รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืชอย่างง่ายแก่โรงเรียนมัธยมในจังหวัดสงขลาที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชในรูปของสวนพฤกษศาสตร์

Transfer of Simple Biotechnology for Micropropagation of Conserved Plants to Secondary School in Songkhla Province

คณะนักวิจัย
ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต
ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน
นางสาววราภรณ์ หีดฉิม

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2555-2559

สารบัญ

	หน้า
รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย	1
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ	3
บทนำ	5
วัตถุประสงค์	5
สรุปโครงการการถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืชอย่างง่ายๆ	6
- การเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ	6
- การชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส / ยอดรวมของผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองบางชนิด	8
- การอนุบาลออกปลูก	37
เอกสารอ้างอิง	40
การถ่ายทอดความรู้ / เทคโนโลยีแก่นักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไป	41
- การอบรมเชิงปฏิบัติการ	41
- การประเมินการเข้ารับชมการสาธิต / การฝึกอบรมในกิจกรรมฯ	43
- ผลการประเมินกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช	44
ภาพรวมของงานเกษตรในส่วนของนิทรรศการ / การสาธิตกิจกรรม	50
ผลงานตีพิมพ์	57
ผลงานที่ได้รับรางวัล	83

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการสร้างยอดรวมของพืชสกุล Garcinia บนอาหารสูตร MMS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์	8
2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของพืชสกุล Garcinia บางชนิด	9
3	สรุปการเพิ่มปริมาณยอดจากชิ้นส่วนหลายชนิดของพืชสกุล Garcinia บางชนิด	10
4	ผลของสูตรอาหาร และชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการสร้างยอดบนอาหาร MS ที่ไม่เติม BA และเติมด้วยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	12
5	ผลของชนิดชิ้นส่วน และความเข้มข้นของ BA ที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำยอดรวมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	13
6	ผลของความเข้มข้นของ BA ที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดรวมหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน	20
7	ผลของชนิดของผงวุ้น และชนิดชิ้นส่วนที่มีผลต่อการสร้างยอดรวมของต้นเหรียงหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	24
8	ผลของอายุใบอ่อนสีแดงต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส	27
9	การสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ L2 หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน	27
10	ผลของความเข้มข้นของ dicamba ที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	29
11	ผลของพันธุ์ส้มโอต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต	33
12	ผลของพันธุ์ส้มโอต่อการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน	34
13	ชนิดพืช ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ สูตรอาหาร และการพัฒนาของชิ้นส่วนหลังการเพาะเลี้ยงของผักพื้นบ้าน ไม้ผลพื้นเมืองบางชนิดที่มีการขยายพันธุ์และเก็บรักษาพันธุกรรมในหลอดทดลอง	38

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	สารเคมีที่จำเป็น และใช้ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวชิ้นส่วนพืชก่อนทำการเพาะเลี้ยง	6
2	การเตรียมฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดเนียงเพื่อเพาะเลี้ยงคัพภะ ขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรม	7
3	การล้างบริเวณผิวภายนอกของฝักกระเจี๊ยบด้วยน้ำยาทีโพล และผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 15-20 นาที	7
4	ลักษณะแคลลัสชนิด friable ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของส้มแขกบนอาหารสูตรอาหาร WPM เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์	10
5	ผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการสร้างยอดรวมบนอาหารที่ไม่เติม และเติม BA เข้มข้น 5 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน	12
6	ผลของ PVP ต่อการชักนำการสร้างยอดรวมบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	13
7	ลักษณะของยอดรวมที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนปลายยอดและชิ้นส่วนข้อ บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน	14
8	ลักษณะของต้นชมพู่น้ำดอกไม้ที่ชักนำได้ บนอาหารสูตร ½ MS เติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 45 วัน (บาร์= 1.0 เซนติเมตร)	15
9	ยอดรวมที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 45 วัน	16
10	พัฒนาการของโนดูลาแคลลัสบนอาหารชักนำแคลลัส และชักนำยอดรวมรวมบนอาหารชักนำยอด	17
11	การสร้างแคลลัส และยอดรวมจากชิ้นส่วนเมล็ดมะดัน บนอาหารที่เติมและไม่เติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน	18
12	ลักษณะการสร้างแคลลัส และยอดรวม จากชิ้นส่วนเมล็ด บนอาหารที่เติมและไม่เติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน	19
13	การพัฒนาของยอดหลังวางเลี้ยงกลุ่มยอดรวมขนาดเล็กมะดันบนอาหาร MS เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน	21
14	ต้นเหรียงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะที่ปราศจากใบเลี้ยง (ซ้าย) และคัพภะที่มีใบเลี้ยงอยู่ครึ่งหนึ่ง (ขวา) บนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน	22
15	ลักษณะของเมล็ดเหรียงที่จำแนกตามความสุกแก่ของเมล็ดจากมากสุด (ซ้ายมือ) ไปน้อยสุด (ขวามือ)	23
16	ต้นเหรียงที่ได้จากการวางเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 เดือน	24
17	ผลของชนิดของผงวุ้นและชนิดชิ้นส่วนที่มีผลต่อการสร้างยอดของต้นเหรียงหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	25
18	ผลของผงถ่านต่อการพัฒนาของยอดเหรียงหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	25

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะของใบอ่อนสีแดงของอบเชยแต่ละขนาดที่ใช้ในการชักนำแคลลัส	26
20	ลักษณะแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีแดง L2 หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน	28
21	ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่ (ศรชี้) ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข)	29
22	ลักษณะของผล และเมล็ดลังแขที่แยกจากผลเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง	30
23	ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนเมล็ดลังแขเพื่อวางเลี้ยงในหลอดทดลอง	31
24	อัตราการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและข้อของลังแข บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์	31
25	ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบ (ก) และ ชิ้นส่วนข้อ (ข) บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์	32
26	ยอดรวมที่สร้างจากชิ้นส่วนข้อของสะตอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมผงถ่าน 0.2 % (ก) และไม่เติมผงถ่าน (ข) เป็นเวลา 6 สัปดาห์	32
27	ยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงของส้มโอพันธุ์ทองดีบนอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร) อายุ 1 เดือน (ซ้าย) และ 2 เดือน (ขวา)	34
28	ตัวอย่างขั้นตอนการอนุบาลพืชที่ได้จากในหลอดทดลองปลูกลงดิน	38
29	การเยี่ยมชมและร่วมประชุมเชิงปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของนักเรียนจากโรงเรียนศรีนครมูลนิธิ	41
30	บรรยากาศการฝึกอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืชแก่นักเรียนโรงเรียนแสงทอง	41
31	ภาพรวมของกิจกรรมการประกวดและสาธิตการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองที่จัดขึ้นในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 25	42
32	ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 21	44
33	ผลการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้ารับชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 21	44
34	ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 22	45
35	ผลการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้ารับชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 22	45

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
36	ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช	46
37	ผลประเมินความพึงพอใจในการเข้าชมนิทรรศการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 23	46
38	ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช	47
39	ผลประเมินความพึงพอใจในการเข้าชมนิทรรศการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 24	47
40	ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช	48
41	ผลประเมินความพึงพอใจในการเข้าชมนิทรรศการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 25	48
42	การจัดเตรียมนิทรรศการก่อนวันงาน	50
43	บรรยากาศการเข้าชมนิทรรศการและสาธิตทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช	51
44	การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	52
45	แนะนำอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	53
46	อธิบายกระบวนการในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	53
47	การแนะนำขั้นตอนต่างๆ ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	54
48	เทคนิคการทำให้อุปกรณ์ต่างๆ ในตู้ย้ายเลี้ยงปลอดเชื้อ	54
49	บรรยากาศการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ ภายในตู้ย้ายเลี้ยง	55
50	แนะนำวัสดุปลูกแต่ละชนิดที่เหมาะสมกับพืชและวิธีการอนุบาลต้นกล้าในหลอดทดลองออกจากขวดเพื่ออนุบาลลงดินปลูก	56

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)	การถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืชอย่างง่ายแก่โรงเรียนมัธยมในจังหวัดสงขลาที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชในรูปของสวนพฤกษศาสตร์
(ภาษาอังกฤษ)	Transfer of Simple Biotechnology for Micropropagation of Conserved Plants to Secondary School in Songkhla Province
คณะนักวิจัย	ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน นางสาววราภรณ์ หีดฉิม
หน่วยงานต้นสังกัด	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย

สมปอง เตชะโต

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืชอย่างง่ายแก่โรงเรียนมัธยมในจังหวัดสงขลาที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชในรูปของสวนพฤกษศาสตร์

(ภาษาอังกฤษ) Transfer of Simple Biotechnology for Micropropagation of Conserved Plants to Secondary School in Songkhla Province

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์พืชด้วยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมพืชไว้ในหลอดทดลองสามารถแก้ไขปัญหาการสูญพันธุ์ของพืชพื้นเมืองไม่ให้สูญหายไปจากท้องถิ่นเดิม กิจกรรมการดำเนินงานในขั้นต้นจะเป็นการเตรียมการเพาะเลี้ยง ซึ่งได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองของภาคใต้มากกว่า 10 ชนิด ได้แก่ สะตอ เนียง เหรียง อบเชย หลุมพี ลังแข ผักหวาน มะดัน ชมพู่น้ำดอกไม้ พืชสกุล *Garcinia* และพืชสมุนไพร เป็นต้น ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้ เช่น เมล็ด ยอด และใบ เป็นต้น เพื่อชักนำแคลลัส ยอดรวมและเพิ่มปริมาณต้นกล้า เพื่อเก็บอนุรักษ์พันธุกรรมไว้ในหลอดทดลอง และถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่นักเรียนมัธยมในเขตจังหวัดสงขลาจำนวน 12 โรงเรียน ในเขตอำเภอเมือง หาดใหญ่ สะเดา จะนะ นาทวี สะบ้าย้อย รัตภูมิ บางกล่ำ สิงนคร สทิงพระ กระแสสินธ์ และระโนด นอกจากนี้ ยังมีนักศึกษา และบุคคลทั่วไปที่สนใจ โดยกิจกรรมส่วนใหญ่จะจัดขึ้นในงานเกษตรภาคใต้ของแต่ละปี ๆ ละ 10 วัน (วันละ 3 รอบ) เริ่มดำเนินงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 – ปัจจุบัน (2559) ณ อาคารเทิดพระเกียรติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีผู้ให้ความสนใจเข้าร่วมชมนิทรรศการ ฝึกอบรม อย่างต่อเนื่องซึ่งในแต่ละปี มีผู้เข้าร่วมไม่น้อยกว่า 100 คน/รอบ จากการประเมินผลการเข้าร่วมกิจกรรม โดยการทำแบบสอบถามความพึงพอใจ พบว่า ผู้เข้าร่วมมีความพึงพอใจระดับดี-ดีมาก สามารถนำไปใช้ประโยชน์และสนับสนุนให้มีการจัดกิจกรรมนี้ขึ้นอีกในปีต่อๆ ไป ดังนั้นกิจกรรมดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์แก่นักเรียน นักศึกษา ตลอดจนบุคคลทั่วไปและสามารถสร้างเครือข่ายการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชระหว่างมหาวิทยาลัยกับโรงเรียนระดับมัธยม ตลอดจนเกษตรกรได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ เทคโนโลยีชีวภาพ โรงเรียนมัธยม จังหวัดสงขลา

Absract

Propagation of southern native plant species by biotechnological method could help solving the extinction of those plants. The activities include the preparation of culturing more than 10 species of southern native plants e.g. *Parkia*, Djenkol bean, Nitta tree, cinnamon, Lumphi, Lungkhae, star gooseberry, schomburkiana, rose apple, *Garcinia* and some medicinal plants. The initial explants such as seeds, shoots and leaves were used for callus induction, plantlet regeneration and shoot multiplication and proliferation.The further purposes were to conserve those plant species *in vitro* and transfer this simple propagation biotechnology to students at secondary school level in Songkhla province about 12 schools in Muang, Hat-Yai, Sadao, Chana, Nathawee, Sabayoi, Ratthapoom, Bangklam, Singhanakorn, Kasaesin and Ranot district. This transferred technology would cover students in university and interested farmer. The acitivities was conducted during Agricultural Fair in each year (2012-2016) at Faculty of Natural Resources, Prince of Sonkla Universitty. Each day 3 rounds of transferred technology was performed and each round approx. 100 participants attended.

Then, activities were evaluated by all of participants. The result showed that participants were satisfy at have a good appreciation. Therefore, this reseach project will be useful for student both secondary school and university and interested farmers. Moreover, it can create a network of plant genetic conservation between secondary school, universities and interested farmer.

Keywords: plant genetic conservation, Royal project, biotechnology, secondary school, Songkhla province

บทนำ

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของมนุษย์เราอย่างมากในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยพื้นฐาน หรือปัจจัยอำนวยความสะดวกอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้แก้ปัญหาที่เกี่ยวกับความเป็นอยู่ของมนุษย์ ช่วยให้คุณภาพชีวิตดีขึ้น เป็นที่ทราบกันว่าพืชเป็นทั้งอาหาร เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย และยารักษาโรค ในสภาพปัจจุบันมีการเพิ่มของประชากรมากขึ้น มีการบุกรุกและทำลายธรรมชาติกันมากขึ้น ส่งผลให้ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชลดน้อยลง การระบาดของโรคและแมลงก่อให้เกิดความสูญเสียพันธุกรรมพืชที่เคยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจไป พืชเศรษฐกิจบางพืชสร้างเมล็ดได้น้อยหรือไม่มีการสร้างเลย กอปรกับการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการไม่อาศัยเพศอื่นๆ มีความยากลำบาก ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้เสนอโครงการวิจัยการขยายพันธุ์และจัดเตรียมต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองภาคใต้เพื่อเก็บรวบรวมไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และนำไปปลูกยังถิ่นเดิม (*in situ*) ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2551 ถึงปีพ.ศ. 2554 และประสบผลสำเร็จในการผลิตพืชดังกล่าวจำนวนหนึ่งโดยเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเทคโนโลยีที่สำคัญคือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชเพื่อขยายพันธุ์จำนวนมาก ในระยะเวลาที่สั้นให้เพียงพอกับความต้องการของประชากรที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังศึกษาการสร้างสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่เป็นที่ต้องการ สร้างความหลากหลายทางชีวภาพ และเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต

จากคุณประโยชน์นานับประการผลิตพืชด้วยของเทคโนโลยีชีวภาพที่กล่าวแล้วข้างต้นจึงเป็นการสมควรที่จะมีการเผยแพร่เทคโนโลยีดังกล่าวไปยังนักเรียนในระดับมัธยมศึกษา นักศึกษาในมหาวิทยาลัยทั้งที่เป็นของรัฐ และเอกชนเพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูงต่อไป และยังเป็นการขยายโอกาสในการประกอบอาชีพให้กับธุรกิจขนาดย่อมที่อาจเป็นโอกาสสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีโรงเรียนจำนวนมากกระจายทั่วประเทศที่มีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช ทั้งที่เป็นไม้ดอก พืชผัก พืชสมุนไพร ตลอดจนไม้ในวรรณคดีในรูปของสวนพฤกษศาสตร์ อันเนื่องมาจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ฯ ซึ่งไม้เหล่านี้เป็นทรัพยากรพืชที่ใช้เรียนรู้ในโรงเรียนนั้นๆ และชุมชน การอนุรักษ์ด้วยวิธีการดังกล่าวเสี่ยงต่อการสูญหาย อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะพืชที่มีน้อยเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ แม้ว่าบางโรงเรียนมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่อาจไม่มีความพร้อมทางด้านเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์ด้วยวิธีการในหลอดทดลอง และเทคนิคที่จำเพาะในพืชดังกล่าว โครงการนี้จึงพัฒนาขึ้นเพื่อถ่ายทอดความรู้ และอบรมให้กับนักเรียนในระดับมัธยม ตลอดจนบุคคลในชุมชนทั่วไปได้ทราบวิธีการดังกล่าว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการอนุรักษ์ทางเลือกในหลอดทดลอง และขยายพันธุ์ใช้ประโยชน์ในอนาคตไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากท้องที่ของชุมชนนั้นๆ
2. เป็นการหารายได้ให้แก่โรงเรียนในรูปของการจำหน่ายพืชอนุรักษ์ดังกล่าว
3. สร้างเครือข่ายระหว่างหน่วยงานอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในระดับรากหญ้า

สรุปโครงการการถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืชอย่างง่ายแก่โรงเรียนมัธยมในจังหวัดสงขลา ที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชในรูปของสวนพฤกษศาสตร์

รายละเอียดของกิจกรรมการดำเนินงานในขั้นต้นจะเป็นการเตรียมการเพาะเลี้ยง ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ เพื่อชักนำแคลลัส ยอดรวม และเพิ่มปริมาณต้นกล้าจำนวนมาก และส่งเสริมความยืดยาวยอดผักพื้นบ้านไม้ผลพื้นเมืองของภาคใต้บางชนิด พร้อมกับการชักนำราก อนุบาลต้นจากหลอดทดลองไปดูแลในเรือนระแนง เพื่อเตรียมถ่ายทอดเทคโนโลยีในรูปของการประชุมเชิงปฏิบัติการ

กระบวนการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชดังกล่าว ประกอบด้วย

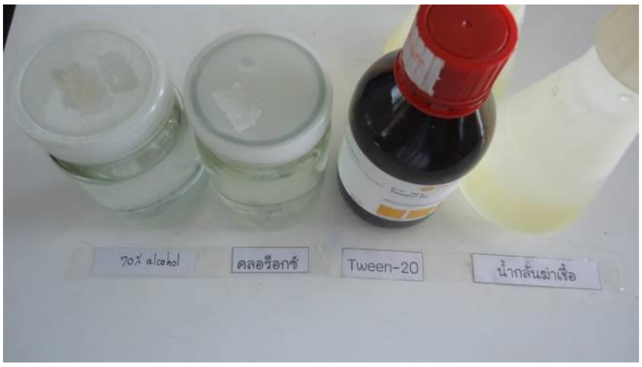
- การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช
- การชักนำแคลลัส/ยอด
- การเพิ่มปริมาณยอด
- การชักนำราก
- การอนุบาลลงดินปลูก

<u>1. การเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ</u>

2.1. การฟอกฆ่าเชื้อ มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาใช้ เช่น

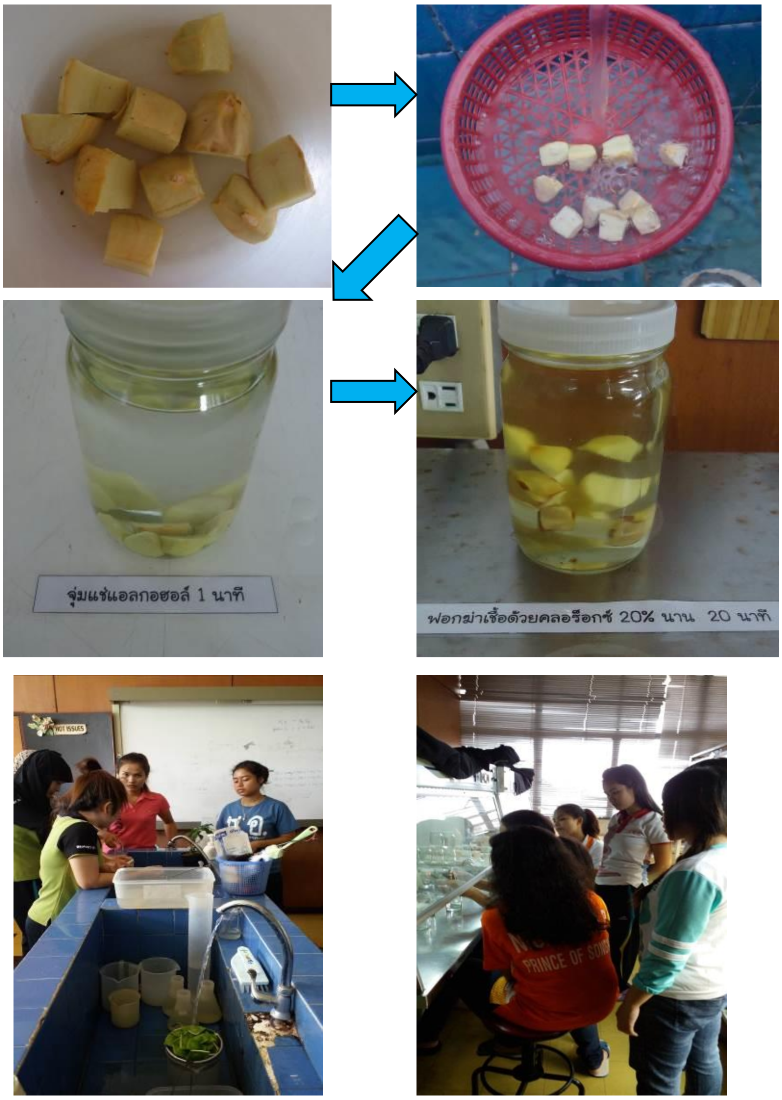
- สะตอและเนียง เริ่มต้นนำผลเนียงและสะตอ ล้างให้สะอาด เปิดน้ำไหลผ่าน 30 นาที จุ่มแช่ 70% แอลกอฮอล์ 30 วินาที จากนั้นจุ่มแช่สารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween-20 2-3 หยด นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

<u>วัสดุ และอุปกรณ์ในการฟอกฆ่าเชื้อ</u>



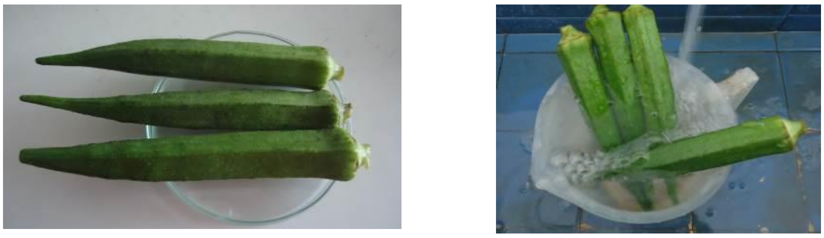
ภาพที่ 1 สารเคมีที่จำเป็น และใช้ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวชิ้นส่วนพืชก่อนทำการเพาะเลี้ยง

- <u>เนียง</u> (*Archidendron pauciflorum*) นำผลมาปอกเปลือกออก ตัดเมล็ดตรงส่วนที่เป็นที่อยู่ของต้นอ่อนภายในเมล็ด เป็นรูปลูกบาศก์ ขนาด 5-10x5-10x5-10 มม ล้างด้วยสารละลายทีโพลในน้ำไหล 3-5 นาที ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวอีกครั้งด้วยคลอร๊อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเตรียมฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดเนียงเพื่อเพาะเลี้ยงคัพภะ ขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรม

- <u>กระเจี๊ยบเขียว</u> (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.) เริ่มต้นนำผลกระเจี๊ยบเขียวล้างให้สะอาด เปิดน้ำไหลผ่าน 15-20 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อโดยนำส่วนของผลจุ่มแช่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟ 3 ครั้ง ผ่าผลเพื่อแยกเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงต่อไป



ภาพที่ 3 การล้างบริเวณผิวภายนอกของฝักกระเจี๊ยบด้วยน้ำยาทีโพล และผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 15-20 นาที

2. <u>การชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส/ยอดของผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองบางชนิด</u>

ในส่วนนี้จะเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ และเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ของผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองของภาคใต้หลายๆ ชนิด พร้อมทั้งการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ได้แก่

2.1 <u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล</u> *Garcinia*

-การชักนำยอด

แยกเมล็ดมังคุด พะวา และส้มแขกจากผล นำมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้ววางเลี้ยงบนสูตรอาหารชักนำยอดรวม (Multiple shoot induction medium: MSIM) ซึ่งเป็นอาหารสูตรดัดแปลง MS (MMS) เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกอัตราการสร้างยอดรวม จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน

เมล็ดของพืชสกุล *Garcinia* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSIM แสดงให้เห็นความสามารถในการสร้างยอดรวมได้แตกต่างกันทั้งอัตราการเพิ่มปริมาณยอด และจำนวนยอด (ตารางที่ 1) เมล็ดพะวาให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดสูงสุด รองลงมาคือ มังคุด ในขณะที่ส้มแขกไม่สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้

ตารางที่ 1 อัตราการสร้างยอดรวมของพืชสกุล *Garcinia* บนอาหารสูตร MMS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์

Species	Multiple shoot formation	% Multiple shoot formation	Avg. shoot number per seed
G. mangostana(มังคุด)	Yes	73	20
G. speciose (พะวา)	Yes	100	40
G. atroviridis (ส้มแขก)	No	0	1
N		100	

ตัดแยกใบอ่อนของมังคุด พะวา และส้มแขก ที่ได้จากยอดในหลอดทดลอง วางเลี้ยงบนสูตรอาหารชักนำตายอด (Shoot primordial induction medium: SPIM) ซึ่งเป็นสูตรอาหาร Woody plant medium (WPM) เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารโพลีไวนิลไพโรริโดล (PVP) เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ที่ความเข้มข้น 0.1 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือร่วมกับไธโอยูเรีย (TU) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เททับด้วยอาหารชักนำการยืดยาวยอด (Shoot elongation medium: SEM) ซึ่งเป็น อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ บันทึกการสร้างยอด

ใบอ่อนของมังคุด และพะวาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง (Woody plant medium: WPM) เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ 2-5 ยอด (ตารางที่ 3 ภาพที่ 3) ในส้มแขกใบไม่สามารถชักนำยอดรวมได้แต่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ (friable callus) (ภาพที่ 4) และใบอ่อนของพะวาให้อัตราการเกิดยอดโดยตรงได้ดีกว่ามังคุด

ภาพที่ 3 ยอดรวมโดยตรงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของพะวาบนอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

-การชักนำแคลลัสจากใบอ่อน

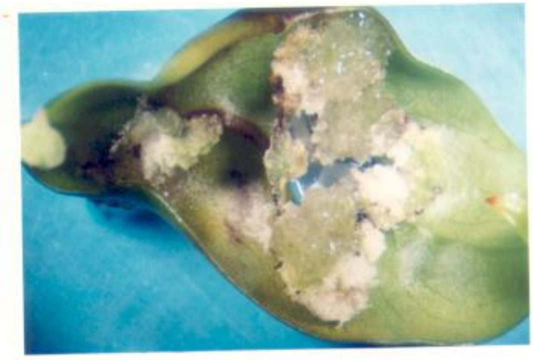
นำใบอ่อนของมังคุด พะวา และส้มแขก ที่ได้จากยอดที่ชักนำได้ในหลอดทดลองอายุ 1 เดือน วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส (Callus induction medium: CIM) ซึ่งเป็นอาหารสูตรดัดแปลง MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA BA TDZ และ TU ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน) วางเลี้ยงภายใต้สภาพการวางเลี้ยงเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณยอด หลังจากวางเลี้ยงนาน 4-6 สัปดาห์ บันทึกอัตราการสร้างแคลลัส

พืชสกุล *Garcinia* ทั้งสามชนิดให้ผลการชักนำแคลลัสที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) มังคุดให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุดบนอาหาร CIM เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในพะวาให้อัตราการชักนำแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหาร CIM เติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการเพิ่มปริมาณของแคลลัสเพิ่มขึ้น 3-4 เท่า หลังการย้ายเลี้ยงทุกเดือน สำหรับส้มแขก พบว่า อาหารสูตร CIM เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของพืชสกุล *Garcinia* บางชนิด

Species	PGR				% Callus	Type of callus
	BA	TDZ	TU	NAA	formation	
G. mangostana	0.5	1	-	-	15.0a	
(mangosteen)	0.5	0.5	-	-	68.8a	
	0.5	0.5	-	0.5	0c	mreristematic
	1.0	0.5	-	-	66.7a	nodular callus
	1.0	1.0	-	-	25.0b	
C.V. (%)					10.3	

G. speciosa	0.1	0.5	-	-	25.4bc	
(pawa)	0.5	0.5	-	-	54.1ab	
	0.5	1.0	-	-	26.4bc	meristematic
	0.1	-	-	0.1	66.6a	nodular callus
	0.5	-	-	0.5	8.8c	
	2.5	-	-	0.25	90.0a	
C.V.(%)					31.3	
G. atroviridis	0.5	-	0.5	-	15.4b	friable callus
(somkhag)	0.5	0.5	-	-	0c	
	1.0	-	-	0.5	34.5a	
C.V.(%)					25.2	



ภาพที่ 4 ลักษณะแคลลัสชนิด friable ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของส้มแขกบนอาหารสูตรอาหาร WPM เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ตารางที่ 3 สรุปการเพิ่มปริมาณยอดจากชิ้นส่วนหลายชนิดของพืชสกุล *Garcinia* บางชนิด

Species	Explant	Culture media+PGR	Avg. shoot no./explant
G. mangostana	Seed	MMS+5mg/l BA	20
(Mangosteen)	Leaf	WPM+5mg/l BA	2-5
	Callus	MS+0.5mg/l BA+0.5mg/l TDZ (1)	
		WPM+0.1mg/l BA (2)	
		Overlaid medium (3)	10
G. speciosa	Seed	MMS+5mg/l BA	50
(Pawa)	Leaf	WPM+5mg/l BA	2-5
	Callus	MS+0.25mg/l NAA+2.5mg/l BA(1)	
		overlay medium(2)	20

G. atroviridis	Seed	MMS+5mg/l BA	1
(Somkhag)	Leaf	WPM+5mg/l BA	0
	Nodal explant	WPM+0.1mg/l TU (1) overlay medium (2)	20-30

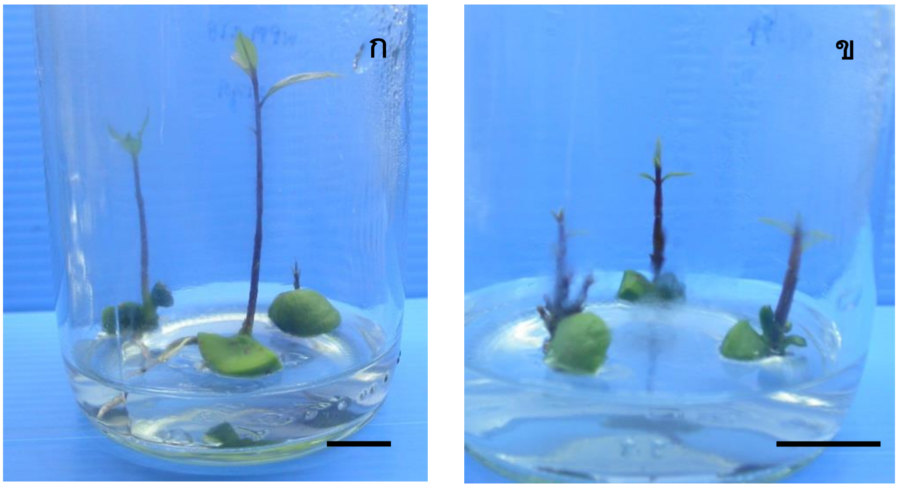
PGR: plant growth regulator, MMS: modified MS medium
WPM: woody plant medium, BA: benzyladenine
NAA: naphthaleneacetic acid, TDZ: thidiazuron
TU: thiourera
overlay medium: อาหารเหลว ½ MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร
(1) (2) and (3) อาหารชักนำแคลลัส ชักนำยอด และการยืดยาวของยอด ตามลำดับ

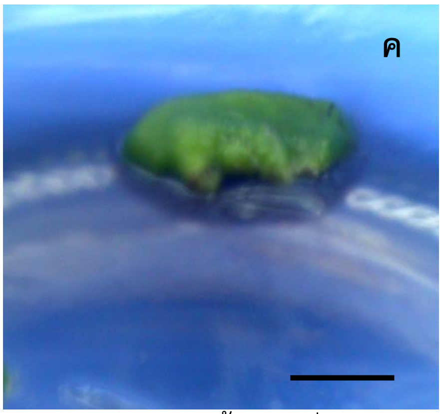
2.2 <u>ชมพู่น้ำดอกไม้</u> (*Syzygium jambos* (L.) Alston)

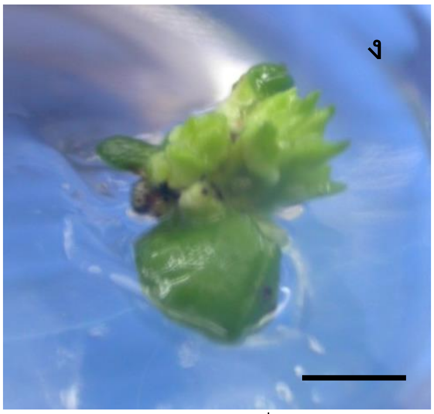
-การเพาะเลี้ยงเมล็ดชมพู่น้ำดอกไม้ต่อการชักนำยอดรวม

ตัดแยกเมล็ดชมพู่น้ำดอกไม้จากผล ทำความสะอาดตามวิธีการมาตรฐาน เพาะเลี้ยงทั้งเมล็ดหรือตัดแบ่งเป็นส่วนๆ บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทั้งสองสูตรเติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดทั้งเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้อัตราการงอก 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนต้น 1 ต้นต่อหนึ่งเมล็ด ส่วนอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการงอก 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3.66 ยอดต่อหนึ่งเมล็ด ยอดในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสูงกว่าการวางเลี้ยงบนอาหารเติม BA (ภาพที่ 5)

เมล็ดที่ตัดแบ่งเป็นส่วนๆ ตามขวางแล้ววางเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำยอดเดี่ยวหรือยอดรวมได้ แต่ในอาหารที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้อัตราการสร้างยอดรวม 88.89 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอด 8.67 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 4)







ภาพที่ 5 ผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการสร้างยอดรวมบนอาหารที่ไม่เติม และเติม BA เข้มข้น 5 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน ก. เลี้ยงทั้งเมล็ดบนอาหารที่ไม่เติม BA ข. เลี้ยงทั้งเมล็ดบนอาหารเติม BA เข้มข้น 5 มก./ล.(บาร์= 1.0 เซนติเมตร) ค. เลี้ยงเมล็ดตัดตามขวางบนอาหารที่ไม่เติม BA ง. ชิ้นส่วนเมล็ดที่ตัดตามขวางวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 5 มก./ล. (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4 ผลของสูตรอาหาร และชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการสร้างยอดบนอาหาร MS ที่ไม่เติม BA และเติมด้วยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

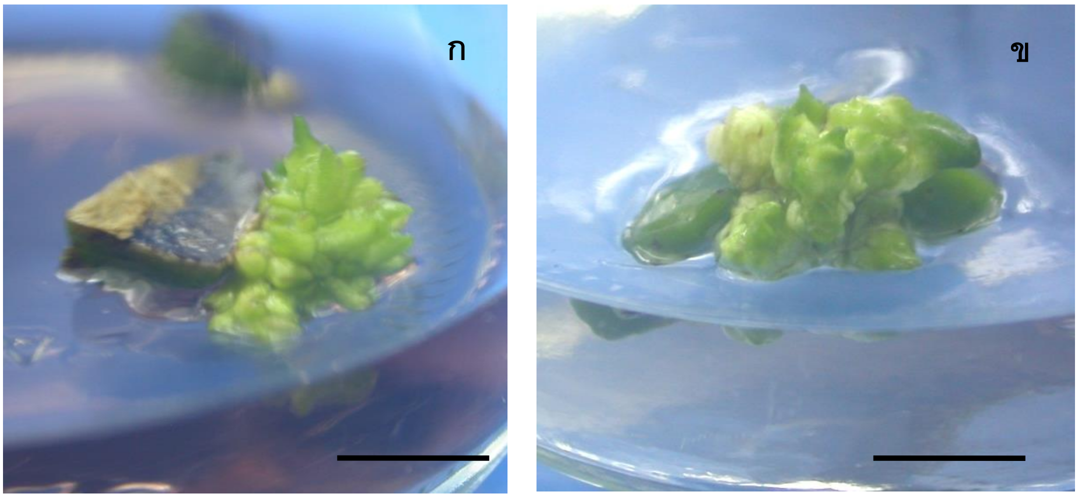
สูตรอาหาร	ชนิดชิ้นส่วน	การสร้างยอด (%)	จำนวนยอด/ชิ้นส่วน (ยอด)
PGR-free MS	ทั้งเมล็ด	100a	1.00c
	ตัดตามขวาง	0.00b	0.00c
MS+5 mg/l BA	ทั้งเมล็ด	100a	3.67b
	ตัดตามขวาง	88.89a	8.67a
F-test		*	*
C.V.(%)		13.32	19.36

* แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT

-ผลของ PVP ต่อการชักนำยอด

นำชิ้นส่วนเมล็ดมาตัดตามขวางให้มีความหนา 3 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม PVP หรือเติมเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกอัตราการสร้างยอดรวมเปรียบเทียบกันระหว่างการเติมหรือไม่เติม PVP พบว่า ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงมีการเกิดยอดรวมได้ในอาหารทั้งสองสูตร (อาหารที่เติม และไม่เติม PVP) และพบว่าชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PVP เกิดการสร้างสารประกอบพวกฟีนอล ส่งผลให้อาหารที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลของ PVP ต่อการชักนำการสร้างยอดรวมบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)

ก. อาหารที่ไม่เติม PVP

ข. อาหารที่เติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

-ผลของชนิดชิ้นส่วนและความเข้มข้นของ BA ต่อการชักนำยอดรวม

นำชิ้นส่วนปลายยอด และ ข้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT พบว่า ชิ้นส่วนข้อให้การสร้างยอดรวมได้ดีกว่าชิ้นส่วนปลายยอดในทุกระดับความเข้มข้นของ BA โดยที่ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดรวมได้สูงสุด 12 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 7)

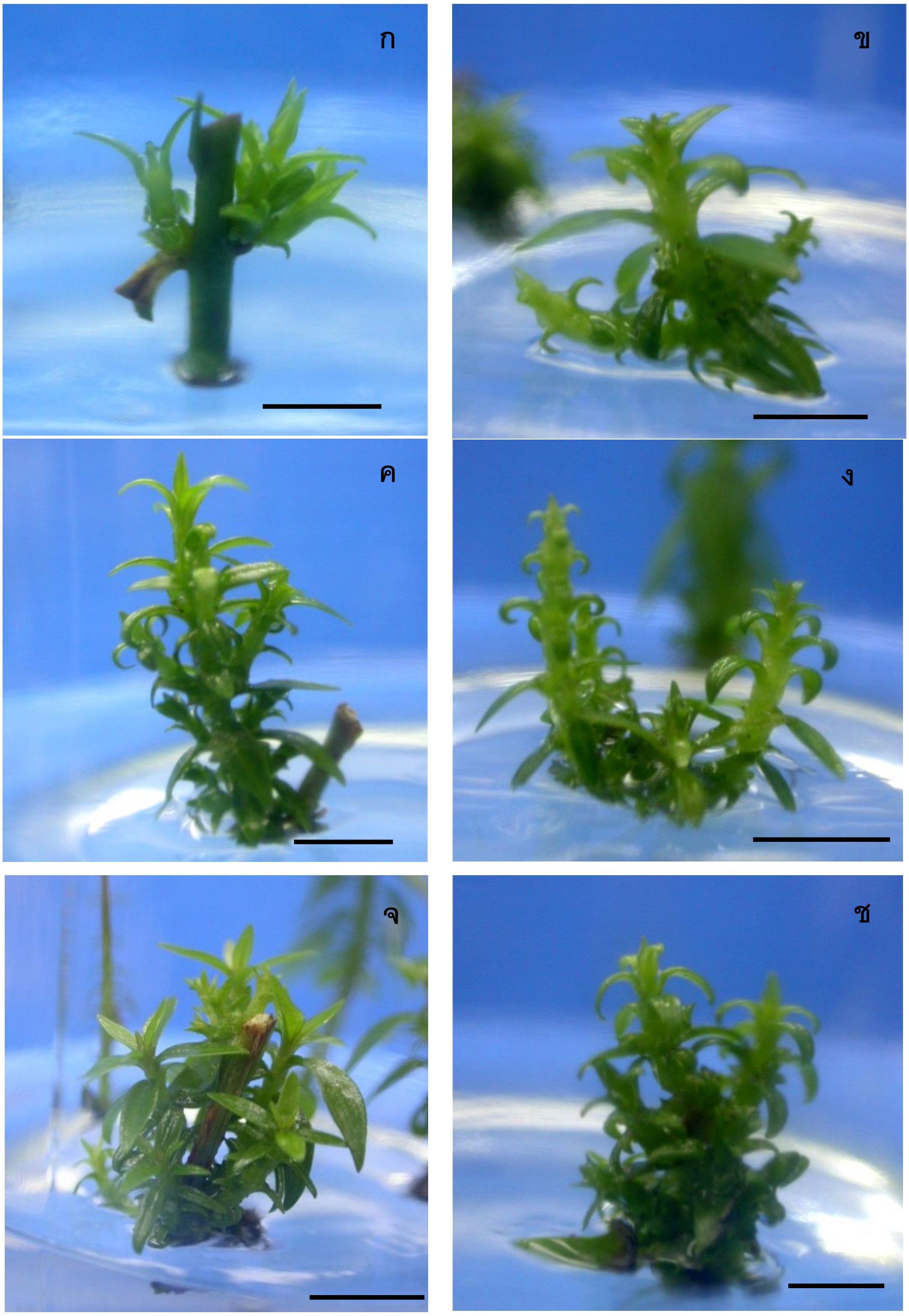
ตารางที่ 5 ผลของชนิดชิ้นส่วน และความเข้มข้นของ BA ที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำยอดรวม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

BA (mg/l)	ชนิดชิ้นส่วน	เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด	จำนวนยอด/ชิ้นส่วน
0.5	ข้อ	91.67	4.67de
	ปลายยอด	100	3.66e
3.0	ข้อ	100	7.00c
	ปลายยอด	100	5.67d
5.0	ข้อ	100	12.00a
	ปลายยอด	100	8.33b
F-test		ns	*
C.V.(%)		13.32	10.82

ns: ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT

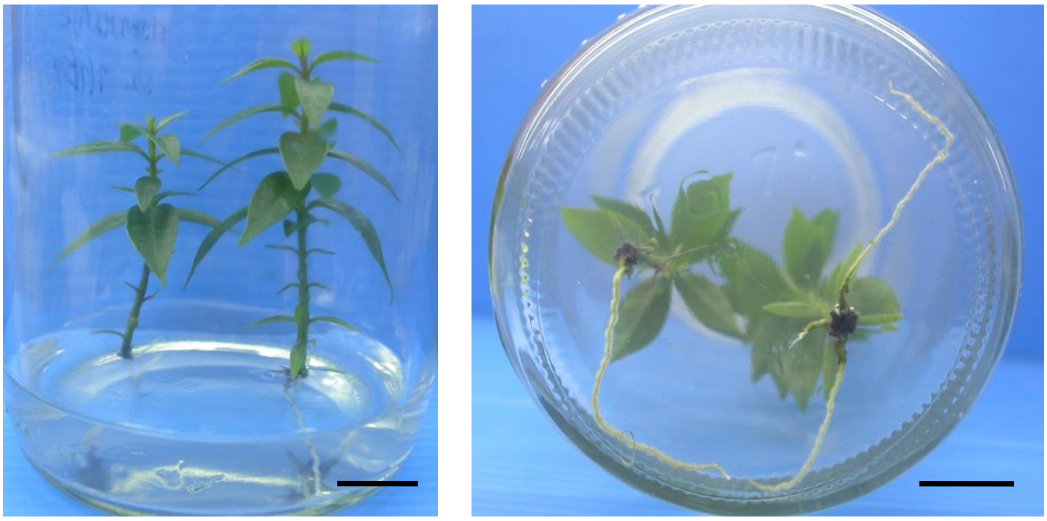


ภาพที่ 7 ลักษณะของยอดรวมที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนปลายยอดและชิ้นส่วนข้อ บนอาหารสูตร MS เติม BA

ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)
(ก) ชิ้นส่วนข้อและปลายยอด (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค) ชิ้นส่วนข้อและปลายยอด (ง) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
(จ) ชิ้นส่วนข้อและปลายยอด (ช) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

-การพัฒนาของยอดและการชักนำราก

ตัดแยกยอดเดี่ยวๆ ที่มีความสูง 0.5-1 เซนติเมตร มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ สูตรอาหาร MS ที่ลดองค์ประกอบของอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2MS) เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26$\pm$4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของยอดรวม และการเกิดราก พบว่า ยอดมีการพัฒนา และยืดยาวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งมีการสร้างรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารทั้งสองสูตร (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ลักษณะของต้นชมพู่น้ำดอกไม้ที่ชักนำได้ บนอาหารสูตร ½ MS เติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 45 วัน (บาร์= 1.0 เซนติเมตร)

สรุปได้ว่าเมล็ดชมพู่น้ำดอกไม้ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดทั้งเมล็ดบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถงอก และให้ต้นที่สมบูรณ์ได้ 1 ต้นต่อหนึ่งเมล็ด หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และเมื่อนำเมล็ดมาตัดแยกตามขวางแล้ววางเลี้ยงบน อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรวุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดรวมได้เฉลี่ย 8.67 ยอดต่อชิ้นส่วน

ชิ้นส่วนข้อ วางเลี้ยงบน อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรวุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ยอดสูงสุด 12 ยอดต่อชิ้นส่วน

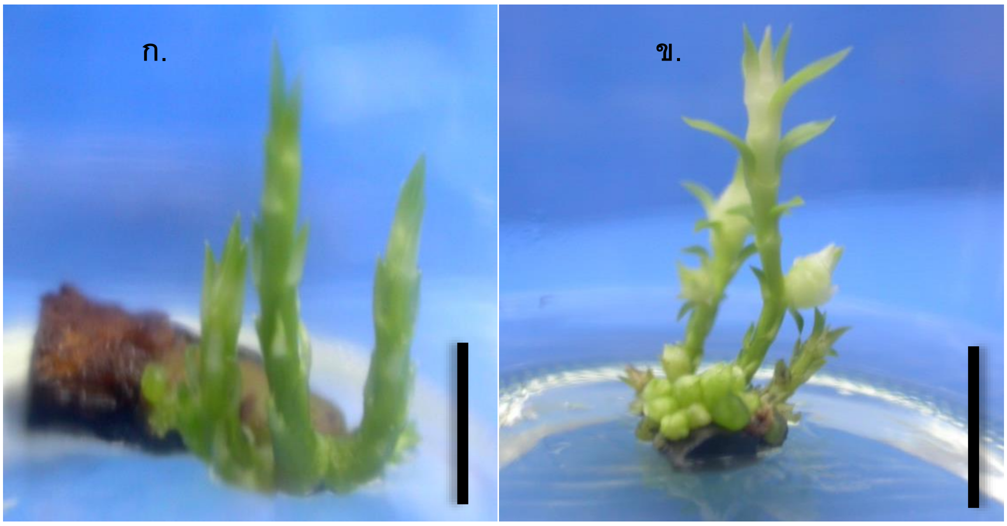
ชิ้นส่วนยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ ½ MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้ยอดที่พัฒนาและยืดยาวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งมีการสร้างรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

2.3 มะดัน (*Garcinia schomburgkiana* Pierre.)

-การศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะดันต่อการชักนำยอดรวม

ตัดแยกเมล็ดมะดันจากผล ทำความสะอาดตามวิธีการมาตรฐาน เพาะเลี้ยงทั้งเมล็ด หรือตัดแบ่งเป็นส่วนๆ บนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของเมล็ดมะดัน บนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงเกิดเป็นตายอด และเมื่อวางเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 15 วัน (รวมเวลาการเพาะเลี้ยง 45 วัน) โดยไม่มีการย้ายเลี้ยง พบว่า ตายอดมีการยืดยาว (ภาพที่ 9ก) อัตราการเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนเมล็ดทั้งเมล็ด และตัดแยกให้ผลตอบสนอง 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกัน และให้จำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 2 เซนติเมตรเฉลี่ย 3 ยอด (2-5) ต่อชิ้นส่วน ยอดที่มีขนาดเล็ก (0.3-0.5 เซนติเมตร) มีจำนวนเฉลี่ย 6 ยอด (4-8 ยอด) ต่อชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าวเป็นเวลา 60 วัน พบว่า มีการแตกตายอดเพิ่มขึ้นจากชิ้นส่วนเดิม (ภาพที่ 9ข)



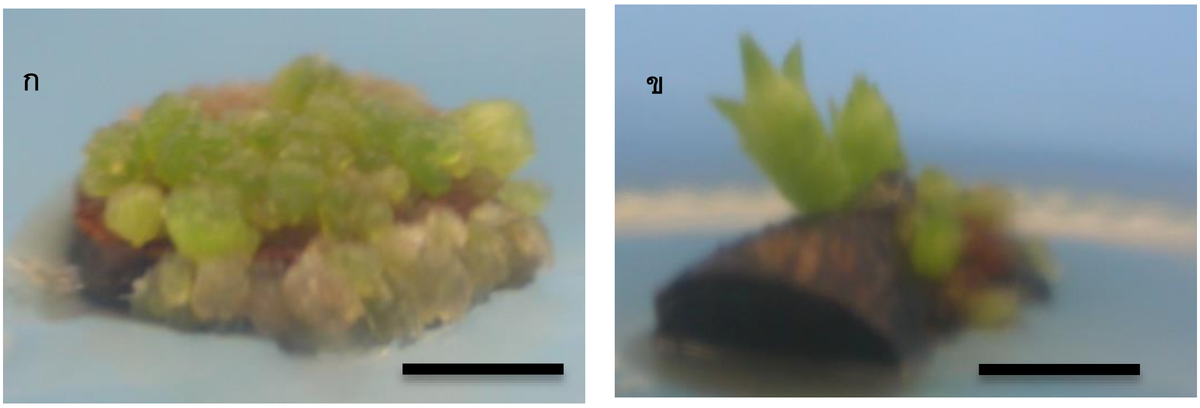
ภาพที่ 9 ยอดรวมที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 45 วัน (บาร์= 1.0 เซนติเมตร)

ก. ยอดรวมเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

ข. ยอดรวมเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

-การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนเมล็ด

นำเมล็ดมะดันที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดตามขวางที่มีความหนา 2 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ (Thidiazuron) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการสร้างยอดรวม พบว่า ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงสามารถพัฒนาให้แคลลัส 30 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองใสถึงสีเขียวอ่อน และเกาะกลุ่มกันอย่างแน่น (ภาพที่ 10ก) แคลลัสดังกล่าวมีลักษณะคล้ายแคลลัสมังคุดที่ชักนำบนสูตรอาหารเดียวกัน แต่ละปมของแคลลัสคาดว่ามีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด เช่นเดียวกับที่ตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยาในมังคุด และมีความพร้อมที่จะพัฒนาให้ยอดหนึ่งยอดต่อหนึ่งปม เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสนี้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอด (MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10ข) หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 10 พัฒนาการของโนดูลาแคลลัสบนอาหารชักนำแคลลัส และชักนำยอดรวมรวมบนอาหารชักนำยอด

ก. แคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรMS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)

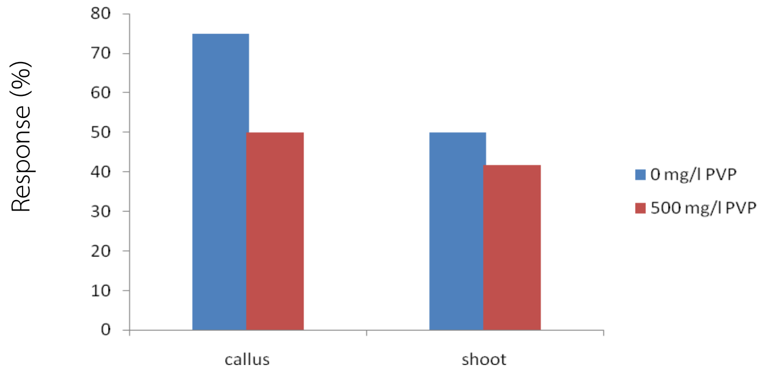
ข. ยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนเมล็ดบนอาหารสูตรชักนำยอด สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 1.0 เซนติเมตร)

-ผลของ PVP ต่อการชักนำแคลลัส และยอดรวม

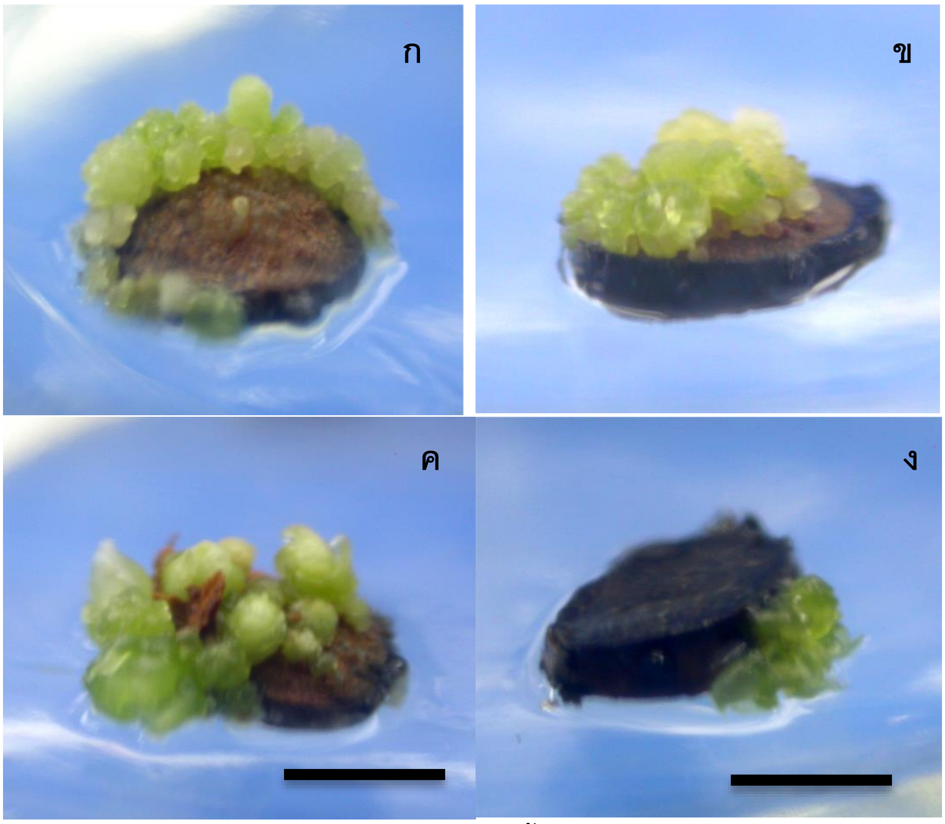
นำชิ้นส่วนเมล็ดที่มีการสร้างแคลลัสแล้วในการศึกษาข้างต้น มาตัดแยกเป็นส่วนๆ หลังจากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม และอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่อาหารทั้งสองสูตรนั้นไม่เติม PVP หรือเติมด้วยเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ

26 ± 4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการสร้างยอดรวมเปรียบเทียบกันในอาหารทั้งสองสูตร (ระหว่างการเติมหรือไม่เติม PVP) พบว่า ชิ้นส่วนเมล็ดยังคงสร้างแคลลัสใหม่ได้ โดยให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารที่ไม่เติม PVP และ 50 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารที่เติม PVP ซึ่งสูงกว่าการชักนำแคลลัสในรอบแรก (30 เปอร์เซ็นต์) และให้ผลเช่นเดียวกันกับอาหารชักนำยอดรวมซึ่งพบว่า อาหารที่ไม่เติม PVP ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดสูงกว่าอาหารที่เติม PVP (ภาพที่ 11 และ 12) และเมื่อตัดแยกชิ้นส่วนแคลลัส และยอดรวมที่ชักนำได้ไปวางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม พบว่า ให้ผลเช่นเดียวกันกับการชักนำแคลลัสคือ อาหารที่ไม่เติม PVP ให้การพัฒนาของแคลลัส และยอดรวมได้ดีกว่าอาหารที่เติม PVP ซึ่งแคลลัสและยอดที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติม PVP จะมีการสร้างสารประกอบพวกฟีนอล หลังวางเลี้ยงเพียงแค่ 1 สัปดาห์ โดยสังเกตุได้จากสีของอาหารที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นชิ้นส่วนจะค่อยๆซีด และไม่มีการพัฒนาต่อ

โดยทั่วไปแล้ว สาร PVP เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อลดการสร้างสารประกอบฟีนอล เช่น ในการเพาะเลี้ยงมังคุด ส้มแขก พะวา ได้มีการเติมสาร PVP เพื่อช่วยลดการสร้างสารฟีนอล แต่จากการศึกษานี้พบว่า การเติม PVP ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของมะดันนั้นให้ผลที่แตกต่างไปจากพืชชนิดอื่น ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าชิ้นส่วนของมะดันมีการสร้างสารบางอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสาร PVP จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสรอบแรกค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อทำการย้ายเลี้ยงแคลลัสและยอดรวมบนอาหารที่ไม่เติม PVP พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสและยอดได้ดี



ภาพที่ 11 การสร้างแคลลัส และยอดรวมจากชิ้นส่วนเมล็ดมะดัน บนอาหารที่เติมและไม่เติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน



ภาพที่ 12 ลักษณะการสร้างแคลลัส และยอดรวม จากชิ้นส่วนเมล็ด บนอาหารที่เติมและไม่เติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก: MS + BA 0.5 มก/ล+ TDZ 0.5 มก/ล

ข: MS + BA 0.5 มก/ล+ TDZ 0.5 มก/ล + PVP 500 มก/ล

ค: MS + BA 0.5 มก/ล ง : MS + BA 0.5 มก/ล + PVP 500 มก/ล

-ศึกษาความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างยอดรวม

นำกลุ่มยอดรวมมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และเติม BA เข้มข้น 0 0.5 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการเกิดยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำยอดรวมได้จำนวนสูงสุด อย่างไรก็ตาม ยอดรวมมีขนาดเล็กจำนวนมากที่สุด 13.67 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ BA ความเข้มข้นอื่นๆ เมื่อความเข้มข้นของ BA ลดลงสามารถส่งเสริมการยืดยาวของยอด ยอดยืดยาวได้ดีที่สุดในอาหารที่ไม่เติม BA ซึ่งให้ยอดที่มีความสูงมากกว่า 3 เซนติเมตรสูงสุด 9 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 6) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า ที่ BA ความเข้มข้นสูงนั้นให้การพัฒนาของใบที่มีขนาดเล็ก และติดกับลำต้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติม BA ให้ต้นที่มีใบขนาดใหญ่ และจำนวนใบมากกว่า (ภาพที่ 13)

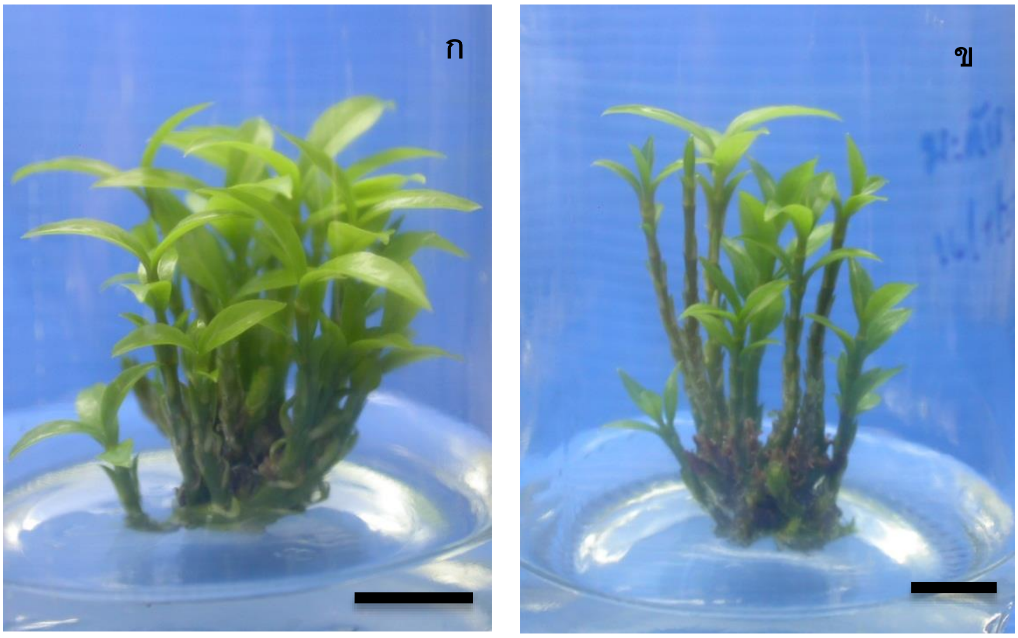
ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของ BA ที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดรวมหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

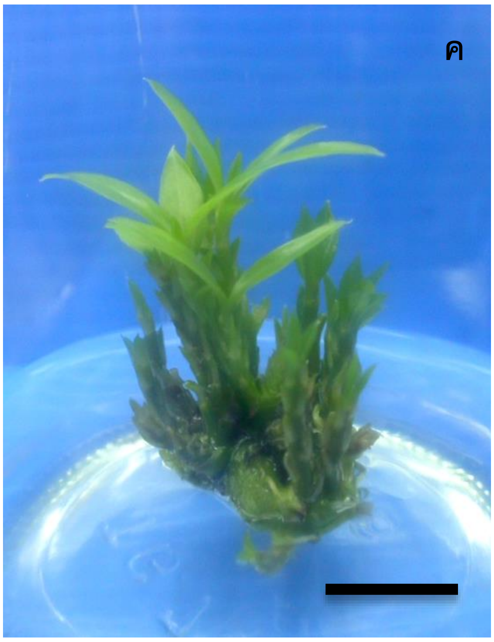
BA (mg/l)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน		
	ความสูงน้อยกว่า 1 ซม.	ความสูง 1-3 ซม.	ความสูงมากกว่า 3 ซม.
0	1.33c	2.00	9.00a
0.5	2.33c	2.67	7.33a
3	8.67b	2.33	2.00b
5	13.67a	2.67	0.00c
F-test	*	ns	*
C.V. (%)	14.04	35.83	22.70

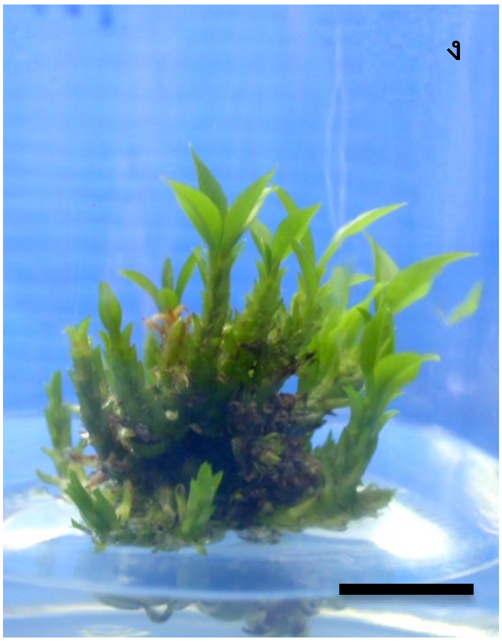
ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติ (p<0.05)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT







ภาพที่ 13 การพัฒนาของยอดหลังวางเลี้ยงกลุ่มยอดรวมขนาดเล็กมะดันบนอาหาร MS เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก: BA เข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข: BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค: BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง: BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สรุปได้ว่าอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเกิดยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดที่มีความยาวมากกว่า 2 เซนติเมตรเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้นส่วน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ยอดที่มีความยาวน้อยกว่า 1 เซนติเมตรเฉลี่ย 6 ยอด หลังจากวางเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน โดยไม่มีการย้ายเลี้ยง

อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ชักนำการสร้างแคลลัสแบบปมที่เรียกว่าโนดูลาแคลลัส 30 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เมื่อย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอด พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มยอดรวมสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้สูงสุดบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.4 <u>เหรียง</u> (*Parkia timoriana* Merr.)

-ผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่มีผลต่อการงอก และความสมบูรณ์ของต้นกล้า

นำคัพภะเหรียงที่ตัดแยกออกจากใบเลี้ยง และคัพภะที่ยังมีส่วนของใบเลี้ยงอยู่ครึ่งหนึ่ง มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวันหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของคัพภะเปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า คัพภะที่ตัดแยกออกจากใบเลี้ยงให้อัตราการงอกที่เร็วกว่าคัพภะที่วางเลี้ยงทั้งใบเลี้ยงในช่วง 1 สัปดาห์แรก เนื่องจากคัพภะที่วางเลี้ยงบนอาหารโดยตรงสามารถดูดซึมธาตุอาหารได้ดีกว่า ในขณะที่คัพภะที่วางเลี้ยงทั้งใบเลี้ยงยังไม่งอกในช่วงสัปดาห์แรก แต่เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เริ่มมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้น หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ต้นกล้าที่ได้จากการวางเลี้ยงคัพภะที่ยังมีส่วนของใบเลี้ยงอยู่นั้นให้ต้นที่มีความสมบูรณ์มากกว่าต้นที่ตัดแยกออกจากใบเลี้ยง (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 14 ต้นเหรียงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะที่ปราศจากใบเลี้ยง (ซ้าย) และคัพภะที่มีใบเลี้ยงอยู่ครึ่งหนึ่ง (ขวา) บนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน

-ผลของอายุคัพภะที่มีต่อการงอก และการพัฒนาของคัพภะเหรียง

นำคัพภะเหรียงที่อายุต่างๆ (ภาพที่ 15) มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของคัพภะ เปรียบเทียบกันในแต่ละอายุของชิ้นส่วน พบว่า อายุของคัพภะไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอก โดยทุกระยะของคัพภะให้อัตราการงอก 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมออกปลูกได้หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 15 ลักษณะของเมล็ดเหรียงที่จำแนกตามความสุกแก่ของเมล็ดจากมากสุด (ซ้ายมือ) ไปน้อยสุด (ขวามือ)

ภาพที่ 16 ต้นเหรียงที่ได้จากการวางเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ = 1เซนติเมตร)

-ผลของชนิดผงวุ้น และชิ้นส่วนที่มีผลต่อการชักนำยอดรวมของต้นเหรียง

วางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดและข้อบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรดังกล่าวเติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ หรือ phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียสให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของชิ้นส่วน และชนิดของผงวุ้น พบว่าชิ้นส่วนข้อให้อัตราการสร้างยอดรวมสูงกว่าชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารที่เติมผงวุ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันในอาหารที่เติม phytagel และเมื่อพิจารณาจำนวนยอดจากการวางเลี้ยงข้อ พบว่า อาหารที่เติม phytagel ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเฉลี่ย 3.33 ยอด สูงกว่าอาหารที่เติมวุ้นซึ่งให้จำนวนยอดชิ้นส่วน 2.33 ยอดต่อ (ตารางที่ 7) โดยยอดที่ได้จากอาหารที่เติม phytagel ยืดยาวดีกว่าอาหารที่เติมผงวุ้น (ภาพที่ 17)

ตารางที่ 7 ผลของชนิดของผงวุ้น และชนิดชิ้นส่วนที่มีผลต่อการสร้างยอดรวมของต้นเหรียงหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดผงวุ้น	ชนิดชิ้นส่วน	การสร้างยอด (%)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน
ผงวุ้น	ข้อ	100	2.33b
	ปลายยอด	66.67	1.00c
ไฟตาเจล	ข้อ	100	3.33a
	ปลายยอด	100	1.00c
F-test		ns	*
C.V. (%)		31.49	21.29

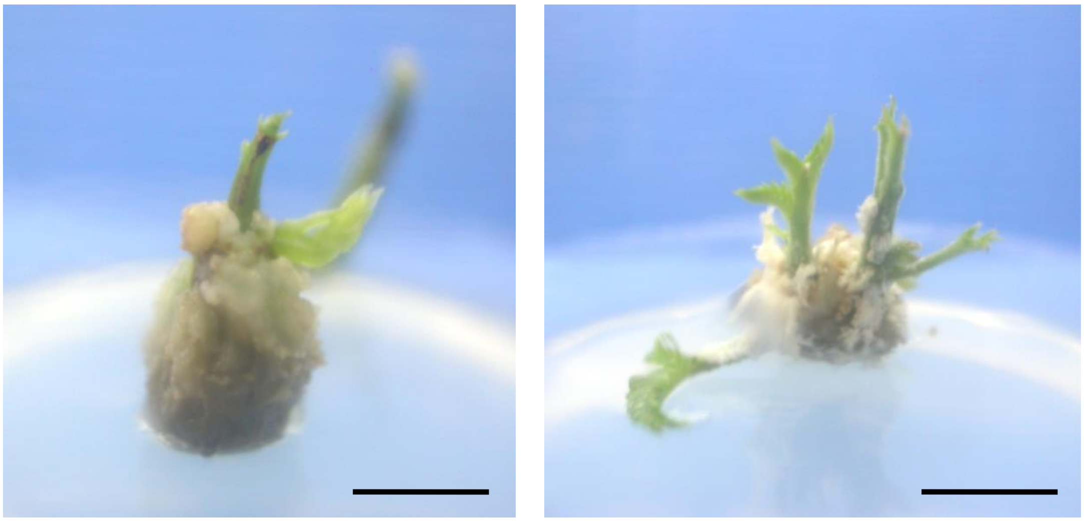
ns: ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT

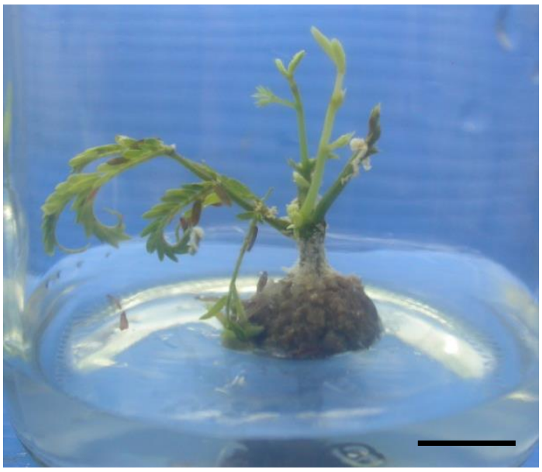
-ผลของผงถ่านต่อการสร้างยอดรวม

วางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบระหว่างการเติมหรือไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน เปรียบเทียบกันระหว่างการเติมหรือไม่เติมผงถ่าน



ก ข

ค

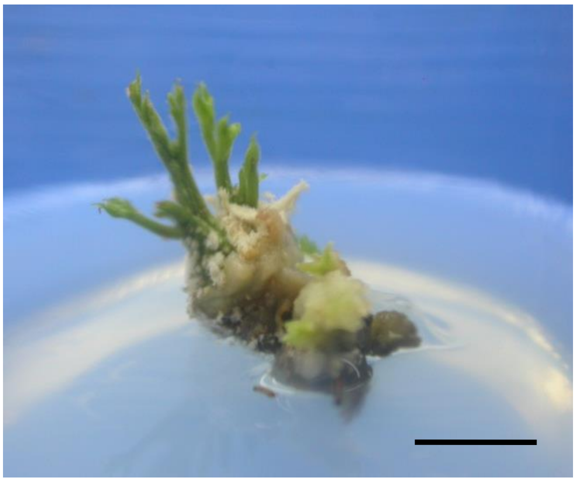


ง

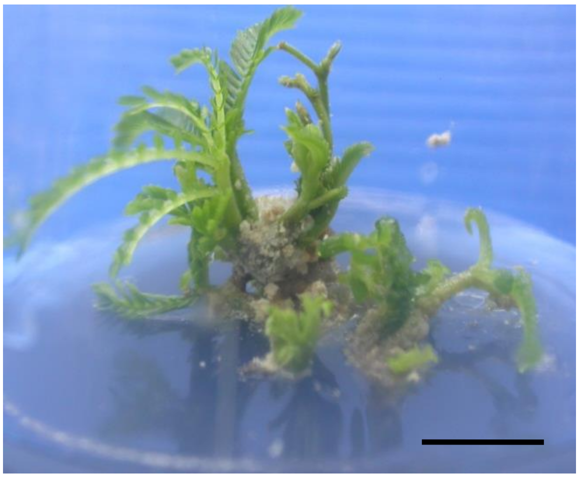
ภาพที่ 17 ผลของชนิดของผงวุ้นและชนิดชิ้นส่วนที่มีผลต่อการสร้างยอดของต้นเหรียงหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

(ก) ชิ้นส่วนข้อวางเลี้ยงบนอาหารเติมผงวุ้น
(ข) ชิ้นส่วนปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารเติมผงวุ้น
(ค) ชิ้นส่วนข้อวางเลี้ยงบนอาหารเติม phytagel
(ง) ชิ้นส่วนปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารเติม phytagel

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบระหว่างการเติมหรือไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อาหารที่เติมผงถ่านให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.33 ยอดต่อชิ้นส่วน สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมผงถ่าน และมีการพัฒนาของใบได้เร็วกว่าชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมผงถ่าน (ภาพที่ 18)



ก



ข

ภาพที่ 18 ผลของผงถ่านต่อการพัฒนาของยอดเหรียงหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก: อาหารที่ไม่เติมผงถ่าน
ข: อาหารที่เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์

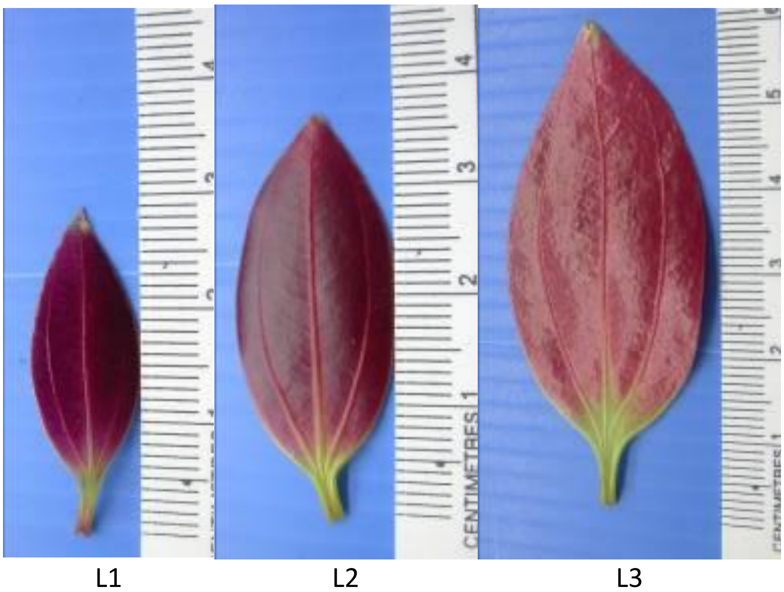
สรุปการวางเลี้ยงคัพภะเหรียงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ คัพภะงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดยอดรวมได้ดีที่สุด

2.5 อบเชย (Cinnamon; *Cinnamomum verum*)

-การเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงเพื่อชักนำแคลลัส

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนที่อายุต่างกันโดยใช้ขนาดของใบเป็นเกณฑ์ (ภาพที่ 19) นำใบขนาดต่างๆ มาฟอกฆ่าเชื้อโดยการแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นแช่ในสารละลายคลอร๊อกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที นำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง หลังจากนั้นตัดใบให้มีขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร และวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียสให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละขนาดของใบวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนสีแดงของอบเชยทั้ง 3 ขนาดพบว่า ใบ L2 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้สูงสุด รองลงมาคือ L3 และ L1 ตามลำดับ เนื่องจาก L1 เป็นใบที่อ่อนที่สุด เมื่อผ่านการฟอกฆ่าเชื้อทำให้ใบเปื่อย เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายมากกว่าขนาดอื่น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสต่ำ ในขณะที่ใบ L3 เป็นใบที่มีอายุมากสุด ระยะพัฒนาการของเซลล์แก่กว่า L2 จึงทำให้การสร้างแคลลัสต่ำกว่า ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่า ใบ L2 เป็นใบที่มีระยะพัฒนาที่เหมาะสม สามารถนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด (ตารางที่ 8)



L1 L2 L3

ภาพที่ 19 ลักษณะของใบอ่อนสีแดงของอบเชยแต่ละขนาดที่ใช้ในการชักนำแคลลัส

ตารางที่ 8 ผลของอายุใบอ่อนสีแดงต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส

อายุใบอ่อนสีแดง	การสร้างแคลลัส (%)
L1	13.33b
L2	46.67a
L3	26.67ab
F-test	*
C.V. (%)	75.96

*แตกต่างทางสถิติที่ (p<0.05)
ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT

-ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส

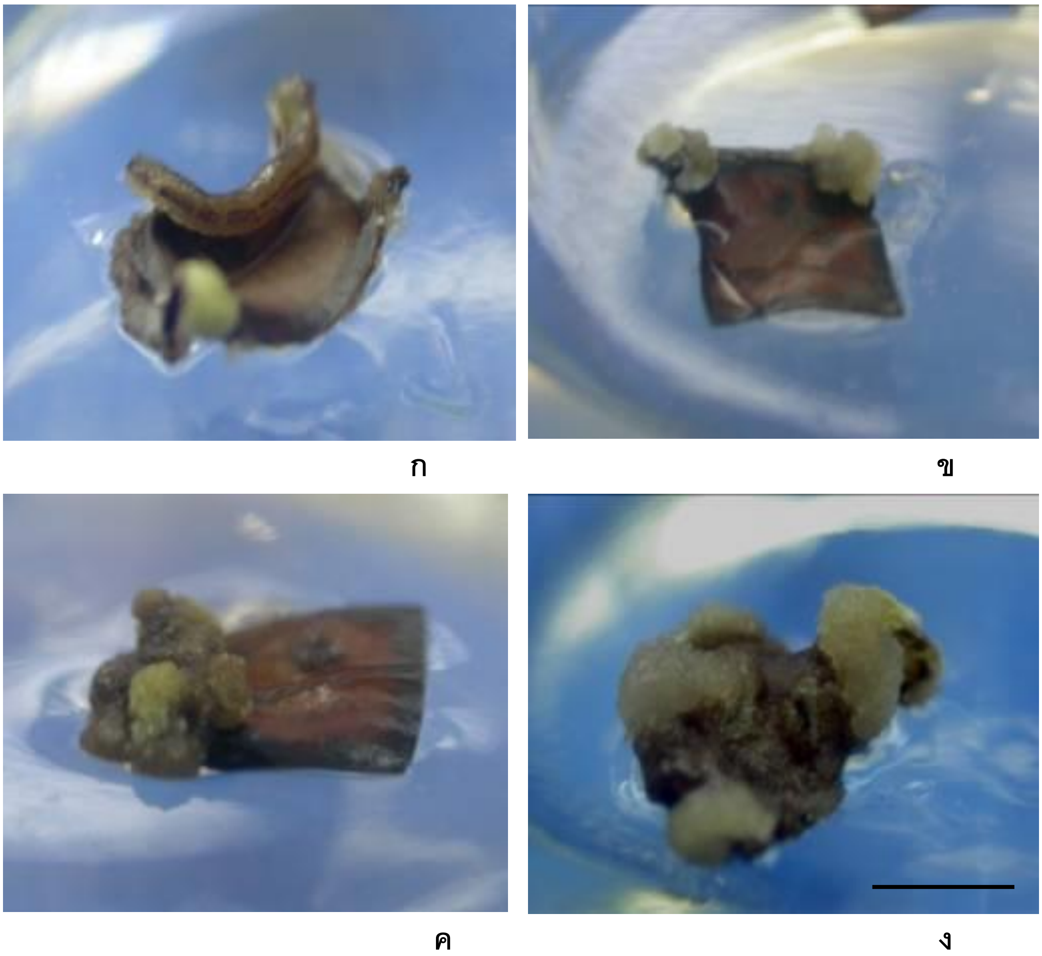
นำใบ ใบอ่อนสีแดง (L2) มาฟอกฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นจุ่มแช่ในสารละลายคลอร๊อกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที นำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง หลังจากนั้นตัดใบให้มีขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร และวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT พบว่า อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) กับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นอื่นๆ ซึ่งจะเห็นว่าอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D หรือ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ร่วมกับ TDZ (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับการศึกษาของสมปอง และคณะ (2538) ที่รายงานว่าการชักนำแคลลัสมังคุดให้ผลดีที่สุดในอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดีกว่าการใช้ BA หรือ TDZ เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแคลลัสอบเชยเพื่อเพิ่มปริมาณเกิดสีน้ำตาลซึ่งสามารถลดได้โดยการเติม PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 9 การสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ L2 หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน

	TDZ (มก/ล)	การสร้างแคลลัส (%)
2,4-D 0.5 มก/ล	0	6.67b
	0.5	40.00ab
	1.0	33.33ab
BA 0.5 มก/ล	0	26.66ab
	0.5	53.33a
	0.1	60.00a

F-test	**
C.V. (%)	53.79

**แตกต่างทางสถิติ (p<0.01)
ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 20 ลักษณะแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีแดง L2 หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 1 เซนติเมตร)

ก: MS + 0.5 mg/l 2,4-D

ข: MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l TDZ

ค: MS + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ

ง: MS + 0.5 mg/l BA + 1 mg/l TDZ

<u>2.6</u> <u>หลุมพี</u> (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burr.)

-ผลของความเข้มข้นของ dicamba ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

นำแคลลัสของหลุมพีที่ได้จากการเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยทำการย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรดังกล่าวทุกๆ เดือน เป็นเวลา 18 เดือน ซึ่งจากการศึกษานี้ใช้แคลลัสอายุ 1 เดือน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

ที่เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียสทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอดทดลอง หลังย้ายเลี้ยงทุกเดือนบันทึกการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ dicamba โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ในอาหารทั้งสองสูตร โดยที่อาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ 42 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 3 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง สูงกว่าอาหารที่เติม dicamba ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ 20 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 1.8 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง (ตารางที่ 10 ภาพที่ 21)

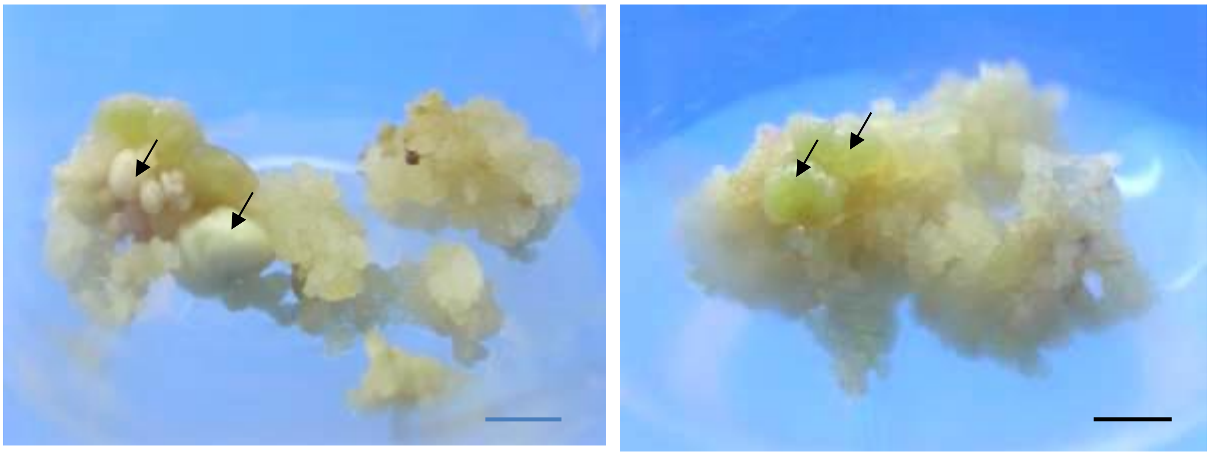
ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นของ dicamba ที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

Dicamba (mg/l)	การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ (%)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ/หลอด
0.1	42.00a	3.0
0.3	20.00b	1.8
F-test	**	ns
C.V. (%)	29.74	43.70

ns: ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติ ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT

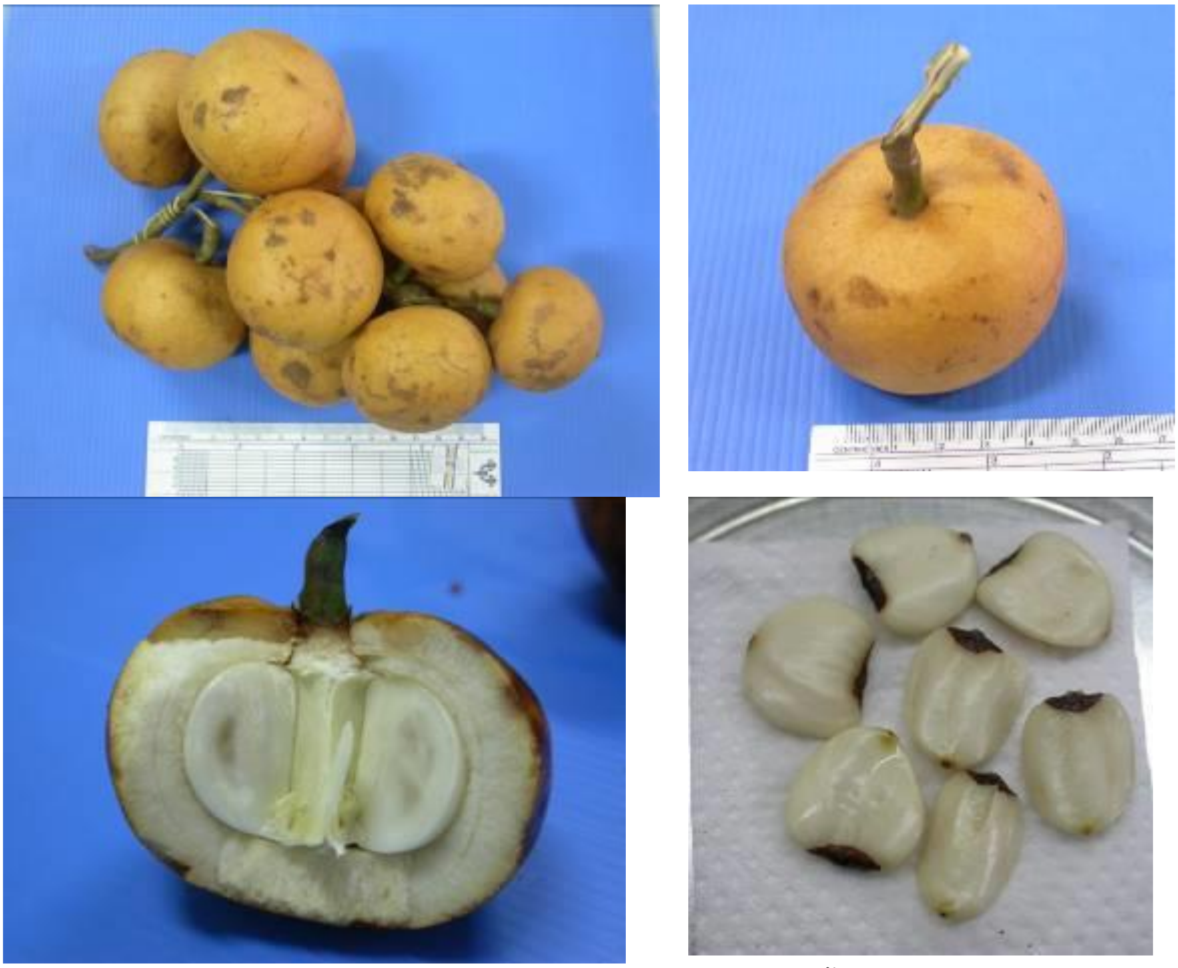


ก ข

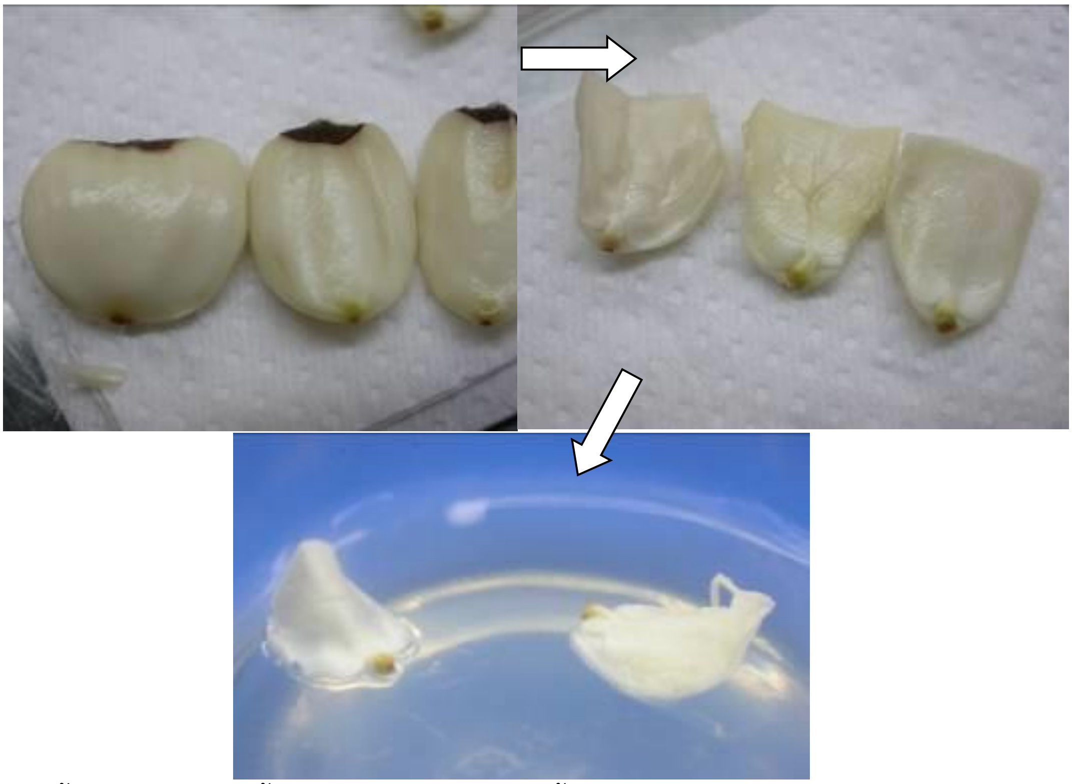
ภาพที่ 21 ลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอที่ (ศรชี้) ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) (บาร์= 1 เซนติเมตร)

2.7 ลังแข (*Baccaurea macrophylla* Muell. Arg.)

แยกเมล็ดลังแขจากผล (ภาพที่ 22) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที ตามด้วยคลอร็อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จึงเพาะเมล็ดลังแขบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 23) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมล็ดงอกจึงตัดส่วนของใบ และข้อ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียสให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกอัตราการสร้างแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วนโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

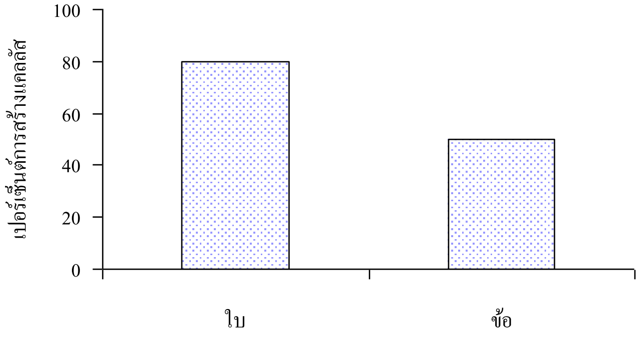


ภาพที่ 22 ลักษณะของผล และเมล็ดลังแขที่แยกจากผลเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

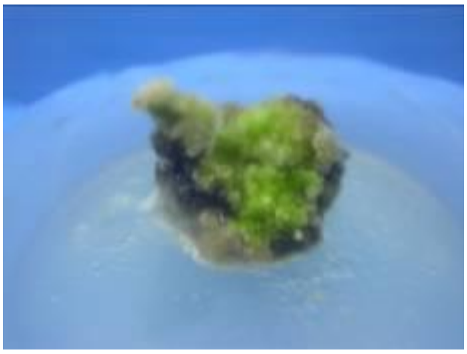


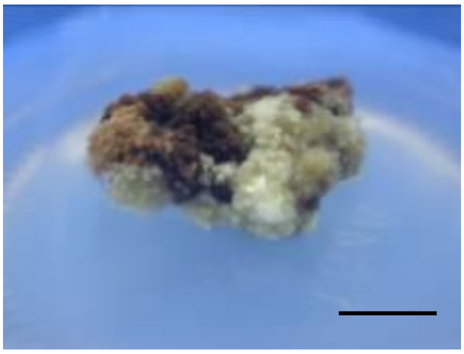
ภาพที่ 23 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนเมล็ดลังแขเพื่อวางเลี้ยงในหลอดทดลอง

วางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ และใบ บนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนทั้งสองสามารถสร้างแคลลัสได้หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยที่ชิ้นส่วนใบให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้สูงกว่าชิ้นส่วนข้อ (ภาพที่ 24) และแคลลัสที่สร้างจากใบจะให้แคลลัสที่มีสีเขียว ส่วนแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนข้อจะมีสีเขียวอ่อนจนถึงสีครีม (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 24 อัตราการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและข้อของลังแข บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์





ก ข

ภาพที่ 25 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบ (ก) และ ชิ้นส่วนข้อ (ข) บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)

2.8 สะตอ (*Parkia speciose* L.)

-ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดรวม

นำชิ้นส่วน ข้อ ของสะตอมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ±2 องศาเซลเซียสให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ให้อัตราการสร้างยอดรวม 25 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดเฉลี่ย 8 ยอดต่อชิ้นส่วน สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมผงถ่าน (ภาพที่ 26)

ก ข

ภาพที่ 26 ยอดรวมที่สร้างจากชิ้นส่วนข้อของสะตอที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมผงถ่าน 0.2 % (ก) และไม่เติมผงถ่าน (ข) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

2.8 ส้มโอ (*Citrus maxima* (Burm.) Merrill)

-ผลของพันธุ์ส้มโอต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด

นำเมล็ดส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ทับทิมสยามมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที และคลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งภายในตู้ย้ายเลี้ยง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอก และการตอบสนองที่เกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงทุกสัปดาห์เป็นเวลา 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least significant difference (LSD) แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด หลอดละ 1 เมล็ด

จากการศึกษาพบว่าเมล็ดของส้มโอพันธุ์ทองดีให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม โดยให้เปอร์เซ็นต์ความงอก 97.67 แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของพันธุ์ส้มโอต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

พันธุ์ส้มโอ	เปอร์เซ็นต์ความงอก
ทองดี	97.67
ทับทิมสยาม	63.33
$LSD_{.05}$	12.28
C.V.(%)	6.73

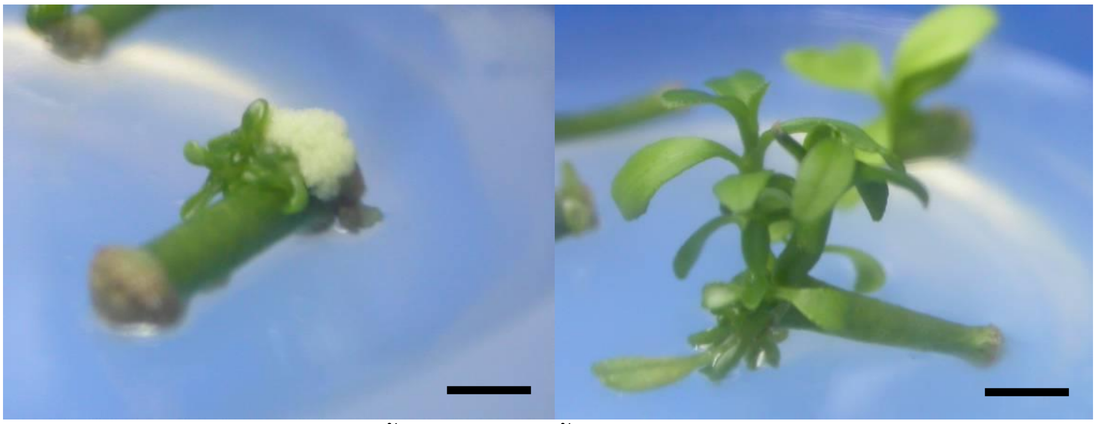
-ผลของพันธุ์ส้มโอต่อการสร้างยอดรวม

นำลำต้นใต้ใบเลี้ยงของส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ทับทิมสยาม จากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง ขนาดความยาว 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำๆ ละ 7 ขวด ขวดละ 4 ชิ้นส่วน

จากการศึกษาพบว่าส้มโอพันธุ์ทองดีให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงกว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม โดยให้การสร้างยอด 91.75 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอด 3.50 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 12) ซึ่งหลังจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเป็นเวลา 1 เดือน ปรากฏตายอดบริเวณรอยตัด (ภาพที่ 27ซ้าย) และเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ตายอดเกิดการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 27ขวา)

ตารางที่ 12 ผลของพันธุ์ส้มโอต่อการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน

พันธุ์ส้มโอ	การสร้างยอดรวม (%)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน
ทองดี	91.75	3.50
ทับทิมสยาม	30.00	0.58
$LSD_{.05}$	16.03	0.66
C.V.(%)	15.22	18.74



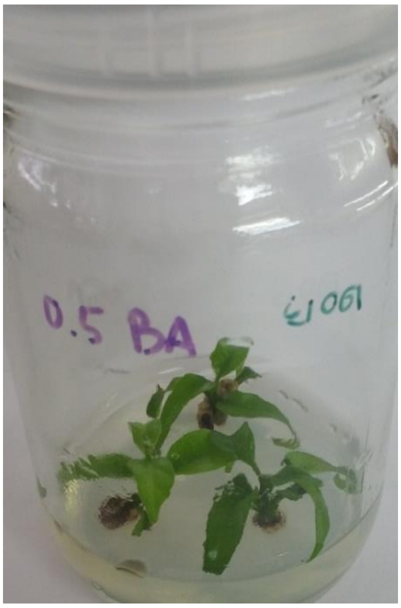
ภาพที่ 27 ยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงของส้มโอพันธุ์ทองดีบนอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร) อายุ 1 เดือน (ซ้าย) และ 2 เดือน (ขวา)

นอกจากนี้ยังมีพืชอื่นๆ ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้เพื่อใช้เป็นต้นพันธุ์เก็บไว้ขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชต่อไป ได้แก่

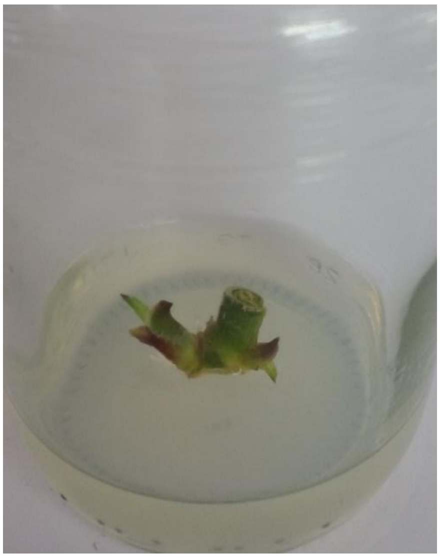
-เนียง (*Archidendron pauciflorum*)

-**<u>ดาหลา</u>** [*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith)]

-**พญาวานร** (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. ex Lindau)



-**กระชายดำ** (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)



-**ผักหวานบ้าน** (*Sauropus androgynus* L.)

-**ส้มจี๊ด** (*Citrus mitis* Thunb.)

-**<u>ขมิ้นขาว</u>** (*Curcuma mangga* Valeton & Zijp)

-**<u>ขมิ้นชัน</u>** (*Curcuma longa* L.)

3. <u>การอนุบาลออกปลูก</u>

ก่อนที่จะอนุบาลต้นพืชออกปลูกจำเป็นที่จะต้องมีการชักนำรากก่อน เพื่อให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์พร้อมที่จะย้ายลงดินปลูกซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์แล้วต่อไปเป็นการย้ายไปปลูกลงดิน และเนื่องจากต้นกล้าที่อยู่ในหลอดนั้นมีสภาพความชื้นสูงมาก (90-100%) ดังนั้นหากทำการย้ายปลูกเหมือนพืชทั่วไป ทำให้ต้นกล้าตายหมด ในขั้นแรกจึงค่อยลดความชื้นลงเป็นลำดับขั้นโดยการนำต้นกล้าในหลอดทดลองไปเลี้ยงในสภาพการให้ความเข้มแสงเพิ่มขึ้นจาก 2,500-3,000 ลักซ์ เป็น 7,500-10,000 ลักซ์ (สมปอง, 2539) จากนั้นดึงพืชออกจากหลอด ล้างวุ้นที่ติดมากับรากออกจนหมดแล้วนำไปปลูกในวัสดุปลูกที่เหมาะสม จากนั้นใช้ขวดแก้วหรือขวดพลาสติคใสครอบต้นพืชไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นพืชปรับตัวได้ (ภาพที่ 28)

ภาพที่ 28 ตัวอย่างขั้นตอนการอนุบาลพืชที่ได้จากในหลอดทดลองปลูกลงดิน

โดยสรุปแล้วพืชที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการถ่ายทอดเทคโนโลยีได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ชนิดพืช ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ สูตรอาหาร และการพัฒนาของชิ้นส่วนหลังการเพาะเลี้ยงของผักพื้นบ้านไม้ผลพื้นเมืองบางชนิดที่มีการขยายพันธุ์และเก็บรักษาพันธุกรรมในหลอดทดลอง

ลำดับ	ชนิดพืช	ชิ้นส่วนพืช	สูตรอาหาร	การพัฒนาหลังเพาะเลี้ยง
1	ชมพู่น้ำดอกไม้	เมล็ด/ข้อ/ปลายยอด	MS + 5 mg/l BA	ยอดรวม
		ยอด	PGR-free MS	ราก
2	มะดัน	เมล็ด	MS + 5 mg/l BA + 500 mg/l PVP	ยอดรวม
		เมล็ด	MS + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ + 500 mg/l PVP	แคลลัส
		แคลลัส	MS + 5 mg/l BA + 500 mg/l PVP	ยอดรวม

		กลุ่มยอด	MS + 5 mg/l BA	ยอดรวม
3	เหรียง	คัพภะ	PGR-free MS	ต้นกล้า
		ข้อ	MS + 1 mg/l BA + 2.5 mg/l TDZ + 0.2% AC	ยอดรวม
4	อบเชย	ใบ	MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l TDZ	แคลลัส
5	หลุมพี	แคลลัส	MS + 0.1 mg/l dicamba	โซมาติคเอ็มบริโอ
6	ลังแข	ใบ	MS + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	แคลลัส
7	สะตอ	ข้อ	MS + 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.2% AC	ยอดรวม
8	เนียง	คัพภะ	PGR-free MS	ต้นกล้า
		ข้อ	MS + 0.5 mg/l BA	ยอดรวม
9	ดาหลา	ยอด	MS + 3 mg/l BA	ยอดรวม
10	พญาวานร	ข้อ, ยอด	MS + 0.5 mg/l BA	ยอดรวม
11	กระชายดำ	หน่องอก	MS + 3 mg/l BA	ยอดรวม
12	ผักหวาน	ข้อ, ยอด	MS + 0.5 mg/l BA	ยอดรวม
13	ส้มจี๊ด	เมล็ด	PGR-free MS	ต้นกล้า
		ข้อ, ยอด	MS + 0.5 mg/l BA	ยอดรวม
14	ขมิ้น	หน่องอก	MS + 3 mg/l BA	ยอดรวม
		กาบใบ	MS + 1 mg/l dicamba	แคลลัส

4. เอกสารอ้างอิง

สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และ พจมาลย์ สุรนิลพงศ์. 2538. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของอาหารและไซโตโคนินต่อการชักนำใบสีม่วงและแคลลัสของมังคุด. Songklanakarin Journal of Science and Technology 17: 121-127.

สมปอง เตชะโต. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. PhysiologiaPlantarum 15: 473-497.

5. การถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช

5. <u>การถ่ายทอดความรู้/เทคโนโลยีแก่นักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไป</u>

5.1 การอบรมเชิงปฏิบัติการ

การถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวจัดให้มีขึ้นในงานวันเกษตรภาคใต้ ซึ่งช่วงหนึ่งของงานตรงกับวันสัปดาห์วิทยาศาสตร์ มีนักเรียนมาเยี่ยมชมเป็นจำนวนมาก เกือบครบทั้ง 14 จังหวัดของภาคใต้ เลือกโรงเรียนที่เป็นตัวแทนในจังหวัดสงขลาซึ่งจากการศึกษาในเบื้องต้นว่ามีสวนพฤกษศาสตร์ ทั้งนี้เพราะสามารถที่จะติดตามและประเมินผลได้ง่ายในชั้นต้น จำนวนโรงเรียนที่เข้าร่วมชมงานและประชุมเชิงปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในงานวันเกษตรภาคใต้ณ อาคารเทิดพระเกียรติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลาภาพที่ 29-30

กิจกรรมในการประชุมเชิงปฏิบัติการ

1. แนะนำอุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะ
2. วิธีการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. การเริ่มต้นเพาะเลี้ยง การย้ายเลี้ยง และอนุบาลต้นกล้ากล้าลงดินปลูก

ภาพที่ 29 การเยี่ยมชมและร่วมประชุมเชิงปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของนักเรียนจากโรงเรียนศรีนครมูลนิธิ

ภาพที่ 30 บรรยากาศการฝึกอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืชแก่นักเรียนโรงเรียนแสงทอง

5.2 การประกวดและสาธิตการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองภาคใต้

การประกวดดังกล่าวจัดให้มีขึ้นในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 25 ซึ่งตรงกับวันสัปดาห์วิทยาศาสตร์ มีนักเรียนโรงเรียนมัธยมเข้าร่วมและส่งผลงานเข้าประกวด ณ อาคารเทิดพระเกียรติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลา ภาพที่ 31

โดยกิจกรรมประกอบด้วย

1. การนำเสนอผลงานจากนิทรรศการที่ทางโรงเรียนได้ศึกษาและทดลองมา โดยให้ตัวแทนนักเรียน 4-5 คนต่อกลุ่มร่วมกันนำเสนอ ซึ่งรายละเอียดของผลงานและการนำเสนอจะประกอบด้วยชื่อเรื่อง ที่มาและความสำคัญ วัตถุประสงค์ วิธีการ ผลการศึกษา และสรุปผล

2. การซักถามและตอบคำถาม หลังจากที่นักเรียนนำเสนอจบ จะเปิดโอกาสให้ผู้เข้าร่วมฟังได้มีการซักถามในประเด็นที่ตนสนใจหรือมีข้อสงสัย

3. การให้คะแนนและประกาศผลการประกวดผลงานจากคณะกรรมการ

4. การมอบเกียรติบัตรและของรางวัล

ภาพที่ 31 ภาพรวมของกิจกรรมการประกวดและสาธิตการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองที่จัดขึ้นในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 25

5.3 การประเมินการเข้ารับชมการสาธิต/การฝึกอบรมในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช

1. ออกแบบสอบถามเพื่อใช้ในการประเมินหลังการเข้าร่วมกิจกรรม
2. เก็บรวบรวมแบบสอบถามหลังการเข้าชม/ร่วมกิจกรรม
3. ประเมินผลแบบสอบถาม
4. แปรผล และนำเสนอเพื่อปรับปรุงในครั้งถัดไป

ในส่วนของแบบสอบถามจะประกอบด้วยข้อมูลทั่วไป และเนื้อหา

ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

1. เพศ O ชาย O หญิง
2. อายุ O ต่ำกว่า 10 ปี O 10-20 ปี O 21-30 ปี O มากกว่า 30 ปี
3. สถานภาพ O ผู้นำนักศึกษา O นักศึกษา O อื่นๆโปรดระบุ..................

เนื้อหา	**ระดับความพึงพอใจ**				
	มากที่สุด (5)	มาก (4)	ปานกลาง (3)	น้อย (2)	น้อยที่สุด (1)
1. ท่านได้รับความรู้ ความเข้าใจในเนื้อหาเกี่ยวกับ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ					
2. ท่านมีความสนใจในกิจกรรมดังกล่าว					
3. ท่านคิดว่ากิจกรรมดังกล่าวมีประโยชน์ใน การขยายพันธุ์พืชในอนาคต					
4. สถานที่จัดงานมีความเหมาะสม					
5. ท่านมีความประสงค์ที่จะนำตัวอย่างพืชที่มีมาขยายพันธุ์					
6. ท่านสามารถที่จะปฏิบัติได้ด้วยตนเอง					
7. ความพึงพอใจโดยรวม					

ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

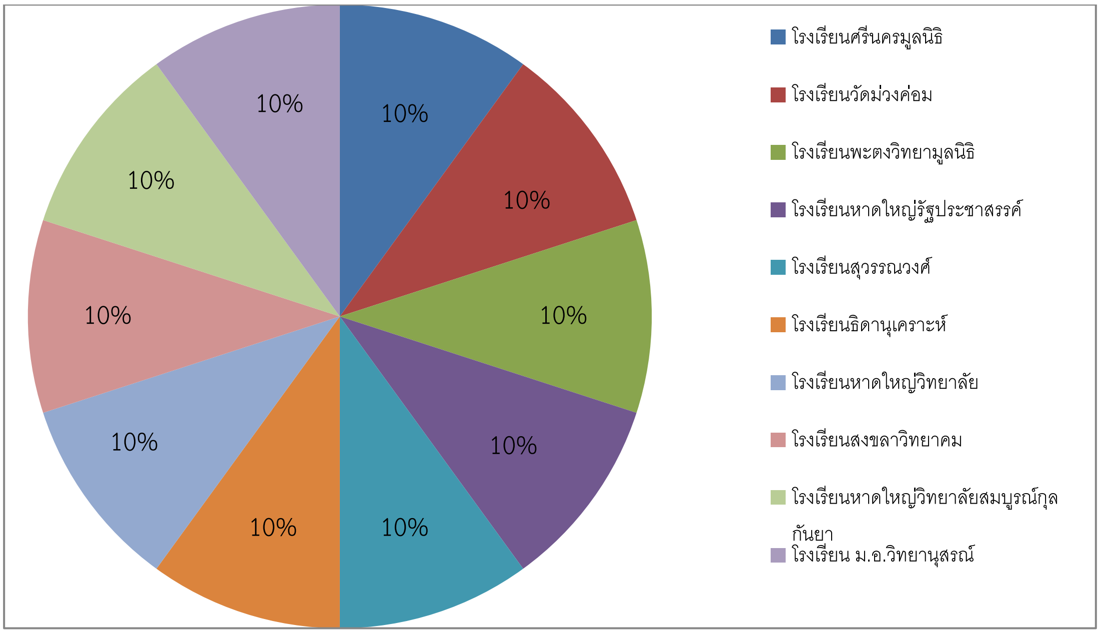
....

....

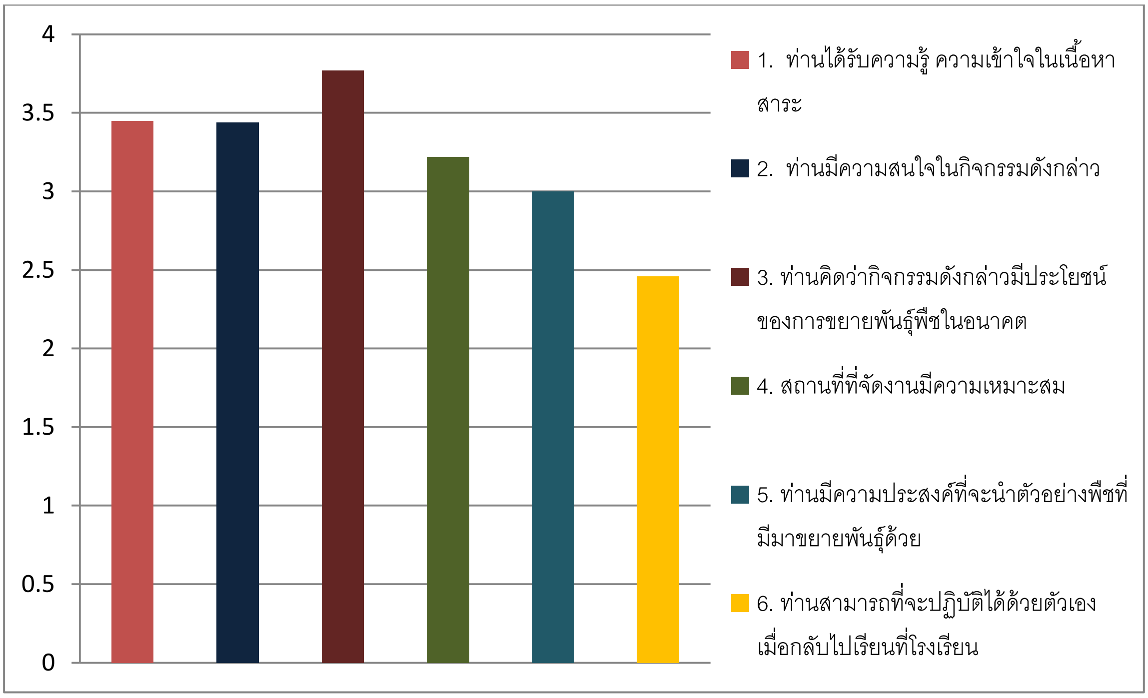
5.4 ผลการประเมินกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช

5.4.1 การประเมินผลการเข้ารับชมการสาธิต/การฝึกอบรมในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 21 ระหว่างวันที่ 10-19 สิงหาคม 2555

จากผู้เข้าร่วมกิจกรรม และตอบแบบประเมินจำนวน 100 ชุด



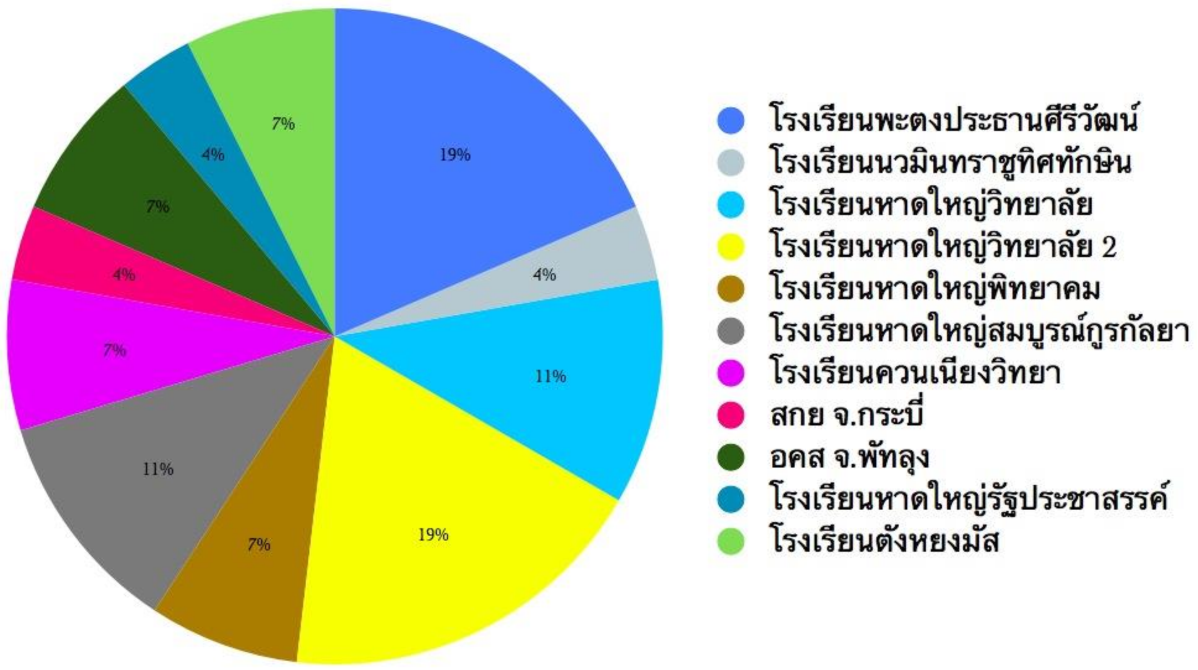
ภาพที่ 32 ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 21



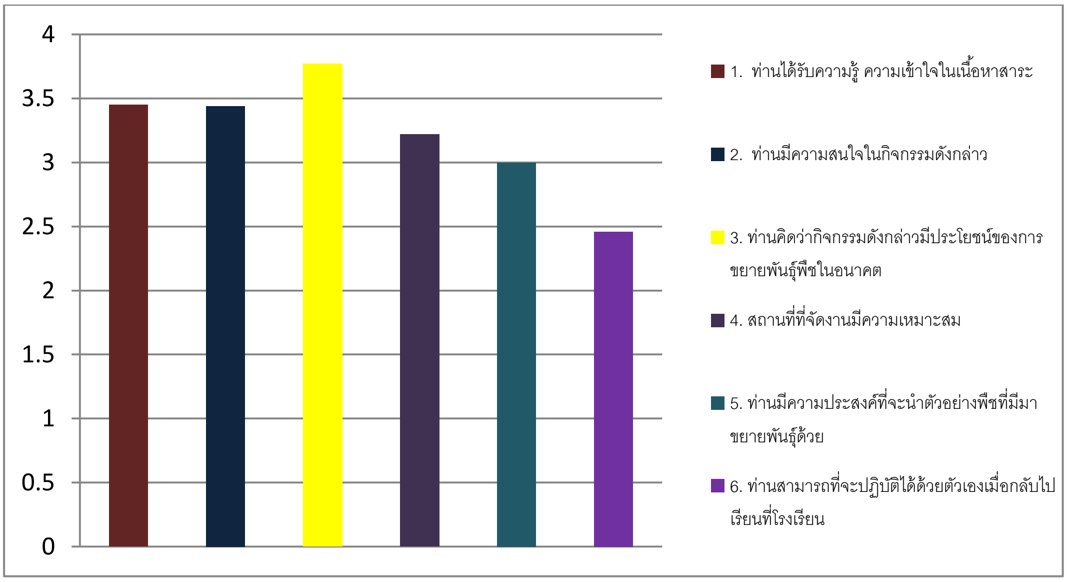
ภาพที่ 33 ผลการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้ารับชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 21

5.4.2 การประเมินผลการเข้ารับชมการสาธิต/การฝึกอบรมในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 22 ระหว่างวันที่ 9-12 สิงหาคม 2556

จากผู้เข้าร่วมกิจกรรม และตอบแบบประเมินจำนวน 244 ชุด

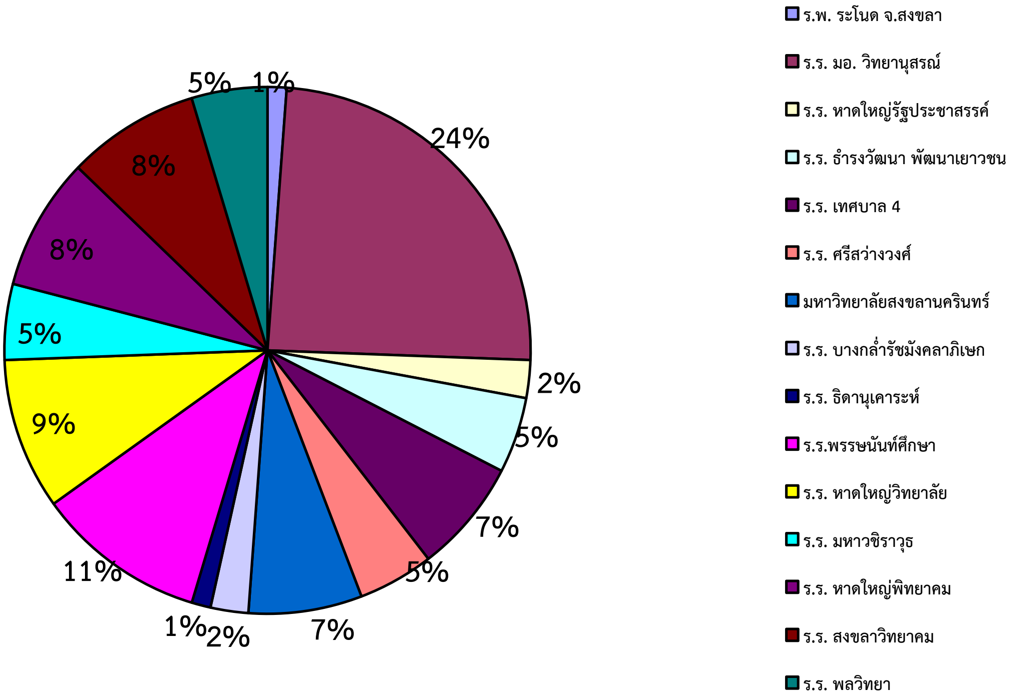


ภาพที่ 34 ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 22

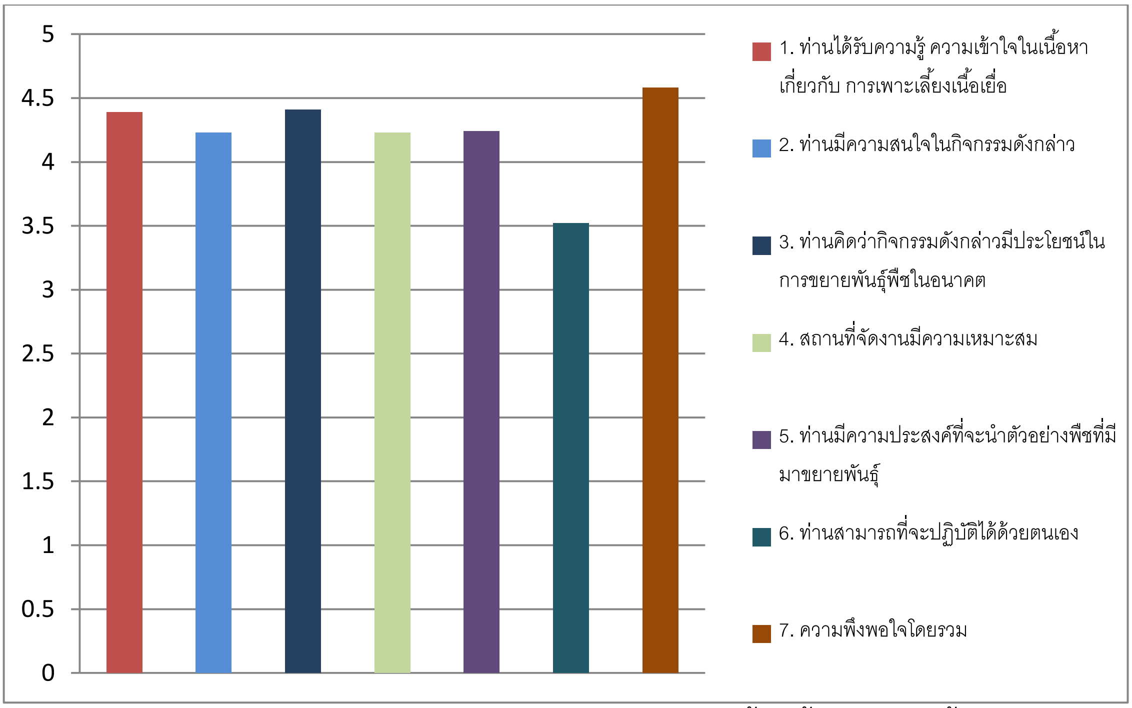


ภาพที่ 35 ผลการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้ารับชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 22

5.4.3 การประเมินผลการเข้ารับชมการสาธิต/การฝึกอบรมในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 23 ระหว่างวันที่ 9-12 สิงหาคม 2557 จากผู้เข้าร่วมกิจกรรม และตอบแบบประเมินจำนวน 92 ชุด

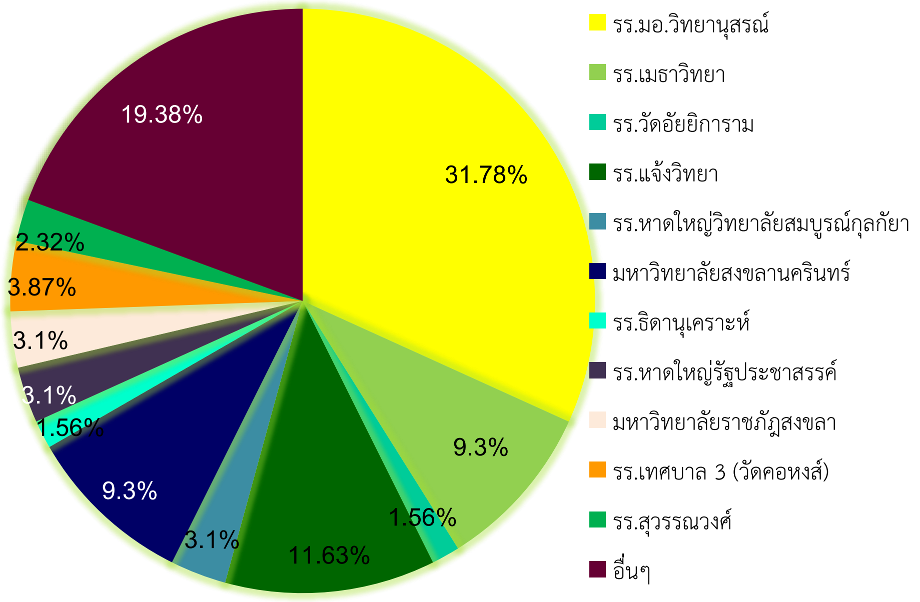


ภาพที่ 36 ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ การขยายพันธุ์พืช

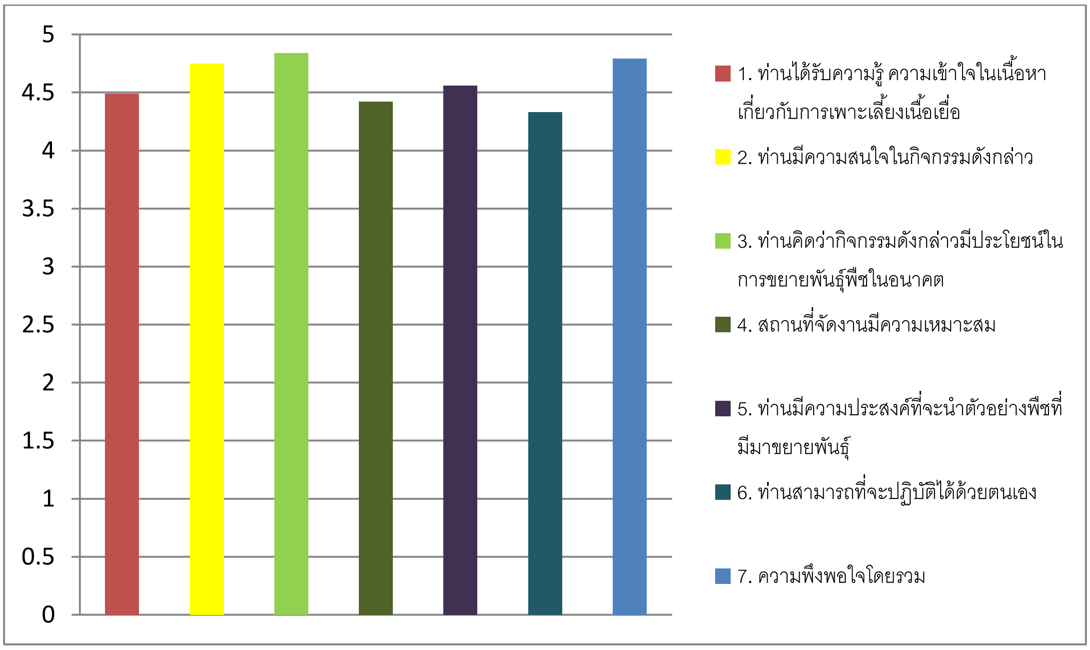


ภาพที่ 37 ผลประเมินความพึงพอใจในการเข้าชมนิทรรศการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 23

5.4.4 การประเมินผลการเข้ารับชมการสาธิต/การฝึกอบรมในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 24 ระหว่างวันที่ 9-12 สิงหาคม 2558 จากผู้เข้าร่วมกิจกรรม และตอบแบบประเมินจำนวน 129 ชุด



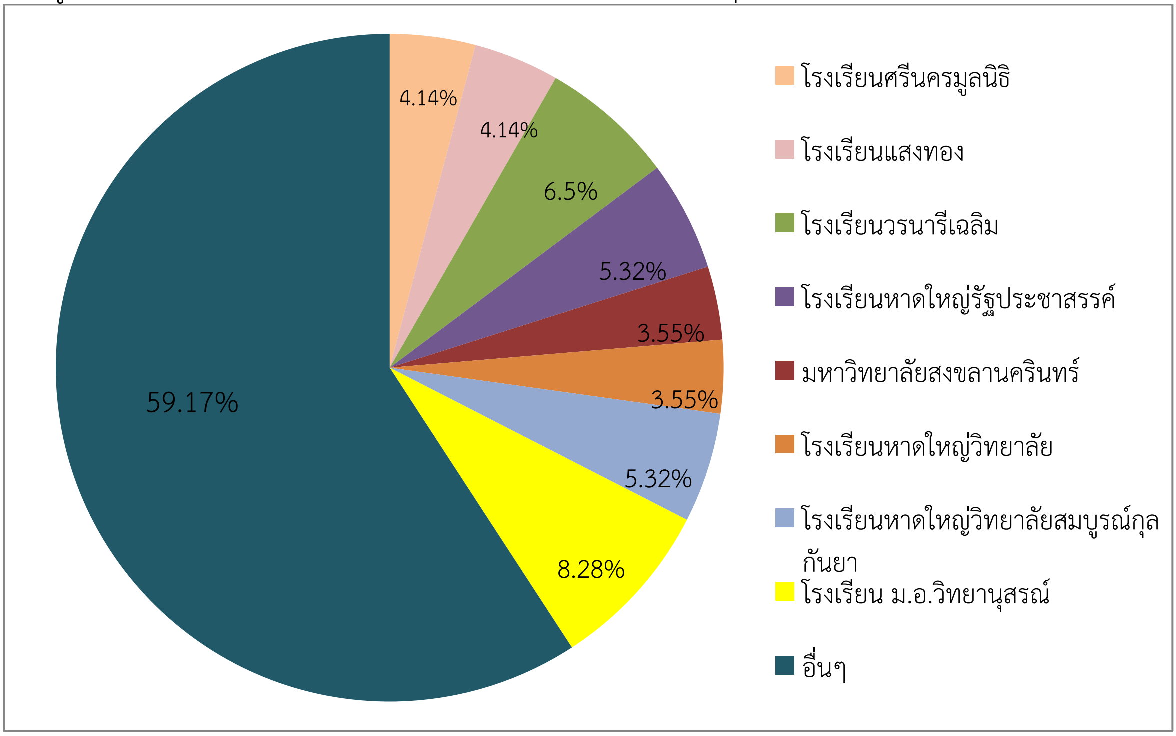
ภาพที่ 38 ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช



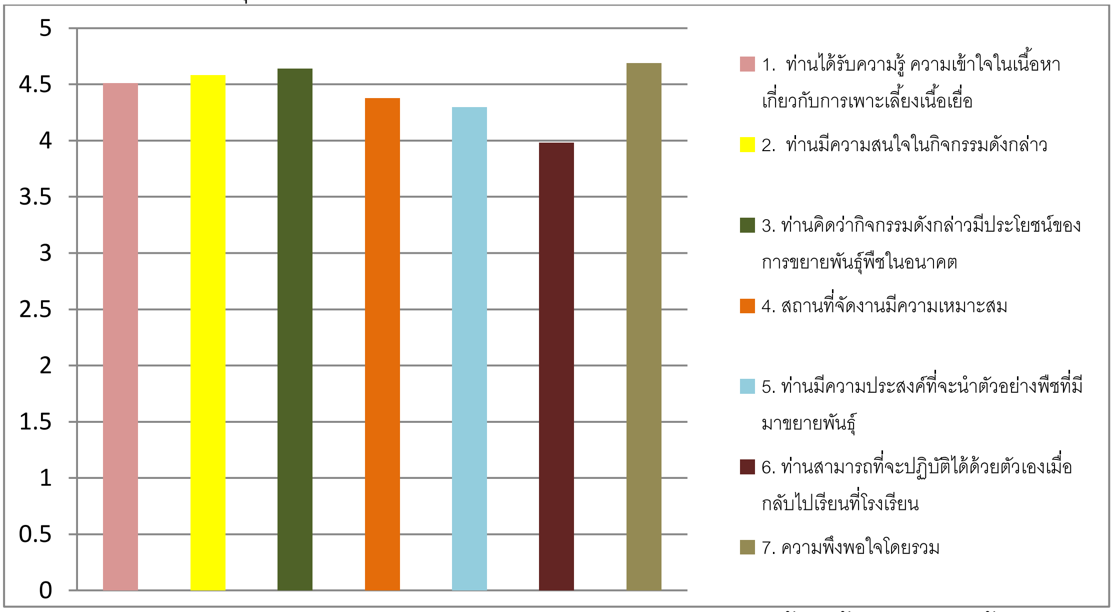
ภาพที่ 39 ผลประเมินความพึงพอใจในการเข้าชมนิทรรศการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 24

5.4.5 การประเมินผลการเข้ารับชมการสาธิต/การฝึกอบรมในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในงานวันเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 25 ระหว่างวันที่ 9-21 สิงหาคม 2559

จากผู้เข้าร่วมกิจกรรม 169 คน และตอบแบบประเมินจำนวน 88 ชุด



ภาพที่ 40 ร้อยละของหน่วยงานที่เข้าร่วมชมนิทรรศการ/การสาธิตในกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช



ภาพที่ 41 ผลประเมินความพึงพอใจในการเข้าชมนิทรรศการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในงานเกษตรภาคใต้ครั้งที่ 25

ข้อเสนอแนะ

1. อยากให้มีการประกาศให้ชัดเจนและรับทราบได้ทั่วถึงมากกว่านี้ เพราะมีประโยชน์มาก อยากให้ทุกคนได้เรียนรู้
2. ควรจะมีการประชาสัมพันธ์ไปยังโรงเรียนให้เข้าร่วม หรือลงไปทำให้นักเรียนชม
3. สถานที่จัดนิทรรศการห่างจากจุดสนใจ และสถานที่จัดมีพื้นที่แคบเกินไป บริเวณทางเดินน่าจะมีดอกไม้จัดให้น่าเดินเข้าชมมากกว่านี้
4. อยากให้มีการจัดค่าย หรือการจัดอบรมผู้สนใจเพื่อเพิ่มทักษะในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และควรมีกิจกรรมเพื่อดึงดูดความสนใจจากคนที่ผ่านไปมาให้มากกว่านี้
5. อยากให้จัดทุกๆปี
6. เร่งพัฒนาพันธุ์ และเพิ่มต้นกล้าพันธุ์เพื่อจะขยายให้เกษตรกรนำไปปลูกได้มากขึ้น
7. พืชที่นำมาแสดงให้ดูมีน้อยเกินไป
8. ป้ายบอกการเข้าชมนิทรรศการน่าจะมีขนาดใหญ่กว่านี้ ง่ายต่อการพบเห็น และมีกิจกรรมดึงดูดความสนใจมากกว่านี้
9. น่าจะมีการประชาสัมพันธ์ให้มากกว่านี้
10. ห้องสาธิตการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่เขียนให้ชัดเจน บางครั้งมองไม่เห็น

<u>ภาพรวมของงานเกษตรในส่วนของนิทรรศการ/การสาธิตกิจกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช</u>

ภาพที่ 42 การจัดเตรียมนิทรรศการก่อนวันงาน

ภาพที่ 43 บรรยากาศการเข้าชมนิทรรศการและสาธิตทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพการขยายพันธุ์พืช

5.5 กิจกรรมฝึกอบรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองแก่นักเรียน นักศึกษา และบุคคลที่สนใจทั่วไป

โดยกิจกรรมหลักๆ จะประกอบด้วย

4.4.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.4.2 การแนะนำอุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.4.3 การฟอกฆ่าเชื้อเพื่อให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ

4.4.4 การเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.4.5 การย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

4.4.6 การอนุบาลต้นกล้าเพื่อให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง

5.5.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แนะนำหรืออธิบายหลักการในการเก็บตัวอย่างพืช โดยชิ้นส่วนเริ่มต้นที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ควรคัดเลือกมาจากต้นแม่ที่ดี ให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคและแมลง และปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีเพื่อจะได้มั่นใจว่าต้นที่ได้จากกระบวนการขยายพันธุ์เป็นพันธุ์ดี ทั้งนี้ชิ้นส่วนที่ใช้อาจเป็นชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เช่น ปลายยอด ข้อ หน่อ คัพภะ เป็นต้น หรือชิ้นส่วนที่ไม่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เช่น ใบ ลำต้น เป็นต้น ก็ได้ (ภาพที่ 44)

5.5.2 การแนะนำอุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลากหลายชนิด ขึ้นอยู่กับการใช้งาน ดังนั้นในขั้นต้นผู้ฝึกอบรมจึงควรมีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเครื่องมือที่จะใช้ เพื่อให้ใช้งานได้สะดวกและถูกต้อง (ภาพที่ 45)

ภาพที่ 44 การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ภาพที่ 45 แนะนำอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

5.5.3 การฟอกฆ่าเชื้อเพื่อให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ

อธิบายกระบวนการในการฟอกฆ่าเชื้อ เริ่มตั้งแต่การล้างทำความสะอาดชิ้นส่วนพืช การให้น้ำประปาไหลผ่าน การจุ่มแช่แอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 46)

ภาพที่ 46 อธิบายกระบวนการในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5.5.4 การเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อธิบายองค์ประกอบและวิธีการเตรียมอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมทั้งให้ผู้ฝึกอบรมได้ฝึกปฏิบัติด้วยตนเอง โดยทั่วไปแล้วอาหารที่ใช้จะเป็นอาหารสูตร MSอาจมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน เพื่อชักนำหรือเพิ่มปริมาณยอด หรือกลุ่มออกซินเพื่อเพิ่มปริมาณราก ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ (ภาพที่ 47)

ภาพที่ 47 การแนะนำขั้นตอนต่างๆ ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

5.5.5 การย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

อธิบายและฝึกปฏิบัติการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิคที่ปลอดเชื้อ (ภาพที่ 48-49)

ภาพที่ 48 เทคนิคการทำให้อุปกรณ์ต่างๆ ในตู้ย้ายเลี้ยงปลอดเชื้อ

ภาพที่ 49 บรรยากาศการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ ภายในตู้ย้ายเลี้ยง

5.5.6 การอนุบาลต้นกล้าเพื่อให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง

อธิบายและฝึกปฏิบัติวิธีการย้ายต้นกล้าที่มีรากสมบูรณ์ออกปลูกนอกหลอดทดลอง ในขั้นตอนนี้สิ่งที่จะต้องควบคุมคือ ความชื้นและแสง เพื่อให้ต้นกล้าสามารถปรับตัวได้ ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง ภาพที่ 50

ภาพที่ 50 แนะนำวัสดุปลูกแต่ละชนิดที่เหมาะสมกับพืชและวิธีการอนุบาลต้นกล้าในหลอดทดลองออกจากขวดเพื่ออนุบาลลงดินปลูก

ภาคผนวก

6. ผลงานตีพิมพ์

Micropropagation of Three Species of *Garcinia*

SompongTe-chato and Mongkol Lim

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University,
Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand
E-mail:Tesompon@ratree.psu.ac.th

Abstract

Three species of *Garcinia; G. mangostana*(mangosteen)*, G. speciosa*(pawa)*,* and G. *atroviridis* (somkhag) were cultured for micropropagation on modified Murashige and Skoog medium (MS) containing various plant growth regulators. In the culture of seeds, many shoots (20-50shoots/seed) were induced in mangosteen and pawa, while multiple shoots were not induced in somkhag. In the former two species, young leaves excised from the shoots induced from seeds in vitro produced 2-5 shoots per leaf on woody plant medium (WPM) containing 5 mg/l BA. Shoot regeneration from leaves was also achieved through meristematic nodular callus formation in these 2 species. In mangosteen, callus was most efficiently induced from leaves on 0.15% Gelrite-solidified MS supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l PVP, 0.5mg/l benzyladenine (BA) and 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ), whereas medium containing 0.25 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA) and 2.5 mg/l BA was the most suitable for callus induction from pawa leaves. In somkhag, friable callus was induced from leaves in medium containing 0.5 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA. The calli were originated from proximal region and wounded sites at midrib of leaf explants in all the species tested. In both mangosteen and pawa, single nodular callus produced 10-20 shoots/month on WPM containing 3% sucrose, 500 mg/l PVP and 0.1 mg/l BA for 2 weeks, followed by overlaying liquid half-strength MS containing 3% sucrose, 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA, whereas no shoot was induced from friable callus of somkhag. For propagation of somkhag, nodal explants with or without axillary buds were alternatively used for culture on WPM containing 3% sucrose, 500 mg/l PVP, 0.1 mg/l thiourea and 0.1 mg/l BA for 2 weeks, followed by culture in liquid half-strength MS containing 3% sucrose, 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA for further 4-6 weeks. By employing this method, 20-30 shoots per explant were produced after 2 months of culture.

Keywords: Tissue culture, *Garcinia*, mangosteen, pawa, somkhag

Introduction

The genus *Garcinia* belongs to Guttiferae and is composed of at least 49 species including 10 unidentified ones. All *Garcinia* species are native to Malaysia Archipelago (Lim, 1984). The most important species that is well known and grown for commercial purpose is mangosteen (*Garciniamangostana* Linn.). Some of the other related species such as somkhag (*Garciniaatroviridis*Griff.), pawa (*Garciniaspeciosa* Wall.), ma-pood (*Garciniadulcis*Kurz.), cha-muang (*Garciniacowa*Roxb.) are sometimes grown in backyard. Generally, all species except mangosteen can adapt well to drought or dry area since they have good root systems which distribute both horizontally (soil surface) and vertically (deep beneath the surface). At early growth stage, they need not to be shaded so much like mangosteen and watering is not necessary. Because of these characteristics, these species have been used as rootstocks of mangosteen for making its plantation in drought area.

Although it has been well-known that vegetative propagation of Garcinia species is rather difficult, Husan (1990) reported successful results on asexual propagation of mangosteen by various methods, among which side grafting provided the highest percentage of success (90%), followed by top grafting and chip budding. However, development of graft union and further growth of scion are usually not so good and healthy even when percentage of success in grafting was very high. The main constrain to the success is the production of yellow gum from wounds which inhibits the formation of graft union and results in low grafting success. Attempts on employing *in vitro* grafting (Te-chato*et al.*, 1992) also resulted in low percentage of grafting success due to the same reason. Further establishment of the in vitro-grafted plants to soil was also difficult due to the weak root systems. Accordingly, several authors tried to micropropagatemangosteen through shoot formation by culturing seeds (Te-chato and Aengyong, 1988; Normah*et al.*, 1995; Goh *et al.*, 1988), young leaves (Te-chato*et al.*, 1992; Goh *et al.*, 1994) and meristematic nodular callus (Te-chato*et al.*, 1995a, b and c).

For breeding of mangosteen, it has been expected to introduce drought resisitant character by crossing with related wild species. However, it has been difficult to hybridize mangosteen with other *Garcinia* species is difficult because of the cross incompatibilities. To overcome the difficulty, it may be useful to apply the biotechnological methods. Especially, somatic hybridization through protoplast fusion opens a wide view for genetic manipulation of these species. For the somatic hybridization, it is necessary to establish a system for efficient plant regeneration from protoplasts. Before stepping into the study on improvement of mangosteen and their related species by biotechnological methods, it is necessary to obtain basic data on tissue culture response of those species. So far, there have been no reports on tissue culture of the species of *Garcinia* which are related to mangosteen.

In this paper, therefore, we report the results on the callus induction and micropropagation of shoots from various explants of mangosteen, pawa and somkhag.

Materials and Methods

Plant materials

Three species of *Garcinia,* namely; mangosteen, pawa and somkhag were used as materials. In case of mangosteen, plantlets raised *in vitro* by subculturing monthly intervals for 2 years were used as a source for explants. For pawa and somkhag, fresh seeds were excised from the fruits and cultured for germination on modified Murashige and Skoog medium (MMS) supplemented with 3% sucrose and 5 mg/l BA, which was previously reported to give higher percentage of shoot formation from seedling than basal MS (Te-chato, 1999). After culturing for one month on this medium under 2,500 lux illumination with 14 hour photoperiod and at 26-28^{o}C, various explants were excised from the seedlings and used for callus induction and micropropagation experiments.

Culture media

Culture media used in this experiment are as follows;

1. *Multiple shoot induction medium (MSIM)*: The modified MS medium supplemented with 3% sucrose and 5 mg/l benzyladenine (BA). The components of modified MS medium in mg/l were as follows; 1650 NH_4NO_3, 1900 KNO_3, 440 $CaCl_2.2H_2O$, 370 $MgSO_4.7H_2O$, 170 KH_2PO_4, 12.4 H_3BO_3, 33.8 $MnSO_4.H_2O$, 21.0 $ZnSO_4.7H_2O$, 1.7 KI, 0.5 $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0.05 $CuSO_4.5H_2O$, 0.05 $CoCl_2.6H_2O$, 15 $FeSO_4.7H_2O$, 18 Na_2EDTA, 500 myo-inositol and 5 thiamine-HCl.

2. *Callus induction medium (CIM)*: Modified MS medium supplemented with 3% sucrose and 500 mg/l polyvinylpyrrolidone (PVP). Various concentrations of α-naphthaleneacetic acid (NAA), BA, thidiazuron (TDZ) and thiourea (TU) were added.
3. *Shoot primordia induction medium (SPIM)*: Woody plant medium (WPM) containing 3% sucrose and 500 mg/l PVP. BA at 0.1 or 5 mg/l alone or in combination with 0.5 mg/l TU were added.
4. *Shoot elongation medium (SEM):* Liquid half-strength MS containing 3% sucrose, 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA. Usually this medium was used to overlay on the SPIM.

All the media except for SEM were solidified with 0.2% Gelrite and adjusted pH to 5.7-5.8 before autoclaving at 1.07 kg/cm^2 for 15 minutes.

Multiple shoot formation from seeds, young leaves and nodal segments

Seeds of pawa and somkhag were isolated from fresh fruits. After removing all arils and surface-adhering fibrous tissues, they were soaked in 20% Clorox solution for 20 minutes, washed three times with sterile distilled water, sown on 10 ml MSIM, and kept

under 14 hour photoperiod with 2,500 lux illumination at 26-28°C. After culture for four weeks, percentage of explant which multiple shoot formation and number of shoots per explant were recorded in each species. Young leaves of mangosteen, pawa and somkhag were excised from shoots which were raised by in vitro culture of seeds, and cultured on SPIM. After culture for two to three weeks, SEM containing various plant growth regulators was overlaid onto SPIM and cultured for further 4-6 weeks. The number of shoots induced in each explant was recorded 9 weeks after initiation of the culture. In somkhag, shoots were further cut into nodal segments and cultured for shoot multiplication on 10 ml of gellan gum-solidified WPM containing 0.1 mg/l TU, on which 10 ml of SEM was overlaid. For these cultures, 15x90 mm Petri-plates were used and they were sealed with Parafilm after inoculation of the explants.

Callus induction from young leaves

Young leaves of mangosteen, pawa and somkhag raised after one month of *in vitro* culture on MSIM were excised and cultured as entire, segmented or striped explants on CIM supplemented with plant growth regulators. Twenty five leaf explants were cultured in each 15x20 mm Petri-plate containing 15 ml culture medium. Four plates were replicated for each treatment. The cultures were sealed with Parafilm and kept under the same conditions as multiple shoot formation experiment. After culture for 4-6 weeks, percentage of callus induction and origin of the callus were recorded.

Shoot induction from nodular callus

Nodular calli induced from leaf segments of mangosteen and pawa were transferred onto 20 ml SPIM in 15x90 mm Petri-plate. For each plate, 10 ml SEM was overlaid after two weeks of culture. After culture for 6-8 weeks the number of shoots induced in each nodular callus was recorded.

Results

Multiple shoot formation from seeds

The seeds cultured on MSIM showed different ability to produce multiple shoots among the three *Garcinia* species in terms of both percentages of explants with shoot formation and number of shoots per explant (Table 1). Pawa gave the highest values in both of the percentages followed by mangosteen, whereas somkhag did not produce multiple shoots.

Multiple shoot formation from leaf segments

Young leaves of mangosteen and pawa produced 2-5 shoots when they were cultured as a whole or segments on WPM supplemented with 5 mg/l BA (Table 4). In somkhag, however, the leaves produced no shoot on this medium as well as other media

containing different concentrations and concentrations of plant growth regulators.. In the culture of somkhag leaves, only friable callus was observed at notch site or cut area (Figure 2). Frequency of direct shoot bud formation from leaves of pawa was far greater than those of mangosteen, especially when the leaves were cultured as segments (data not shown). In addition, the time required for shoot bud formation in pawa was faster than that in mangosteen.

Nodular callus induction from young leaves

Callus induction from young leaves occurred differently among the three *Garcinia*species tested (Table 2). Mangosteen provided the highest frequency of callus induction on CIM supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ. Addition of NAA completely inhibited the callus formation. In pawa, however, addition of low concentration of NAA favoured for the callus formation and the best callus induction was obtained on CIM containing 2.5 mg/l BA and 0.25 mg/l NAA. Proliferation rate of the callus on this medium was 3-4 times by subculturing with monthly intervals (data not shown). In case of somkhag, addition of NAA also favoured for the callus formation and medium containing 1.0 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA gave the best callus induction. Replacement of NAA by cytokinin, TDZ and TU, acted inhibitory to the callus formation and no callus was induced when TDZ was combined with BA, whereas TU reduced the percentage to the half.

The quality of callus induced from young leaf explant on CIM was different between somkhag and other 2 species. Mangosteen and pawa produced meristematic nodular callus which was compact and nodular with some shoot primordia (Figure 1). In contrast, somkhag produced friable callus which had light green color with slow growth (Figure 2). In all the three species, the calli were mostly originated from proximal region of the explants, followed by midrib and distal regions. In case where wound treatment was made by stripping at midrib, callus induction was also triggered at the cut surfaces (Table 3, Figure 3).

Shoot induction from meristematic nodular callus

Multiple shoots could be induced from nodular callus of mangosteen and pawa. After multiplication of the calli in CIM till reaching to a desirable quantity, they were transferred onto SPIM on which development of the shoot primordia was induced. Further elongation of the shoots was promoted by ovelaying SEM onto SPIM. By adopting this procedure, ten (mangosteen) to twenty (pawa) shoots/callus were produced within 4-6 weeks (Table 4). In case of somkhag, leaf-derived callus proliferated quite slowly, turned brown, ceased growth and finally died after 2-3 subcultures. Neither shoot induction nor establishment of cell suspension culture could be achieved in this species.

Discussion

*Garcinia*spp. are characterized by agamospermy or obligate agamospermy. Seeds of the species contain somatic pro-embryos originated from ovary tissue or nucellar tissue without fertilization (Lim, 1984). Accordingly, approximately 10% of the seeds germinated have more than one seedlings per seed in mangosteen and pawa. By culturing in vitro, embryogenic potential of the seed was intensified and 70% of the mangosteen seeds produced a large number of shoots on MMS containing 5 mg/l BA (Table 1). The number of shoots obtained per seed has been reported to range from 10 to 20 in mangosteen (Goh*et al.*,1988; Te-chato and Aengyong, 1988; Normah *et al.,*1995). Although pawa also gave 100% multiple shoot formation due to polyembryony, somkhag gave only one shoot probably due to the lack of the nature of polyembryony. Although Normah*et al.* (1995) reported that NAA in combination with BA increased the number of shoots, reverse results were obtained in the present study. Presence of NAA or other auxin in the medium gave inhibitory effect on both multiple shoot formation and callus induction in mangosteen. Addition of NAA to the medium caused a rapid browning of explant and culture media, leading to the necessity for shortening the interval of subculture.

In micropropagation of fruit crops, frequency of the success generally depends upon genotypes, culture media and plant growth regulators. Predieri*et al.* (1989) reported the difference in the ability of plantlet regeneration from cultured leaf explants in different pear varieties. Similar results were also obtained in micropropagation of apple rootstocks, in which some varieties required a low concentration of IBA while others required a high concentration of that alone or in combination with GA_3 (Yepes and Aldwinckle, 1994). In the present study, three species of *Garcinia*responded differently to plant growth regulators for callus induction from leaf segments. Mangosteen callus proliferated most profoundly in MS supplemented with only cytokinins (BA and TDZ at the same concentration of 0.5 mg/l), while the calli of pawa and somkhag were induced and proliferated in the presence of both auxin and cytokinin (NAA and BA) (Table 2). Characteristics of the calli induced also varied from species to species. Leaf-derived calli of mangosteen and pawa were compact and meristematic, whereas somkhag produced friable callus. In these 3 species, the calli were mostly originated from proximal region of the leaf segments (Table 3). The same phenomena were also observed by culturing immature cotyledon of apple (Rubos and Pryke, 1984), peach (*Prunuspersica*), plum (*P. domestica*) and cherry (*P. cerasus*) (Mante*et al.*, 1989), in which multiple shoots were formed only at proximal region and that no shoot was produced in the absence of that region.

In the present study, various explants of *Garcinia* spp. produced multiple shoots on SPIM containing different plant growth regulators although somkhag gave quite different responses to the culture media from the other two species (Table 4). Twenty and fifty

shoots were induced from one seed in mangosteen and pawa, respectively on MMS supplemented with 5 mg/l BA. Young leaves of these species provided only 2-5 shoots when they were cultured on WPM containing 5 mg/l BA. Although somkhag could not be propagated through seeds and young leaves, nodal explant was proved to be the best explant for multiplication on WPM containing 0.1 mg/l BA and TU (Table 4). Based on the results of the present study, propagation of elite trees for each species will be efficiently performed year round. Moreover, improvement of the species by genetic transformation through particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated methods will be achieved through the use of plant regeneration systems established in the present study.

References

Goh, H.K.L., Rao, A. N. and Loh, C. S. 1988.*In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garciniamangostana* L.).Annal of Botany 62:87-93.

Hasan, B. M. 1990. Vegetative propagation studies in mangosteen (*Garciniamangostana*). Japan. J. Trop. Agr. 34:78-83.

Lim, A. L. 1984. The embryology of *Garciniamangostana* L. (Clusiaceae). The Garden's Bulletin, Singapore 37:93-103.

Mante, S., Scorza, R. and Cordts, J. M. 1989. Plant regeneration from cotyledons of *Prunuspersica, Prunusdomestica,* and *prunuscerasus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19:1-11.

Normah, M. N., Nor-Azza, A. B. and Aliudin, R. 1995.Factors affecting *in vitro* proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43:291-294.

Predieri, S., FasoloFabbriMalavasi, F., Passey, A. J., Ridout, M. S. and James, D. J. 1989. Regeneration from *in vitro* leaves of "Conference" and other pear cultivars (*Pyruscommunis* L.). Journal of Horticultural Science 64:553-559.

Rubos, A. C. and Pryke, J. A. 1984.Morphogenesis in embryogenic tissue cultures of apple. J. Hort. Sci. 59:469-475.

Te-chato, S. 1999.Efficient clonal propagation of mangosteen (*Garciniamangostana*L.) through tissue culture of apomictic seedlings.Ph.D. Dissertation, Shiba University, Japan.

Te-chato, S. and Aengyong, W. 1988.Micropropagation of mangosteen by culture seed.Songklanakarin J. Sci. Technol. 10:7-11.

Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992.Enhanced efficiency micropropagation of mangosteen.Songklanakarin J. Sci. Technol. 14:1-7.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a.Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garciniamangostana* L.).Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:115-120.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b.Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen.Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:129-135.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995c.Types of medium and cytokinins in relation with purple leaf and callus formation of mangosteen.Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:121-127.

Virscek, M.M., Bohanec, B. and Jarvonik, B. 1999. Adventitious shoot regeneration from apple leaves-optimisation of the protocol and assessment of genetic variation among the regenerants. Phyton-Horn. 39:61-70.

Virscek, M.M., Jarvonik, B., Stampar, F., Bohanec, B., Tobutt, K.R. and Alston, F.H. 1999. Assessment of genetic variation among regenerants from in vitro apple leaves using molecular markers. Acta-Horticulturae 484:299-303.

Yepes, L. M. and Aldwinckle, H. S. 1994.Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks and effect of antibiotic on proliferation. Plant Growth Regulation 15: 55-67.

Table 1 Difference in multiple shoot formation among the 3 species of *Garcinia* on MMS medium containing 5 mg/l BA.

Species	Multiple shoot formation	% Multiple shoot formation	Avg. shoot number per seed
G. mangostana	yes	73	20
G. speciosa	yes	100	40
G. atroviridis	no	0	1
N		100	

Table 2 Effect of plant growth regulators on callus induction from leaf explants in some species of *Garcinia.*

Species	PGR				% Callus	Type of callus
	BA	TDZ	TU	NAA	formation	
G. mangostana	0.5	1	-	-	15.0a	
(mangosteen)	0.5	0.5	-	-	68.8a	
	0.5	0.5	-	0.5	0c	mreristematic
	1.0	0.5	-	-	66.7a	nodular callus
	1.0	1.0	-	-	25.0b	
C.V. (%)					10.3	
G. speciosa	0.1	0.5	-	-	25.4bc	
(pawa)	0.5	0.5	-	-	54.1ab	
	0.5	1.0	-	-	26.4bc	meristematic
	0.1	-	-	0.1	66.6a	nodular callus
	0.5	-	-	0.5	8.8c	
	2.5	-	-	0.25	90.0a	
C.V.(%)					31.3	
G. atroviridis	0.5	-	0.5	-	15.4b	friable callus
(somkhag)	0.5	0.5	-	-	0c	
	1.0	-	-	0.5	34.5a	
C.V.(%)					25.2	

Table 3 Origin of the callus from various types of cultured leaves.

Species	% Callus	Origin of callus		
		Proximal end	Mid rib	Distal end
G. mangostana	89.7	51.6	16.0	14.0
G. speciosa	55.5	41.6	13.9	0
G atroviridis	15.4	15.4	0	0
N	50			

Table 4 Summary of the conditions for shoot multiplication from various explants in three species ofGarcinia.

Species	Explant	Culture media+PGR	Avg. shoot no./explant
G. mangostana	Seed	MMS+5mg/l BA	20
(Mangosteen)	Leaf	WPM+5mg/l BA	2-5
	Callus	MS+0.5mg/l BA+0.5mg/l TDZ (1)	
		WPM+0.1mg/l BA (2)	
		overlayed medium (3)	10
G. speciosa	Seed	MMS+5mg/l BA	50
(Pawa)	Leaf	WPM+5mg/l BA	2-5
	Callus	MS+0.25mg/l NAA+2.5mg/l BA(1)	
		overlayed medium(2)	20
G. atroviridis	Seed	MMS+5mg/l BA	1
(Somkhag)	Leaf	WPM+5mg/l BA	0
	Nodal	WPM+0.1mg/l TU (1)	
	explant	overlayed medium (2)	20-30

PGR: plant growth regulator, MMS: modified MS medium

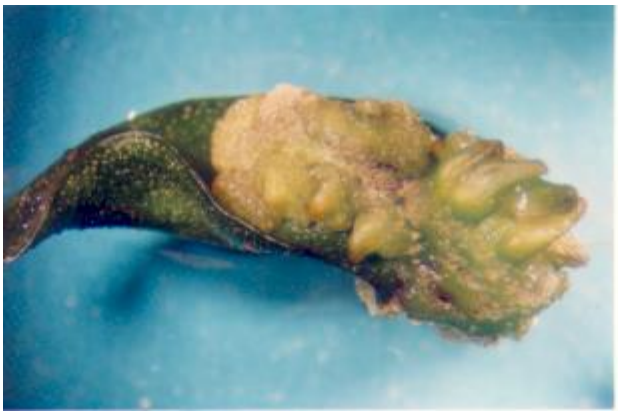
WPM: woody plant medium, BA: benzyladenine

NAA: naphthaleneacetic acid, TDZ: thidiazuron

TU: thiourera

overlay medium: 1/2MS liquid medium supplemented with 0.06mg/l NAA and 0.03mg/l BA

(1) (2) and (3) callus induction, shoot bud induction and shoot elongation medium, respectively



A

B

Figure 1 Nodular callus with leaf primordia obtained from leaf of mangosteen (A) and direct shoot formation from leaf of pawa (B).

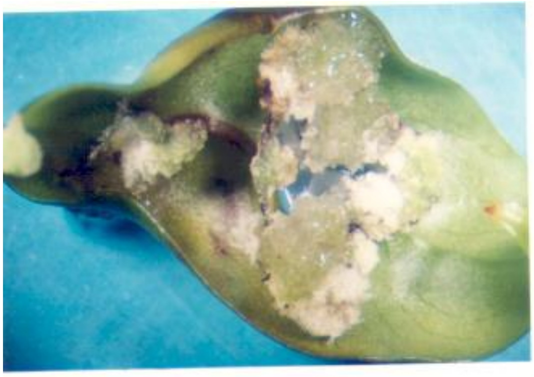


Figure 2 Light green friable callus obtained from leaf of somkhag.

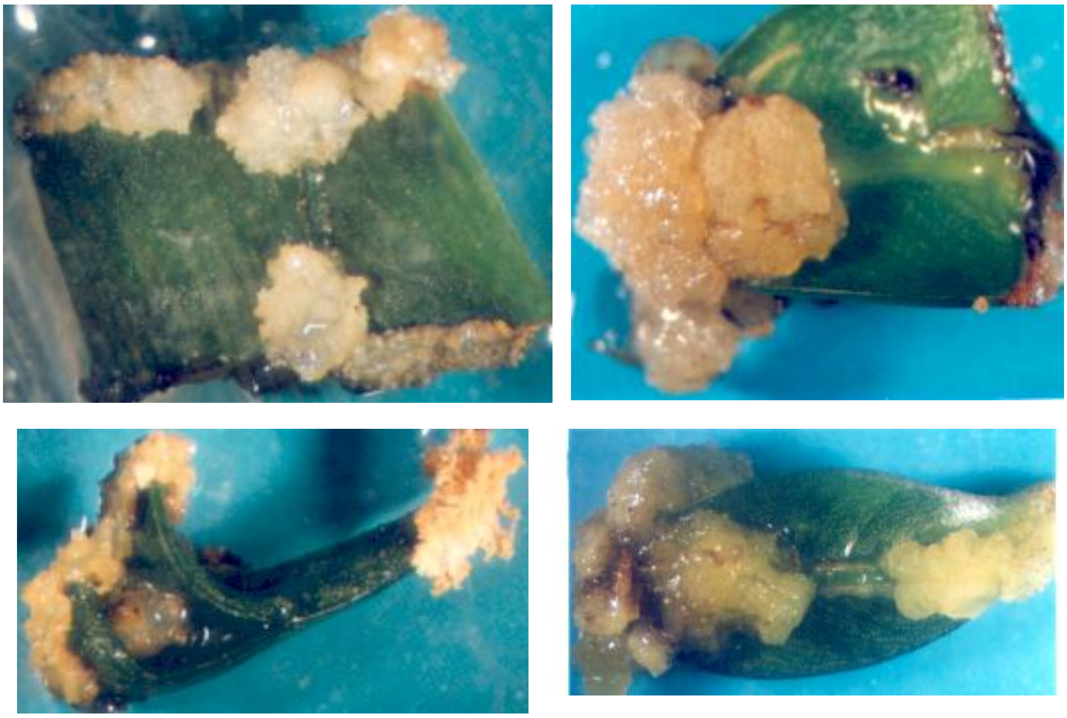


Figure 3 Callus formation from wound area at stripped midrib.

การใช้โฟลไซโตเมทรีตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในไม้ผลบางชนิด
The Use of Flow Cytometry for Verification ofSome Fruit Crops

สมปอง เตชะโต[1] และ สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1]
Sompong Te-chato[1] and Sureerat Yenchon[1]

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
[1]Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

Abstract

Generally, the same species of plant contains different DNA contents. By this characteristic it is very useful for verification of relative species each other. Flow cytometry is popular technique which is used for that purpose due to short steps, incomplicate, rapid perform with a large amount of samples. In *Garcinia*spp., the DNA content of mangosteen, madan and somkhage is nearly the same or equal. Mapood had DNA content two times higher than those cultivars and four times higher than that of Phawa. In case of *Lansium*spp., longkong had the highest DNA content, followed by langsat and duku. From the above results it is suggest that flow cytometry is very useful for verification of fruit crop varieties in a short time in future.

Keywords: Fruit crops, flow cytometry, cultivar verification

บทคัดย่อ

โดยทั่วไปพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันมีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันไม่มากก็น้อย จากลักษณะดังกล่าวเราจึงสามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจน โฟลไซโทเมทรีเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของพืชโพลีพลอยด์เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ขั้นตอนไม่ซับซ้อน ได้ผลรวดเร็วทำได้คราวละมากๆจากการศึกษาในพืชสกุล *Garcinia*พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอของมังคุด มะดัน และส้มแขกใกล้เคียงกันหรือเท่ากันมากกว่าพะวาสองเท่า ส่วนมะพูดมีมากกว่ามังคุดสองเท่าหรือมากกว่าพะวาสี่เท่า ในกรณีของพืชสกุล *Lansium*นั้นพบว่าดูกูมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด ส่วนลองกองมีปริมาณมากที่สุด ลางสาดมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่างดูกูและลองกอง จากผลการศึกษาข้างต้นนับว่าเป็นประโยชน์ของการใช้โฟลไซโตเมทรีเพื่อการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ซึ่งส่งผลต่อการปลูกสร้างสวนไม้ผลในอนาคต

คำสำคัญ: ไม้ผล โฟลไซโทเมทรี การตรวจสอบพันธุ์

คำนำ

โฟลไซโทเมทรี เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยการแยกนิวเคลียสของเซลล์พืชที่ต้องการศึกษา ทำให้สามารถประมาณจำนวนนิวเคลียสและขนาดของจีโนมพืชที่ต้องการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับการเปลี่ยนแปลงเพิ่มหรือลดของจำนวนชุดโครโมโซม รวมทั้งสามารถยืนยันถึงความเสถียรของโครโมโซมพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นเวลานาน เทคนิคดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูง ขั้นตอนไม่ซับซ้อน ได้ผลรวดเร็วทำได้คราวละมากๆ (Dolezel*et al*., 2007) ปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวเป็นที่นิยมในการตรวจสอบการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมในหลอดทดลองจากการใช้โคลชิซิน/ออริซาลิน (Samala and Techato, 2012) การจำแนกความแตกต่างระหว่างแบบของปาล์มน้ำมันในสกุล *Elaeisguineensis*ก็คือการแยกเซลล์พืชให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยการหั่นเนื้อเยื่อพืชด้วยใบมีด หรือ การตีด้วยเม็ดบีท(Roberts, 2007) ในสารละลายบัฟเฟอร์ และย้อมนิวเคลียสด้วยสารละลาย Propidium iodide (PI) หรือ 4’, 6-diamino-2-phenylindole(DAPI) หลังจากนั้นวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ซึ่งเครื่องจะวิเคราะห์ด้วยการดูดเซลล์ให้เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์แล้วตรวจจับขนาดของนิวเคลียสที่ผ่านการย้อมสีนับพันเซลล์ต่อนาทีจากนั้นเครื่องจะวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ แปลผลออกมาในรูปของความสัมพันธ์กับระดับพลอยดี (Cousin *et al*., 2009) จึงสามารถตรวจสอบระดับพลอยดีของพืชได้จำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น

อุปกรณ์ และวิธีการ

<u>พืชสกุล *Garcinia*</u> ใบมังคุด ส้มแขก พะวา มะพูด มะดัน ในระยะกึ่งอ่อนกึ่งแก่ ไม่มีสีม่วงแดงเหลืออยู่ จากต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้วในแปลงปลูก

<u>พืชสกุล *Lansium*</u> ใบลองกอง ลางสาด ดูกู ในระยะสีเขียวอ่อนจากต้นโตที่ให้ผลผลิตแล้วในแปลงปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ม.สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

นำใบพืชมาหั่นให้ละเอียดในสารลายบัฟเฟอร์ของ DAPI หรือบัฟเฟอร์สำเร็จรูปของ Partec ที่ใช้แยกเซลล์เดี่ยวๆ และย้อมสี กรองเซลล์แล้วป้อนเข้าเครื่อง FCM ตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณ DNA (Fig. 1)

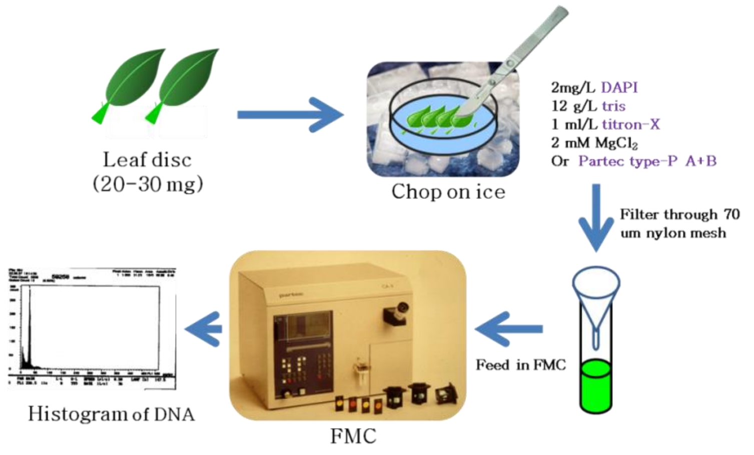
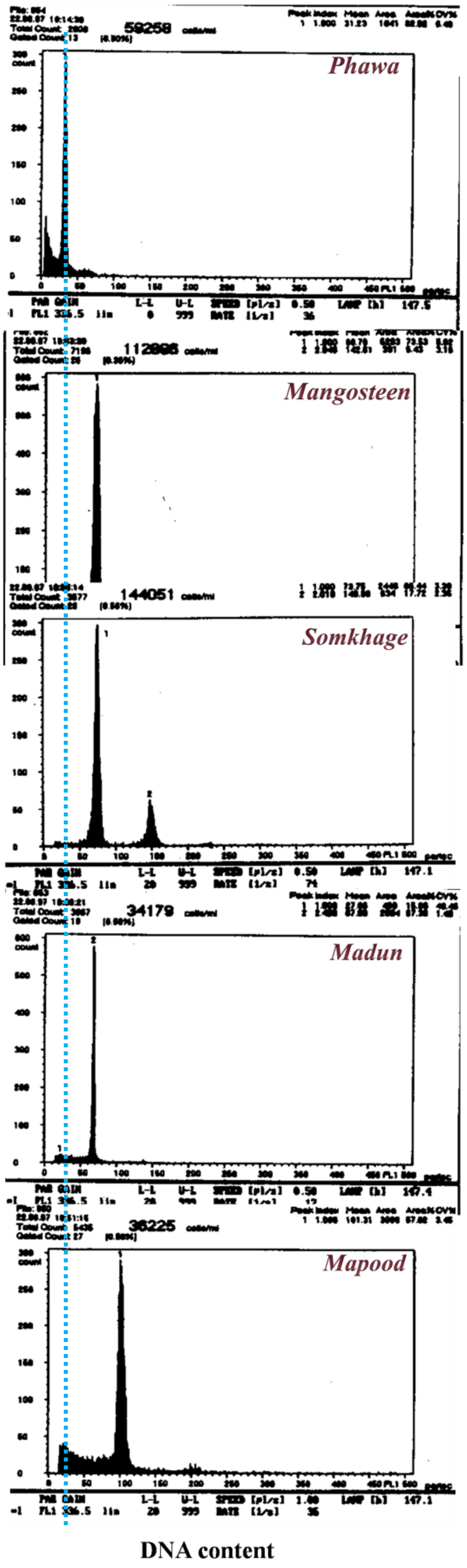


Fig. 1 Steps in analysis of DNA content of *Garcinia* spp. and *Lansium*spp. using flow cytometry.



ผลและวิจารณ์

ส้มแขก มังคุด และมะดันมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากัน และมีเป็นสองเท่าของพะวา ส่วนมะพูดมีปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุด คิดเป็นสองเท่าของส้มแขก มังคุด และมะดัน และคิดเป็นสี่เท่าของพะวา (Fig. 2) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของRichards (1990)ซึ่งอาศัยการสังเกตลักษณะทางสัณฐานร่วมกับการตรวจสอบโครโมโซม

สำหรับพืชในสกุล *Lansium*นั้นเห็นได้ชัดเจนว่าลองกองมีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด ดูกูมีน้อยที่สุด ส่วนลางสาดอยู่ระหว่างลองกอง และดูกู หากจัดระดับพลอยดีของพืชสกุล *Lansium*ทั้ง 3 ชนิดอาจเป็นไปได้ว่าดูกูมีโครโมโซม 2 ชุด (2n=2x) ส่วนลางสาด และลองกองมี 3 ชุด (2n=3x) และ 4 ชุด (2n=4x) ตามลำดับ (Fig. 3) วิธีการนี้มีประโยชน์มากในพืชสกุลนี้ที่จะช่วยแยกต้นดูกูและลางสาดออกจากลองกองในขณะที่ยังเป็นต้นกล้า ทำให้เกษตรกรได้พันธุ์ลองกองที่แท้จริงเท่านั้นไปปลูก

สรุปผล

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการตรวจสอบพันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ FMC ในไม้ผลเหล่านี้มาก่อน รายงานฉบับนี้จึงเป็นรายงานครั้งแรกของการใช้ FMC ตรวจสอบพันธุ์ไม้ผลดังกล่าว และคาดว่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อเกษตรกรผู้ปลูกสวนไม้ผลพันธุ์ดีที่ผ่านการตรวจสอบอย่างถูกต้องในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี และสถานวิจัยความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำ

Fig. 2 Comparison of DNA content in some species of*Garcinia*spp.

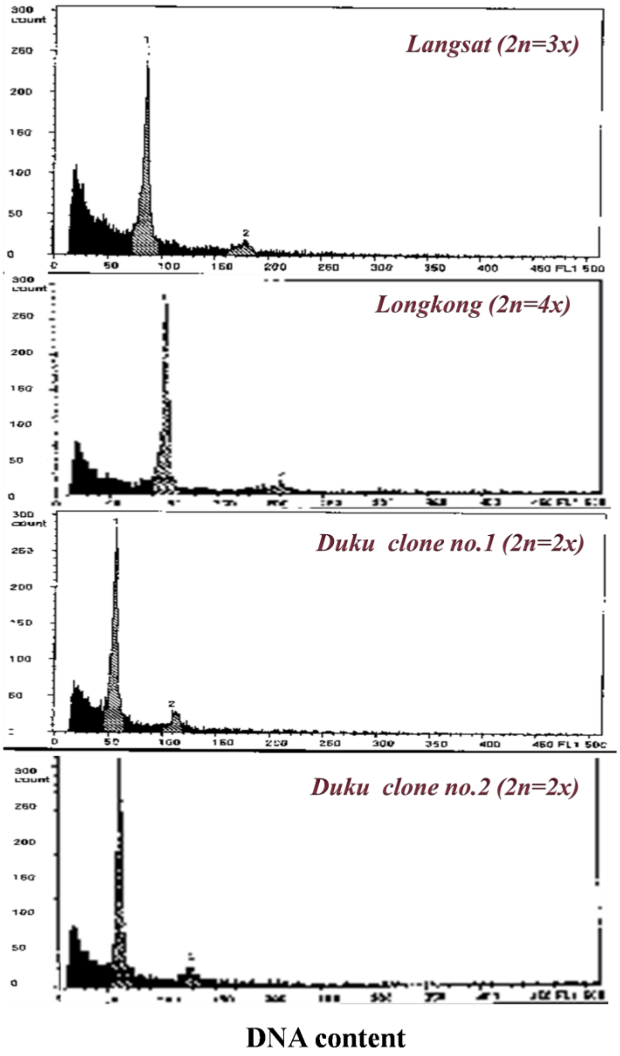


Fig. 3 DNA content of some important cultivated *Lansium* spp.and their ploidy level.

เอกสารอ้างอิง

Cousin, A., Heel, K., Cowling, W.A. and Nelson, A.N. 2009. An efficient high-troughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants. Cytometry Part A 75: 1015-1019.

Dolezel, J., Greilhuber, J. and Suda, J. 2007. Flow cytometry with plants: an overview. *In* Flow cytometry with plant cells (eds. J. Dolezel, J. Greilhuber and J. Suda), pp 41-65. Weinheim : Wiley Press.

Richards, A.J., 1990. Studies in *Garcinia*, dioecious tropical forest trees: the origin of the mangosteen (*G. mangostana* L). Botanical Journal of the Linnean Society 103: 301–308

Roberts, A.V. 2007. The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen. Cytometry Part A 71: 1039-1044.

Samala, S. and Techato, S. 2012.Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicines treatment. J. of Agricultural Technology 8(1):337-352

ผลของชิ้นส่วนและสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงส้มแขกในหลอดทดลอง
Effects of Explant Types and Culture Media on Multiple Shoot Formation from Tissue Culture of Somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.)

สมปอง เตชะโต[1] สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1] และ ลินดา สายยนต์[1]
Sompong Te-chato,[1] Sureerat Yenchon [1] and Linda Saiyon [1]

Abstract

Various explants of Somkhag were cultured in different culture media supplemented with various plant growth regulators (PGRs). The results showed that nodal explant gave the highest percentage and number of direct shoot formation at 100% and 3.8 shoots per cultured node, respectively on woody plant medium (WPM) supplemented with 0.5 mg/l benzyladenine (BA) and 1 mg/l thiourea (TU). The following result was obtained from distal cut end of stem (35% with 4.5 shoots/cultured stem) and leaf explant (56.17% with 2.64 shoots/cultured leaf). Multiple shoot formation was not obtained from root explant. Histological observation of stem and leaf produced shoots revealed that those shoots originated from monolayer of epidermis. The cells in this layer were chracterised as meristematic cells, rapidly divided to form shoot structure with vascular tissue. Shoots were successfully rooted (55.56% with 2.67 roots/shoot) by wounding the basal part, dipping in 1000 mg/l 3-indolebutyric acid (IBA) in the dark for 15 min and the inserting in Nitsch&Nitsch (NN) medium with 0.5 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA).
Keywords: Somkhag, thiourea, multiple shoot, Histological

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของส้มแขก ในอาหารสูตรต่างๆ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันเพื่อชักนำยอดรวม พบว่าชิ้นส่วนข้อให้ยอดรวมสูงสุด 100% จำนวนยอด 3.8 ยอดต่อชิ้นส่วนในอาหารสูตร WPM (woody plant medium) เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TU (thiourea) เข้มข้น 1 มก./ล. รองลงมาเป็นชิ้นส่วนลำต้นด้านปลายรอยตัด และใบให้การสร้างยอดรวม 35 และ 56.17% จำนวนยอด 4.5 และ 2.64 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ส่วนรากไม่สามารถสร้างตายอดได้ เกิดเพียงแคลลัส และราก เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยาของลำต้นและใบที่สร้างยอดรวมโดยตรงพบพัฒนาการของยอดจากเซลล์ผิว เซลล์ดังกล่าวมีลักษณะเป็นเซลล์เมอริสเต็ม แบ่งตัวอย่างรวดเร็วพัฒนาให้โครงสร้างยอดที่มีเนื้อเยื่อเจริญท่อลำเลียง การชักนำรากจากยอดส้มแขกได้ทำโดยการนำยอดมาทำให้เกิดรอยแผลขนาด 2 มม. จำนวน 2 แผลที่บริเวณโคน แล้วจุ่มแช่ในสารละลาย IBA (3-Indolebutyric acid) เข้มข้น 1000 มก./ล. ในสภาพมืดเป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NN (Nitsch&Nitsch) เติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า NAA 0.5 มก./ล. ชักนำรากได้ดีสุด โดยสามารถชักนำรากได้ 55.56% รากที่ชักนำได้มีจำนวน 2.67 รากต่อยอด
คำสำคัญ: ส้มแขกthiourea ยอดรวม เนื้อเยื่อวิทยา

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
[1]Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

คำนำ

ส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.) เป็นไม้ผลป่าทางใต้ตอนล่างของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดยะลา ปัตตานี นราธิวาส เป็นไม้ยืนต้นจัดอยู่ในวงศ์ Guttiferae (สมพร, 2538) ผลของไม้ส้มแขกมีรสเปรี้ยว ประชาชนในภาคใต้นิยมนำมาปรุงอาหารแทนผลของมะขาม หรือมะนาว รวมทั้งรู้จักนำมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านด้วยการนำผลของส้มแขกมาต้มใช้ดื่มเป็นยาฟอกโลหิต ขับเสมหะ (ธนิตย์ และคณะ, 2543) ในอดีตส้มแขกไม่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายยกเว้นภาคใต้ แต่ในปัจจุบันส้มแขกเป็นที่รู้จักมากขึ้น เนื่องจากมีการค้นพบว่า ส้มแขกมีกรดไฮดรอกซีซิตริก(hydroxycitric acid, HCA) สูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารดังกล่าวเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATP-citratelyaseที่รุนแรงมากในวิถีชีวสังเคราะห์ของกรดไขมัน จึงมีผลในการยับยั้งการสร้างกรดไขมันขึ้นมาใหม่ในเซลล์ สำหรับรายงานการขยายพันธุ์ส้มแขกด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นเมล็ด และปลายยอด (ราตรี และสมปอง, 2539) การพัฒนาการสร้างยอดรวมได้ดีในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม BA (benzyladenine) และ TU (thiouria) ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มก./ล. ชิ้นส่วนใบพัฒนาสร้างแคลลัสได้ดีในอาหารพื้นฐาน MS เติม NAA (naphthaleneacetic acid) 0.5 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. และการทวีจำนวนยอดทำได้โดยการเพาะเลี้ยงปลายยอดและข้อในอาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium) เติม BA และ TU ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.1 มก./ล.การชักนำรากจากยอดส้มแขกโดยการสร้างแผล 2 มม. จำนวน 2 แผลที่บริเวณส่วนโคนแล้วจุ่มแช่ยอดในสารละลาย IBA (3-indolebutyric acid) (พจมาลย์ และสมปอง, 2541) รายงานฉบับนี้จะได้อธิบายถึงผลของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงต่อการสร้างยอดรวม และกำเนิดของยอดรวมจากชิ้นส่วนดังกล่าวเพื่อขยายพันธุ์จำนวนมาก อนุรักษ์พันธุกรรม และใช้เป็นเครื่องมือในการปลูกถ่ายยีนให้กับส้มแขกในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

นำชิ้นส่วนยอด และข้อของส้มแขกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. TU เข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน มาตัดแยกให้มีขนาด 1 ซม.นำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ โดยยอดเลี้ยงบนอาหารเหลวในฟลาค์ส ๆ ละ 3 ยอด/ ข้อเลี้ยงบนอาหารแข็งในขวด 4 ออนซ์ ขวดละ 1 ชิ้น เมื่อได้จำนวนยอดมากพอแล้ว จึงนำไปศึกษาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ร่วมกับ TU และ IBA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน นำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสงนาน 14 ชั่วโมงต่อวันที่ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 ℃ เป็นเวลา 1 เดือนโดยแบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

1. อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวม

นำชิ้นส่วนยอดหรือข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ TU ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1 มก./ล.เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบอัตราการเกิดยอดรวม และจำนวนตายอดเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

2. อิทธิพลของการเตรียมใบต่อการชักนำยอดโดยตรงจากใบส้มแขก

เตรียมใบที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ 3 วิธีคือ 1) ใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว 1 เดือน 2) ใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 1 เดือนแล้วย้ายลงอาหารเหลว 1 เดือน และ 3) ใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 1 เดือนแล้วย้ายลงอาหารแข็งต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือนเก็บรวบรวมใบทั้ง 3 วิธีการมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TU เข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือนตรวจสอบอัตราการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดต่อใบ

3. ศึกษากำเนิดของยอดด้วยวิธีเนื้อเยื่อวิทยา

รวบรวมตัวอย่างข้อที่สร้างยอดรวมโดยตรงมาตรึงในน้ำยา fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ฝังในพาราฟิน ตัดด้วยเครื่องตัดไมโครโตมให้มีขนาด 8-10 ไมครอนเรียงบนสไลด์ ล้างพาราฟินออก ย้อมสีแซฟรานิน นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูกำเนิดของเซลล์ที่พัฒนาให้ยอดรวม

4. ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำราก

นำยอดซึ่งจุ่มแช่ใน IBA เข้มข้น 1,000 มก./ล. เป็นเวลา 15 นาที มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NN(Nitsch&Nitsch)เติม NAA เข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงยอดในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนย้ายไปเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกับข้างต้นเป็นเวลาอีก 6 สัปดาห์ ตรวจผลการชักนำราก (อัตราการสร้างราก จำนวนราก/ยอด และความยาวราก)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัวอย่าง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวม

การเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TU เข้มข้น 0.25 และ 1 มก./ล. สร้างยอดรวมสูงสุด 100% แต่ในอาหารสูตรที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TU เข้มข้น 0.75 มก./ล. ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยสูงสุด 4ยอด (Table1 Figure1A 1B) และพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนข้อโดยตัดปลายด้านเหนือข้อให้มีความยาวมากส่งเสริมการสร้างยอดรวมขนาดเล็กจำนวนมาก (>10 ยอด/ชิ้นส่วน) โดยไม่ผ่านการสร้างแคลลัส (Figure 2A) สำหรับชิ้นส่วนรากนั้นให้การสร้างยอดรวมโดยตรง ไม่ผ่านการสร้างแคลลัสได้เช่นกันจำนวน3-5 ยอด/ราก (Figure 2B)

2. อิทธิพลของการเตรียมใบต่อการชักนำยอดโดยตรงจากใบส้มแขก

จากการเพาะเลี้ยงยอดส้มแขกในอาหาร 3 วิธี พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งหรืออาหารเหลวเพียงอย่างเดียวไม่เกิดการสร้างยอด แต่ในการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวสลับกัน พบว่ามีการสร้างยอดโดยตรงจากใบ (Figure3) มีอัตราการสร้างยอด 56.17% จำนวนยอดเฉลี่ย 2.64 ยอดต่อใบ (Table2) ซึ่งเป็นรูปแบบอาหารที่เหมาะสมในการเตรียมใบเพื่อชักนำยอดโดยตรงอย่างไรก็ตามจำนวนยอดที่ได้ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงใบมังคุด (สมปอง, 2540) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุ์ที่แตกต่างกัน และการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ในกรณีส้มแขกไม่ตอบสนองต่อการสร้างแอนโธไซยานินเมื่อใช้ TDZ ในขณะที่ใบมังคุดตอบสนองได้มากกว่า 50% และแอนโธไซยานินเป็นตัวส่งเสริมการสร้างยอดจำนวนมากโดยตรงจากใบ (>50 ยอด/ใบ) (สมปอง, 2540)

3. เนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดยอด

เมื่อตรวจสอบกำเนิดของยอดจำนวนมากที่พัฒนาจากชิ้นส่วนของลำต้นด้านเหนือข้อพบว่า ยอดดังกล่าวพัฒนามาจากเซลล์เดี่ยวๆ หรือกลุ่มเซลล์บริเวณเซลล์ผิวของลำต้น (Figure 2C) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงใบมังคุด แต่ในมังคุดไม่มีรายงานการชักนำยอดรวมโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนราก และข้อที่มีปลายยาว (สมปอง, 2540)

4.ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำราก

อาหารสูตร NN เติม NAA ทุกความเข้มข้นชักนำรากได้ไม่แตกต่างกัน (55%)NAA เข้มข้น 0.25 มก./ล. ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 1.48 ซม. (Table3) ต้นกล้าที่ชักนำรากได้แล้วเมื่อนำไปอนุบาลนอกหลอดทดลองโดยปลูกในกระถางที่มีผสม ขุยมะพร้าว เวอมิคูไรท์ และพีทมอส ในอัตราส่วน 1 :1 : 1 เป็นเวลา 12 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 38.89% (Figure4) เนื่องจากใบส้มแขกมีลักษณะบาง มีนวลและไขน้อยเมื่อเทียบกับใบมังคุด ดังนั้นการคายน้ำในช่วงแรกสูงมาก ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตต่ำ ดังนั้นก่อนอนุบาลลงดินปลูกอาจต้องเติมพาโคลบิวทราโซลลงไปเพื่อปรับโครงสร้างของใบช่วยให้อัตรารอดสูงขึ้น

สรุปผล

ชิ้นส่วนข้อ และข้อที่มีปลายด้านยาว และใบของส้มแขกให้การพัฒนาเป็นต้นโดยตรงได้ง่าย โดยเฉพาะข้อที่มีปลายด้านยาว และใบมีกำเนิดของยอดมาจากเซลล์ผิวเพียงเซลล์เดียวในอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TU เข้มข้น 1 มก./ล. ดังนั้นการใช้ชิ้นส่วนดังกล่าวเพื่อการขยายพันธุ์ อนุรักษ์พันธุกรรม และปลูกถ่ายยีนเพื่อสร้างส้มแขกพันธุ์ใหม่ในอนาคตที่สร้างสาร HCA จำนวนมากมีโอกาสเป็นไปได้สูงมาก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และสถานวิจัยความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรและทรัพยากรคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ธนิตย์ หนูยิ้ม สุวิทย์ ไทยนุกูล อุบล รักษาศรี และอรดา เจธาหวัง. 2543. ไม้ส้มแขกไม้ป่าเศรษฐกิจชนิดใหม่ของภาคใต้. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการศูนย์วิจัยและการศึกษาทางธรรมชาติป่าพรุสิรินธร โครงการศูนย์ศึกษาพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (งานป่าไม้). หน้า 1-7.

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และสมปอง เตชะโต. 2541. การชักนำรากจากยอดส้มแขกที่ชักนำในหลอดทดลอง. แก่นเกษตร 26: 74-84.

ราตรี สุจารีย์ และ สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มแขก. แก่นเกษตร 24:14-22.

สมพร จันทเดช. 2538. ส้มแขก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. หน้า 4-7.

สมปอง เตชะโต. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด *(Garciniamangostana* L.) พะวา (*G.speciosa* Wall.) และส้มแขก (*G.atroviridis*Griff). ว. สงขลานครินทร์ วทท.19: 147-155.

Table1 Effect of plant growth regulators on proliferation of shoot from culturing nodal explant on WPM medium for one month.

PGR (mg/l)	Multiple shoot formation (%)	Avg. no. of shoot
BA(0.5)+TU(0.25)	100	3.13
BA(0.5)+TU(0.5)	93.33	3.88
BA(0.5)+TU(0.75)	86.67	4.00
BA(0.5)+TU(1)	100	3.8
F-Test	ns	ns
C.V. (%)	8.59	40.87

ns = not significant difference

Table 2 Effect of leaf preparation on direct shoot formation prior culturing on WPM+0.5BA + 0.5TUfor one month.

Treatments	Avg. leaf forming shoot (%)	Avg. no. of shoots/leaf
SM	0^{b}	0^{b}
SM+LM+SM	56.17^{a}	2.64^{a}
LM	0^{b}	0^{b}
F-Test	**	**
C.V. (%)	11.78	36.31

** : Significant difference at p<0.01 Means sharing letters in common is not significant difference by DMRT. SM: Solidified medium, LM: Liquidified medium

Table 3 Effect of concentrations of NAA containing NN medium on root induction from excised single shootafter one month of culture.

PGR (mg/l)	Avg. shoot forming root(%)	Avg. root number	Avg. root length (cm)
NAA (0.25)	55.56	1.5	1.48
NAA (0.5)	55.56	2.67	0.97
NAA (0.75)	55.56	1.67	1.15
NAA (1.00)	55.55	1.33	1.25
F-Test	ns	ns	ns
C.V. (%)	36.56	54.04	56.62

ns: not significant difference

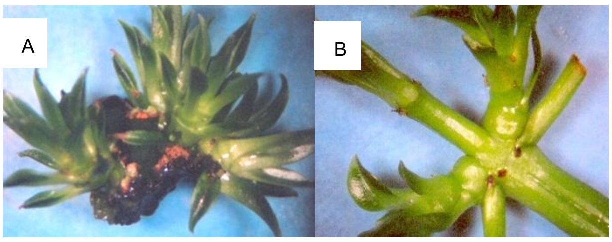


Figure 1 Multiple shoots of somkhag from cultured nodal explants (A) and shoot tip with one node (B) on WPM medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l TU for one month.

Figure 2 Development of cultured nodal explantswith long distal end (A), root (B) and histology of shoot on nodal explants with long distal end (C) on WPM medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l TU for one month.

Figure 3 Direct shoot formation from culturing leaf onWPM+0.5BA + 0.5TUfor one month. (The leaf was prepared by culturing shoot on solidified WPM for one month follow by liquidified WPM medium for further one month)

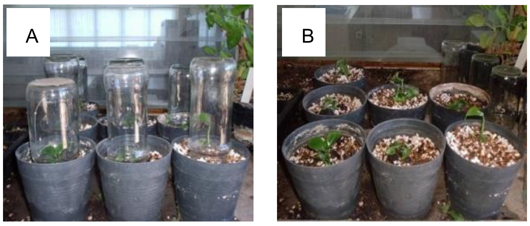


Figure 4 Acclimatization of complete plantlets to soil vermiculite mixture containing 4 inch pot.
A: control humidity for first week
B: survive under greenhouse conditions

การขยายพันธุ์มะดัน (*Garcinia schomburgkiana* Pierre.) ในหลอดทดลอง
In vitro propagation of*Garcinia schomburgkiana* Pierre.

สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1] และสมปอง เตชะโต[1]
Sureerat Yenchon[1] and Sompong Te-chato[1]

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
[1]Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

Abstract

In vitro propagation of *Garciniaschomburgkiana* Pierre.was carried out using apomict seeds which weresurface sterilized and cross-sectionally cut into 2 mm segment. The explants were cultured on solidified MS medium supplemented with 5 mg/l BA, 500 mg/l PVP and 0.2% phytagel. The results revealed that the explants gave the percentage of multiple shoot formation at 100%. For shootmultiplication, cluster of shoot (1 cm in diameter) were separated and transferred to culture on solidified MS medium supplemented with 0-5 mg/l BA. The results showed that 5 mg/l BA gave the highestshoot numbers at 16.34 shoots/explant while the medium without BA gave a maximum number of elongated shoot (3 cm) at 9 shoots/explants, significantly different with another treatment. The shoots at 3 cm in length were excised and rooted on solidified MS medium supplemented with NAA or IAA at 0.5 and 1.0 mg/l. The suitable auxin for root induction was NAA at 0.5 mg/l which gave the percentage of rooting and average root number at 57.14% and 2.07 roots/shoot, respectively after culture for 6 weeks.By this technique,*Garciniaschomburgkiana* Pierre.could be multiplied and conserved *in vitro* as genetic source for further improvement of *Garcinia*spp. in the future.

Keywords: shoot clumps, *In vitro* propagation, *Garcinia schomburgkiana* Pierre.

บทคัดย่อ

การศึกษาการขยายพันธุ์มะดันในหลอดทดลอง ทำโดยการนำเมล็ดมะดันที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดตามขวางให้มีความหนา 2 มิลลิเมตร แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagelเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีการสร้างยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มปริมาณยอดรวมทำโดยตัดแยกกลุ่มยอดรวมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่า BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 16.34 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนอาหารที่ไม่เติม BA ส่งเสริมให้ยอดมีการยืดยาวได้ดีกว่าซึ่งให้ยอดที่มีความสูงมากกว่า 3 เซนติเมตร จำนวน 9 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับทรีตเมนต์อื่นๆ และเมื่อตัดแยกยอดเดี่ยวๆ มาชักนำรากบนอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA หรือ IAA เข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารเติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการชักนำรากมากที่สุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การสร้างราก 57.14 เปอร์เซ็นต์ และให้

จำนวนรากเฉลี่ย 2.08 รากต่อชิ้นส่วน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ วิธีการดังกล่าวใช้ในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมมะดันในหลอดทดลองเพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชในสกุล *Garcinia*ต่อไปในอนาคต
คำสำคัญ: ยอดรวม การขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง มะดัน

คำนำ

มะดัน (*Garcinia schomburgkiana* Pierre.) เป็นไม้ผลประเภทไม้ยืนต้นชนิดหนึ่งในวงศ์ Cruciaceae ผลมีลักษณะยาวรีสีเขียวมีรสชาติเปรี้ยวมาก มีวิตามินซีสูง ยอดอ่อน และใบอ่อนนำมาประกอบอาหารได้ ปัจจุบันพบต้นมะดันในพื้นที่ทุกภาคของประเทศไทยแต่พบในปริมาณน้อยเนื่องจากการทำลายพืชป่าดั้งเดิมมีมากขึ้น ความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จึงมีสูงมาก การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุกรรมจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง สำหรับการขยายพันธุ์พืชสกุล *Garcinia*ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น มีรายงานในมังคุด (สมปอง, 2540) ส้มแขก (พจมาลย์ และสมปอง, 2541) และพะวา (สมปอง, 2540) สำหรับมะดันได้มีการศึกษาชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ แต่แคลลัสไม่สามารถเพิ่มปริมาณและชักนำยอดได้สำเร็จ (ลัดดาวัลย์, 2544) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ชิ้นส่วนเมล็ดเพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต้นมะดันในหลอดทดลอง เพื่อขยายพันธุ์จำนวนมาก อนุรักษ์พันธุกรรม และใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์มะดันและพืชในสกุล *Garcinia* ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

4. ศึกษาการชักนำยอดจากชิ้นส่วนเมล็ด

ตัดแยกเมล็ดมะดันจากผล ฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการมาตรฐาน ตัดเมล็ดตามขวางให้มีความหนา 2 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA (6-benzyladenine) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP (Polyvinylpyrrolidone) เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagelเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (สมปอง, 2540) หลังเพาะเลี้ยง 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดและจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน

2. ความเข้มข้นของ BA ต่อการพัฒนาของยอดรวม

ตัดแบ่งกลุ่มยอดรวมให้มีขนาด 1 เซนติเมตร (5-6 ยอด) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0 0.5 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น phytagelเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วันบันทึกการเกิดยอดรวม

3. ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำราก

นำยอดมะดันที่มีความสูง 2-3 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA หรือ IAA เข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากต่อต้น

สภาพการเพาะเลี้ยงและแผนการทดลอง

ในทุกการทดลองวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ อุณหภูมิ 26 $\pm$2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวันและวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design)เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's multiple range tests)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาการชักนำยอดจากชิ้นส่วนเมล็ด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ด บนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยง 30 วัน ชิ้นส่วนมีการสร้างตายอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1A) และเมื่อเพาะเลี้ยงต่ออีก 20 วัน (รวมเวลาการเพาะเลี้ยง 50 วัน) โดยไม่มีการย้ายเลี้ยง พบว่า มีการสร้างตายอดเพิ่มขึ้น ซึ่งให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 20 ยอดต่อชิ้นส่วน(Figure 1B) เมื่อย้ายกลุ่มของยอดรวมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม พบว่า มีการเพิ่มจำนวนยอดแต่ไม่มีการยืดยาว และมีการตายเกิดขึ้น (Figure 1C) แสดงว่า BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมในการชักนำยอดแต่ไม่เหมาะสมในการพัฒนาของยอด สอดคล้องกับ สมปอง และ วันทนา (2531) ซึ่งรายงานว่าการเพาะเมล็ดมังคุดบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นสูงชักนำยอดได้มากแต่การเจริญเติบโตและการยืดยาวของยอดไม่ดี

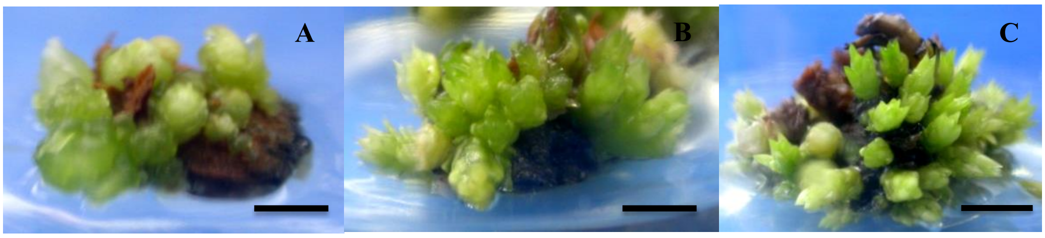


Figure 1 Multiple shoots of madan from cultured cross-sectionally seed segments for 30 days (A), 50 days (B) and shoot multiplication (C) on MS medium supplemented with 5 mg/l BA (bar= 0.3 cm).

2. ความเข้มข้นของ BA ต่อการพัฒนาของยอด

จากการตัดแยกกลุ่มยอดรวมไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 16.34 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนอาหารที่ไม่เติม BA ส่งเสริมให้การพัฒนาของยอดได้ดีกว่าซึ่งให้ยอดที่มีความสูงมากกว่า 3 เซนติเมตร จำนวน 9 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นอื่นๆ (Table 1 และ Figure 2)สอดคล้องกับ สมปอง และ วันทนา (2531) ซึ่งรายงานว่าเมื่อย้ายยอดรวมขนาดเล็กของมังคุดไปเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้นต่ำ ส่งผลให้ยอดยืดยาวได้เร็วขึ้น

Table1 Effect of concentrations of BA on shoot development from cluster of shoots after 45 days of culture on MS medium supplemented with 3% sucrose and 0.2% phytagel.

BA (mg/l)	No. of shoots/explants			Total number of shoots/explant
	Less than1 cm height	1-3 cm height	More than 3 cm height	
0	1.33c	2.00	9.00a	12.33
0.5	2.33c	2.67	7.33a	12.33
3.0	8.67b	2.33	2.00b	13.00
5.0	13.67a	2.67	0.00c	16.34
F-test	*	ns	*	
C.V. (%)	14.04	35.83	22.70	

* : Significant difference at p<0.05, ns: not significant difference
Means sharing letters in common is not significant difference by DMRT.

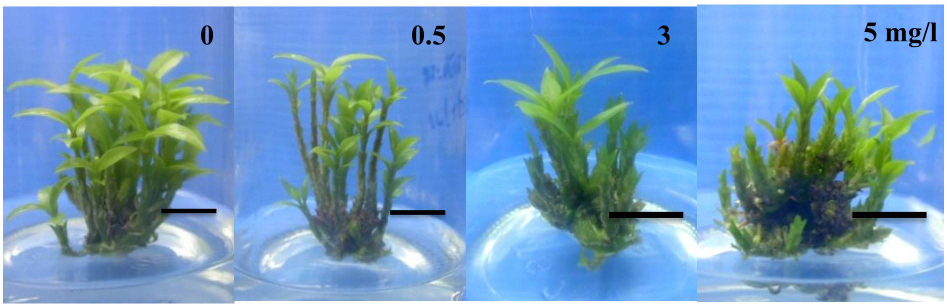


Figure 2 Effect of concentrations of BA on shoot development from cluster of shoot after 45 days of culture on MS medium supplemented with 3% sucrose and 0.2% phytagel (bar= 1 cm).

4. ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำราก

จากการตัดยอดเดี่ยวๆ ที่มีความสูง 2-3 เซนติเมตร มาชักนำรากพบว่า อาหารเติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำราก โดยให้เปอร์เซ็นต์การสร้างราก 57.14 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนรากเฉลี่ย 2.08 รากต่อชิ้นส่วน รากมีขนาดใหญ่กว่าในอาหารที่เติม IAAหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (Table 2 และ Figure 3) สอดคล้องกับ สมปอง และคณะ 2554 พบว่า NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การเกิดรากในส้มแขกได้สูงสุด

Table 3 Effect of types andconcentrations of auxin on root induction from excised single shootafter 6 weeks of culture.

PGR (mg/l)	Avg. shoot forming roots(%)	Avg. root number
free	0.00c	0.00d
NAA (0.5)	57.14ab	2.08a
NAA (1.0)	23.81bc	1.55b
IAA (0.5)	33.33ac	1.16c
IAA (1.00)	61.91a	1.25bc
F-Test	**	**
C.V. (%)	84.10	37.98

* * Significant difference at p<0.01
Means sharing letters in common is not significant difference by DMRT

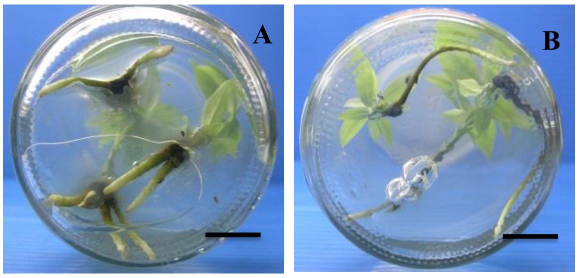


Figure 3 Characters of roots induced on NAA (A) and IAA (B) containing MS medium supplemented with 3% sucrose and 0.2% phytagelafter 6 weeks of culture

สรุปผล

อาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มยอดรวมมีการพัฒนาได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมในการชักนำราก ดังนั้นการใช้ชิ้นส่วนและสูตรอาหารดังกล่าวเพื่อการขยายพันธุ์ อนุรักษ์พันธุกรรมของมะดันในหลอดทดลองจำนวนมากมีโอกาสเป็นไปได้สูงมาก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และสมปอง เตชะโต. 2541. การชักนำรากจากยอดส้มแขกที่ชักนำในหลอดทดลอง. แก่นเกษตร 26: 74-84.

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ. 2544. การชักนำแคลลัส การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบพืชในตระกูล *Garcinia*บางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด (*Garciniamangostana* L.) พะวา (*G.speciosa* Wall.) และส้มแขก (*G.atroviridis*Griff). ว. สงขลานครินทร์ วทท.19: 147-155.

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง. 2531. การขยายพันธุ์มังคุดจำนวนมากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. สงขลานครินทร์ 10: 7-11.

สมปอง เตชะโต สุรีรัตน์ เย็นช้อน และ ลินดา สายยนต์. 2554. ผลของชิ้นส่วนและสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงส้มแขกในหลอดทดลอง. ว.วิทย.กษ. 42 3/1 (พิเศษ): 151-154.

7. <u>ผลงานที่ได้รับรางวัล</u>

- ผลงานเรื่อง ผลของชิ้นส่วนและสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงส้มแขกในหลอดทดลอง ได้รับรางวัลดีเยี่ยมในการนำเสนอผลงานภาคบรรยาย สาขา เครื่องเทศและสมุนไพร ในงานประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 10

งานประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 10
Hort for Wealth & Well-being

การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ ๑๐
The 10th National Horticultural Congress 2011

ขอมอบใบประกาศเกียรติคุณรางวัลดีเยี่ยม
ในการนำเสนอผลงานภาคบรรยาย สาขา เครื่องเทศและสมุนไพร

เรื่อง ผลของชิ้นส่วนและสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงส้มแขกในหลอดทดลอง

ให้แก่

สมปอง เตชะโต สุรีรัตน์ เย็นช้อน และ ลินดา สายยนต์

มอบให้ไว้ ณ วันที่ ๒๐ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๔

(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนพิภพ เกษมทรัพย์)
ประธานคณะกรรมการดำเนินการจัดการประชุมพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๑๐

- ผลงานเรื่องการใช้โฟลไซโตเมทรีตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในไม้ผลบางชนิด ได้รับรางวัลรองชนะเลิศในการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 12

HORTICULTURAL SCIENCE SOCIETY OF THAILAND

สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย

สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย

ขอมอบใบประกาศเกียรติคุณ

รางวัลรองชนะเลิศ

นำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์

เรื่อง การใช้โฟลไซโตเมรีตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในไม้ผลบางชนิด

ให้แก่

สมปอง เตชะโต และ สุรีรัตน์ เย็นช้อน

ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ ๑๒

วันที่ ๙-๑๒ พฤษภาคม ๒๕๕๖ ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพฯ

มอบให้ไว้ ณ วันที่ ๑๑ พฤษภาคม ๒๕๕๖

(นายอนันต์ ดาโลดม)

นายกสมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย

สกว TRF

กรมวิชาการเกษตร