี่ยของรากและยอดจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ 38

4.8 เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และความยาวเฉลี่ยของรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของต้นส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี บนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA และ NAA ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ 40

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของดอกส้มโอ	4
2.2	ลักษณะของผลส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม	5
2.3	ลักษณะของผลส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี	6
2.4	ลักษณะของลำต้น ใบ และผล ของต้นส้มโอสายพันธุ์มือ	7
4.1	กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนของตาข้างและใบจากต้นส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 และ 2 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	29
4.2	ลักษณะการเจริญเป็นยอดใหม่จากตาข้างของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามและสายพันธุ์ขาวทองดี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาเวลา 8 สัปดาห์ (ก-ข)	31
4.3	กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้างของต้นส้มโอสายพันธุ์มือ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ ระดับความเข้มข้น 1 2 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์	32
4.4	ลักษณะการเจริญเป็นยอดใหม่จากตาข้างของส้มโอสายพันธุ์มือบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ก-ฉ)	32
4.5	ลักษณะการเจริญเป็นแคลลัสจากใบส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (ก-ข)	35
4.6	ลักษณะการเจริญเป็นแคลลัสจากใบส้มโอสายพันธุ์มือบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ก-ฉ)	35
4.7	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากใบของส้มโอ 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์	36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	ลักษณะการงอกของยอดอ่อน และรากเมล็ดส้มโอทับทิมสยาม ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาสัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 (ก-ค)	38
4.9	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม และขาวทองดี บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์	39
4.10	กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากยอดที่เจริญจากยอดอ่อนส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์	41
4.11	ความยาวรากที่เกิดจากยอดอ่อนของต้นส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก-จ)	42
4.12	ความยาวรากที่เกิดจากยอดอ่อนของต้นส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะสัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4 (ก-ค)	42

คำย่อ/สัญลักษณ์

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic
BA	N_6-Benzyladenine
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole butyric acid
Kn	Kinetin
MS	Murashige and Skoog Z1962X Basal medium
NAA	Naphthaleneacetic acid
PPM	Plant preservative mixture
Zn	Zeatin

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ส้มโอ หรือ *Citrus maxima* Merr. เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำต้นมักเป็นเหลี่ยมไม่มีรูปแน่นอน มีทรงต้นสูง บางครั้งมีหนามตามลำต้น ใบมีขนาดใหญ่รูปร่างคล้ายรูปไข่หรือรูปโล่ สีของใบด้านบนเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างเป็นสีเขียวอ่อนมีขนอ่อนนุ่มปกคลุม (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2530) ส่วนผลมีขนาดใหญ่ มีรูปร่างค่อนข้างกลมคล้ายผลสาลี่ สีผลขณะที่ยังอ่อนมีสีเขียว พอแก่เปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองหรือสีทอง (วิเศษ, 2540) สายพันธุ์ส้มโอที่นิยมปลูกทางการค้า มี 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และขาวน้ำผึ้ง (วิกิพีเดีย, 2559) ส้มโอมีการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านธุรกิจ และส่วนของพืชยังมีสรรพคุณทางยามากมายซึ่งสามารถนำส่วนต่างๆ ของส้มโอมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งสิ้น เช่น ช่วยการขับลมในกระเพาะอาหาร บำรุงสายตา ช่วยลดกรดไหลย้อน การแก้ปัญหาเลือดออกตามไรฟัน อีกทั้งส้มโอมือยังสามารถนำมาทำเป็นยาดมสมุนไพรได้อีกด้วย (ฐานข้อมูลสมุนไพร มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2558) สำหรับการขยายพันธุ์ส้มโอนั้นได้ใช้วิธีการขยายพันธุ์เหมือนกับผลไม้อื่นๆ ตั้งแต่การเพาะเมล็ด การตอน การทาบกิ่ง และการติดตา เป็นต้น แต่วิธีที่เกษตรกรนิยมใช้กันมากที่สุดและได้ผลดี คือ การตอน วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น สะดวกในการดูแลรักษาและเก็บเกี่ยว ให้ผลผลิตเร็ว สามารถทำได้ง่าย อุปกรณ์ในการทำหาได้ง่าย และมีราคาถูก รวมทั้งเกิดรากได้เร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีการใช้ฮอร์โมนเร่งรากเข้าช่วย แต่ต้นส้มโอที่ใช้วิธีการตอนกิ่งนั้นก็มีข้อเสียเช่นกัน คือ ไม่มีระบบรากแก้ว อายุไม่ยืน โค่นล้มง่าย และอ่อนแอต่อโรคแมลง ดังนั้นจึงได้มีการนำวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ นั่นคือ การนำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ประโยชน์ทางด้านการขยายพันธุ์พืช ซึ่งผลผลิต คือ ได้ต้นพันธุ์ปลอดโรคเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดปี ซึ่งเมื่อนำไปปลูกได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี (จารุวรรณ, 2544) และจากการศึกษาข้อมูลจากแหล่งต่างๆ พบว่ามีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความเหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ผลชนิดนี้อยู่น้อยมาก ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความเหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ผลเนื้อแข็ง ไม่ว่าจะเป็นการเลือกชิ้นส่วนของพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของพืชก่อนการนำมาเพาะเลี้ยง

2) เพื่อศึกษาชิ้นส่วนต่างๆ ของส้มโอ เช่น ตาข้าง ใบ และเมล็ด เพื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมสำหรับการเจริญเป็นยอด และแคลลัส

3) เพื่อศึกษา และเปรียบเทียบชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อการเจริญเป็นยอด แคลลัส และราก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาโดยเลือกส่วนใบ ตาข้าง และเมล็ด จากต้นส้มโอส้มโอ หรือ *Citrus maxima* Merr. (สายพันธุ์ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเจริญเป็นแคลลัส และยอด รวมทั้งการศึกษาความเหมาะสมของสูตรอาหารสังเคราะห์ MS (Murashige and skoog 1962) ซึ่งมีการเติมสารควบคุมการเจริญเพื่อกระตุ้นการเจริญของยอด การเจริญเป็นแคลลัส และการเจริญเป็นราก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นส้มโอแต่ละสายพันธุ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด แคลลัส และราก

2) ทราบความเหมาะสมของการขยายพันธุ์พืชไม้เนื้อแข็งด้วยวิธีการนำส่วนต่างๆ มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นทางเลือกในการเพิ่มจำนวนการผลิตกล้าพันธุ์ที่ปลอดเชื้อ ให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาดที่เพิ่มสูงขึ้น และลดระยะเวลาในการขยายพันธุ์

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.)

2.1.1 อนุกรมวิธานของส้มโอ

ตามฐานข้อมูล ITIS

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Viridiplantae
Infrakingdom : Streptophyta
Superdivision : Embryophyta
Division : Tracheophyta
Subdivision : Spermatophytina
Class : Magnoliopsida
Superorder : Rosanae
Order : Sapindales
Family : Rutaceae
Genus : *Citrus* L.
Species : *Citrus maxima* Merr.

ที่มา : http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_Value=501574

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ส้มโอ หรือ Pomelo มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Citrus maxima* Merr. จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae ซึ่งเป็นพืชในตระกูลส้ม มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางหมู่เกาะมลายูและหมู่เกาะโปลีนีเซีย ต่อมาได้มีการแพร่กระจายไปตามแหล่งต่างๆ สำหรับประเทศไทยนั้นนิยมปลูกทางภาคตะวันตกของประเทศ ส้มโอเป็นไม้ผลยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลักษณะทรงต้นสูงประมาณ 5-15 เมตร กิ่งก้านสาขาที่แตกออกมาจะห้อยลงมาเป็นพุ่มสวยงาม ส่วนกิ่งที่ยังอ่อนจะมีขนสั้นๆ ปกคลุม นอกจากนี้ส่วนของหนามมีลักษณะอ้วน ความยาวประมาณ 1-5 เซนติเมตร (นฤมล, 2548)

ใบ ส้มโอมีใบเป็นรูปไข่หรือรูปโล่ ยาว 4-5 นิ้ว กว้าง 2-12 เซนติเมตร สีของใบด้านบนเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างเป็นสีเขียวอ่อนมีขนอ่อนนุ่มปกคลุม ริมใบเรียบหรือหยักเล็กน้อย เส้นใบนูนเด่นชัด (วิเศษ, 2540)

ดอก มีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-7 เซนติเมตร อาจเกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกช่อที่บริเวณซอกใบจำนวน 2-10 ดอก ส่วนของดอกประกอบด้วยชั้นของกลีบเลี้ยงที่มีจำนวน 3-5 กลีบติดกัน ชั้นของกลีบดอกมีจำนวน 4-5 กลีบ และมีเกสรตัวผู้ 20-25 อัน ทำการเชื่อมติดกันเป็นกลุ่ม ส่วนเกสรตัวเมียจะมีรังไข่ประมาณ 11-16 ช่อง (รูปที่2.1) (นฤมล, 2548)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของดอกส้มโอ

ที่มา : https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d2/Pomelo_flower.jpg

ผล มีขนาดปานกลางถึงใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12-18 เซนติเมตร สูง 14-18 เซนติเมตร ทรงผลมีหลายแบบคล้ายผลสาลี่ สีผลขณะที่ยังอ่อนมีสีเขียว พอแก่เปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองหรือสีทอง เปลือกหนาประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร เนื้อมีลักษณะเป็นเส้นอวบยาวรัดรวมตัวกันอยู่ มีรสหวานอมเปรี้ยว (วิเศษ, 2540)

เมล็ด ส้มโอมีเมล็ดค่อนข้างใหญ่ แบน เปลือกย่น ร่องเมล็ดลึก มีสีขาวอมเหลือง อยู่รวมกันตรงกลางผลรอบๆ แกน บางผลไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบ ภายในผลมีเมล็ดจำนวนน้อยซึ่งจำนวนเมล็ดในแต่ละผลจะแตกต่างกันตามพันธุ์ (วิเศษ, 2540)

2.1.3 พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าและลักษณะประจำพันธุ์ (วิเศษ, 2540)

พันธุ์ส้มโอที่ปลูกในประเทศไทยมีอยู่หลายพันธุ์ ซึ่งอาจเรียกชื่อต่างกันไปตามภาษาท้องถิ่นที่ปลูก ชนิดหรือพันธุ์ของส้มโอที่พบในปัจจุบันมีอยู่มากกว่า 10 พันธุ์ขึ้นไป แต่ที่มีชื่อเสียงเป็นที่รู้จัก และนิยมปลูกมีอยู่ 3 พันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และขาวน้ำผึ้ง นอกจากนี้ยังมีพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่เป็นที่นิยมได้แก่ ขาวพวง ขาวแป้น ขาวใหญ่ ปัตตาเวีย ขาวหอม ขาวแตงกวา ขาวแก้ว ชมพูศรีราชา เป็นต้น (วิเศษ, 2540)

2.1.4 พันธุ์ส้มโอที่ใช้ในการศึกษา

ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ ดังนี้

2.1.4.1 ส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม

ประวัติความเป็นมาของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม คือ เมื่อประมาณปี 2523 นายสมหวัง มันแหละ อยู่บ้านแสงวิมาน อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช ได้ซื้อส้มโอพันธุ์พื้นเมืองจาก อ.ยะรัง จ.ปัตตานี ที่ชาวบ้านนิยมเรียกส้มโอสายพันธุ์ดังกล่าวว่า ส้มโอสีชมพู เพราะสีของเนื้อส้มโอมีสีชมพู แต่รสชาติไม่เป็นที่นิยมรับประทาน เนื่องจากไม่อร่อย เมื่อนำไปทดลองปลูกที่บ้านปรากฏว่าเมื่อต้นโตจนติดผลแก่และนำเนื้อออกมารับประทานกลับมีรสชาติหวานมากขึ้นกว่าเดิมเยอะแต่ก็ยังมีรสขมปนอยู่ จึงใช้วิธีปรับปรุงพันธุ์เข้าช่วยด้วยการตอนกิ่งแบบต่อเนื่องหลายๆ รุ่น จนกระทั่งในรุ่นสุดท้ายนำกิ่งตอนไปปลูกจนติดผล แล้วนำเอาเนื้อรับประทานดู ปรากฏว่ารสขมได้หายไปเหลือเพียงรสหวานเพียงอย่างเดียว ส่วนสีสันของเนื้อส้มโอยังคงเป็นสีแดงเข้มเช่นเดิม และสีเข้มขึ้นด้วย ทำให้ดูคล้ายสีของทับทิมสดใสมาก นายสมหวังเจ้าของผู้ปรับปรุงพันธุ์ จึงตั้งชื่อให้ใหม่ว่าส้มโอทับทิมสยามหรือส้มโอแดงสยาม จากนั้นทำการขยายพันธุ์ปลูกเก็บผลออกวางขายได้รับความนิยมจากผู้ซื้อรับประทานอย่างแพร่หลาย เพราะนอกจากรสชาติหวานอร่อยแล้ว สีสันของเนื้อยังงดงามอีกนั่นเอง ส้มโอทับทิมสยามหรือส้มโอแดงสยาม มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เหมือนกับส้มโอทั่วไปทุกอย่างแต่มีลักษณะประจำพันธุ์คือ ใบค่อนข้างกว้าง ปลายแหลม ผลมีขนาดใหญ่ วัดรอบผลประมาณ 16-22 นิ้ว ฟุต หัวผลเป็นรูปจีบ เปลือกนุ่ม และบาง (รูป2.2) (นายเกษตร, 2554)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของผลส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม

ที่มา : http:// www.palangkaset.com/เมืองไม้ผลไม้/ส้มโอ-gi-ทับทิมสยาม-ลุ่ม/

2.1.4.2 ส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี

เดิมส้มโอสายพันธุ์นี้มีผู้เรียกกันว่าส้มสีปูน เนื่องจากลักษณะสีของเปลือกในเป็นสีปูน ลักษณะทั่วไป คือ ใบค่อนข้างมนหรือกลม ริมขอบใบเป็นจักเล็กๆ ปลายใบมีจักใหญ่ 1 จัก เส้นใบหยาบ และหนา ลักษณะของผลมีขนาดโตปานกลาง รูปทรงกลมแป้น ไม่มีจุก เส้นผ่าศูนย์กลางด้านกว้างของผลใบประมาณ 15 เซนติเมตร เส้นรอบวงด้านกว้างบริเวณกลางผลประมาณ 40 เซนติเมตร ผิวผลเรียบสีเขียว และมีขนอ่อนนุ่มเล็กน้อย มีเปลือกบาง เนื้อผลนิ่ม ฉ่ำ สีชมพูอ่อนรสหวานไม่อมเปรี้ยว เป็นพันธุ์ที่สามารถรักษารสชาติไว้ได้เป็นอย่างดีแม้ปลูกในต่างพื้นที่กัน (รูปที่ 2.3) (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2530)

รูปที่ 2.3 ลักษณะของผลส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี

ที่มา : http://www.kasetorganic.com/ส้มโอ-พันธุ์ทองดี-ขายดี.html

2.1.4.3 ส้มโอสายพันธุ์มือ

ส้มโอสายพันธุ์มือ จัดเป็นไม้พุ่มกึ่งไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 2-4 เมตร เปลือกลำต้นเรียบสีน้ำตาล ตามลำต้น และกิ่งมีหนามยาวแข็ง ใบเป็นใบประกอบแบบลดรูป ใบย่อยมีใบเดียว ออกเรียงสลับ มีขนาดกว้าง 4-5 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ปลายใบ และโคนใบมน ขอบใบจักเป็นซี่ฟัน หลังใบเรียบ สีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบสีอ่อนกว่า ดอกออกดอกเดี่ยวหรือเป็นกระจุก 2-3 ดอก ออกตามซอกใบ และกิ่ง ดอกสีขาว มีกลิ่นหอม กลีบดอกมี 5 กลีบ กลีบดอกด้านนอกมีสีม่วงแดง หลุดร่วงง่าย กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ เกสรตัวผู้เป็นเส้นสีขาวมีจำนวนมาก ผลรูปทรงรีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 8-10 เซนติเมตร ยาว 12-15 เซนติเมตร ปลายผลเป็นแฉกงอคล้ายนิ้วมือ ผิวขรุขระเป็นมัน ผลอ่อนมีสีเขียว ผลสุกมีสีเหลือง ภายในผลมีสีขาวเหมือนเปลือกส้มโอ ไม่มีเนื้อผล และเมล็ด (รูปที่ 2.4) โดยส้มโอสายพันธุ์มือสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางยาได้ เช่น ใช้เปลือกแห้ง ผิวผล มีน้ำมันหอมระเหย ทำยาดมส้มโอมือ สำหรับแก้หน้ามืด เป็นลม วิงเวียน น้ำจากผล มีรส

เปรี้ยวคล้ายมะกรูด มีวิตามินซีสูง กินเป็นยาฟอกเลือดประจำเดือนสตรี ใช้ผสมเป็นยากัดเสมหะ แก้ไอ แก้เลือดออกตามไรฟัน (สุดารัตน์, 2556)

รูปที่ 2.4 ลักษณะของลำต้น ใบ และผล ของต้นส้มโอสายพันธุ์มือ
ที่มา : http://www.nanagarden.com/product/176126

2.1.5 การขยายพันธุ์ส้มโอ

สำหรับการขยายพันธุ์ส้มโอนั้นได้ใช้วิธีการขยายพันธุ์เหมือนกับผลไม้อื่นๆ ตั้งแต่การเพาะเมล็ด การตอน การทาบกิ่ง และการติดตา แต่การเพาะเมล็ดนั้นมีโอกาสกลายพันธุ์ไปในทางเสื่อมได้มาก นอกจากนานๆ ครั้งจะพบที่ผ่าเหล่าออกมาเป็นพันธุ์ที่ดีกว่าได้ วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยม สำหรับวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้กันมากที่สุด และได้ผลดี คือ การตอน วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น ทรงต้นเป็นพุ่มสวยงามสะดวกในการดูแลรักษา และเก็บเกี่ยว ให้ผลผลิตเร็ว ไม่มีการกลายพันธุ์ นอกจากนี้วิธีปฏิบัติสามารถทำได้ง่าย อุปกรณ์ในการทำหาได้ง่าย และมีราคาถูก รวมทั้งเกิดรากได้รวดเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีการใช้ฮอร์โมนเร่งรากเข้าช่วย แต่ต้นส้มโอที่ใช้วิธีการตอนกิ่งนั้นก็มีข้อเสียเช่นกัน คือ ไม่มีระบบรากแก้ว อายุไม่ยืน โค่นล้มง่าย และอ่อนแอต่อโรคพืช (นฤมล, 2548)

2.1.6 ประโยชน์ของส้มโอ

ผลของส้มโอมีประโยชน์ในด้านการขับลมในกระเพาะอาหาร บำรุงสายตา และช่วยลดกรดไหลย้อนได้ ในส่วนดอกของส้มโอหากรับประทานสดช่วยลดอาการปวดกระเพาะอาหาร ปวดกระบังลม ขับลมในท้อง ขับเสมหะ เปลือกของส้มโอนำมาตำใช้พอกแผลที่เป็นหนอง และฝีเพราะสามารถช่วยฆ่าเชื้อโรคได้ ถ้านำมารับประทานช่วยในเรื่องอาการจุกอัดแน่นอก และใช้ขับลมขับเสมหะได้อีกด้วย เมล็ดของผลส้มโอเมื่อเคี้ยวแล้วกลืนจะมีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการไส้เลื่อน และลำไส้หดตัวผิดปกติ รากช่วยรักษาอาการไอ เป็นหวัด แก้อาการปวดของท้องน้อย และช่วยปัญหาเลือดออกตามไรฟันได้ เพราะในส้มโอมีวิตามินสูงจึงเข้าไปช่วยเสริมสร้างเหงือก และยังมีแคลเซียมที่ช่วยให้ฟันแข็งแรงอีกด้วย สำหรับส้มโอมือมีการนำเปลือกของส้มโอมาทำให้แห้ง ผิวผลมีน้ำมันหอม

ระเหยใช้ทำยาดมส้มโอมือ สำหรับแก้หน้ามืด เป็นลม วิงเวียน น้ำจากผลมีรสเปรี้ยวคล้ายมะกรูด มีวิตามินซีสูง กินเป็นยาฟอกเลือดประจำเดือนสตรี ใช้ผสมเป็นยาขับเสมหะ แก้ไอ แก้เลือดออกตามไรฟัน ในประเทศจีน และญี่ปุ่นใช้ส้มโอมือเป็นผลไม้มงคลในพิธีกรรมต่างๆ ทางศาสนา ส่วนผลไม่สามารถนำมารับประทานได้โดยตรง แต่อาจนำเปลือกมาใช้ผสมในอาหารได้ (สุดารัตน์, 2556)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆ ส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (อนุรักษ์, 2550)

2.2.1 ส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

2.2.1.1 เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาประมาณไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2.2.1.2 เนื้อเยื่อบริเวณปลายราก (root apex) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณถัดจากส่วนของหมวกราก (root cap) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับบริเวณส่วนของปลายยอด

2.2.1.3 เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในบริเวณส่วนของราก และลำต้น โดยอยู่บริเวณระหว่างกลุ่มของท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem)

2.2.1.4 เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

2.2.1.5 เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อท่ออาหาร และคอร์เท็กซ์ (cortex) ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา ใบ (leaf) ในส่วนของใบมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่เป็นจำนวนมาก เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์ ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา และเมล็ด (seed) ในบริเวณส่วนของเมล็ดประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ เอ็มบริโอ เอ็นโดสเปิร์ม และใบเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็มบริโอภายในเมล็ดจะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จค่อนข้างสูง (อนุรักษ์, 2550)

2.2.2 การปรับสภาพชิ้นส่วนพืชก่อนเพาะเลี้ยง

พืชหลายชนิดโดยเฉพาะพืชไม้เนื้อแข็ง จะปลอดปล่อยสารออกมาทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนสี เนื่องจากเอนไซม์ phenol oxidase หรือ tyrosinase ทำปฏิกิริยากับอากาศหรือสารพวกออกซินหรือไซโทไคนิน ทำให้เกิดสีน้ำตาลมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่เจริญ อายุของเนื้อเยื่อพืชฤดูกาลเก็บเกี่ยวมีผลถึงปริมาณของสารที่ทำให้เกิดอาการ browing ของอาหาร ซึ่งการป้องกันการเกิด browing ของอาหาร คือ กำจัดสารจำพวกฟีนอลิคออกจากเนื้อเยื่อโดยการแช่น้ำสะอาดก่อนหรือใส่ activated charcoal ลงในอาหารเพื่อดูดซับสารฟีนอลิค อีกวิธีการหนึ่ง คือ ลดโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยากับอากาศ โดยการใช้สารเคมีที่เรียกว่า antioxidants โดยการแช่ชิ้นส่วนของพืชในสารละลายผสมระหว่าง กรดซิตริกความเข้มข้น 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ไว้สักระยะก่อนการนำไปเพาะเลี้ยง (อารีย์, 2541)

2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึงกลุ่มเซลล์พาเรงไคมาที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสมีขนาดต่างๆ กันหลายรูปแบบ มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคิวโอลสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภท ได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ ฉ่ำน้ำ คล้ายฟองน้ำ เรียกว่า friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน (อนุรักษ์, 2550)

2.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

2.3.1.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึง สารในกลุ่มของออกซิน และไซโทไคนิน ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการพัฒนา และเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช โดยขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินและไซโทไคนิน เช่น ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินมีค่าอัตราส่วนสูง เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นราก แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินมีอัตราส่วนต่ำ เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นส่วนยอด และถ้าในอัตราส่วนที่สมดุล เนื้อเยื่อพืชพัฒนาไปเป็นราก และยอด แต่ในบางกรณีก็ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินเสมอไป อาจขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ

2.3.1.2 ธาตุอาหารชนิดต่างๆ เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท กลูตามีน แอลฟาคีโตกลูตาลิก โพรลีน แอสปาราจีน อาร์จินีน และซิลเวอร์ไนเทรต นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าวยังมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน

2.3.1.3 แหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลซอบิทอล น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลกาแลกโทส เป็นต้น ซึ่งโดยปกติจะใช้น้ำตาลประมาณ 20-40 กรัมต่อลิตรหรือประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์

2.3.1.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องใช้แสงที่มีความเข้มต่ำหรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

2.3.1.5 สถานะของอาหารที่ใช้เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งทำให้แคลลัสมีพื้นที่ผิวสัมผัสอาหารน้อยกว่า (อนุรักษ์, 2550)

2.3.2 เอ็มบริโอเจเนซิส

เอ็มบริโอเจเนซิส คือ การพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยเกิดจากกลุ่มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง และพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนเริ่มต้นเกิดจากไซโกตแบ่งเป็น 2 เซลล์ (proembryo) เซลล์ที่มีขนาดเล็กจะอยู่ด้านบนเรียกว่า epical cell ส่วนเซลล์ขนาดใหญ่อยู่ด้านล่างเรียกว่า basil cell มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า globular shaped embryo

ขั้นตอนที่ 2 กลุ่มเซลล์ globular shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ heart shaped embryo

ขั้นตอนที่ 3 กลุ่มเซลล์ heart shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็น torpedo-shaped embryo

ขั้นตอนที่ 4 คือขั้นตอนสุดท้ายกลุ่มเซลล์ torpedo-shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอซึ่งในขั้นตอนนี้กลุ่มเซลล์สามารถเจริญเป็นยอด และรากพร้อมกัน โดยเนื้อเยื่อด้านบนของเอ็มบริโอจะเจริญไปเป็นยอด และเนื้อเยื่อด้านล่างของเอ็มบริโอ คือส่วนที่สัมผัสกับอาหารจะเจริญไปเป็นราก (อนุรักษ์, 2550)

2.4 การเพาะเลี้ยงตาข้าง

การนำตาข้างมาเลี้ยงในอาหารโดยการใช้อาหารที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เรียกว่า micro- หรือ in vitro propagation กระบวนการนี้ใช้ในการขยายพันธุ์พืชเป็นการค้า หลักการเพาะเลี้ยงของตาข้าง คือ เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก แต่ไม่มีการเกิดแคลลัส เรียกว่า direct morphogenesis โดยใช้ไซโทไคนินกระตุ้นตา เช่น การขยายพันธุ์ไม้ยืนต้น ไม้ดอกทางการค้า เมื่อเกิดยอดจำนวนมากสามารถแยกขยายหรือนำไปชักนำให้เกิดรากได้ อัตราการเกิดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง วิธีการนี้สามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วภายใน 1 ปี อาจจะได้จำนวนหลายต้นจาก 1 ยอด กระบวนการนี้อาจแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่

ขั้นตอนที่ 1 การนำชิ้นส่วนของพืชมาทำความสะอาดเพื่อเริ่มเลี้ยงบนอาหาร

ขั้นตอนที่ 2 การแยกขยายต้นอ่อนเพื่อเพิ่มปริมาณ

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมพร้อมเพื่อนำออกปลูก เช่น การชักนำให้เกิดราก และการปรับตัวของต้นอ่อนในบางกรณีอาจไม่มีขั้นตอนนี้

ขั้นตอนที่ 4 การนำพืชออกปลูกในดินในเรือนปลูกหรือในแปลง ในบางกรณีสามารถนำพืชจากขั้นตอนที่ 2 มาปลูกได้เลย (อารีย์, 2541)

2.5 สารอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหารต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตร แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วจะพบว่ามีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

2.5.1 ธาตุอาหารจำพวกอนินทรีย์ (inorganic salts) ได้แก่ แร่ธาตุอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช บ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.5.1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก (macronuetrient) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมาก และขาดไม่ได้ โดยทั่วไปพืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณ 25-60 มิลลิโมลหรือมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (อนุรักษ์, 2550)

2.5.1.2 แร่ธาตุอาหารรอง (micronutrient) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล โคบอลต์ (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโคลโมล ทองแดง (Cu) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล โดยทั่วไปพืชต้องการแร่ธาตุอาหารรองไปใช้ในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (อนุรักษ์, 2550)

2.5.2 ธาตุอาหารจำพวกอินทรีย์ (organic substances) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกวินเจน แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

2.5.2.1 คาร์โบไฮเดรต ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีส่วนสำคัญในการให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ น้ำตาลที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีทั้งชนิดที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยปกติใช้น้ำตาลปริมาณ 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเตรียมอาหาร 1 ลิตร หรือพบในบางรายงานว่าอาจต้องใช้ในปริมาณที่มากกว่านี้ (อนุรักษ์, 2550)

2.5.2.2 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีความสำคัญมาก มีผลทำให้พืชมีการพัฒนาและเจริญเติบโต มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

-ไทอามีน (thiamine) หรือวิตามิน B_1 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{17}N_4OS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 265.35 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

-อินโนสิทอล (inositol) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_{12}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุล 180.15 ปกติจะใช้ในรูปของ ไมโอ-อินโนสิทอล ใช้ความเข้มข้นประมาณ 50-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

-ไนอะซิน (niacin) หรือกรดนิโคทินิก หรือเรียกว่าวิตามิน B_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_3NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 123.11 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร

-ไพริดอกซิน (pyridoxine) หรือวิตามิน B_6 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_{11}NO_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 169.18 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

-ไบโอติน (biotin) หรือวิตามิน H หรือวิตามิน B_7 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{15}N_2O_3S$ มีน้ำหนักโมเลกุล 244.31 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

-อะดีนีน (adenine) หรือวิตามิน B_4 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_2H_3N_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 135.13

-กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) หรือวิตามิน C มีน้ำหนักโมเลกุล 176.13 (อนุรักษ์, 2550)

2.5.2.3 กรดอะมิโน (amino acid) มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก กรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในรูปของ L มากกว่า D (อนุรักษ์, 2550)

2.5.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเองได้ และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช เร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

1. ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส ออกซินปกติจะพบในรูปกรดอินโดลอะวิติก (indol-3-yl acetic: IAA) ส่วน IAA ที่ผลิตจากทริปโตเฟนหรืออินโดล โดยส่วนมากพบได้ในใบอ่อนที่กำลังงอก และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาในขณะที่มีการงอก สาร IAA จะมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ควบคุมการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และมีผลในการกระตุ้นการเกิดรากออกวินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ พวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น กรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acetic acid) เรียกย่อๆว่า IAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_9NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 175.19 สามารถละลายในอะซิโตน และอีเทอร์ เป็นต้น และพวกที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น กรดแอลฟาแนพทาลีนอะวิติก (α-napthalene acetic acid) เรียกย่อๆว่า NAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{10}O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 186.21 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ได้ กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) หรือเรียกย่อๆว่า 2,4-D มีน้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ กรดอินโดล-3-บิวทิริก (3-indole butyric acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า IBA มีน้ำหนักโมเลกุล 203.24 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และอะซิโตน เป็นต้น

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์ โดยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลส และการเจริญของลำต้น ช่วยส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งเซลล์ในแคมเบียม โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิก กระตุ้นการเกิดรากบริเวณลำต้นที่ถูกตัด และพัฒนาการเกิดรากแขนงให้สมบูรณ์ก่อนนำออกปลุก การเกิดรากสัมพันธ์กับระดับของออกวินในต้นพืชกับสภาพแวดล้อม และยังช่วยส่งเสริมให้มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ลำเลียงน้ำและอาหาร (อนุรักษ์, 2550)

2. ไซโทไคนิน (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีนซึ่งพบได้หลายชนิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไซโทไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกรดอะดินีน โดยจะเกิดในบริเวณปลายรากและเอ็มบริโอที่กำลังเจริญ มีผลต่อการแสดงออกของพืช คือ สามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม นอกจากนี้ยังกระตุ้นการเจริญทางด้านข้างของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง ชะลอการแก่ของพืช นอกจากนั้นยังมีผลเล็กน้อยต่อการพัฒนาของผลโดยสารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ 6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine) หรือเรียกย่อๆว่า ไคเนติน (kinetin) มีน้ำหนักโมเลกุล 215.2 สามารถละลายในเมทานอล เอทานอล 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine) หรือเรียกว่า BAP มีน้ำหนักโมเลกุล 225.26 สามารถละลายในเมทานอลและเอทานอล และ ซีเอทิน (zeatin) เรียกย่อๆ ว่า zea เป็นสารที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ มีน้ำหนักโมเลกุล 219.25 ลักษณะเป็นสีขาวปนเหลืองขุ่นๆ ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็นต้น

ผลของไซโทไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ช่วยส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์และยังช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ รวมถึงสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดหลายยอดได้ (multiple shoots) (อนุรักษ์, 2550)

3. จิบเบอร์เรลลิน (gibberellin) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid) เรียกย่อๆว่า GA_3 มีน้ำหนักโมเลกุล 346.38 สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิกในเนื้อเยื่อพืช หรือเรียกว่าเอ็มบริโอที่กำลังจะเจริญ ซึ่งสามารถเคลื่อนย้ายผ่านท่อน้ำและท่ออาหารได้

ผลของจิบเบอเรลรินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ ช่วยกระตุ้นทั้งการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์ และยังชักนำให้เมล็ดเกิดการงอกโดยกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์จำนวนมากโดยเฉพาะ แอลฟาอะไมเลส ในพืชที่กำลังงอก (อนุรักษ์, 2550)

2.5.3 วุ้น (agar) ทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะของเนื้อเยื่อพืช ใช้สำหรับการเตรียมอาหารเป็นอาหารแข็ง และอาหารกึ่งแข็งได้ สำหรับวุ้นทั่วๆ ไป ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.8-1.0 เปอร์เซ็นต์ และบริษัทอื่นๆที่ผลิตวุ้นมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น บริษัท Keleo Crop ผลิตวุ้นที่มีชื่อว่า

Gelrite เป็นวุ้นที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง แต่มีราคาแพง โดยปกติใช้ความเข้มข้น 1.25-2.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีความใส สามารถตรวจสอบการเจริญเติบโตของรากได้ง่าย และตรวจสอบการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี (อนุรักษ์, 2550)

2.5.4 สารอื่นๆ เช่น สารอินทรีย์อื่นๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ น้ำองุ่น น้ำมันฝรั่ง กล้วย น้ำข้าวโพด และอื่นๆ บทบาทของสารอินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ผงถ่าน เมื่อเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะช่วยดูดซับสิ่งที่ถูกกำจัดออกมาจากเซลล์เช่น พวกสารฟีนอลิกต่างๆ ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่ได้รับอันตรายต่อสารดังกล่าว แต่ข้อเสียของการเติมผงถ่านคือ จะไปกีดกั้นการลำเลียงสารควบคุมการเจริญของพืช ทำให้ไม่ได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ (อนุรักษ์, 2550)

2.6 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืช

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอก เป็นต้น ซึ่งจะต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้สารเคมีก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งจำเป็นต้องเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ ดังต่อไปนี้

1. มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และเปอร์เซ็นต์ความปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์สูง
2. สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว
3. สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว
4. ไม่ควรมีสี และกลิ่นอันไม่พึงประสงค์
5. ราคาไม่แพง และหาซื้อง่าย
6. ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

โดยสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ได้แก่ สารละลายพวกโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) คลอรอกซ์ (clorox) เมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นที่ใช้ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสารปฏิชีวนะ (antibiotic) อีกหลายชนิดที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ เตตราไมซิน กานาไมซิน แอมพิซิลิน เพนิซิลิน จี ไฮโกรมัยซิน เป็นต้น (อนุรักษ์, 2550)

จากงานวิจัยของ Pooja *et al.* (2011) ซึ่งได้นำเมล็ดของ *Sapindus trifoliatus* L. มาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยการนำมาล้างด้วยน้ำประปาด้วยวิธีการให้น้ำไหลผ่านนาน 15-20 นาที จากนั้นหยดนำมาแช่ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยหยด tween-20 จำนวน 2-3 หยด และเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ จำนวน 3-4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และตัดชิ้นส่วนจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาล้างด้วยน้ำประปานาน 10 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลาสั้นๆ

ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ แล้วนำไปแช่ใน cetrimade 1 เปอร์เซ็นต์ และหยด tween-20 ประมาณ 2-3 หยด เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วนำมาแช่ในเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 รอบ แล้วจึงนำชิ้นส่วนของต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยง

2.7 ประโยชน์และการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบันมีบทบาทมากขึ้นต่อการพัฒนาการเกษตรที่พอจะสรุปแนวทางในการนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ได้ในหลายๆ แนวทาง ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตสารเคมีบางชนิด สารเคมีที่ได้นี้ส่วนใหญ่เป็น metabolite ของเซลล์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถจะผลิตสารที่ต้องการได้ในปริมาณมาก โดยเสียค่าใช้จ่ายต่ำลง สารเคมีที่ผลิตส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์ เช่น เป็นองค์ประกอบของยารักษาโรค เครื่องสำอาง สี และสารที่ใช้ผสมอาหาร เป็นต้น

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเซลล์เพื่อผลิตพันธุ์พืช ซึ่งการขยายหรือเพิ่มปริมาณพืชที่มีลักษณะเหมือนพ่อและแม่สามารถทำได้ในปริมาณที่มากขึ้น และรวดเร็ว สะดวกต่อการเก็บรักษารวบรวมพันธุ์ แนวทางนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้พันธุ์พืชที่ปราศจากโรคในพืชบางชนิด โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่มีความสำคัญมากต่อการผลิตพืช เนื่องจากไปลดผลผลิตลงอย่างมาก ประกอบกับยังไม่มีสารเคมีใดๆ ที่ป้องกันโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเซลล์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ในด้านนี้เป็นแนวทางที่ตื่นตัวกันมาก เนื่องจากสามารถที่จะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเซลล์ ในปริมาณที่มากๆ และนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีออกมาได้โดยใช้เวลาที่สั้น และไม่เสียแรงงานมากเหมือนนำไปคัดเลือกในแปลงทั้งหมด ซึ่งหลังจากคัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว จึงนำไปทดสอบอีกครั้งในสภาพแปลงปลูกที่ประสบความสำเร็จ

5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเซลล์ในงานพันธุวิศวกรรมของพืช ปัจจุบันได้มีการผลิตพืชพันธุ์ใหม่ๆ หลายชนิดโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การสร้างต้นพืชที่มีความทนทานต่อเชื้อไวรัส และแมลง เป็นต้น (วิชัย, 2541)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อัจฉริยา และคณะ (2538) ทำการขยายพันธุ์ *Citrus maxima* Merr. ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตเนื้อเยื่อสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรม ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนของส้มโอพันธุ์ขาวทองดีที่ตัดปลายเอาเอ็มบริโอออกบนอาหารสูตร MT ดัดแปลงพบว่า อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกับ Malt Extract (ME) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 2 ชนิดคือ แคลลัสที่เป็นก้อนแน่นสีขาวหรือเขียวและแคลลัสชนิดอ่อนนุ่มสีเขียวอ่อน นอกจากนี้อาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญยังสามารถพัฒนาเป็นกลุ่มใบเลี้ยงได้ ทั้งนี้แคลลัสชนิดอ่อนนุ่มเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นกลุ่มใบเลี้ยงได้ และกลุ่มใบเลี้ยงทั้งที่ได้จากเมล็ดอ่อนและแคลลัสชนิดอ่อนนุ่มสามารถพัฒนาเป็นต้น และรากได้บนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA

Normah. *et al.* (1997) ทำการขยายพันธุ์ *Citrus halimii* ซึ่งเป็นพืชในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ใกล้สูญพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการเพาะเลี้ยง *C. halimii* จากเมล็ดบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.4 ถึง 11.1 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ค) โดยส่วน hypocotyl หรือ ส่วนใต้ใบเลี้ยงเป็นส่วนที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด ซึ่งสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ได้จำนวนยอดมากที่สุดคือการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.2 ถึง 11.1 ไมโครโมลาร์ ส่วนการชักนำส่วนยอดที่ได้ให้เกิดราก พบว่าสภาวะที่ดีที่สุด คือการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.7 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเมื่อได้ต้นขนาดเล็กที่มียอดและรากสมบูรณ์แล้ว ก็ทำการย้ายลงปลูกในดินผสมที่ประกอบด้วยดิน ทราย และวัสดุอินทรีย์ (อัตราส่วน 1:1:1) ในเรือนกระจก พบว่ามีการรอดชีวิตเฉลี่ยเท่ากับ 83.3 เปอร์เซ็นต์

Nirmal. *et al.* (2000) ทำการขยายพันธุ์ *Murraya koenigii* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การปลูกต้นใบแกงมีจุดประสงค์เพื่อนำใบมาใช้ประโยชน์เนื่องจากใบของ *Murraya koenigii* มีกลิ่นหอม โดยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Murraya koenigii* ทำโดยการตัดชิ้นส่วนข้อจากต้นที่เจริญเต็มที่มาเลี้ยงบนอาหารสูตร Woody plant medium (WPM) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ค) และ Kinetin ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีจำนวนยอดหลายยอดเกิดขึ้น 12 ถึง 30 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ และพบว่าเกิดรากได้ง่ายเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.35 ไมโครโมลาร์ เมื่อได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ พบว่ามีต้นพืชที่สมบูรณ์ และรอดชีวิตคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงย้ายลงกระถางเป็นเวลา 3 เดือน จึงย้ายลงปลูกในแปลง นอกจากนี้ยังพบว่าในการชักนำให้ยอดเกิดรากยังทำได้โดยจุ่มลงใน IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายลงกระถางที่มีทราย ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส พบว่าจะได้พืชที่สมบูรณ์และรอดชีวิตคิดเป็น 80-90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 3 เดือนจึงย้ายลงปลูกในแปลง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Abdulaziz. *et al.* (2002) ทำการเพาะเลี้ยงยอดจากชิ้นส่วนของตาข้างของต้นไลม์เลมอน (*Citrus aurantifolia* (Christm.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP Kinetin และ NAA โดยในอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kn 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเท่ากับ 9 ยอด จะเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญชนิดไซโทไคนินสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ยาวที่สุด และเมื่อย้ายยอดที่เกิดใหม่ไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA และ NAA เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว กับ อาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดรากได้สูงที่สุด และในอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากได้มากที่สุด และต้นกล้าที่ได้จะมีโอกาสรอดชีวิตถึง 82 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำลงปลูกในเรือนกระจก

Puchooa (2004) ทำการศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ *Litchi chinensis* Sonn. หรือ ลิ้นจี่ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำส่วนของใบอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า สารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว หรือรวมกับ BA และ Kn และยังพบว่าบนอาหารที่เติม 2,4-D และ BA จะได้แคลลัสที่เป็นก้อนแน่น(Compact callus) และเมื่อนำแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และยังสามารถชักนำยอดเกิดใหม่นี้ให้เกิดรากได้บนอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งยังพบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อย้ายแคลลัสที่เจริญบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปเลี้ยงต่อบนอาหารที่ไม่เติม 2,4-D

Daniele. *et al.* (2010) ทำการชักนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆของ *Citrus x monstruosa* ให้พัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 35 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ค) สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด ซึ่งถูกนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 21 วัน และการชักนำแคลลัสให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือการนำแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.4 ไมโครโมลาร์ หรือ IBA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ชิ้นส่วนของพืชที่มีอายุหลังการเจริญได้ 40 วัน จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Hwang (2010) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอด *Zanthoxylum piperitum* DC. ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Rutaceae บนอาหารสูตร MS ที่มีการทดสอบความเข้มข้นต่างๆของสารควบคุมการเจริญ BA BPA และ TDZ เพียงชนิดเดียว และมีการใช้ NAA ร่วมกับสารควบคุมการเจริญชนิดอื่นๆด้วย ซึ่งผลการศึกษาพบว่าปลายยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 40 วัน สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดเท่ากับ 23 ยอด และนำยอดใหม่ที่รอดชีวิตเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ไปชักนำให้เกิดราก โดยอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชัก

140402

นำให้เกิดรากได้ดีที่สุด และทำการย้ายต้นพืชไปเลี้ยงในดินในแปลงปลูกซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์

Samarina. *et al.* (2010) ทำการขยายพันธุ์ *Citrus limon* โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารฟอกฆ่าเชื้อ และองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการขยายพันธุ์ *Citrus limon* โดยตัวอย่างชิ้นส่วนข้อที่ใช้เพาะเลี้ยงได้จากต้นอายุ 8 ปีในช่วงฤดูหนาว โดยสารฆ่าเชื้อที่ใช้ได้แก่ veltolen ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์, เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าสภาวะที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อที่ให้ผลดีที่สุด คือฟอกด้วยสารละลาย veltolen เป็นเวลา 40 นาที ซึ่งให้ตัวอย่างที่ปราศจากการปนเปื้อนคิดเป็น 58.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการหาความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ และการขยายพันธุ์ จะใช้ BA และ NAA ร่วมกันในหลายความเข้มข้น ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานสูงที่สุด ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนพืชที่เจริญขึ้นมา ส่วนการชักนำให้เกิดรากพบว่าชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีเกิดรากในอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Pooja (2011) ทำการศึกษาความเหมาะสมของการขยายพันธุ์ *Sapindus triforiatus* Linn. ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าการนำต้นอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเมล็ด มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนาให้เกิดยอดได้สูงที่สุดเท่ากับ 97.22 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายยอดเกิดใหม่ไปเลี้ยงบนอาหารใหม่จำนวน 3 ครั้ง จะได้จำนวนยอดใหม่สูงถึง 5.16 ยอดต่อยอดเดิม และในการชักนำยอดเกิดใหม่ให้เกิดราก วิธีที่ดีที่สุด คือ นำยอดที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ และเมื่อนำต้นอ่อนที่ได้ย้ายลงแปลงปลูกพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และต้นอ่อนที่ได้ไม่เกิดการกลายพันธุ์

Fazel. *et al.* (2011) ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ด *Citrus sinensis* ซึ่งทำการศึกษาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ Kn โดยเมล็ดที่ไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญของยอดสูงที่สุดเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และยอดที่ได้จากการงอกของเมล็ดจะนำไปศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดเท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์

Dipnalayan. *et al.* (2012) ทำการศึกษาการสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนของตาข้าง ไม้เนื้อแข็งสายพันธุ์ *Schleichera oleosa* ซึ่งพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนของตาข้างให้เกิดเป็นยอดใหม่ได้สูงที่สุดเท่ากับ 83.33±13.61

Savita. *et al.* (2012) ทำการขยายพันธุ์ *Citrus jambhiri* Lush. โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการประเมินความคงที่โดยการศึกษาลักษณะทางกายวิภาค และอาร์เอพีดี ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ *C. jambhiri* หรือ รัฟเลมอน บนอาหาร MS ที่เติม BA 2iP และ Kn ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดยอดหลายยอดสูงสุดเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำยอดมาแบ่งเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรเป็นเวลา 30 วัน พบว่ายอดที่นำมาเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดยอดคิดเป็น 67 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 4.02 ยอด และความยาวยอด 1.81 เซนติเมตร ส่วนในการชักนำให้เกิดรากพบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดรากสูงที่สุดคิดเป็น 87 เปอร์เซ็นต์

อุบล และคณะ (2556) ผลการศึกษาพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของ *Citrus medica* L. var. linetta Risso ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที และการฟอกฆ่าเชื้อปลายยอดจากสภาพแปลงด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที มีการปนเปื้อนเท่ากับ 27.50 เปอร์เซ็นต์ และ 30.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการชักนำยอดจากส่วนต่างๆ ของต้นกล้า (ยอด ใบเลี้ยง และข้อใบเลี้ยง) และปลายยอดจากต้นในสภาพแปลงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ชักนำยอดจากจำนวนมากที่สุดจากแต่ละส่วนคือ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.70 ยอด) MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.40 ยอด) MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (6.40 ยอด) และ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.90 ยอด) ตามลำดับ และอาหารที่ให้ความยาวยอดมากที่สุดคือ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (10.36 มิลลิเมตร) MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต (2.85 มิลลิเมตร) MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (9.47 มิลลิเมตร) และ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (5.56 มิลลิเมตร) ตามลำดับ การชักนำรากของ Citrus medica L. var. linetta Risso เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารทุกสูตรให้จำนวนรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ (1.00-1.45 ราก) โดย MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญให้เปอร์เซ็นต์การงอกของรากมากที่สุดเท่ากับ 91.68 เปอร์เซ็นต์ และความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 3.02 เซนติเมตร และสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสาร NH_4NO_3 และ KNO_3 ทำให้รากงอกเร็วที่สุด 23.33 วัน

Komal. *et al.* (2013) ทำการขยายพันธุ์ *Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan หรือ เลมอนไร้เมล็ด และการประเมินความคงที่ทางพันธุกรรมของต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยวิธีอาร์เอพีดี ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อเพื่อขยายพันธุ์ *Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ Kn ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดยอดสูงที่สุด ซึ่งยังพบว่า BA ดีกว่า Kn ในแง่ของจำนวนวันที่เกิดการแตกตาข้าง นอกจากนี้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นสูงขึ้นจะให้การเจริญของยอดลดลง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA (ความเข้มข้นสูงสุด 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญของยอดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ BA อย่างไรก็ตามในการ

เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA หรือ Kn หรือ BA ร่วมกับ NAA ให้จำนวนยอดที่ไม่มากพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ส่วนในการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA Kn และ IBA ร่วมกัน พบว่าในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Kn ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกัน หรือ BA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kn ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกัน ให้จำนวนยอดสูงสุด (5.5 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ) ในการชักนำให้เกิดรากพบว่ามีรากเกิดขึ้นบนอาหาร MS และบนอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อนำชิ้นส่วนยอดที่ได้มาเพาะเลี้ยง (เป็นรุ่นที่2) พบว่ามีการเจริญของยอดเพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kn ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกัน และเพิ่มขึ้นเป็น 7 เท่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kn ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกัน ซึ่งในการวิเคราะห์อาร์เอพีดีที่ใช้ไพรเมอร์อย่างสุ่ม 14 ชนิดให้ผลยืนยันว่าไม่เกิดการกลายในทั้ง 2 รุ่น

Reetika. *et al.* (2015) กระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนใบของต้น *Sapindus mukorossi* Gaertn. ที่โตเต็มวัยแล้วโดยชักนำให้เกิดแคลลัสบริเวณเส้นกลางใบของชิ้นใบบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D และ BA ที่แตกต่างกัน การชักนำให้เกิดแคลลัส และเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจะได้รับอิทธิพลมาจากขนาด อายุทางสรีรวิทยา ด้านของผิวใบ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยผิวใบด้านท้องใบส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโออย่างมีนัยสำคัญ จำนวนของโซมาติกเอ็มบริโอจะมีจำนวนสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ค) และจะทำการตรวจดูบริเวณของโซมาติกเอ็มบริโอด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อดูพัฒนาการของเอ็มบริโอระยะต่างๆ คือ เอ็มบริโอระยะก้อนกลม ระยะรูปหัวใจ และระยะใบเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ จะมีความถี่ของการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA และต้นกล้าที่พัฒนามาจากโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมแล้วจะสามารถมีอัตราการรอดชีวิตได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ต้นส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) สายพันธุ์ทับทิมสยาม สายพันธุ์ขาวทองดี และสายพันธุ์มือ (ชิ้นส่วนจาก ตาข้าง ใบ และเมล็ด)

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

3.2.1 สารเคมี

- อาหารสังเคราะห์ MS (Murashige and Skoog, 1962)
- ไฟตาเจล (Phytagel)
- น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- Benzylaminopurine (BA)
- Kinetin (Kn)
- Zeatin (Zn)
- Indole-3-butyric acid (IBA)
- α-naphthalenacetic acid (NAA)
- แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- เมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)
- เซฟโฟแซน (Cefozan)
- พีพีเอ็ม (Plant preservative mixture)
- สารปฏิชีวนะ (Streptomycin)
- Tween-20
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

3.2.2 อุปกรณ์

- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (Balance)
- เครื่องปั๊ม (Pump)
- เครื่องเขย่า (Shaker)
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (Beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- ออโต้ปิเปต และทิปขนาดต่างๆ (Autopipete and Tip)
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
- เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier caliper)
- แท่งแก้ว (Glass rod)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- ขวดลดความดัน (Sucktion flask)
- ปากคีบ (Forcep)
- จานแก้ว (Petri dish)
- กรวยกรอง (Bucher funnel)
- มีดผ่าตัด (Scalpel)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- ไฟแช็ค (Lighter)
- ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- ตะแกรงวางเครื่องมือ (Rack)

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนตาข้าง และใบ จากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ)

ตัดชิ้นส่วน ตาข้างและใบ จากต้นส้มโอ 3 พันธุ์ (ได้แก่ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาดเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้นด้วยวิธีการให้น้ำไหลผ่าน แล้วนำชิ้นส่วนของพืชมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 วินาที สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อตาข้าง และเป็นเวลา 30 วินาที สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อใบ จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยแบ่งการฟอกฆ่าเชื้อออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่1 ทำการฟอกทั้งหมด 4 ครั้ง ครั้งที่ 1 ฟอกในน้ำปราศจากเชื้อที่เติมเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารปฏิชีวนะสเตร็ปโตไมซิน ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และเซฟโฟแซน ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที ครั้งที่ 2-4 จะฟอกในน้ำปราศจากเชื้อที่เติม สเตร็ปโตไมซิน ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และเซฟโฟแซน ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลาครั้งละ 10 นาที

วิธีที่2 ทำการฟอกทั้งหมด 4 ครั้ง ครั้งที่ 1 ฟอกในน้ำปราศจากเชื้อที่เติมเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ สเตร็ปโตไมซิน ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และพีพีเอ็ม ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร (ไม่มีการเติมเซฟโฟแซน) เป็นเวลา 30 นาที ครั้งที่ 2-4 จะฟอกในน้ำปราศจากเชื้อที่เติมสเตร็ปโตไมซิน ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และพีพีเอ็ม ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร (ไม่มีการเติมเซฟโฟแซน) เป็นเวลาครั้งละ 10 นาที

นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ทำการบันทึกผลในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง โดยนับจำนวนใบ และตาข้างที่เกิดการปนเปื้อน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบและตาข้าง จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนใบและตาข้างที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนใบและตาข้างทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนของตาข้างส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดยอดใหม่

นำชิ้นส่วนตาข้างของส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ได้แก่ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่เหมาะสมดังการทดลองหัวข้อ 3.3.1 มาตัดแต่งให้มีความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Kn ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Zn ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 5.6 - 5.8 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ภาคผนวก ข) แล้วนำชิ้นส่วนตาข้างไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกการเจริญเติบโตโดยนับจำนวนตาข้างที่มีการเจริญเป็นยอดใหม่ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากสูตร พร้อมทั้งวัดความยาวของยอดใหม่โดยใช้เครื่องมือเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่} = \frac{\text{จำนวนตาข้างที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนตาข้างทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนใบของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดแคลลัส

ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบที่ตัดจากต้นส้มโอแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธีที่เหมาะสมตามการทดลองหัวข้อ 3.3.1 ตัดแต่งชิ้นส่วนใบส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ได้แก่ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ โดยตัดชิ้นส่วนของใบให้มีขนาดประมาณกว้าง 1 เซนติเมตร และยาว 1 เซนติเมตร ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล ความเข้มข้น 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 5.6-5.8 จากนั้นแบ่งบรรจุใส่ขวดแก้ว ขวดละประมาณ 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำชิ้นส่วนใบไปเพาะเลี้ยงในสภาวะได้รับแสงและที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญเติบโต

โดยสังเกตการเกิดแคลลัสที่มีลักษณะการเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะกลุ่มแน่น และวัดขนาดของความยาวและความกว้าง โดยใช้เครื่องมือเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนใบที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดของส้มโอ 2 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม และขาวทองดี) ให้เกิดการงอก

นำเมล็ดของส้มโอ 2 สายพันธุ์ (ได้แก่ ทับทิมสยาม และขาวทองดี) ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.6-5.8 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (ภาคผนวก ข) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบผลการเจริญโดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดจากสูตร รวมทั้งลักษณะของการงอก ความยาวของราก และยอดที่เกิดโดยใช้เครื่องมือเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดการงอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.5 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดอ่อนจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีให้เกิดราก

จากการทดลองในหัวข้อที่ 3.3.4 ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มโอทองดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีการเกิดยอดใหม่จากเมล็ด จึงทำการตัดยอดเกิดใหม่ให้มีขนาด 1 - 2 เซนติเมตร ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบผลการเจริญเพื่อที่

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากสูตร รวมทั้งสังเกตการเกิดราก และวัดความยาวรากที่เกิดด้วยเครื่องมือเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \times 100$$

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนตาข้าง และใบ จากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ)

จากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนตาข้าง และใบ ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ เพื่อลดการเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สำหรับชิ้นส่วนของตาข้าง วิธีที่เหมาะสมมากที่สุดก่อนการนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ วิธีที่ 1 คือทำการฟอกทั้งหมด 4 ครั้ง ครั้งที่ 1 ฟอกในน้ำปราศจากเชื้อที่เติมเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สเตร็ปโตไมซิน ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และเซฟโฟแซน ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที ครั้งที่ 2-4 ฟอกในน้ำปราศจากเชื้อที่เติมสเตร็ปโตไมซิน ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และเซฟโฟแซน ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลาครั้งละ 10 นาที นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตาข้างเท่ากับ 77.11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสูงกว่าวิธีที่ 2 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตาข้างเท่ากับ 64.29 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.1) และสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของใบ วิธีที่เหมาะสมมากก่อนการนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สุด ได้แก่ วิธีที่ 1 เช่นเดียวกับตาข้าง ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบเท่ากับ 86.79 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสูงกว่าวิธีที่1 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตาข้างเท่ากับ 86.05 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.1)

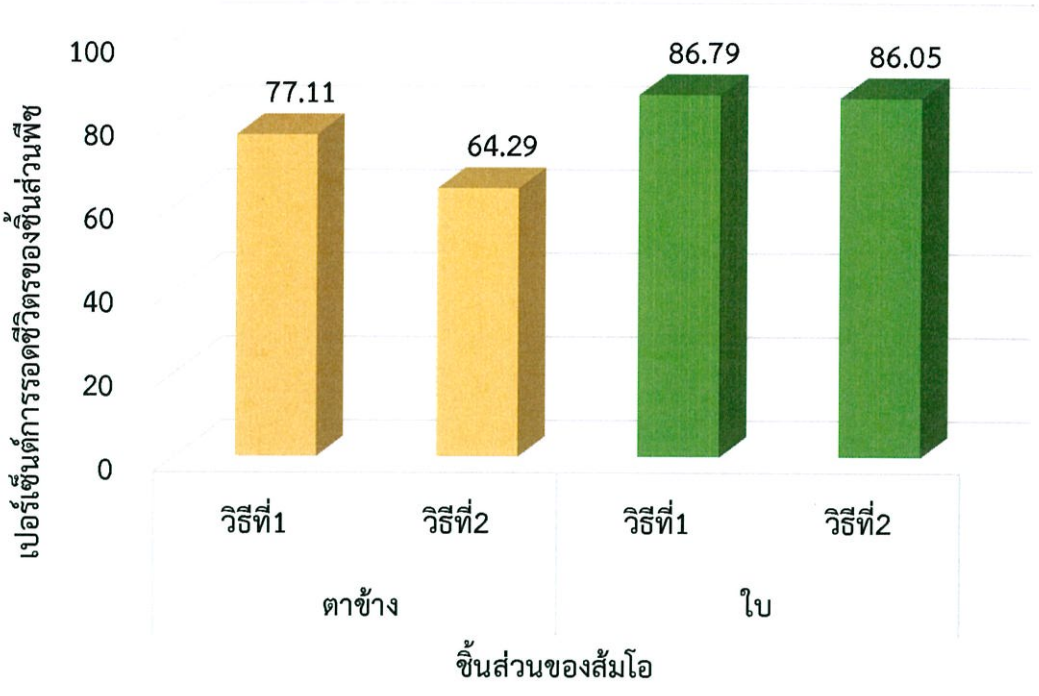
จากการสังเกตผลการทดลองข้างต้น นับจำนวนการรอดชีวิตโดยสังเกตจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนชิ้นงานและชิ้นส่วนตาข้างและใบที่ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล พบว่าตัวอย่างที่เป็นตาข้างของต้นส้มโอมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้มากกว่าชิ้นส่วนของตัวอย่างที่เป็นใบ เนื่องจากลำต้นของส้มโอมีลักษณะเป็นหยักสลับฟันปลา มีซอกมุมของลำต้นที่ทำความสะอาดด้วยน้ำประปาในขั้นตอนแรกได้ยากกว่าใบ และชิ้นส่วนของใบส้มโอไม่ควรแช่ในแอลกอออล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นานมากเกินไป เนื่องจากใบที่นำมาศึกษามีอายุน้อย ทำให้ใบเกิดการเหี่ยว และตายได้ในที่สุด

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของตาข้างจากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

สายพันธุ์	วิธีที่ 1			วิธีที่ 2		
	ตาข้างที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	ตาข้างที่ปนเปื้อน (ชิ้น)	จำนวนตาข้างที่รอด (เปอร์เซ็นต์)	ตาข้างที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	ตาข้างที่ปนเปื้อน (ชิ้น)	จำนวนตาข้างที่รอด (เปอร์เซ็นต์)
มือ	51	11	40 (78.43)	20	7	13 (65)
ขาวทองดี	13	3	10 (76.92)	10	4	6 (60)
ทับทิมสยาม	19	5	14 (73.68)	10	4	8 (66.67)
รวม	83	19	64 (77.11)	42	15	27 (64.29)

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบจากต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

สายพันธุ์	วิธีที่ 1			วิธีที่ 2		
	ใบที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	ใบที่ปนเปื้อน (ชิ้น)	จำนวนใบที่รอด (เปอร์เซ็นต์)	ใบที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	ใบที่ปนเปื้อน (ชิ้น)	จำนวนใบที่รอด (เปอร์เซ็นต์)
มือ	25	1	24 (96)	28	4	24 (85.71)
ขาวทองดี	20	3	17 (85)	8	1	7 (87.5)
ทับทิมสยาม	8	3	5 (62.5)	7	1	6 (85.71)
รวม	53	7	46 (86.79)	43	6	37 (86.05)



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของชิ้นส่วนของตาข้าง และใบจากต้นส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 และ 2 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนของตาข้าง จากส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดยอดใหม่

เมื่อนำชิ้นส่วนของตาข้างของต้นส้มโอ 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญชนิดต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเกิดการเจริญของยอดใหม่ได้ โดยสังเกตเห็นการเกิดยอดใหม่ได้ในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ยอดที่เกิดมีลักษณะเป็นจุดสีเขียวเกิดขึ้นมาบริเวณตาข้างในระยะแรก และหลังจากนั้นจึงค่อยพัฒนาเป็นยอดอ่อนสีเขียวบริเวณตาข้าง โดยทั้งส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามและสายพันธุ์ขาวทองดี สามารถเกิดยอดใหม่ได้ที่ความเข้มข้นเดียวคือ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) แต่ส้มโอทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ไม่สามารถวัดการเจริญเติบโตของยอดใหม่ได้ จึงสังเกตเห็นได้เพียงจุดสีเขียว และยอดขนาดเล็กมากเท่านั้น (รูปที่ 4.2) และสำหรับส้มโอสายพันธุ์มือมีการเจริญเติบโตได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร Kn ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Zn ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการเติม BA ความ

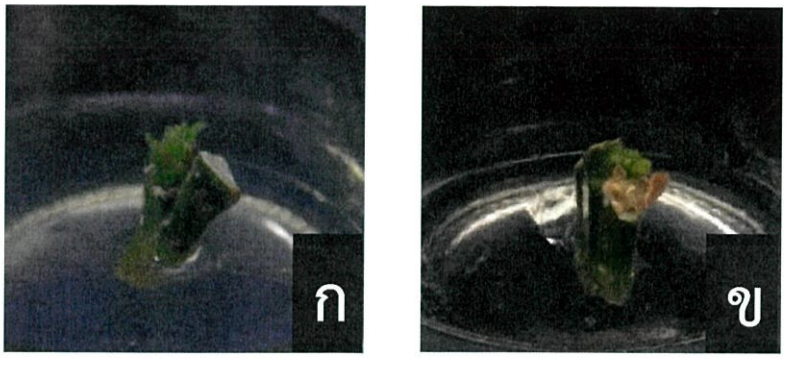
เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำตาข้างให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ เท่ากับ 37.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) (รูปที่ 4.3) แต่ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดใหม่ที่มีความยาวมากที่สุด โดยมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 7.88 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.4) แต่จากการทดลองดังกล่าว จะวัดประสิทธิภาพของระดับความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก ซึ่งสารควบคุมการเจริญชนิด BA มีประสิทธิภาพในการชักนำการเกิดยอดได้ดีกว่า Kn และ Zn สอดคล้องกับงานวิจัยของ Komal *et al.* (2013) ที่ทำการขยายพันธุ์ต้นเลม่อนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้การเจริญของยอดลดลง จากการศึกษาการเลือกชิ้นส่วนของส้มโอที่นำมาใช้พบว่ายอดที่เกิดจากชิ้นส่วนของตาข้างมีขนาดและความยาวที่มากกว่ายอดที่เกิดจากตายอด ผลการทดลองการชักนำชิ้นส่วนของตาข้างส้มโอสายพันธุ์มือให้เกิดยอดใหม่ และพบว่าความเข้มข้นของ BA ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการชักนำจำนวนยอด และความยาวยอดไม่ใช่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นหากนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ต้นส้มโอมือควรจะนำตาข้างไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรก่อน เพื่อเพิ่มจำนวนยอดใหม่ แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มความยาวยอด รวมทั้งหากทำการเปลี่ยนอาหารให้กับชิ้นส่วนพืช และใช้ระยะเวลาในการศึกษาต่อไป ทำให้สามารถนำยอดเกิดใหม่ที่มีความยาวมากพอ ไปชักนำให้เกิดรากเพื่อผลิตเป็นกล้าพันธุ์ที่มีคุณภาพดีต่อไป

ตารางที่ 4.3 จำนวนการเกิดยอดใหม่ และความยาวเฉลี่ยของยอดใหม่ จากชิ้นส่วนของตาข้างส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม และขาวทองดี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

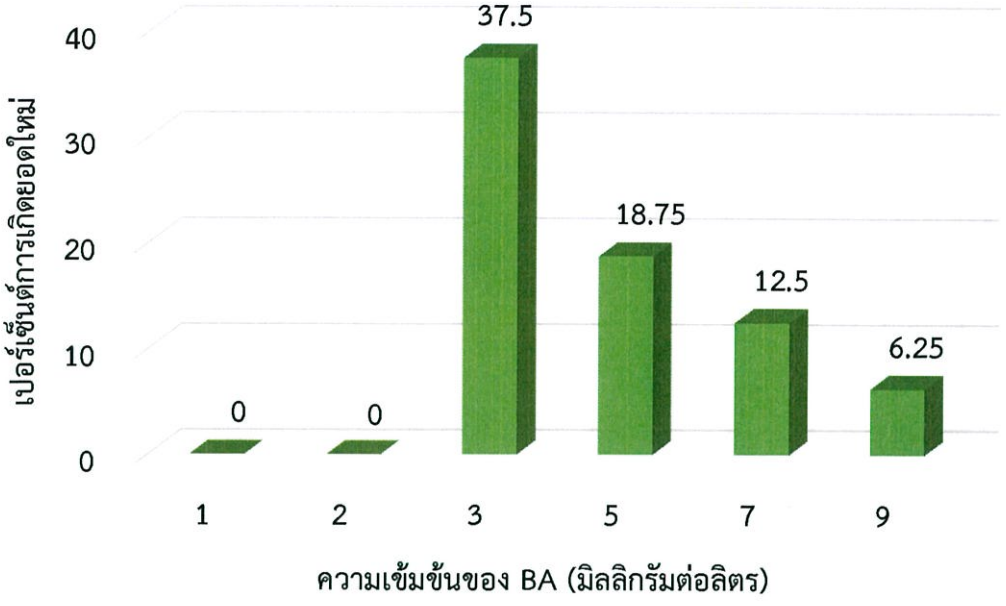
ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ทับทิมสยาม			ขาวทองดี		
	จำนวนเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนที่เจริญ (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่	จำนวนเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนที่เจริญ (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่
1	5	0	0	5	0	0
2	5	0	0	5	0	0
3	5	2	40	5	1	20
5	5	0	0	5	0	0
7	5	0	0	5	0	0

ตารางที่ 4.4 จำนวนการเกิดยอดใหม่ และความยาวเฉลี่ยของยอดใหม่ จากชิ้นส่วนของตาข้างของส้มโอสายพันธุ์มือ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

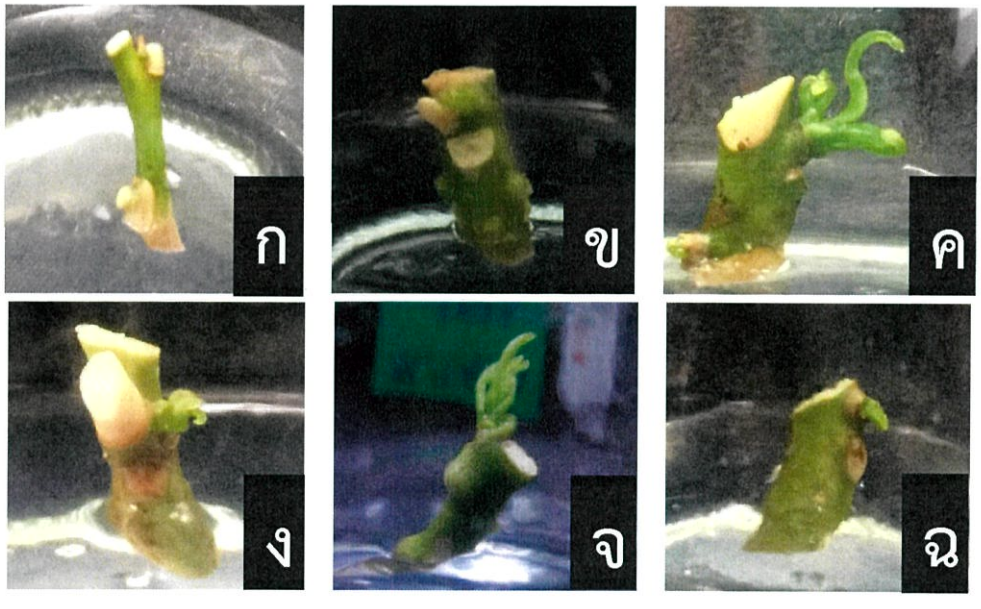
สารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			จำนวนชิ้นตาข้างเริ่มต้น	จำนวนชิ้นตาข้างที่เกิดยอด	ความยาวเฉลี่ยของยอดใหม่
BA	ZN	KN	(ชิ้น)	(เปอร์เซ็นต์)	(มิลลิเมตร)
1	-	-	16	0 (0)	0
2	-	-	16	0 (0)	0
3	-	-	16	6 (37.5)	4.26
5	-	-	16	3 (18.75)	3.97
7	-	-	16	2 (12.5)	7.88
9	-	-	16	1 (6.25)	3.56
-	1	-	10	0 (0)	0
-	3	-	10	0 (0)	0
-	5	-	10	1 (10)	2.15
-	-	1	10	0 (0)	0
-	-	3	10	2 (20)	2.09
-	-	5	10	0 (0)	0



รูปที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเป็นยอดใหม่จากตาข้างของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม (ก) และสายพันธุ์ขาวทองดี (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้างของต้นส้มโอสายพันธุ์มือ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ ระดับความเข้มข้น 1 2 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.4 ลักษณะการเจริญเป็นยอดใหม่จากตาข้างของส้มโอสายพันธุ์มือ บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 (ก) 2 (ข) 3 (ค) 5 (ง) 7 (จ) และ 9 (ฉ) มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

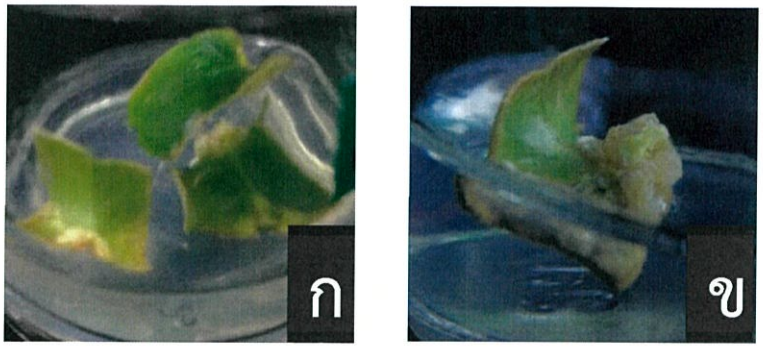
4.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนใบของส้มโอ 3 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ) ให้เกิดแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนของใบส้มโอ 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ มาเลี้ยงบนอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบในที่มืดได้ผลดีกว่าการเลี้ยงในที่สว่าง โดยสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ทั้ง 5 ความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของส้มโอได้เพียง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ขาวทองดี และสายพันธุ์มือ โดยเริ่มสังเกตเห็นการแตกของเส้นกลางใบ ก่อนเกิดจุดสีขาวนวลเล็กขึ้นระหว่างเส้นกลางใบในระยะ 2 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง และในสัปดาห์ที่ 4 แคลลัสเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือในบางชิ้นเกิดแคลลัสขึ้นทั่วทั้งชิ้นส่วนใบ บางชิ้นส่วนเกิดการงอ และมีแคลลัสสีขาวขึ้นบริเวณใต้ผิวใบ โดยทำการวัดขนาดในด้านกว้างและยาวเพื่อหาพื้นที่ของแคลลัส เพราะแคลลัสที่ได้มีลักษณะกระจายทั่วผิวใบแต่ไม่เจริญเป็นก้อน สำหรับส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี แคลลัสสามารถเจริญได้บนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ของการเพาะเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เท่ากับ 15 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รวมทั้งมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 6.05 และ 49.28 ตารางมิลลิเมตร (ตารางที่ 4.5) (รูปที่ 4.5) และสำหรับส้มโอสายพันธุ์มือ แคลลัสสามารถเจริญได้บนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ของการเพาะเลี้ยง แคลลัสที่เจริญบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด เท่ากับ 8.92 และ 28 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) (รูปที่ 4.6) ซึ่งในระดับความเข้มข้นอื่นๆ ของ 2,4-D ไม่สังเกตเห็นการเจริญของแคลลัส

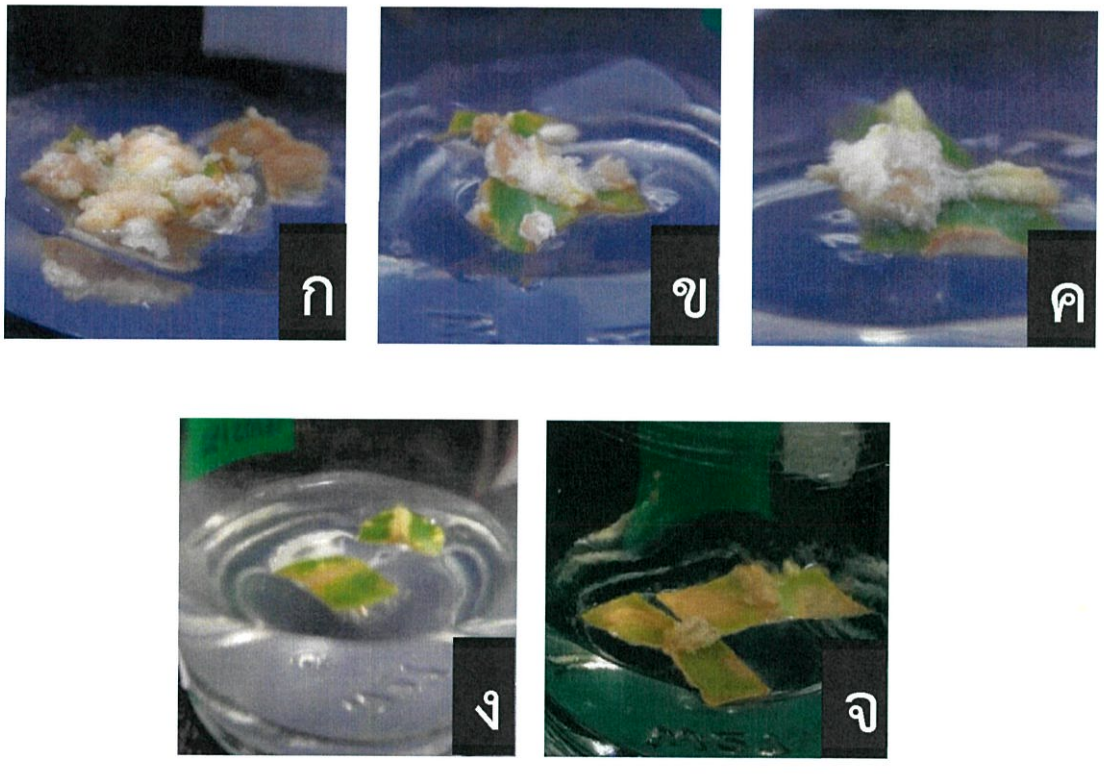
เมื่อเปรียบเทียบจากกราฟแสดงขนาดเฉลี่ยของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของส้มโอ 3 สายพันธุ์ (รูปที่ 4.7) พบว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดทั้งในสายพันธุ์ขาวทองดี และสายพันธุ์มือ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Puchooa (2004) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบต้นลิ้นจี่ ซึ่งพบว่าอาหารที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด จากผลการทดลองข้างต้น ชิ้นส่วนใบที่เกิดการเจริญของแคลลัสมากที่สุด คือใบที่มีอายุน้อย มีสีเขียวอ่อน เส้นกลางใบมีขนาดเล็ก ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป ไม่ควรเลือกใบที่แก่มาใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนการเกิดแคลลัส และขนาดเฉลี่ยของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบส้มโอ 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งสูตร MS ในระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

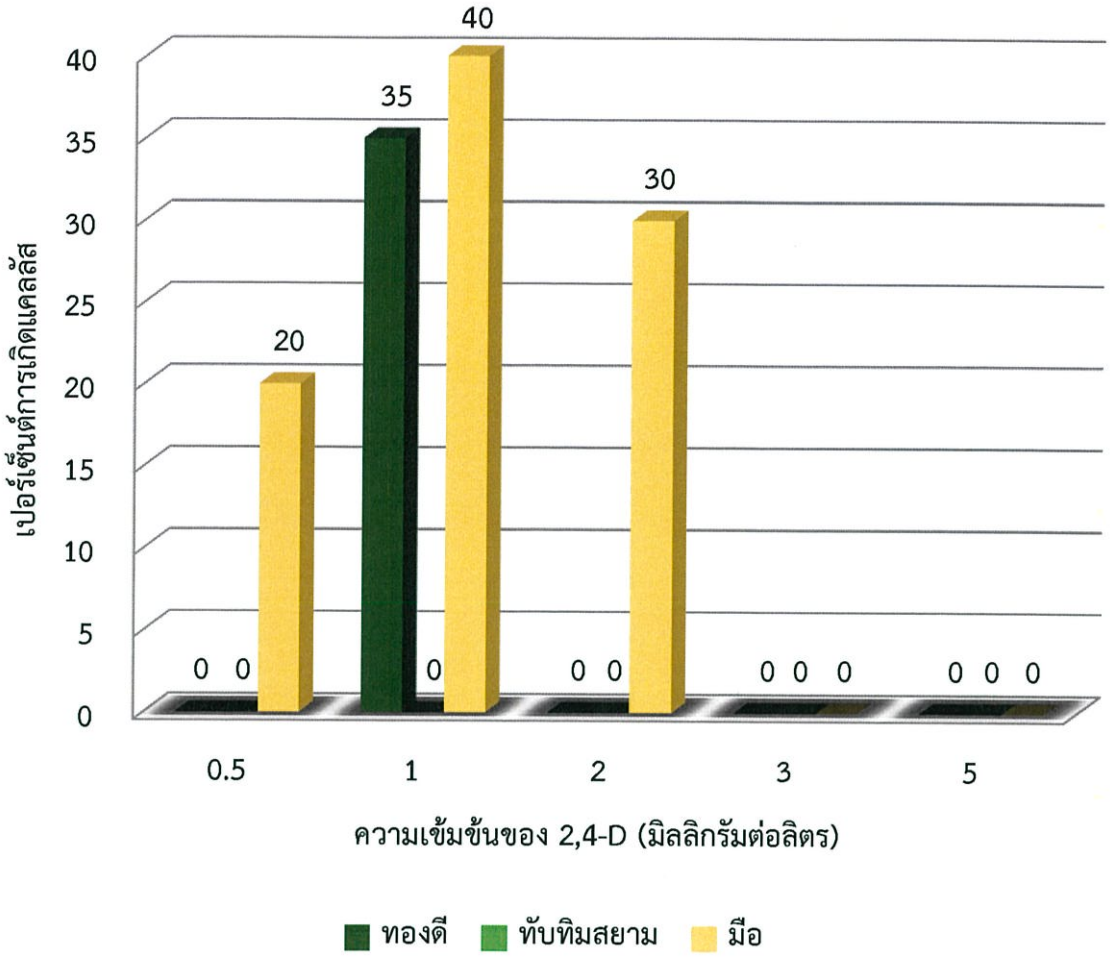
สายพันธุ์	ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนใบเริ่มต้น (ชิ้น)	สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 8	
			จำนวนใบที่เกิดแคลลัส (ชิ้น), (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ตารางมิลลิเมตร)	จำนวนใบที่เกิดแคลลัส (ชิ้น), (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (ตารางมิลลิเมตร)
ทับทิมสยาม	0.5	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	1	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	2	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	3	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	5	20	0 (0)	0	0 (0)	0
ขาวทองดี	0.5	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	1	20	3 (15)	6.05	7 (35)	49.28
	2	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	3	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	5	20	0 (0)	0	0 (0)	0
มือ	0.5	20	2 (10)	8.92	4 (20)	28
	1	20	6 (30)	6.56	8 (40)	12.71
	2	20	4 (20)	8.66	6 (30)	19.34
	3	20	0 (0)	0	0 (0)	0
	5	20	0 (0)	0	0 (0)	0



รูปที่ 4.5 ลักษณะการเจริญเป็นแคลลัสจากใบส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีบนอาหารสูตร MS ที่เติมสาร 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ก) และ 8 สัปดาห์ (ข)



รูปที่ 4.6 ลักษณะการเจริญเป็นแคลลัสจากใบส้มโอสายพันธุ์มือ บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 (ก) 1 (ข) 2 (ค) 3 (ง) และ 5 (จ) ในระยะเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากใบของส้มโอ 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดของส้มโอ 2 สายพันธุ์ (ทับทิมสยาม และขาวทองดี) ให้เกิดการงอก

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม และขาวทองดี บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติมโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม และขาวทองดีที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญของเมล็ดได้ทุกความเข้มข้น โดยในระยะแรกสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเริ่มมีการเจริญเป็นรากออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ดก่อน หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 4-5 ของการเพาะเลี้ยง จึงเริ่มสังเกตเห็นการเกิดยอด ดังตัวอย่างของการเจริญของเมล็ดส้มโอที่ระยะเวลาต่างๆ โดยการเกิดยอด และรากจากเมล็ดส้มโอทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นมีลักษณะ

เป็นยอดเดียว และรากเดียวที่มีขนาดยาวมากขึ้นเรื่อยๆ (รูปที่ 4.8) ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดทั้งสองสายพันธุ์ผ่านไป 8 สัปดาห์ เมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงที่สุด เท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.9) และที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตเป็นรากมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 18.44 มิลลิเมตร และเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของยอดที่มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 45.21 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.6) และสำหรับเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงที่สุด เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.9) และอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตเป็นรากมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 21.09 มิลลิเมตร อีกทั้งเมล็ดที่เจริญบนอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของยอดมากที่สุด โดยมีความยาวยอดเฉลี่ย 68.87 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.7) ซึ่งยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนี้ถูกนำไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากในหัวข้อต่อไป

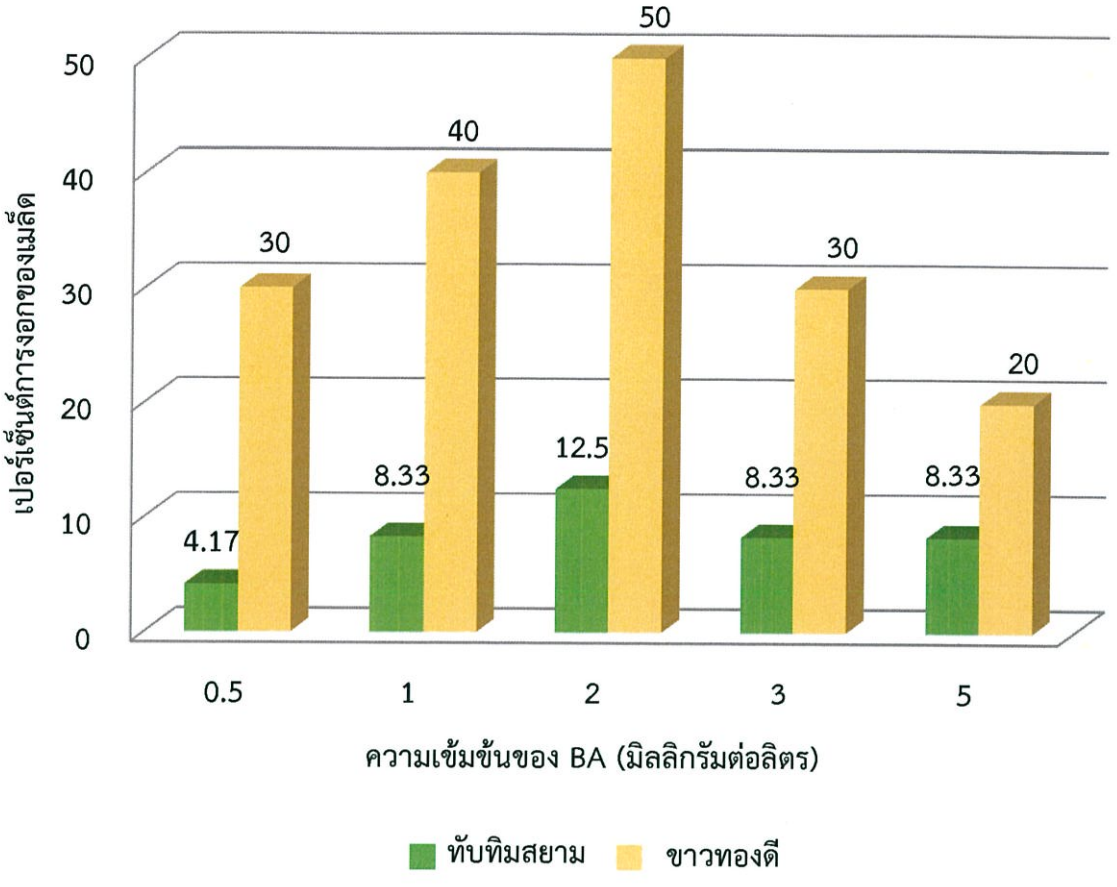
ตารางที่ 4.6 จำนวนการงอก ความยาวเฉลี่ยของราก และยอดจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	จำนวนเมล็ดที่งอกทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
0.5	24	1 (4.17)	18.44	30.09
1	24	2 (8.33)	17.79	45.21
2	24	3 (12.5)	15.15	40.33
3	24	2 (8.33)	16.23	38.12
5	24	2 (8.33)	4.85	0

ตารางที่ 4.7 จำนวนการงอก ความยาวเฉลี่ยของราก และยอดจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	จำนวนเมล็ดที่งอกทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
0.5	10	3 (30)	15.15	68.87
1	10	4 (40)	17.8	56.37
2	10	5 (50)	21.09	39.55
3	10	3 (30)	16.94	28.66
5	10	2 (20)	17.59	34.59

รูปที่ 4.8 ลักษณะการงอกของยอดอ่อน และราก จากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม ในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาสัปดาห์ที่ 2 (ก) สัปดาห์ที่ 4 (ข) และสัปดาห์ที่ 8 (ค)



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม และขาวทองดี บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

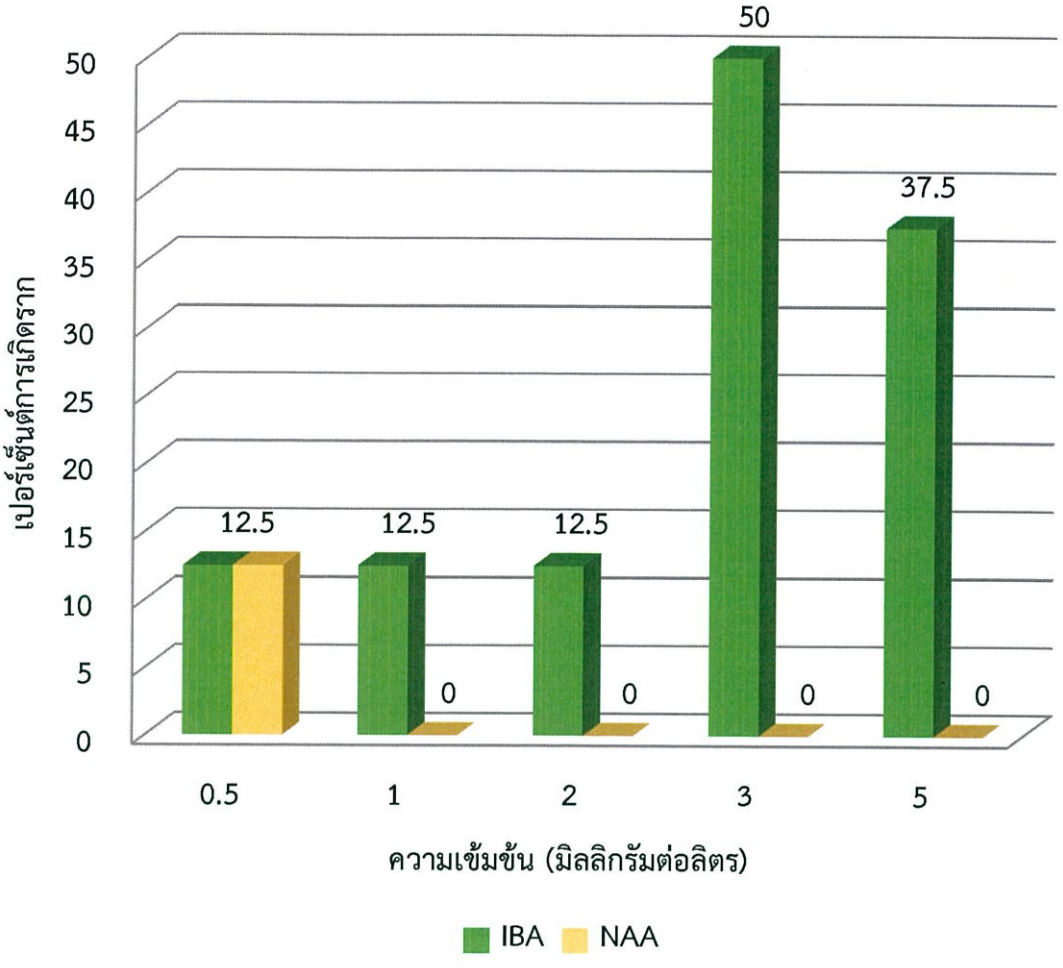
4.5 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดอ่อนจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีให้เกิดราก

จากการตัดยอดเกิดใหม่จากเมล็ดสายพันธุ์ขาวทองดี ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ในทุกความเข้มข้น สามารถชักนำยอดอ่อนจากเมล็ดให้เกิดรากได้ภายในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากได้ดีที่สุด คือ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะ 2 สัปดาห์แรก พบว่าความยาวของรากที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวมากที่สุด เท่ากับ 13.64 มิลลิเมตร แต่ในสัปดาห์ที่ 4 ความยาวของรากที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด คือ 34.49 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.8) (รูปที่ 4.11) โดยมีความยาวของรากเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่

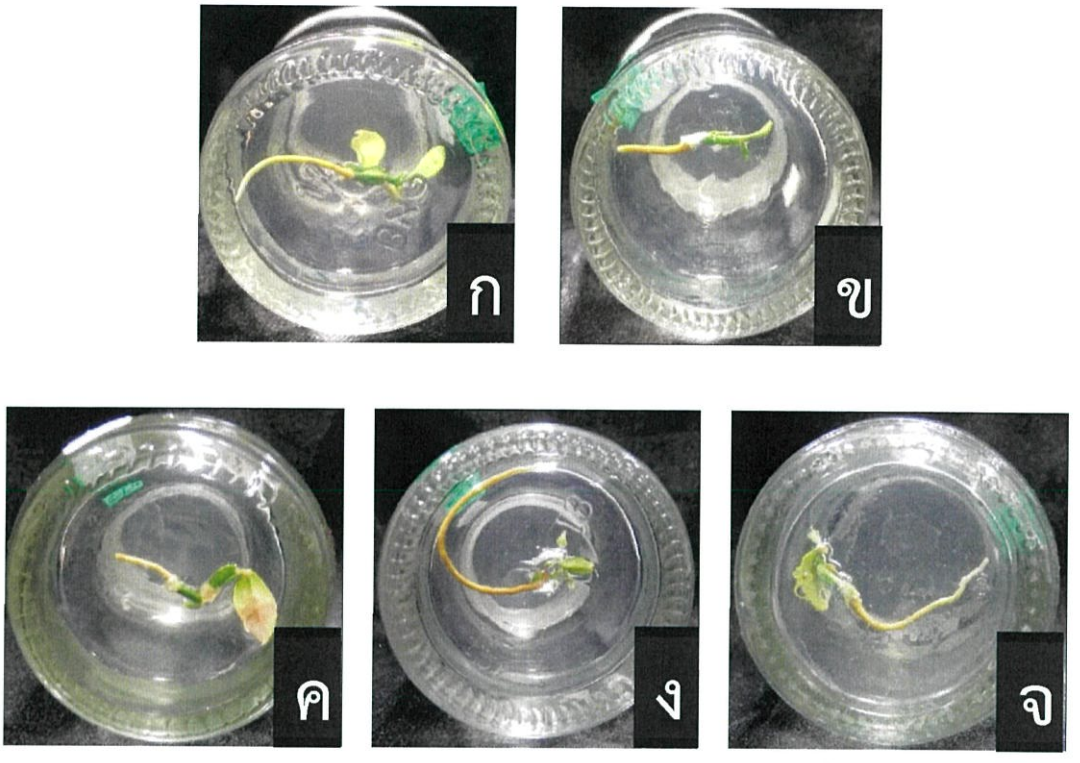
เพาะเลี้ยง (รูปที่4.12) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Hwang (2010) ที่มีการเลี้ยงปลายยอด ของต้น *Zanthoxylum piperitum* DC. ในอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด และสำหรับการพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นเดียวที่สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก คือ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวรากเฉลี่ย 7.84 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.8) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ การใช้สารควบคุมการเจริญ IBA มีประสิทธิภาพกว่าการใช้ NAA ที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเดียวกัน (รูปที่ 4.10) และการใช้ NAA ชักนำให้เกิดรากมีโอกาสเกิดแคลลัสซึ่งไปยับยั้งการเจริญของรากได้

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และความยาวเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA และ NAA ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนยอดเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนยอดที่เกิดราก (ชิ้น), (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวเฉลี่ยรากที่เกิด (มิลลิเมตร)	
IBA	NAA			สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
0.5	-	8	1 (12.5)	5.35	26.35
1	-	8	1 (12.5)	9.83	10.76
2	-	8	1 (12.5)	2.1	11.18
3	-	8	3 (37.5)	12.39	34.49
5	-	8	3 (37.5)	13.64	25.89
-	0.5	8	1 (12.5)	0	7.84
-	1	8	0 (0)	0	0
-	2	8	0 (0)	0	0
-	3	8	0 (0)	0	0
-	5	8	0 (0)	0	0



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากยอดอ่อนส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.11 ความยาวรากที่เกิดจากยอดอ่อนของต้นส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 (ก) 1 (ข) 2 (ค) 3 (ง) และ 5 (จ) มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 4.12 ความยาวรากที่เกิดจากยอดอ่อนของต้นส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา สัปดาห์ที่ 2 (ก) สัปดาห์ที่ 3 (ข) และ สัปดาห์ที่ 4 (ค)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความเหมาะสมของการขยายพันธุ์ต้นส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ทับทิมสยาม ขาวทองดี และมือ ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของพืชก่อนการนำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่ ตาข้าง และใบ ซึ่งมีทั้งหมด 2 วิธี โดยวิธีที่ 1 คือ การใช้สารเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ และเซฟโฟแซน ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 ไมโครลิตร และวิธีที่ 2 คือ การใช้สารเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ และไม่เติมเซฟโฟแซน เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ พบว่าวิธีที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตาข้างสูงที่สุด คือ 77.11 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบสูงที่สุด คือ 86.79 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นวิธีที่ 1 จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมทั้งสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของตาข้างและใบ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามและสายพันธุ์ขาวทองดี พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงที่สุด คือ 40 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างสำหรับส้มโอสายพันธุ์มือ คือ อาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงที่สุด คือ 37.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 7.88 มิลลิเมตร

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้บนสูตรอาหารที่ทำการศึกษา สำหรับส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเจริญของแคลลัสดีที่สุด คือ 35 เปอร์เซ็นต์โดยมีขนาดเฉลี่ยที่ 49.28 ตารางมิลลิเมตร และสำหรับการเพาะเลี้ยงใบของส้มโอมือบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเจริญของแคลลัสสูงที่สุด คือ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขนาดเฉลี่ยที่ 12.71 ตารางมิลลิเมตร

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดส้มโอทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามและสายพันธุ์ขาวทองดี

คือ อาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดดีที่สุด คือ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการเจริญเป็นรากของเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 18.44 มิลลิเมตร และในส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 21.09 มิลลิเมตร และในส่วนของการเจริญเป็นยอดจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 45.21 มิลลิเมตร และในส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดี พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ที่ระดับมิลลิกรัมต่อลิตรจะมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 68.87 มิลลิเมตร

สุดท้ายคือการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดอ่อนจากเมล็ดส้มโอสายพันธุ์ขาวทองดีให้เกิดราก พบว่า อาหาร MS ที่มีการเติม IBA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเจริญของรากจากยอดอ่อนดีที่สุด และมีความยาวเฉลี่ยของรากสูงที่สุด คือ 37.5 เปอร์เซ็นต์ และ 34.49 มิลลิเมตร ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการขยายพันธุ์ส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ทับทิมสยาม สายพันธุ์ขาวทองดี และสายพันธุ์มือ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้มีการศึกษาการชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดแคลลัส การเพาะเลี้ยงเมล็ด และการชักนำให้เกิดราก สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของตาข้างและใบจากต้นส้มโอก่อนการนำไปเพาะเลี้ยง แนวทางในการแก้ไขคือควรเพิ่มระยะเวลาในการล้างชิ้นส่วนใบด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่านให้นานมากขึ้น จึงนำไปแช่ในแอลกอออล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาสั้นๆ และก่อนการนำชิ้นส่วนตาข้างและใบไปเพาะเลี้ยง ควรล้างสารฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่ไม่มีการเติมสารฟอกฆ่าเชื้อใดๆ อีกรอบหนึ่ง เพื่อลดการเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในชิ้นงาน ในขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่เติมสารควบคุมการเจริญ Zn ไม่เติมลงไปก่อนการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เพราะอาจทำให้สารควบคุมการเจริญเสียสภาพได้ รวมทั้งอาจมีการเติมผงถ่านลงไปในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อช่วยดูดซับสารฟีนอลิกต่างๆ ที่พืชสร้างขึ้นมา แต่ต้องใส่ในปริมาณที่เหมาะสม เพราะอาจทำให้ถ่านไปกีดกันการลำเลียงสารควบคุมการเจริญของพืชได้ และจากการศึกษานี้เห็นว่าผลการทดลองที่ได้ (ตัวอย่างที่ตอบสนองการเกิดยอด แคลลัส และราก) มีจำนวนน้อย อาจเป็นไปได้ว่าเพราะตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษามีอายุมาก ซึ่งอาจไม่เจริญอีก หรือเจริญได้แต่ช้ามาก จากการสังเกตพบว่าตัวอย่างที่ตอบสนองได้ดีคือตัวอย่างจากต้นที่เป็นลำต้น(ตาข้าง)ที่อ่อน ใบอ่อน หรือเอ็มบริโอที่ได้จากเมล็ด จึงเสนอว่าหากทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื้อแข็งต่อไปในอนาคตเพื่อให้ได้ผลดี และมีจำนวนมาก ควรเลือกเก็บตัวอย่างจากต้นพืชที่ยังมีอายุน้อย ซึ่งยังมีเซลล์อ่อนซึ่งสามารถเจริญได้ดีกว่าพืชที่มีอายุมากหรือเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด แต่ทั้ง 2 วิธีดังกล่าว ควรมีการตรวจสอบการแปรผันทางพันธุ์กรรมโดยวิธีอาร์เอพีดี เพื่อให้แน่ใจว่าได้ต้นพืชที่มีลักษณะที่ดีเหมือนกับต้นแม่ แต่ต้นพืชที่อ่อน มีอายุน้อย ย่อมมีความบอบบาง ไม่แข็งแรง จึงต้องทำการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ เวลาในการฟอก และขั้นตอนในการฟอกที่เหมาะสม รวมถึงการตกแต่งชิ้นส่วนก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ต้องมั่นใจว่าอุปกรณ์ที่ใช้ เช่น ปากคีบไม่ร้อนจนเกินไป จนทำให้ตัวอย่างพืชไหม้ และตายในที่สุด นอกจากนี้สิ่งที่น่าศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต คือ การเพาะเลี้ยงพืชเนื้อแข็งบนอาหารสังเคราะห์สูตร Woody plant medium ซึ่งอาจมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเนื้อแข็งมากกว่า และให้ผลดีกว่า รวมถึงการใช้สารควบคุมการเจริญหลายชนิดรวมกัน ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันด้วย เพื่อให้ได้ต้นพืชจำนวนมาก ที่มีลักษณะดี มีความคุ้มค่าในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าว เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์ และการปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มเกษตรสัญจร. 2530. **ส้มโอ.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต.

จารุวรรณ จาติกเสถียร. 2544. **การชักนำให้เกิด embryogenic callus ในทุเรียนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** วารสารวิชาการเกษตร. 2544 9(1) : 16-26.

นงนุช และคณะ. 2553. **ส้มโอ.** [Online]. Available: http://www.kasetorganic.com/ส้มโอ-พันธุ์ขาวทองดี-ขายดี.html

นฤมล. 2548. **การเพาะปลูกและขยายพันธุ์ส้มโอผลไม้เศรษฐกิจที่มั่นคง.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ส่งเสริมอาชีพธุรกิจ เพชรกะรัต.

นายเกษตร. 2554. **ส้มโอทับทิมสยามอีกครั้ง.** [Online]. Available: http://www.thairath.co.th/content/193214.

นิรนาม. **ประโยชน์ของส้มโอพันธุ์มือ.** [Online]. Available: http://www.nanagarden.com/product/176126.

วิกิพีเดีย. 2559. **ส้มโอ.** [Online]. Available: https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%AA%E0%B9%89%E0%B8%A1%E0%B9%82%E0%B8%AD.

วิเศษ. 2540. **การปลูกส้มโอ.** กรุงเทพฯ. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดารัตน์. 2556. **ส้มโอมือ.** ฐานข้อมูลสมุนไพร. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. [Online]. Available: http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid-119.

สุเทพ. **ต้นส้มโอพันธุ์ดี.** [Online]. Available: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d2/Pomelo_flower.jpg.

องอาจ. **ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม.** [Online]. Available: http:// www.palangkaset.com/เมืองไม้ผลไม้/ส้มโอ-gi-ทับทิมสยาม-ลุ่ม/.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช.** กรุงเทพฯ. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อัจฉริยา มณีน้อย และ สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2538. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโอ.** การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาพืช, หน้า 28-33.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** พิมพ์ครั้งที่1. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อติสรรค์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

อุบล สมทรง. 2556. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มซ่า.** วารสารเกษตรวรุณ ปีที่ 10 ฉบับที่ 1. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี : หน้า 29-38.

Abdulaziz M *et al.* 2002. "Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing."Department of Horticulture, College of Agriculture and Food Sciences, King Faisal University. 95(4) : 285-295.

Azim, F. Rahman, M.M. Prodhan, S.H. Sikdar, S.U. Zobayer, N. and Ashrafuzzaman, M. 2011. "Development of Efficient Callus Initiation of Malta (Citrus sinensis) Through Tissue Culture." International Journal of Agricultural Research Innovation and Technology. 1(1-2) : 64-68.

Chin. 1988. "Media for embryo culture of some tropical recalcitrant species." Petanika 11(3) : 357-363.

Daniele Fraternale, Laura Giamperi, Anahi Bucchini, Pierpaolo Cara and Donata Ricci. 2010. "*In vitro* plant regeneration from callus of *Citrus x monstruosa* (Pompia), an endemic *Citrus Sardinia.*" Natural product communications. Vol. 5(6) : 927-930.

Dipnalayan. 2012. "Studies on factor influencing node culture establishment during *in vitro* shoot multiplication from mature *Sceheichera oleosa* (Lour.)" Oken tree. Indian Journal of Natural Product and Resources Vol 4(1) : 102-109.

Hwang, S.J.. 2010. "An efficient *in vitro* propagation of Zanthoxylum piperitum." Department of Food and Biotechnology Dongshin University Naju.: 520-714.

ITIS. *Citrus maxima* Merr. [Online]. Available: http//www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt? search_topic-TSN&search_Value=501574

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Komal Goswami, R.Sharma, P.K. Singh and Govind Singh. 2013. "Micropropagation of seedless lemon (Citrus limon L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers." Physiol Mol Biol Plants (January–March 2013) 19(1) : 137-145.

Nirmal, K. Babu, A. Anu, A.B. Remashree and K. Praveen. 2000. "Micropropagation of curry leaf tree." Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61 : 199-203.

Normah, M.N., S. Hamidah and Ghani, F.D. 1997. "Micropropagation of *Citrus halimii* an endangered species of South-east Asia." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50 : 225-227.

Pooja. 2011. "Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagation plants using RAPD analysis." Acta Physiol Plant, 33 : 1821-1829.

Puchooa. 2004. "*In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.)." African Journal of Biotechnology Vol. 3 (11) : 576-584.

Reetika Singh, Kumar Rai and Nishi Kumari. 2015. "Somatic embryogenesis and plant - regeneration in *Sapindus mukorossi* Gaertn. from leaf derived callus induced with 6-benzylaminopurine." Appl Biochem Biotechnology, 10 : 1210-1213

Samarina, L.S. Kolomiets, T.M., Baranova, E.N. and Arutyunova, E.S.. 2010. "Regeneration and micropropagation of lemon cultivars *in vitro* from nodal explants." Russian Agricultural Sciences, 2010, Vol. 36, No. 6 : 417-420.

Savita, Alka Bhagaat, Phatap Kumar Pati, G.S. Virk and Avinash Nagpal. 2012. "An efficient micropropagation protocol for *Citrus jambhiri* Lush. and assessment of clonal fidelity employing anatomical studies and RAPD markers." In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. (2012) 48 : 512-520.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของสูตรอาหารสังเคราะห์ MS (Murashige and Skoog 1962)

สาร	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สารละลายเข้มข้น (กรัม)	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
สารอาหารหลัก		กรัม/1000 (10x)	
NH_4NO_3	1650	16.5	
KNO_3	1900	19	100
$CaCl_2 . 2H_2O$	440	4.4	
$MgSO_4 . 7H_2O$	370	3.7	
KH_2PO_4	170	1.7	
สารอาหารรอง		มิลลิกรัม/100 (100x)	
$MnSO_4 . 4H_2O$	22.3	2230	
$ZnSO_4 . 4H_2O$	8.6	860	
H_3BO_3	6.2	620	1
KI	0.83	83	
$Na_2MoO_4. 2H_2O$	1.25	125	
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025	2.5	
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025	2.5	
สารละลายเหล็ก		กรัม/1000 (10x)	
Na_2EDTA		3.73	10
$FeSO_4 . 7H_2O$		2.78	
วิตามิน		มิลลิกรัม/100 (100x)	
Glycine	2	0.2	
Thiamine-HCl	0.1	0.01	1
Nicotinic acid	0.5	0.05	
Pyridoxine-HCl	0.1	0.01	

ที่มา อารีย์, 2541

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร นำมาละลายน้ำปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่ต้องการเตรียม
2. ปรับปริมาตรอาหารด้วยกระบอกตวงตามปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียม
3. แบ่งอาหารใส่บีกเกอร์ตามจำนวนความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่ต้องการเตรียม
4. คำนวณปริมาตรของสารควบคุมการเจริญที่ต้องเติมลงในอาหารในแต่ละความเข้มข้น จากสูตรดังต่อไปนี้

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

หรือ ปริมาตรที่ใช้ $= \dfrac{\text{ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม} \times \text{ปริมาตรอาหารทั้งหมด}}{\text{ความเข้มข้นจาก stock เริ่มต้น}}$

5. ดูดสารควบคุมการเจริญจาก stock แล้วเติมลงในบีกเกอร์ แล้วจึงปรับปริมาตรอาหารด้วยกระบอกตวงตามปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียมในแต่ละความเข้มข้น
6. นำอาหารไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 5.6-5.8
7. เติมวุ้น 2.6 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารในแต่ละบีกเกอร์ แล้วทำการละลายวุ้นด้วยไมโครเวฟ นาน 1-2 นาที
8. แบ่งใส่ขวดแก้วที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร
9. นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
10. นำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงนาน 2-3 วัน เพื่อสังเกตการปนเปื้อนในอาหารก่อนการนำไปใช้งาน

ภาคผนวก ค

ค่าแปลงจากมิลลิกรัมต่อลิตรเป็นไมโครโมลาร์ของสารควบคุมการเจริญบางชนิด

สารควบคุมการเจริญ	BA	Kinetin	Zeatin	2,4-D	IBA	NAA	IAA
น้ำหนักโมเลกุล	225.2	215.2	219.2	221.0	203.2	186.2	175.2
มิลลิกรัมต่อลิตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไมโครโมลาร์						
0.0001	0.0004	0.0005	0.0005	0.0004	0.0005	0.0005	0.0005
0.001	0.004	0.005	0.005	0.0045	0.005	0.005	0.006
0.005	0.022	0.023	0.023	0.023	0.025	0.027	0.028
0.01	0.044	0.046	0.046	0.045	0.049	0.054	0.057
0.05	0.222	0.232	0.228	0.226	0.246	0.27	0.285
0.10	0.444	0.465	0.456	0.452	0.492	0.54	0.570
0.25	1.11	1.16	1.14	1.13	1.23	1.34	1.43
0.50	2.22	2.32	2.28	2.26	2.46	2.69	2.85
1.0	4.44	4.65	4.56	4.52	4.92	5.37	5.71
5.0	22.20	23.23	22.81	22.62	24.61	26.85	28.54
10.0	44.40	46.47	45.62	45.25	49.21	53.71	57.08
25.0	111.01	116.17	114.05	113.12	123.03	134.26	142.69
50.0	222.02	232.34	228.10	226.24	246.06	268.53	285.39

ที่มา อารีย์, 2541