ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและราก จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลิน (*Bacopa caroliniana* (Walt) Robins.) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

SENGSOULICHAN DETHVONGSA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤศจิกายน 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ SENGSOULICHAN DETHVONGSA ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร. วาสินี พงษ์ประยูร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ศิริพรรณ บรรหาร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ตร. ดรรชิต ธรรมศิริ)

.....กรรมการ
(ดร. วาสินี พงษ์ประยูร)

.....กรรมการ
(ดร. ศิริพรรณ บรรหาร)

.....กรรมการ
(ดร.สลิล ชั้นโรจน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 14 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.วาสินี พงษ์ประยูร อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ดร.ศิริพรรณ บรรหาร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต ธรรมศิริ อาจารย์ประจำภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบ ให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ตรวจแก้ไขและวิจารณ์ผลงานทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สลิล ชั้นโรจน์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาอบบรมสั่งสอนให้ความรู้และแง่คิดการใช้ชีวิตในสังคมแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลา 2 ปี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่เอื้อเฟื้อสถานที่วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับทำการทดลองครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานความร่วมมือเพื่อการพัฒนาระหว่างประเทศ (TICA) ที่ได้ให้เงินทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ผู้เป็นที่รัก ผู้ให้กำลังใจและให้โอกาสการศึกษาอันมีค่ายิ่ง

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

SENGSOULICHAN DETHVONGSA

56920799: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)
คำสำคัญ: ลานไพลิน / การชักนำยอด / การชักนำราก

SENGSOULICHAN DETHVONGSA: ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลิน (*Bacopa caroliniana* (Walt) Robins.) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON SHOOT AND ROOT INDUCTION FROM DIFFERENT EXPLANTS OF *Bacopa caroliniana* (Walt) Robins. IN VITRO) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วาสินี พงษ์ประยูร, ปร.ด. ศิริพรรณ บรรหาร, ปร.ด. 67 หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

จากการนำชิ้นส่วนปลอดเชื้อของลานไพลินได้แก่ ปลายยอด ข้อที่สองจากปลายยอด ข้อที่สามจากปลายยอด และใบมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน เพื่อชักนำให้เกิดยอด ผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และมียอดเฉลี่ยสูงสุด 20.20±1.44 ยอดต่อชิ้นส่วน สำหรับผลของสูตรอาหารที่เติม ในทุกระดับความเข้มข้นไม่มีการตอบสนองในการชักนำยอดแต่พัฒนากลายเป็นแคลลัสทั้งหมด หลังจากนั้นนำยอดเดี่ยวที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่ายอดเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงสุดคือ 93.70±7.15 รากต่อยอด หลังจากนั้นทำการย้ายปลูกต้นกล้าในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติโดยใช้วัสดุปลูก 3 ชนิดได้แก่ ขุยมะพร้าว ทราย และดินร่วนผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 ตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้าลานไพลินมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ในทุกวัสดุปลูกหลังจากย้ายปลูกตามสภาพธรรมชาติ

56920799: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGY EDUCATION)
KEYWORDS: *Bacopa caroliniana* (Walt) Robins/ SHOOT INDUCTION/ ROOT INDUCTION

SENGSOULICHAN DETHVONGSA: EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON SHOOT AND ROOT INDUCTION FROM DIFFERENT EXPLANTS OF *Bacopa caroliniana* (Walt) Robins. IN VITRO. ADVISORY COMMITTEE: WASINEE PONGPRAYOON, Ph.D., SIRIPAN BANHARN, Ph.D. 67 P. 2015.

The explants of sterile *Bacopa caroliniana* (Walt) Robins. i.e. shoot tip, the second node from the top, the third node from the top and leaves were cultured on MS agar medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and kinetin with the concentrations of 0.1, 0.2 0.4 and 0.6 mg/L, as well as thidiazuron (TDZ) at the concentrations of 0.05, 0.1, 0.2 and 0.3 mg/L. After culture for 60 days for shoot induction, the results showed that the best responding explants were leaves that cultured on MS agar medium supplemented with 0.6 mg/L BAP and showed the highest shoot induction of 20.20±1.44 shoots per explant. All explants were cultured on MS agar medium supplemented with TDZ not responded and formed to callus in all concentrations, After shoot induction period, single shoot was separated and cultured on MS agar medium supplemented with IAA, NAA and 2,4-D at the concentrations of 0.1, 0.2 0.4 and 0.6 mg/l. After culture for 30 days for root induction, the results showed that the highest root regeneration was 93.7±7.15 roots per shoot on MS medium supplemented with NAA 0.6 mg/L. Then, seedlings were transferred to natural conditions by using 3 planting materials; coir, sand and loam which were mixed with the ratio of 1:1:1, 1:2:1, and 1:1:2, respectively. The results showed that *B.caroliniana* (Walt) Robins. seedlings had the survival rates of 100% in all planting materials.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการทดลอง 2

สมมุติฐานของการทดลอง 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

ขอบเขตการทดลอง 3

สถานที่ในการทดลอง 3

ระยะเวลาของการทดลอง 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลานไพลิน 5

ชิ้นส่วนพืช (Explants) ที่นำมาเพาะเลี้ยง 7

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) 8

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพืชเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (Morphogenesis in Plant Tissue Culture) 10

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดและราก 11

3 วิธีดำเนินการวิจัย 15

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 15

วิธีการทดลอง 16

4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง 26

ผลการทดลอง 26

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	อภิปรายผลการทดลอง	35
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	38
	สรุปผลการทดลอง	38
	ข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม		39
ภาคผนวก		43
	ภาคผนวก ก	44
	ภาคผนวก ข	47
ประวัติย่อของผู้วิจัย		67

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่เติมลงในอาหารสูตร MS (1962) ที่ใช้ในการชักนำยอดของลานไพลิน 18

3-3 แผนการทดลองในการชักนำให้เกิดยอดของลานไพลิน 22

3-2 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เติมลงในอาหารสูตร MS ที่ใช้ในการชักนำรากของลานไพลิน 23

4-1 ผลของอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BAP และ Kinetin ร่วมกับชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน 27

4-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการชักนำให้เกิดยอดจากอาหารสูตร MS โดยใช้ชิ้นส่วนที่แตกต่างกันร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน 30

4-3 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน 30

4-4 จำนวนยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลานไพลินบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไวไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน 31

4-5 จำนวนรากเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลานไพลินบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของออกซินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน 32

4-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการชักนำให้เกิดรากจากอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของออกซินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน 33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะลำต้น ใบ และดอกของลานไพลิน	6
2-2	การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพืชเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ	11
2-3	สัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่มีผลต่อการพัฒนาของพืช	12
3-1	ลักษณะการตัดชิ้นส่วนปลายยอดจากต้นกล้า	18
3-2	ลักษณะการตัดชิ้นส่วนข้อที่ 2 นับจากปลายยอดจากต้นกล้า	19
3-3	ลักษณะการตัดชิ้นส่วนข้อที่ 3 นับจากปลายยอดจากต้นกล้า	19
3-4	ลักษณะการตัดชิ้นส่วนใบข้อที่ 2 นับจากปลายยอดจากต้นกล้า	20
3-5	แผนผังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนส่วนต่าง ๆ ของลานไพลินเพื่อชักนำให้เกิดยอด	21
3-6	แผนผังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลานไพลินเพื่อชักนำให้เกิดราก	24
4-1	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินคือ BAPและ Kinetin (KN) ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆของลานไพลิน เป็นระยะเวลา 60 วัน	28
4-2	ชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนินในระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	29
4-3	ผลความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินคือ NAA และ IAA ที่มีต่อการชักนำให้ เกิดรากจากการเพาะเลี้ยงยอดเดี่ยวเป็นระยะเวลา 30 วัน	33
4-4	รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมออกซินในระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	34
4-5	ต้นอ่อนของลานไพลินที่นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 2 สัปดาห์	35

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พรรณไม้น้ำสวยงามสำหรับประดับตู้ปลาเป็นพรรณไม้น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในปัจจุบัน เนื่องจากได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในหลายประเทศจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มผลผลิต เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถทำให้ได้ผลผลิตได้เป็นจำนวนมากและยังมีประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ ปัจจุบันพรรณไม้น้ำได้รับความนิยมนำมาใช้ประดับตู้ปลาเพื่อเพิ่มทัศนียภาพและให้ความเพลิดเพลินกับผู้เลี้ยงปลาสวยงามทำให้มีการทำธุรกิจพรรณไม้น้ำควบคู่ไปกับการเลี้ยงปลาสวยงามซึ่งสามารถเพิ่มรายได้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ และการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทยยังคงมีแนวโน้มที่ดีอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะพรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทยที่เป็นเอกลักษณ์ได้แก่ หอมน้ำ ไส้ปลาไหล บอนแดง สาหร่ายคาบอมบา ใบพาย หยดน้ำตาอเมซอน ลัตวิเจียแดง สาหร่ายขนนก หญ้าน้ำ เทปเกลียว รวมทั้งลานไพลินด้วยซึ่งจัดเป็นพรรณไม้น้ำที่ตลาดต่างประเทศมีความต้องการสูงเนื่องจากมีคุณสมบัติของสีสันและรูปทรงสวยงามจึงถือเป็นพรรณไม้น้ำอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ประดับตู้ปลาเช่นเดียวกัน (เกศสุดา แสงมณี, 2552)

นอกจากพรรณไม้น้ำจะให้ความสวยงามของตู้ปลาแล้ว พรรณไม้น้ำยังเป็นที่หลบภัยและวางไข่ของปลา ทั้งยังช่วยกำจัดของเสียที่ปลาขับออกมาโดยของเสียนี้นำไปใช้เป็นปุ๋ยสำหรับการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำ นอกจากนี้พืชยังสามารถนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปลาปลดปล่อยออกมาจากการหายใจไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ด้วยและจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพรรณไม้น้ำยังมีการผลิตก๊าซออกซิเจนเกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการปลูกพรรณไม้น้ำในตู้ปลาจึงช่วยลดปริมาณของเสียและช่วยเพิ่มปริมาณก๊าซออกซิเจนในตู้ปลาได้อีกด้วย (วารสารกสิกร, 2553)

พรรณไม้น้ำประดับตู้ปลานั้นอาจถูกมองข้ามความสำคัญไปเพราะพรรณไม้น้ำของไทยนั้น บางชนิดไม่เป็นที่รู้จัก แต่เนื่องจากการเพาะเลี้ยงพรรณไม้น้ำนั้นกำลังเป็นที่นิยม ทำให้พรรณไม้น้ำของไทยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีปริมาณลดลง ซึ่งบางชนิดเป็นพรรณไม้น้ำที่หายากและมีแนวโน้มสูญพันธุ์ในธรรมชาติได้ ดังนั้นพรรณไม้น้ำที่ประดับตู้ปลานั้น จึงเป็นสินค้าที่มีความต้องการสูงทำให้เพาะเลี้ยงและมีการขยายพันธุ์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งประเทศไทยมีศักยภาพในการเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำ ทั้งในพันธุ์ท้องถิ่นของไทยเองและพันธุ์ต่างประเทศ ซึ่งการขยายพันธุ์โดยทั่วไปใช้เมล็ด รวมทั้งชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชน้ำ เช่น หน่อ ไหล หรือเหง้า แต่การเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำนั้นยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย และยังมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายเพิ่มปริมาณพืชชนิดนี้ในวงแคบ (กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ, 2542)

ในปัจจุบันจะเห็นได้ว่าการใช้เทคโนโลยีชีวภาพโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทอย่างมากในด้านการผลิตพืชเพื่อให้ได้ปริมาณมากๆ สามารถเพิ่มจำนวนได้เป็นทวีคูณ และมีคุณภาพสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตลานไพลินให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ต้นพันธุ์มีคุณภาพสูง ปลอดโรค มีปริมาณเพียงพอตามความต้องการของตลาด ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการเพาะเลี้ยงลานไพลินโดยการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ให้มากขึ้น ซึ่งได้มีการเปรียบเทียบชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากรวมทั้งศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากนำไปปลูกด้วยวัสดุที่มีอัตราส่วนแตกต่างกันในเรือนเพาะชำ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการเพาะเลี้ยงลานไพลิน เพื่อพัฒนาธุรกิจการผลิตลานไพลินต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของไซโตไคนินที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด
2. เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของออกซินที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก
3. เพื่อศึกษาการปรับตัวและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกของลานไพลิน

1.3. สมมุติฐานของการทดลอง

1. ชนิดและระดับความเข้มข้นของไซโตไคนินที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำยอดที่แตกต่างกัน

2. ชนิดและระดับความเข้มข้นของออกซินที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักรากของลานไพลินที่แตกต่างกัน

3. การปรับตัวของลานไพลินเมื่อย้ายปลูกโดยการใช้วัสดุที่แตกต่างกันจะมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของลานไพลินแตกต่างกัน

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณยอดและรากของลานไพลิน

2. ทราบถึงชนิดวัสดุปลูกและสภาพที่เหมาะสมในการปรับตัวเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของลานไพลินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.5. ขอบเขตการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ประกอบด้วย 2 การทดลองได้แก่

1. การหาอัตราความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดและราก

2. การหาชนิดวัสดุปลูกและสภาพที่เหมาะสมในการปรับตัวเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของลานไพลินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ ลานไพลิน (*Bacopa caroliniana* (Walt) Robins.) และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ประกอบด้วยกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ BAP (6-benzylaminopurine), Kinetin และ TDZ (thidiazuron) และกลุ่มออกซินได้แก่ IAA (Indole-3-acetic acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) NAA (Naphthalene acetic acid)

1.6. สถานที่ในการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1.7. ระยะเวลาของการทดลอง

เริ่มทำการวิจัยและศึกษาตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2558 เป็นระยะเวลา 1 ปี

1.8. นิยามศัพท์เฉพาะ

1. Murashige and Skooge, 1962 (MS) เป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย
2. 6-benzylaminopurine (BAP) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin)
3. 6-furfurylaminopurine (kinetin) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin)
4. N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ หรือ thidiazuron) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin)
5. Indole-3-acetic acid (IAA) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (auxin)
6. 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (auxin)
7. naphthalene acetic acid (NAA) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (auxin)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลานไพลิน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Bacopa caroliniana* (Walt) Robins.

วงศ์ : SCROPHULARIACEAE

ชื่อสามัญ : Giant Bacopa Water hyssop

ชื่อไทย : ลานไพลิน

แหล่งกำเนิด : ทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้

ลานไพลิน เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลำต้นกลมเรียวยาวอวบน้ำ ลำต้นชูตั้งตรงสูงประมาณ 10 เซนติเมตร มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ปัจจุบันมีการกระจายพบได้ทั่วโลกชอบขึ้นในที่น้ำขังหรือพื้นดินแฉะ ลานไพลินมีชื่อสามัญอยู่หลายชื่อที่นิยมเรียกกันเช่น Giant Bacopa, Giant Red Bacopa, Lemon Bacopa และ Water Hyssop เป็นต้นและมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bacopa caroliniana* โดยจัดอยู่ในกลุ่มของ Kingdom Plantae Class: Magnoliopsida Family: Scrophulariaceae Genus: Bacopa ประโยชน์ของต้นลานไพลินสามารถใช้ปลูกเป็นไม้ประดับในตู้ปลาหรือในสวนน้ำ มีกลิ่นหอม ออกดอกช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนพฤศจิกายน นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ลานไพลินสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำจืดเหมือนพืชน้ำจืดชนิดอื่น ๆ แต่จะมีลักษณะพิเศษซึ่งแตกต่างกับพืชน้ำจืดชนิดอื่น ๆ คือสามารถเจริญเติบโตในน้ำกร่อยและน้ำเค็มได้ เป็นที่ทราบกันดีว่าลานไพลินมีการแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วในน้ำและสีดอกของมันจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่บ่อย ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแสงที่ได้รับ (วัชรพันธ์ พงษ์รักไทย, 2552) ซึ่งลานไพลินมีลักษณะทั่วไปดังนี้

ลำต้น มีลักษณะกลมใหญ่และมีขนสามารถขึ้นใต้น้ำหรือเลื้อยทอดไปตามพื้นแล้วชูยอดตั้งขึ้นลำต้นที่ขึ้นใต้น้ำอาจสูงถึง 60 เซนติเมตร

ใบ เป็นใบเดี่ยวรูปไข่ส่วนโคนใบกว้างกว่าปลายใบขอบใบเรียบใบจะมีลักษณะคล้ายขี้ผึ้งแตกจากลำต้นแบบตรงกันข้าม ไม่มีก้านใบ โคนใบติดแน่นกับลำต้นขนาดใบยาว 2-3 เซนติเมตร กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร เส้นใบแตกแขนงจากโคนใบ ใบที่เจริญเหนือน้ำจะหนา แข็งและเป็นมันกว่าใบที่เจริญใต้น้ำ

ดอก เป็นดอกเดี่ยวออกตามซอกใบ หรือปลายยอด เจริญเหนือน้ำมีก้านดอกสั้น กลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีเขียว กลีบดอกสีฟ้าครามโคนกลีบติดกันปลายกลีบดอกมี 5 แฉกแยกกันไม่เด่นชัด ภายในมีเกสรตัวผู้ 4 อัน

ผล เป็นผลเดี่ยวแบบ capsule เมื่อผลแก่จะแห้งแตกออกเป็นพูภายในมีเมล็ดเป็นจำนวนมาก

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เป็นพืชที่มีอายุหลายปี ในธรรมชาติชอบขึ้นในที่ลุ่มหรือบริเวณชายน้ำ สามารถเจริญได้ดีในน้ำ ชอบขึ้นในน้ำที่มีอุณหภูมิพอเหมาะ แต่เมื่อนำมาปลูกในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงก็สามารถเจริญได้ดี

การกระจายพันธุ์ ลานไพลินแพร่พันธุ์ได้โดยการใช้เมล็ดและสามารถตัดลำต้นใช้ปักชำได้ ชอบดินเหนียวแฉะและความชุ่มชื้นสูงหรือมีระดับน้ำ ลึก 10-15 เซนติเมตร มีแสงแดดจัด (สุภาพร สุทิน, 2555)

ภาพที่ 2-1 ลักษณะของราก ลำต้น ใบ และดอกของลานไพลิน

(ที่มา: *Bacopa caroliniana* anatomy, 2558)

ก. ราก ข. ลำต้น ค. ใบ ง. ดอก

ชิ้นส่วนพืช (Explants) ที่นำมาเพาะเลี้ยง (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์, 2546)

ทุกส่วนของพืชสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ทั้งนั้น แต่ความสามารถในการเติบโตและการเจริญขึ้นอยู่กับว่ามีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ด้วยโดยชิ้นส่วนพืชที่ได้จากต้นพันธุ์โดยตรง จะเรียกว่า ชิ้นส่วนพืชปฐมภูมิ (primary explants) และเรียกชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่า ชิ้นส่วนพืชทุติยภูมิ (secondary explants) โดยชิ้นส่วนพืชที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้มีดังนี้

1. เนื้อเยื่อเจริญ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อปลายยอด ปลายราก ตาข้าง ตาพิเศษ หรือในลำต้นซึ่งมีแคมเบียม (cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญ

2. ใบ ส่วนใหญ่ใช้ใบที่ยังอ่อนและไม่เจริญเติบโตเต็มที่ โดยตัดใบออกเป็นชิ้นส่วนสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ

3. หัว เป็นพวกพืชจำพวก หอม กระเทียม ลิลลี่ บัวจีน ซึ่งแต่ละกลีบเมื่อนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ จะสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนหัวที่เป็นราก หรือลำต้นสะสมอาหาร เช่น หัวผักกาด สามารถตัดเนื้อเยื่อบริเวณคอร์เทกซ์ (cortex) และไส้ไม้ (pith) มาเพาะเลี้ยงได้

4. เอ็มบริโอ (embryo) เป็นต้นอ่อนซึ่งอยู่ในเมล็ดสามารถเจริญเติบโตได้ง่ายในอาหารเพาะเลี้ยง

5. อวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ ส่วนของอับเรณู ละอองเรณู ออวุล (ovule) นิวเซลลัส (nucellus) ก้านช่อดอก ฐานรองดอก กลีบดอก กลีบเลี้ยง และผลก็สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารได้

สำหรับลานไพลินก็สามารถใช้ทุกส่วนนำมาเพาะเลี้ยงได้เหมือนกันกับพืชชนิดอื่นๆ แต่เนื่องด้วยเป็นพืชที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก การที่จะใช้ ตาข้าง เอ็มบริโอ หรืออวัยวะสืบพันธุ์ ชิ้นส่วนจำพวกนี้ยิ่งมีขนาดเล็กมากจึงไม่นิยมนำมาเพาะเลี้ยง ดังนั้น ชิ้นส่วนที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงจึงได้แก่ ปลายยอด ใบ ลำต้น ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้มากมาย ตัวอย่างในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพรรณไม้น้ำบางชนิด มีดังนี้

Tiwari, Deo Singh and Nath Tiwari (1998) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการชักนำให้เกิดยอดและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์จากชิ้นส่วนของพรมมิ (*Bacopa monnieri*) พบว่า ชิ้นส่วนที่ให้จำนวนยอดได้มากที่สุดคือใบ ตามด้วย ข้อและปล้อง นอกจากนี้ Kane et al. (1999) ใช้ปลายยอดของพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne wendtii* เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne baalansae* ใช้ชิ้นส่วนตายอดเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น (มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ, 2546) ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์ (2550) และ Praveen et al. (2009) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิ (*B. monnieri*) โดยใช้ชิ้นส่วนใบและลำต้น และในการการศึกษาขยายพันธุ์พรมมิของ

Pandiyan and Selvaraj (2012) โดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดและลำต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า ลำต้นมีการตอบสนองที่ดีกว่าปลายยอดและให้ยอดรวมสูงสุด ในการทดลองของ Çinar, Karataș and Aasim (2013) ได้ทำการเพาะเลี้ยงปลายยอด และลำต้นของ Dwarf hygro (*Hygrophila polysperma* [Roxb.] T. Anderson) ที่เป็นไม้น้ำที่มีสรรพคุณทางยาของอินเดีย เช่นเดียวกัน ชิ้นส่วนใบของ Dwarf hygro (*H. polysperma*) ก็สามารถใช้ทำการเพาะเลี้ยงได้ (Karataș et al., 2013)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators)

ปกติเนื้อเยื่อพืชจะสร้างฮอร์โมนขึ้นมาเองตามธรรมชาติ แม้ว่าจะมีในปริมาณเล็กน้อยแต่ก็สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตจนพัฒนาเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ต่อมาได้มีการสังเคราะห์สารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืชขึ้นมา เรียกว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ซึ่งในปัจจุบันก็เรียกทั้งฮอร์โมนพืช (plant hormone) และสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาว่า สารควบคุมการเจริญเติบโของพืช (plant growth regulator) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้กันมากได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน (แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547)

1. ออกซิน (Auxin) ในธรรมชาติฮอร์โมนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการยืดของลำต้นและปล้อง การโค้งเข้าหาสิ่งเร้า (tropism) การยับยั้งการเจริญของตาข้าง (apical dominance) การหลุดร่วงของใบ ดอก ละผล การเกิดรากเป็นต้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำเอาออกซินไปใช้ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเกิดราก ออกซินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีดังต่อไปนี้

IAA	indole-3 acetic acid
IBA	indole-3 butyric acid
NAA	naphthalene acetic acid
NOA	naphthoxy acetic acid
p-CPA	para-chlorophenoxy acetic acid
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid

อย่างไรก็ตาม ออกซินที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ IAA IBA และ NAA เพื่อกระตุ้นให้เกิดรากและใช้ร่วมกับไซโตไคนินเพื่อการเจริญของต้น ส่วน 2,4-D และ 2,4,5-T มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการเจริญของแคลลัส (Callus) ได้ดี โดยทั่วไปละลายออกซินด้วยเอทานอล (ethanol) หรือโซเดียมไฮดรอกไซม์ (NaOH) ที่เจือจางเป็นตัวทำละลาย (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2544)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการใช้ IAA และ NAA ในความเข้มข้นที่ต่ำ โดยการใช้ออกซิน ความเข้มข้นสูงมักจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช เช่น ใบร่วงและต้นชะงักการเจริญเติบโตจนอาจตายได้ ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ, 2542) ส่วนการใช้ 2,4-D ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิด embryogenesis นั้น สามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง และช่วยให้เซลล์ที่กลายพันธุ์ (mutated cells) เพิ่มปริมาณได้รวดเร็ว การใช้ 2,4-D จะต้องระมัดระวังกว่าการใช้ออกซินชนิดอื่น เพราะมีฤทธิ์รุนแรงและสลายตัวยากกว่าออกซินชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Zaerr & Mapes, 1982)

2. ไซโตไคนิน (Cytokinin) ฮอร์โมนกลุ่มนี้มีผลกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเกิดยอดขณะที่ยับยั้งการเกิดรากและกระตุ้นให้เกิดแคลลัสเมื่อใช้ร่วมกันกับออกซินในอัตราส่วนที่เหมาะสม ไซโตไคนินเป็นสารประเภทที่ถูกสร้างขึ้นจากบริเวณปลายรากและใบอ่อน ไซโตไคนินชนิดที่นิยมส่วนใหญ่ใช้มีดังต่อไปนี้

BA	6-benzyladenin
BAP	6-benzylaminopurine
Kinetin	6-furfurylaminopurine
TDZ	N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (thidiazuron)

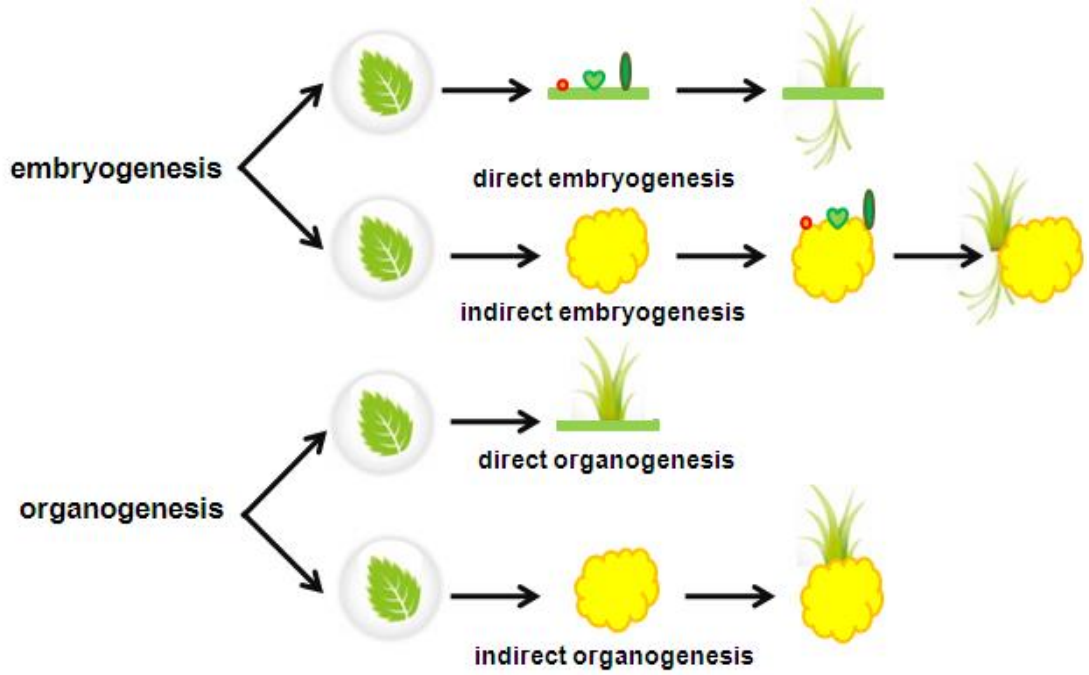
ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำเพื่อเพิ่มปริมาณยอดนั้น มณีรัตน์ หวังพิบูลย์กิจ และอรุณี รอดลอย (2542) พบว่าการเพาะขยายพันธุ์ *Crytocoryne wendtii* โดยใช้ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ดีที่สุด ส่วนการใช้ NAA ไม่มีผลต่อการเกิดต้นอ่อน ในขณะที่ นลินี จักรกริชกูล (2545) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของ *C. wendtii* คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 20 ไมโครโมลลาร์ อุไร เรืองฉรงค์ (2542) ได้ทำการทดลองสูตรอาหาร MS ที่เติม BA และ NAA ปริมาณต่าง ๆ เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอเมซอน (*Echinodorus argentinensis*) พบว่าอาหารที่เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด ส่วน อาหารที่ไม่เติมทั้ง BA และ NAA จะเกิดรากมากที่สุด จากการทดลองของ กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ (2542) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผมหอม (*Cryptocoryne tonkinensis*) พบว่าอาหารสูตร MS ที่ เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ กาญจนรี พงษ์ฉวี (2543) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดของโลบิเลีย (*Lobellia cardinalis*) เกิดยอด และมีการเจริญเติบโตสูงที่ NAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อ ลิตรในอาหารสูตร MS โดยมียอดเฉลี่ย 45 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ สำหรับการทดลอง

ของ ทิพวดี วิเศษสุวรรณ (2544) ได้ทำการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดยอดในออมนาค (*Symgonium* sp.) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ได้จำนวนยอด เฉลี่ยมากที่สุด 4.1 ยอดต่อชิ้น ซึ่งไม่แตกต่างกับสูตรที่เติม BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ลักขณา ต่างใจ (2545) เพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อของแอมมาเนีย (*Ammannia senegalensis*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัม ต่อลิตร จะให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อมากกว่าที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน ระยะเวลา 2 เดือน ส่วนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดรากมากที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติม IBA

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพืชเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

(Morphogenesis in Plant Tissue Culture)

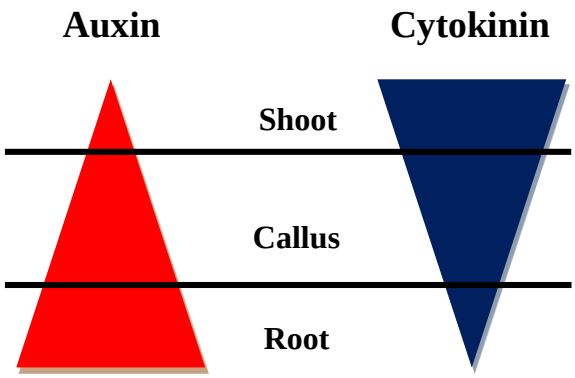
กระบวนการเกิดรูปร่างของพืชสามารถเกิดได้ 2 รูปแบบด้วยกัน คือ embryogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการที่เซลล์ร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นโครงสร้างที่มีทั้งยอดและราก ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตเหมือนกับการเอ็มบริโอที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์ จึงเรียกว่า somatic embryo หรือ embryoid หรือ adventive embryo ซึ่งกระบวนการเกิด somatic embryo สามารถเกิดได้ 2 ลักษณะ คือ direct embryogenesis เป็นการเกิด somatic embryo โดยตรงจากเซลล์หรือกลุ่มเซลล์โดยไม่ผ่านแคลลัส และ indirect embryogenesis เป็นการเกิด somatic embryo จากแคลลัส หรือที่เรียกว่า embryogenic callus โดยการนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อเกิดแคลลัสจึงย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมออกซิน ความเข้มข้นต่ำๆ หรืออาหารที่ไม่เติมออกซินเลย ซึ่งการเจริญในรูปแบบนี้จะพบได้มากกว่าในรูปแบบแรก (direct embryogenesis) อีกรูปแบบหนึ่งคือ organogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการเกิดอวัยวะจากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ คือ เซลล์มีขนาดเล็ก มีแวคคิวโอน้อย ไซโตพลาสซึมหนาแน่น มีเม็ดแป้งขนาดใหญ่ มีความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้ดี เรียกว่า meristemoid หรือ nodule จากจุดนี้จะสามารถเจริญเป็นอวัยวะเพียงชนิดเดียว ซึ่งการเกิดอวัยวะในกระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบคือ direct organogenesis เป็นการเกิดอวัยวะที่เกิดขึ้นโดยตรงจากเนื้อเยื่อ ตายอด หรือตาข้าง โดยไม่มีการเกิดแคลลัสก่อน ส่วน indirect organogenesis เป็นอวัยวะที่เกิดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช โดย embryogenic cell เป็นเซลล์ที่จะเจริญต่อไปเป็น somatic embryo ทั้งโดยตรงหรือผ่านแคลลัส มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ meristemoid ที่เป็นจุดกำเนิดของอวัยวะ ดังที่แสดงตามภาพที่ 2-2 (อุดม นวพานิช, 2549)



ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพืชเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (Morphogenesis in Plant Tissue Culture) (ที่มา: embryogenesis and organogenesis, 2558)

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดและราก (อุดม นวพานิช, 2549)

1. สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) การที่ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นอย่างไรขึ้นอยู่กับสัดส่วนของฮอร์โมนพืช โดยเฉพาะสัดส่วนของฮอร์โมนในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซิน > ไซโตไคนิน) ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นราก (root) ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำ (ออกซิน < ไซโตไคนิน) ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นยอด (shoot) ซึ่งหากสัดส่วนของสมดุลกันเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส ดังภาพที่ 2-3 ซึ่งความเข้มข้นที่จะใช้แปรผันไปตามชนิดพืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง



ภาพที่ 2-3 สัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่มีผลต่อการพัฒนาของพืช
(ดัดแปลงจาก บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2548)

ในปัจจุบันก็มีหลายงานวิจัยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้สัดส่วนความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินในการควบคุมการพัฒนาของต้นพืช เช่น กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโลบิเลีย (*Lobelia cardinalis*) พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อโลบิเลียที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการเจริญพัฒนาเป็นยอดและต้นอ่อนมากที่สุดโดยมียอดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 45 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อมีความสูงของยอดเฉลี่ย 3.02 เซนติเมตร และในทำนองเดียวกัน พิชญ์นรี สิงห์สุวรรณ (2550) ได้ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ลานไพลินในสภาพปลอดเชื้อโดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นของ 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากขึ้นและเหมาะสมในการชักนำให้ความสูงยอดของลานไพลินเพิ่มขึ้นได้มากที่สุด ในขณะที่ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์ (2550) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมออกซินและไซโตไคนิน ที่มีความเข้มข้นต่างกัน พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นของพืชที่เหนี่ยวนำโดยมี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ (2554) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำไทยที่หายาก *Cryptocoryne affinis* โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ร่วมกับ BA ผลการทดลองพบว่า BA และ NAA มีอิทธิพลร่วมกันในการชักนำให้ชิ้นเนื้อเยื่อของใบพาย *C. affinis* เจริญพัฒนาเกิดยอดโดยระดับความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่เหมาะสมคือใช้ BA 1 มิลลิกรัมต่อ

ลิตรร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 7.90±2.41 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อรากเกิดขึ้นเฉลี่ย 11.30±1.49 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อใบเกิดขึ้นเฉลี่ย 25.05±6.12 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และในปีถัดมา กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ (2555) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอเมซอน (*Echinodorus osiris*) โดยการทดลองเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ผลการทดลองพบว่า BA มีผลช่วยในการชักนำให้เกิดยอดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอัตราความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดในขณะที่ NAA ไม่มีผลต่อการเกิดยอดของอเมซอนแดง ($p \leq 0.05$) ในรายงานการทดลองของ Karataş *et al.* (2013) ที่ทำการเพาะเลี้ยง Dwarf hygro (*Hygrophila polysperma*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin หรือ TDZ 0.1-1.6 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว และร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเติม IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ Kinetin หรือ TDZ สามารถช่วยเพิ่มอัตราการชักนำให้เกิดยอดและความยาวของลำต้นได้ดี สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น Kinetin 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ TDZ ร่วมกับ IBA อย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เฉลี่ย 16.33 และ 20.55 ตามลำดับ

2. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบทั่วไปของสูตรอาหารแล้ว ยังพบว่าอาหารที่เติมเสริมเข้าไปมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ กรดอะมิโน (amino acid) เคซิน ไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate) สารสกัดจากข้าว (malt's extract) สารสกัดจากยีสต์ (yeast's extract)น้ำมะเขือเทศ และ น้ำมะพร้าว

3. แหล่งคาร์บอน (carbon sources) แหล่งคาร์บอนที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส อัตราความเข้มข้นที่นิยมใช้คือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ เช่นในรายงานการทดลองของ รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และคณะ (2553) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาวโดยศึกษาอิทธิพลของปริมาณอาหารสังเคราะห์สูตร MS ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับได้แก่ ¼ MS ½ MS ¾ MS และ MS พบว่าอาหารสังเคราะห์ระดับความเข้มข้น ½ MS สามารถชักนำให้เกิดใบอ่อนได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยมีจำนวนใบอ่อนเฉลี่ย 3.79±0.713 ใบต่อชิ้นและมีจำนวนรากที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 3.95±0.705 รากต่อต้น

4. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environmental factors) เช่น แสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องมีความเข้มแสงที่พอเหมาะ 2000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียส และยังต้องการออกซิเจนในการหายใจของเซลล์อีกด้วย เช่นในรายงานการทดลองของ กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ (2555) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอเมซอนแดง (*Echinodorus osiris*) พบว่าการให้แสงที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออเมซอนแดงคือความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งเป็นระยะเวลาให้แสงที่

สามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนอเมซอนแดงได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 4.20±0.36 ยอดต่อชิ้นส่วนมีรากเกิดขึ้นเฉลี่ย 17.03±1.26 รากต่อชิ้นส่วน มีความสูงของลำต้นเฉลี่ย 5.15±0.31 เซนติเมตร และมีจำนวนใบเฉลี่ย 15.00±0.84 ใบต่อต้น

5. สถานะของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (media status) ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเจริญเติบโตได้น้อยกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากพื้นที่ผิวสัมผัสของชิ้นส่วนพืชกับอาหารเหลวได้มากกว่าอาหารแข็ง เช่นในรายงานการทดลองของ Praveen et al. (2009) ได้ทำการศึกษาการชักนำยอดของต้นพรมมิโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว พบว่าอาหารเหลวเหมาะสมต่อการชักนำเพิ่มจำนวนยอดมากที่สุด และ Çinar, Karataș and Aasim (2013) ได้ทำการเพาะเลี้ยง Dwarf hygro (*Hygrophila polysperma* [Roxb.] T. Anderson) ในอาหารอาหารเหลวสูตร MS พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้โดยไม่มีการเกิดเป็นแคลลัส

6. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหาร ถ้าอาหารมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำ หรือ สูงเกินไปจะทำให้พืชไม่สามารถดูดธาตุอาหารมาใช้ได้ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 5.8 แต่ก็สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามชนิดของพืช และจุดประสงค์ของการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Naik et al. (2010) ได้ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงพรมมิเพื่อสร้างการสะสมของสาร bacoside A ผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงพรมมิที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 สามารถชักนำยอดได้มากที่สุด ตามด้วย 5.0 และ 6.5 ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์การทดลอง

1.1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- ขวดขนาด 8 ออนซ์พร้อมฝาปิด
- บีกเกอร์ขนาด 25 30 50 100 500 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- ปิเปตต์ขนาด 1 5 และ10 มิลลิลิตรพร้อมทิปนึ่งฆ่าเชื้อ
- ลูกยางสามทาง
- ช้อนตักสารและแท่งแก้วคนสาร
- กระดาษทิชชู และหนังสือพิมพ์
- เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter CONSORT P800)
- แผ่นให้ความร้อนพร้อมเครื่องกวน (hot plate and magnetic stirrer รุ่น IKAMAX$^{@}$RCT)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง รุ่น Precisa 4000c และ Sartorious BP3100s รุ่นตามลำดับ
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น TOMY ss-325
- ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave)
- ตู้เย็น

1.2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อพืช (Lamina flow รุ่น Astec HLF 1200E)
- ด้ามมีด ใบมีดผ่าตัดและปากคีบ (Forceps)
- สำลีและกระดาษกราฟที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ขวดสำหรับใส่แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- จานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร

2. สารเคมีและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

- สารเคมีที่ใช้เป็นอาหารหลักและอาหารรองของอาหารสูตร MS (1962)
- น้ำตาลทรายขาว
- ผงวุ้น (agar)
- น้ำกลั่น
- สารเคมีใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้แก่ NaOH และ HCl ที่ความเข้มข้น 0.5 N และ 1 N
- สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ BAP (6-benzyl amino purine), Kinetin และ TDZ (thidiazuron) และออกซินได้แก่ IAA (Indole-3-acetic acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy) และ NAA (Naphthalene acetic acid)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหาร

การเตรียมอาหารสูตร MS (1962) ตามวิธีการของ อารยา บุตดี (2555) โดยทำตามลำดับดังนี้

ก. ชั่งสารต่อไปนี้แยกไว้ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลิลิตร

Potassium nitrate (KNO_3)	1.90 กรัม
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1.65 กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4 7H_2O$)	0.37 กรัม
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	0.17 กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ข. เติมสารเคมีที่ละลายไว้แล้วลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลิลิตร ที่เติมน้ำกลั่น 400 มิลิลิตรคนสารละลายให้เข้ากันตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสาร

ค. เติมน้ำตาลทราย 30 กรัม

ง. เติม Stock solution (ลายละเอียดความเข้มข้นของสารใน Stock solution ตามตาราง ก-1 ในภาคผนวก) ตามปริมาตรดังต่อไปนี้

Stock solution 1	10 มิลิลิตร
Stock solution 2	1 มิลิลิตร
Stock solution 3	1 มิลิลิตร
Stock solution 4	1 มิลิลิตร
Stock solution 5	5 มิลิลิตร

จ. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ฉ. ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ช. ปรับ pH ให้ได้ 5.8 ด้วย NaOH 0.5 - 1 N หรือ HCl 0.5 - 1 N

ซ. เติมวุ้น 7 กรัม แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลาย

ฌ. เทใส่ขวดที่เตรียมไว้ ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ญ. หลังจากได้อาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วก็นำไปวางทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วัน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ หากไม่มีการปนเปื้อนก็สามารถนำไปเพาะเลี้ยงต่อได้

2. การเพิ่มปริมาณต้นกล้าของลานไพลินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำลานไพลินที่ปลอดเชื้อมาตัดชิ้นส่วนโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดนำมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) เพื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้าหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน จะได้ต้นกล้าปลอดเชื้อที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้

3. การชักนำให้เกิดยอด

3.1 อาหารชักนำให้เกิดยอด

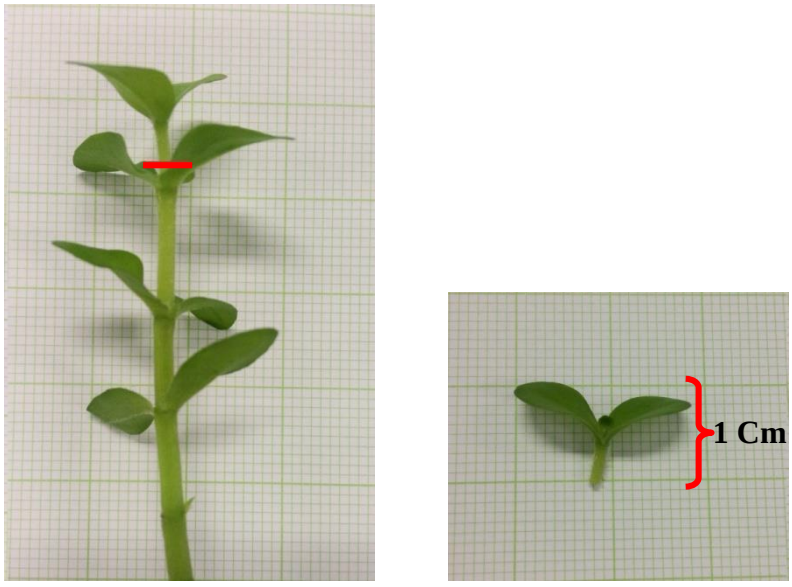
เตรียมอาหารสูตร MS (1962) ตามที่ระบุในข้อที่ 1 โดยมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและแบ่งเป็นชุดการทดลองตามแผนการทดลองดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซไคนินที่เติมลงในอาหารสูตร MS (1962) ที่ใช้ในการชักนำยอดของลานไพลิน

ชนิดของไซโตไคนิน	ระดับความเข้มข้นของไซโตไคนิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6
BAP	✓	-	✓	✓	-	✓	✓
Kinetin (KN)	✓	-	✓	✓	-	✓	✓
TDZ	✓	✓	✓	✓	✓	-	-

3.2 ชิ้นส่วนจากต้นกล้าปลอดเชื้อที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดมีดังนี้

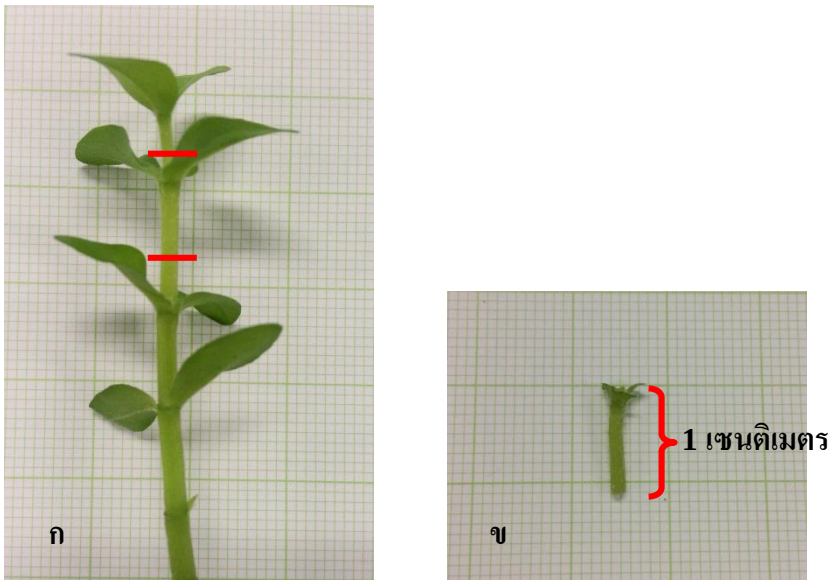
- ชิ้นส่วนปลายยอด (ดังภาพที่ 3-1)
- ชิ้นส่วนข้อที่ 2 นับจากปลายยอด (ดังภาพที่ 3-2)
- ชิ้นส่วนข้อที่ 3 นับจากปลายยอด (ดังภาพที่ 3-3)
- ชิ้นส่วนใบจากข้อที่ 2 (ดังภาพที่ 3-4)



ภาพที่ 3- 1 ลักษณะการตัดชิ้นส่วนปลายยอดจากต้นกล้า

(ก) บริเวณตัดชิ้นส่วนปลายยอด

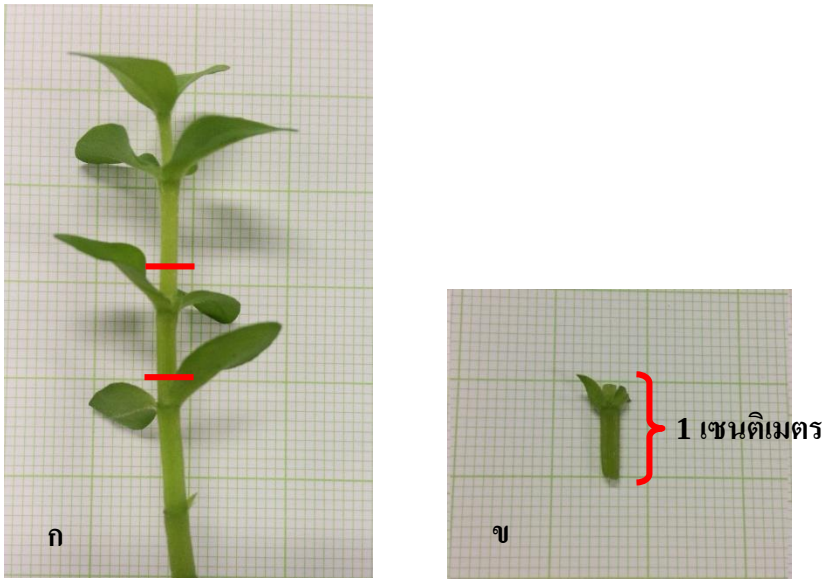
(ข) ชิ้นส่วนปลายยอดที่นำไปเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 3- 2 ลักษณะการตัดชิ้นส่วนข้อที่ 2 นับจากปลายยอดจากต้นกล้า

(ก) บริเวณตัดชิ้นส่วนข้อที่ 2 นับจากปลายยอด

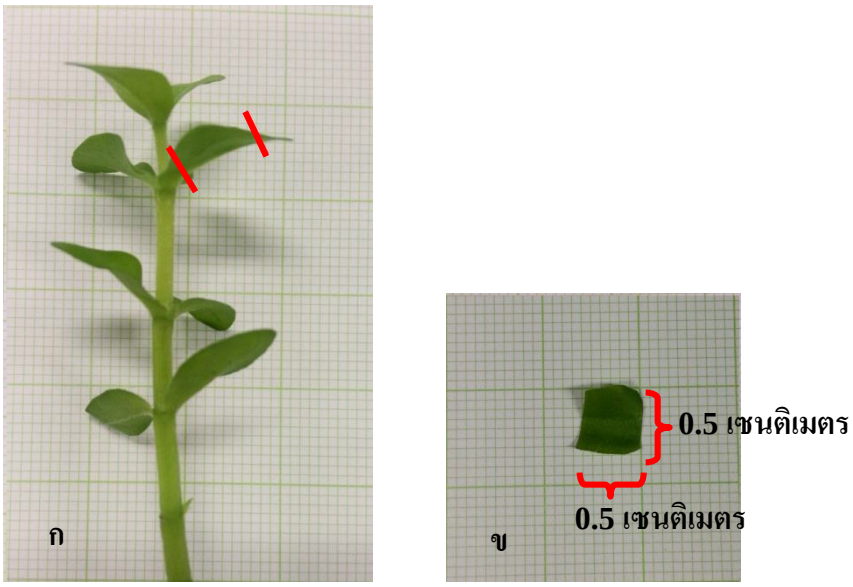
(ข) ชิ้นส่วนข้อที่ 2 นับจากปลายยอดที่นำไปเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 3- 3 ลักษณะการตัดชิ้นส่วนข้อที่ 3 นับจากปลายยอดจากต้นกล้า

(ก) บริเวณตัดชิ้นส่วนข้อที่ 3 นับจากปลายยอด

(ข) ชิ้นส่วนข้อที่ 3 นับจากปลายยอดที่นำไปเพาะเลี้ยง



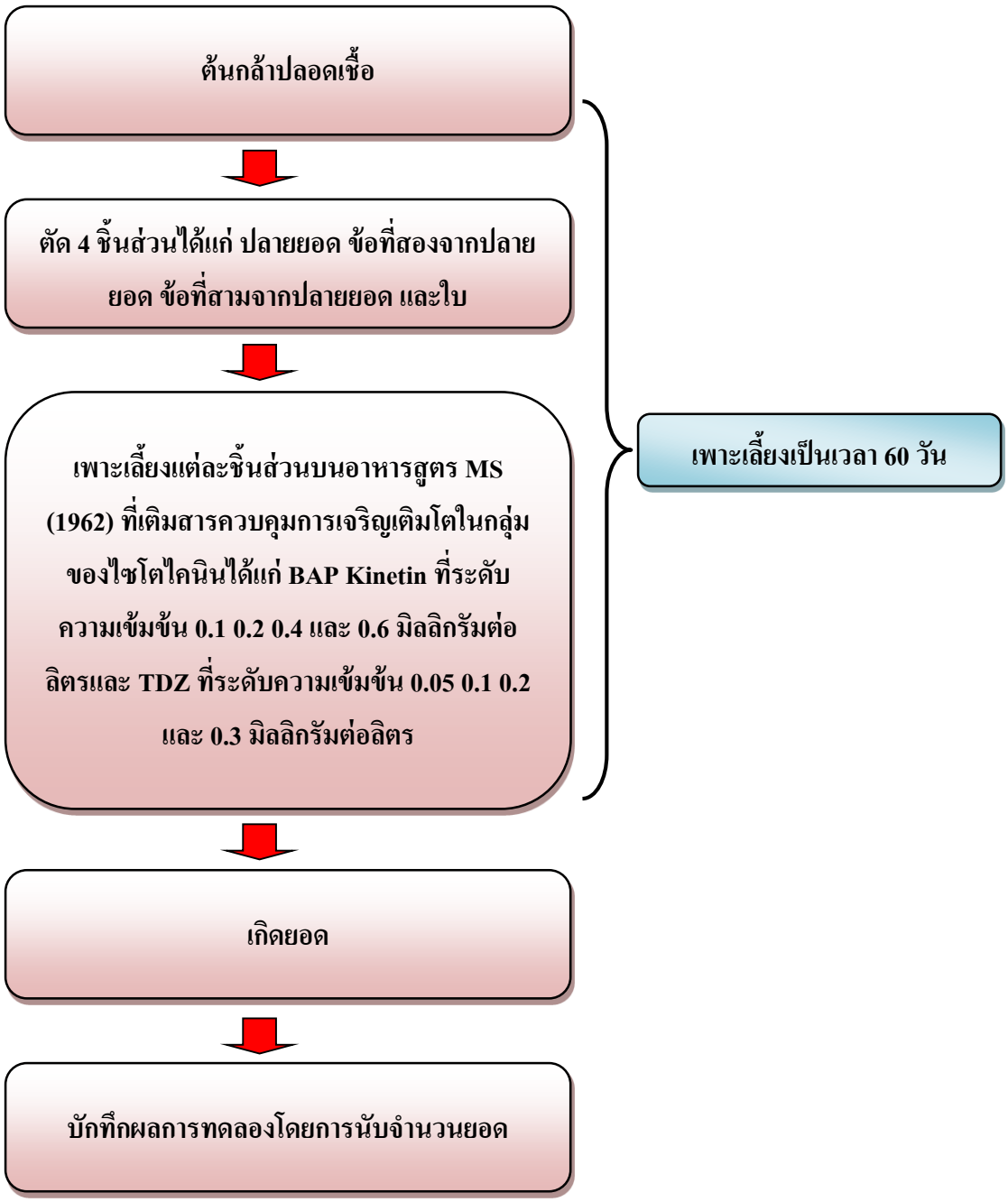
ภาพที่ 3- 4 ลักษณะการตัดชิ้นส่วนใบข้อที่ 2 นับจากปลายยอดจากต้นกล้า

(ก) บริเวณตัดชิ้นส่วนใบข้อที่ 2 นับจากปลายยอด

(ข) ชิ้นส่วนแผนใบของข้อที่ 2 นับจากปลายยอดที่นำไปเพาะเลี้ยง

3.3 การเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอด

นำชิ้นส่วนจากข้อที่ 3.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติมโต ดังตารางที่ 3-1 โดยวางแผนการทดลองแบบ 13X4 factorial design in CRD (ดังตารางที่ 3-2) ศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัยที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดของลานไพลินโดยปัจจัย A คือ สารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของไซโตไคนินได้แก่ BAP Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรและ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปัจจัย B คือ ชิ้นส่วนต่างๆ ของลานไพลินได้แก่ ปลายยอด ข้อที่สองจากปลายยอด ข้อที่สามจากปลายยอด และใบ แต่ละชุดการทดลอง (treatment combination) มี 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วันในสภาพแวดล้อมควบคุมที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2700 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนยอด โดยมีขั้นตอนตามแผนผังดังภาพที่ 3-5



ภาพที่ 3- 5 แผนผังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลินเพื่อชักนำให้เกิดยอด

ตารางที่ 3-2 แผนการทดลองในการชักนำให้เกิดยอดของลานไพลิน

ปัจจัย A ไซโตไคนิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปัจจัย B ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลิน			
		ปลายยอด	ข้อที่สองจากปลายยอด	ข้อที่สองจากปลายยอด	ใบ
MS free hormone	0	A1B1	A1B2	A1B3	A1B4
BAP	0.1	A2B1	A2B2	A2B3	A2B4
	0.2	A3B1	A3B2	A3B3	A3B4
	0.4	A4B1	A4B2	A4B3	A4B4
	0.6	A5B1	A5B2	A5B3	A5B4
Kinetin	0.1	A6B1	A6B2	A6B3	A6B4
	0.2	A7B1	A7B2	A7B3	A7B4
	0.4	A8B1	A8B2	A8B3	A8B4
	0.6	A9B1	A9B2	A9B3	A9B4
TDZ	0.05	A10B1	A10B2	A10B3	A10B4
	0.1	A11B1	A11B2	A11B3	A11B4
	0.2	A12B1	A12B2	A12B3	A12B4
	0.3	A13B1	A13B2	A13B3	A13B4

4. การชักนำให้เกิดราก

4.1 อาหารชักนำราก

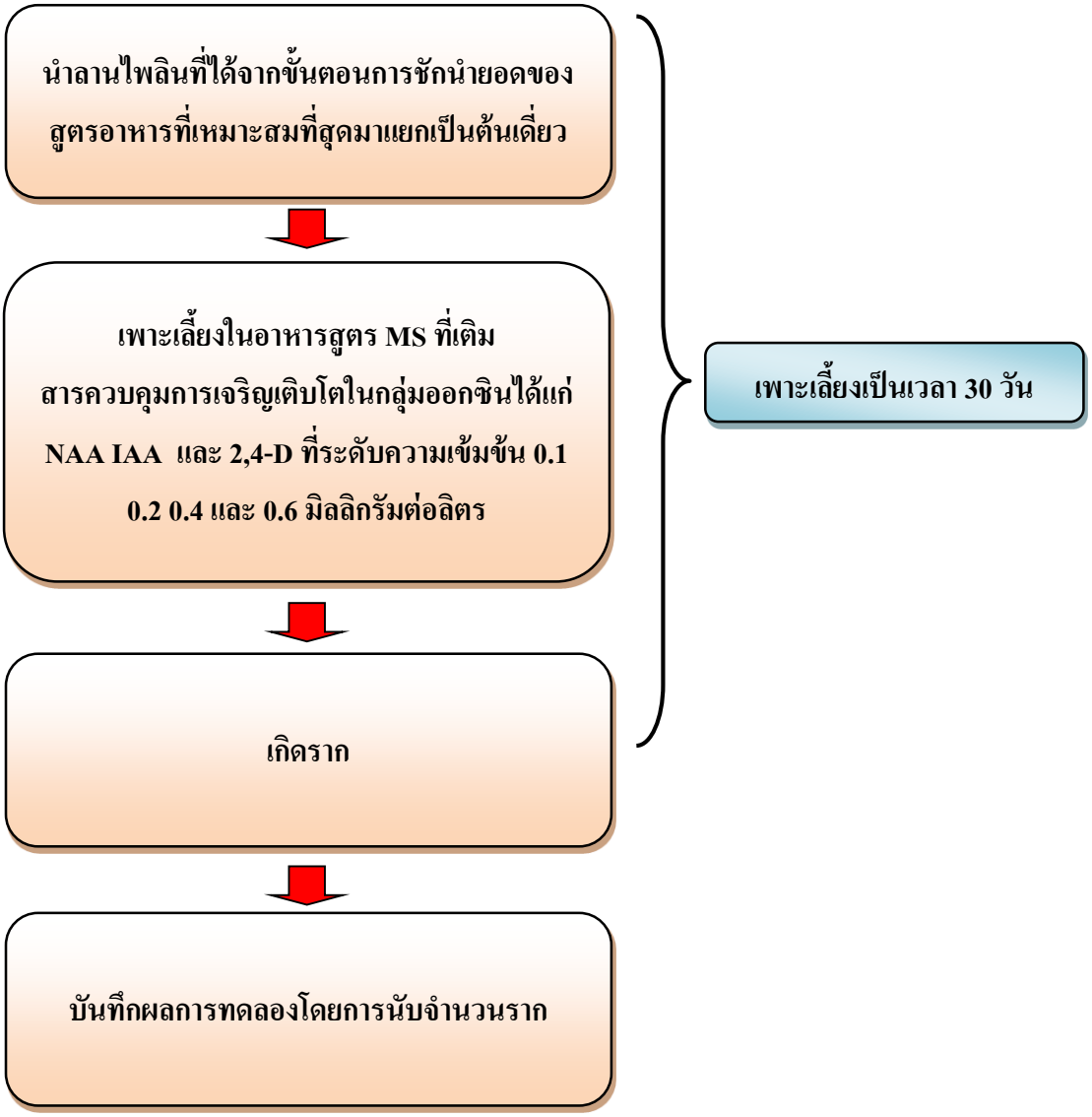
เตรียมอาหารสูตร MS (1962) ตามที่ระบุในข้อที่ 1 โดยมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและแบ่งเป็นชุดการทดลองตามแผนการทดลองดังตารางที่ 3-3 ต่อไปนี้

ตารางที่ 3-3 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เติมลงในอาหารสูตร MS ที่ใช้ในการชักนำรากของลานไพลิน

ชนิดของออกซิน	ระดับความเข้มข้นของออกซิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.6
IAA	✓	✓	✓	✓	✓
NAA	✓	✓	✓	✓	✓
2,4-D	✓	✓	✓	✓	✓

4.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดราก

เมื่อผ่านกระบวนการชักนำให้เกิดยอดและได้ยอดในปริมาณมากแล้วก็นำยอดเดี่ยวที่จากชุดการทดลองที่ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินตามตารางที่ 3-3 ทำการทดลอง 10 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น หลังการเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน เก็บผลการทดลองโดยการนับจำนวนราก โดยมีขั้นตอนตามแผนผังดังภาพที่ 3-6



ภาพที่ 3- 6 แผนผังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลานไพลินเพื่อชักนำให้เกิดราก

5. การย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

5.1 การเตรียมต้นพืชก่อนออกปลูก

หลังจากได้ต้นกล้าที่มีรากสมบูรณ์ นำต้นกล้ามาปลูกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ โดยก่อนนำออกปลูก ทำการปรับสภาพตามวิธีการ ดังนี้

1. ย้ายขวดเพาะเลี้ยงไปไว้ในนอกห้องเพาะเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นและไม่สม่ำเสมอกว่าห้องเพาะเลี้ยง ทิ้งไว้ 1 วัน (อุณหภูมินอกห้องเพาะเลี้ยง เฉลี่ย 30±2 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเฉลี่ย 25±2 องศาเซลเซียส)

2. นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางในที่ที่ได้รับแสงแดดในเรือนเพาะชำแล้วคลายเกลียวฝาขวดเพาะเลี้ยงออกเพื่อให้พืชปรับตัวและเพิ่มความเข้มของแสง (ความเข้มของแสงในเรือนเพาะชำ เฉลี่ย 100,000 ลักซ์ ซึ่งความเข้มแสงของห้องเพาะเลี้ยงเฉลี่ย 2700 ลักซ์) เพื่อกระตุ้นให้พืชสร้างอาหารเองโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงก่อนย้ายลงปลูก 2 วัน เมื่อครบตามกำหนดก็นำเอาพืชมาล้างเศษวุ้นออก แล้วย้ายลงปลูก

5.1 การย้ายพืชออกจากขวดเพาะเลี้ยงเพื่อลงปลูก

1. ผสมขุยมะพร้าว : ทราย : ดินร่วนในอัตราส่วน 1:1:1 1:2:1 และ 1:1:2 พ่นน้ำใส่พอประมาณไม่แห้งหรือแฉะเกินไป แล้วตักใส่กระบะหรือตะกร้าพลาสติก

2. ใช้ปากคีบ คีบต้นกล้าออกจากขวดเพาะเลี้ยงอย่างระมัดระวังอย่าให้รากขาด

3. ล้างเศษวุ้นที่ติดอยู่ออกให้หมดแล้วนำมาปลูกลงในกระบะหรือตะกร้าชำที่เตรียมไว้ทำอย่างละ 5 ซ้ำการทดลอง

4. รดต้นพืชด้วยน้ำชุ่ม รดน้ำวันละ 2 เวลาเช้าและเย็น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยการศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (ดัดแปลงจาก แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547)

6. วิธีการเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดี่ยว (One-way analysis of variation) และแบบสองปัจจัย (Two-way analysis of variation) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง (Treatment) และกลุ่มควบคุมด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดลอง

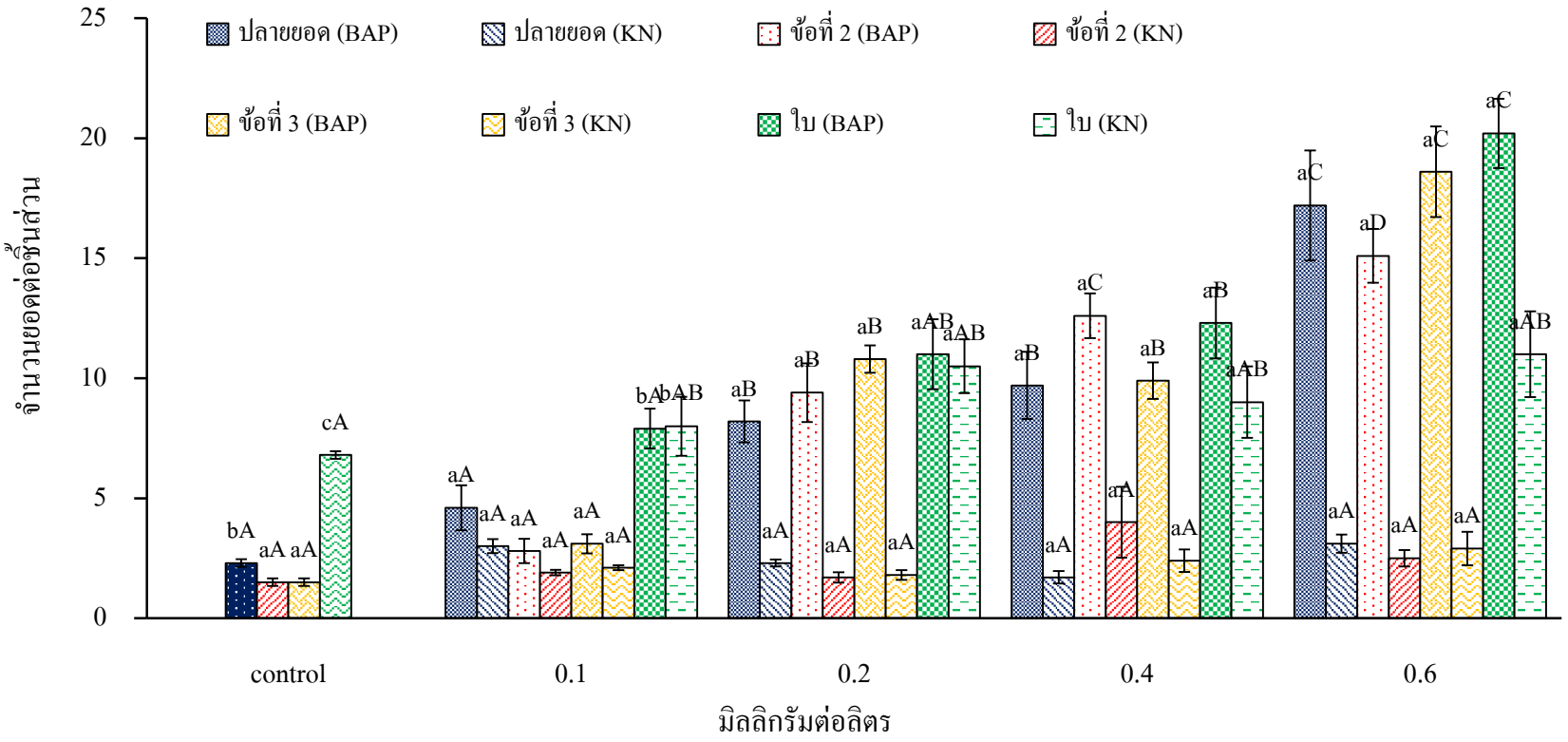
4.1. การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด

หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดคือ ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 20.20±1.44 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากชิ้นส่วนอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน (ตารางที่ 4-1 ภาพที่ 4-1 และภาพที่ 4-2) ส่วนชุดการทดลองที่เติม TDZ ในทุกระดับความเข้มข้น ไม่มีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดยอดแต่มีการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสทั้งหมด

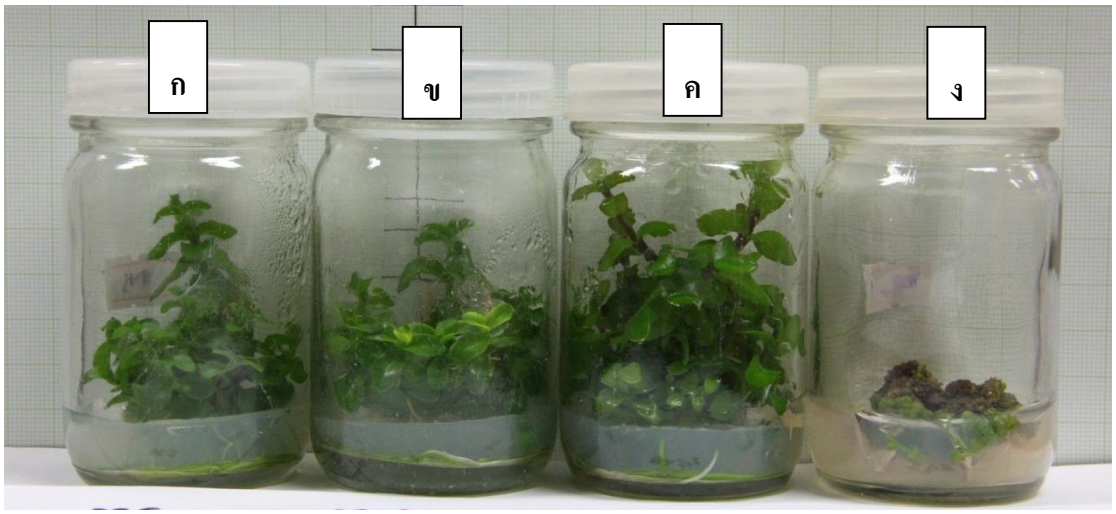
ตารางที่ 4-1 ผลของอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BAP และ Kinetin ร่วมกับชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

ไซโตไคนิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนยอดที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลิน (Mean±S.E.)			
		ปลายยอด	ข้อที่สองจากปลายยอด	ข้อที่สามจากปลายยอด	ใบ
Control		2.30±0.33^{bA}	1.50±0.16^{aA}	1.50±0.16^{aA}	6.89±0.69^{cA}
BAP	0.1	4.60±0.94^{aA}	2.80±0.51^{aA}	3.10±0.40^{aA}	7.90±0.83^{bA}
	0.2	8.20±0.87^{aB}	9.40±1.22^{aB}	10.80±0.57^{aB}	11.00±1.46^{aAB}
	0.4	9.78±1.40^{aB}	12.60±0.93^{aC}	9.90±0.70^{aB}	12.33±1.48^{aB}
	0.6	17.20±2.29^{aC}	15.10±1.12^{aD}	18.60±1.89^{aC}	20.20±1.44^{aC}
Kinetin	0.1	3.00±0.29^{bA}	1.90±0.11^{aA}	2.10±0.10^{abA}	8.00±1.23^{cAB}
	0.2	2.30±0.15^{aA}	1.78±0.22^{aA}	1.89±0.20^{aA}	10.50±1.12^{bAB}
	0.4	1.70±0.26^{aA}	4.00±1.48^{aA}	2.40±0.47^{aA}	9.00±1.49^{bAB}
	0.6	3.11±0.38^{aA}	2.50±0.34^{aA}	2.90±0.70^{aA}	11.00±1.79^{bAB}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันและค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT



ภาพที่ 4- 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินคือ BAPและ Kinetin (KN) ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลิน เป็นระยะเวลา 60 วัน



ภาพที่ 4-2 ชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนินในระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. MS ข. MS+Kinetin ค. MS+BAP ง. MS+TDZ

จากนั้นนำผลของการชักนำให้เกิดยอดที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการมีอิทธิพลร่วมกันของชิ้นส่วนที่แตกต่างกันและอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มชองไซโตไคนินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และทดสอบอิทธิพลของชิ้นส่วนที่แยกกันกับอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดของลานไพลิน พบว่า มีอิทธิพลร่วมกันของชิ้นส่วนพืชและอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาเฉพาะอิทธิพลของชิ้นส่วนพืช พบว่า แต่ละชิ้นส่วนพืชให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อพิจารณาเฉพาะอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการชักนำให้เกิดยอดจากอาหารสูตร MS โดยใช้ชิ้นส่วนที่แตกต่างกันร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hormone	7521.938	8	940.242	99.739	.000
Explant	1537.705	3	512.568	54.372	.000
Hormone * Explant	575.830	24	23.993	2.545	.000
Error	2922.378	310	9.427		
Total	29894.000	346			
Corrected Total	12771.584	345			

จากการพิจารณาเฉพาะอิทธิพลของชิ้นส่วนพืชที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด พบว่าแต่ละชิ้นส่วนพืชให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยชิ้นส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.86±0.34 ซึ่งแตกต่างจากชิ้นส่วนอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน

ชิ้นส่วน	จำนวนยอดเฉลี่ย± SE
ใบ	10.86 ± 0.34^{b}
ข้อที่สามจากปลายยอด	5.91 ± 0.32^{a}
ปลายยอด	5.79 ± 0.32^{a}
ข้อที่สองจากปลายยอด	5.73 ± 0.32^{a}

เมื่อพิจารณาเฉพาะอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BAP 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 17.78±0.512 ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-4 จำนวนยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลานไพลินบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

สูตรอาหาร	**จำนวนยอดเฉลี่ย ± S.E.**
MS free hormone (control)	2.95±0.51[a]
MS + Kinetin 0.1 mg/L	3.44±0.54[ab]
MS + Kinetin 0.4 mg/L	4.15±0.52[ab]
MS + Kinetin 0.2 mg/L	4.24±0.51[ab]
MS + Kinetin 0.6 mg/L	4.42±0.54[ab]
MS + BAP 0.1 mg/L	4.60±0.51[b]
MS + BAP 0.2 mg/L	9.85±0.51[c]
MS + BAP 0.4 mg/L	11.16±0.52[c]
MS + BAP 0.6 mg/L	17.78±0.51[d]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

4.2. การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีผลต่อการชักนำรากของลานไพลิน

หลังจากชักนำให้เกิดยอดแล้ว แยกยอดเดี่ยวที่ได้มาชักนำให้เกิดรากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินคือ IAA NAA และ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่า ยอดเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงสุดโดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 93.70±7.150 รากต่อชิ้นส่วนแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 73.70±7.15 รากต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 4-5) สำหรับยอดเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในทุกระดับความเข้มข้นไม่มีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดรากดังภาพที่ 4-4

ตารางที่ 4-5 จำนวนรากเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลานไพลินบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของออกซินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

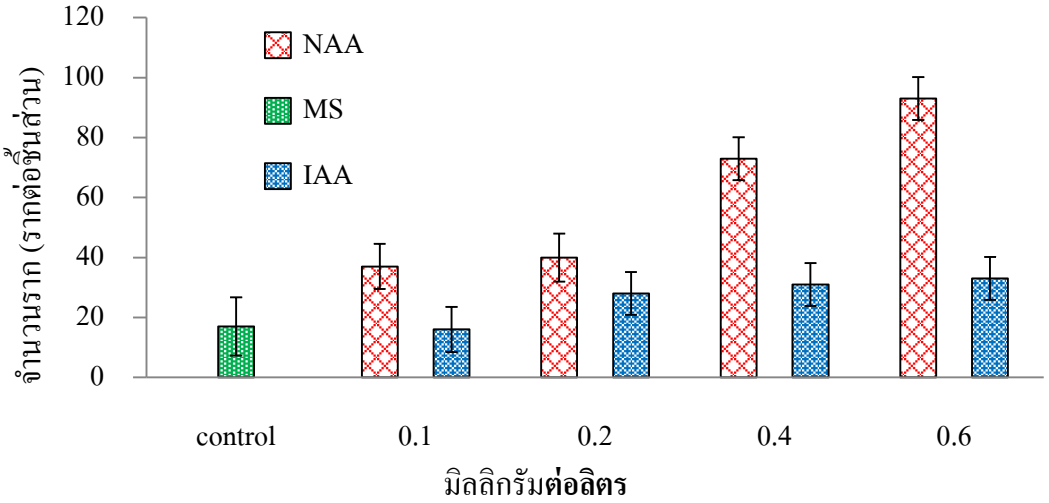
สูตรอาหาร	**จำนวนรากเฉลี่ย ± S.E.**
MS free hormone (control)	17.30±9.69[a]
MS + IAA 0.1 mg/L	16.56±7.53[a]
MS + IAA 0.4 mg/L	28.40±7.15[a]
MS + IAA 0.2 mg/L	31.40±7.15[a]
MS + IAA 0.6 mg/L	33.10±7.15[a]
MS + NAA 0.1 mg/L	37.89±7.53[a]
MS + NAA 0.2 mg/L	40.25±7.99[a]
MS + NAA 0.4 mg/L	73.70±7.15[b]
MS + NAA 0.6 mg/L	93.70±7.15[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

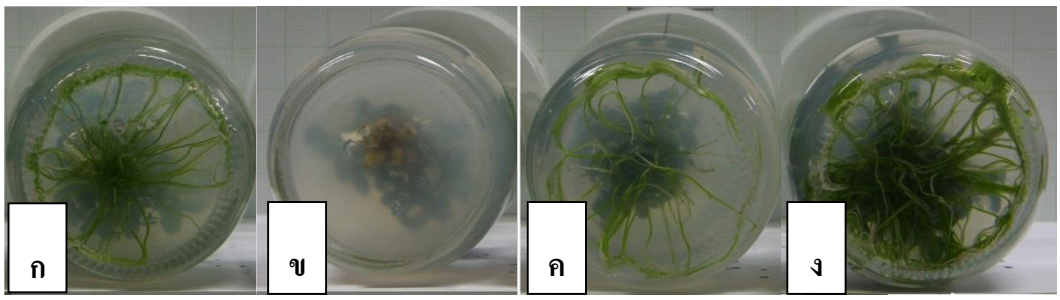
จากนั้นนำผลของการชักนำให้เกิดรากที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการมีอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า มีอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างให้ผลที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการชักนำให้เกิดรากจากอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของออกซินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hormone	52640.691	8	6580.086	12.871	.000
Error	39364.611	77	511.229		
Total	241700.000	86			
Corrected Total	92005.302	85			



ภาพที่ 4- 3 ผลความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินคือ NAA และ IAA ที่มีต่อการชักนำให้ เกิดรากจากการเพาะเลี้ยงยอดเดี่ยวเป็นระยะเวลา 30 วัน

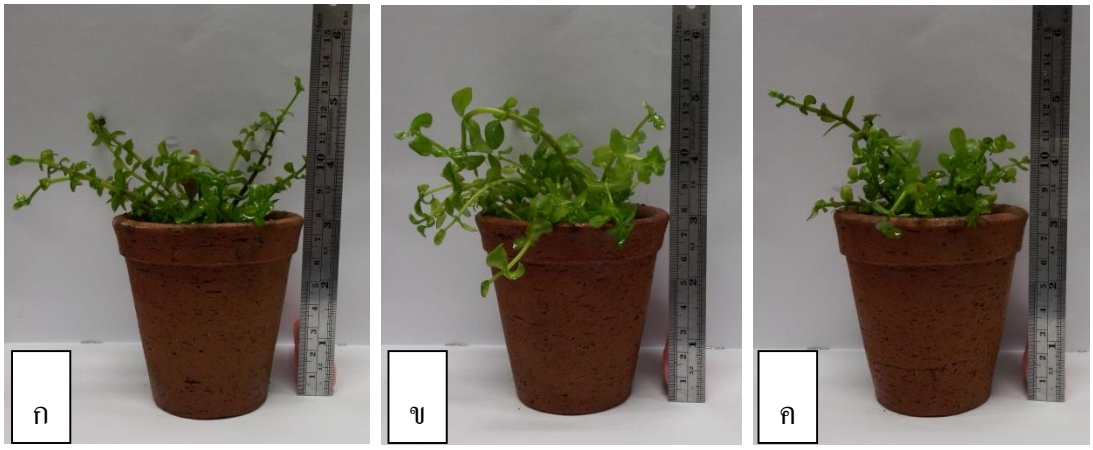


ภาพที่ 4- 4 รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมออกซินในระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. MS ข. MS+2,4-D ค. MS+IAA ง. MS+NAA

4.3. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากการย้ายปลูก

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการย้ายปลูก โดยย้ายพืชที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงไปไว้นอกห้องเพาะเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นและไม่สม่ำเสมอกว่าห้องเพาะเลี้ยง (ดังที่ระบุในวิธีการทดลอง) เพื่อให้พืชปรับตัวกับอุณหภูมิทิ้งไว้ 1 วันหลังจากนั้นเอาไปวางในเรือนเพาะชำในที่ที่ได้รับแสงแดดแล้วคลายเกรียวฝาขวดเพาะเลี้ยงออกทิ้งไว้ 2 วันเพื่อเพิ่มความเข้มของแสงให้มากขึ้น โดยรวมในขั้นตอนนี้ใช้เวลา 3 วันพบว่า พืชสามารถปรับตัวกับอุณหภูมิ และระดับความแสงที่เพิ่มขึ้นได้โดยลักษณะของต้นพืชไม่มีอาการเหี่ยวเฉา และเมื่อนำมาย้ายปลูกภายใต้สภาพธรรมชาติ ตามอัตราส่วนผสมของวัสดุปลูกที่ระบุไว้ในวิธีการทดลองข้างต้น พบว่าในระยะ 2-3 วันแรกใบพืชบางส่วนมีอาการไหม้บริเวณขอบใบ แต่หลังจากนั้นอีก 2 สัปดาห์ พืชก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 3 อัตราส่วนของวัสดุปลูกคือ ขุยมะพร้าว : ทราย : ดินร่วนในอัตราส่วน 1:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4- 5 ต้นอ่อนของลานไพลินที่นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ก. ขุยมะพร้าว : ทราย : ดินร่วนในอัตราส่วน 1:1:1

ข. ขุยมะพร้าว : ทราย : ดินร่วนในอัตราส่วน 1:2:1

ค. ขุยมะพร้าว : ทราย : ดินร่วนในอัตราส่วน 1:1:2

อภิปรายผลการทดลอง

จากการชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ปลายยอด ข้อที่สองจากปลายยอด ข้อที่สามจากปลายยอด และใบของลานไพลินมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในการทดลองพบว่า การใช้ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 20.20±1.44 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายในระยะเวลา 60 วันซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tiwari et al. (1998) ที่ทำการเพาะเลี้ยงพรมมิโดยใช้ชิ้นส่วนใบพบว่า การใช้ BAP ในอัตราความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้เฉลี่ย 21.4±2.1 ยอดต่อชิ้นส่วน และนอกจากนี้จะเห็นได้ว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของไซโตไคนิน ในอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดมีผลกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถเจริญ และพัฒนาเป็นอวัยวะ หรือยอดใหม่จำนวนมากได้ (นภดล จรัสสัมฤทธิ์, 2537) โดยจากการผลการทดลองครั้งนี้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ในทุกชิ้นส่วน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ในทุกระดับความเข้มข้นและชิ้นส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ

Tiwari et al. (1998) ที่ทำการเพาะเลี้ยงพรมมิโดยใช้ชิ้นส่วนใบพบว่า การใช้ BAP ในการชักนำให้เกิดยอดของพรมมิ ให้ผลที่ดีกว่า การใช้ Kinetin ในอัตราความเข้มข้นเท่ากัน

จากการทดลองครั้งนี้ ยังพบอีกว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ในทุกระดับความเข้มข้น ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดยอดของลานไพลินแต่ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเกิดเป็นแคลลัสทั้งหมด ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์ (2550) ที่ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิ พบว่า การใช้ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 116.8 ยอดต่อชิ้นส่วนทั้งนี้ Fellman et al. (1987) รายงานว่า TDZ เป็นสารประกอบประเภท phenyl urea สามารถช่วยกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ และ Junyan et al. (1994) รายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัส ทำลายการพักตัวของตา และส่งเสริมการเกิด organogenesis ของ *Cayratia japonica* นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบในทำนองเดียวกันนี้ในพืชชนิดอื่น เช่น *Carica pentagona* (Zhou & Collet, 1989), *Malus domestica* (Wang et al., 1986; Van Nieuwkerk et al., 1986) และ *Rubus* sp. (Fiola et al., 1990)

ในการเปรียบเทียบความสามารถในการชักนำให้เกิดยอดในชิ้นส่วนต่าง ๆ ของลานไพลินพบว่า ชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ ชิ้นส่วนใบ ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับ Tiwari et al. (1998) ที่ได้ศึกษาความสามารถในการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพรมมิ (*Bacopa monniera*) พบว่า ชิ้นส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด

ผลจากการชักนำให้เกิดรากในการทดลองครั้งนี้ พบว่า การเติม NAA สามารถชักนำลานไพลินให้เกิดรากได้มากกว่า การเติม IAA และ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นเท่ากันและการเติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงสุด ในการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า การเติม NAA ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีแนวโน้มในการสร้างรากเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ กาญจนรี พงษ์ฉวี และคณะ (2554) ที่ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของใบพาย (*Cryptocoryne affinis*) พบว่าการใช้ NAA ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้การสร้างรากของใบพายมีแนวโน้มลดลง ในการทดลองครั้งนี้การเติม IAA ในทุกระดับความเข้มข้นให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Rout et al. (2007) พบว่าการใช้ออกซินในระดับความเข้มข้นที่ต่ำคือ การใช้ IBA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลในการชักนำให้เกิดรากของ *Nyctanthes arbortristis* ในสภาพปลอดเชื้อ แต่รากจะเกิดช้าหรือลดลงเมื่อใช้ออกซินในระดับความเข้มข้นสูง สำหรับการใช้ 2,4-D ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าในทุกระดับความเข้มข้นไม่

ตอบสนองในการชักนำให้เกิดรากของลานไพลิน ซึ่งฤทธิ์ของ 2,4-D ในความเข้มข้นที่สูงใช้ในการกำจัดวัชพืช และหากใช้ในปริมาณน้อยก็เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (กรมควบคุมมลพิษ, 2553) แต่ในการทดลองครั้งนี้ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D อาจจะมีความเข้มข้นสูงเกินไปสำหรับลานไพลิน เพราะทำให้ต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญแบบไม่ปกติ ใบเหลือง และเน่าตาย

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการย้ายปลูก โดยย้ายพืชที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงไปไว้ในที่ที่มีความเข้มแสงและอุณหภูมิสูงกว่าห้องเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มการสังเคราะห์แสงของพืชกระตุ้นให้พืชสามารถสร้างอาหารเองได้ เมื่อพืชสามารถปรับตัวได้ นำมาย้ายปลูกภายใต้สภาพธรรมชาติ ตามอัตราส่วนผสมของวัสดุปลูกที่ระบุไว้ในวิธีการทดลองข้างต้น พบว่า พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 อัตราส่วนของวัสดุปลูก ซึ่งการใช้ ขุยมะพร้าวเป็นส่วนหนึ่งของวัสดุปลูกช่วยให้ลานไพลินมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ดีขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติที่มีน้ำหนักเบา มีความพรุนสูงช่วยให้ระบายอากาศได้ดีช่วยให้รากได้รับอากาศได้มาก และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีมากช่วยให้รากพืชสามารถนำน้ำและดูดซับธาตุอาหารได้ดี (ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และชัยวัฒน์ เคารพ, 2546) อย่างไรก็ตามการใช้วัสดุปลูกพืชชนิดต่าง ๆ ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญเพียงอย่างเดียวที่ทำให้ลานไพลินสามารถรอดชีวิตแต่ต้องรวมไปถึงการดูแลรักษาการให้น้ำในปริมาณที่พอเหมาะ แสงแดด และการเอาใจใส่ของผู้ปลูกเลี้ยงด้วย

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของไซโตไคนินในการทดลองชักนำให้เกิดยอดของลานไพลินครั้งนี้ พบว่าชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด

2. ผลการศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของออกซินในการทดลองชักนำให้เกิดรากของลานไพลินครั้งนี้ พบว่ายอดเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ในระดับความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด

3. ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกของลานไพลินในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ทั้ง 3 อัตราส่วนของวัสดุปลูกคือ ขุยมะพร้าว : ทราย : ดินร่วนในอัตราส่วน 1:1:1, 1:2:1 และ 1:1:2 ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลานไพลินเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้ในเชิงปริมาณครั้งต่อไปสามารถนำส่วนที่เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ไปชักนำให้เกิดยอดได้อีก

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลานไพลินเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้ในเชิงปริมาณในครั้งนี้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากในเชิงเดี่ยว ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจจะศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตหลาย ๆ ชนิดที่มีการชักนำเกิดยอดและรากร่วมกัน

3. การเก็บผลการทดลองในครั้งต่อไปในขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดและรากควรมีการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตในหลาย ๆ ด้านเพิ่มขึ้น เช่น ความยาวยอด ความยาวราก เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดยอดแระรากเป็นต้น

4. ในขั้นตอนการย้ายปลูก ควรมีการเก็บข้อมูลในด้านการเจริญเติบโต เช่น ความสูงของลำต้น พื้นที่ใบรวมต่อต้น การสะสมน้ำหนักแห้งของราก ลำต้น และใบ ฯลฯ

บรรณานุกรม

กาญจนรี พงษ์ฉวี, พัฒนพงศ์ ชูแสง และวิจารณ์ ทองมีเอียด. (2542). *การขยายพันธุ์ผมหอมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2542*. กรุงเทพฯ: กรมประมง, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ.

กาญจนรีพงษ์ฉวี, บังอร โชติพ่วง, ณัฐนันท์ คงขา และวิจารณ์ ทองมีเอียด. (2543). *ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโลบิเลีย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2543*. กรุงเทพฯ: กรมประมง, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ.

กาญจนรี พงษ์ฉวี,วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และวารุณีย์ คันทรง. (2554). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ Cryptocoryne affinis Hook. f., 1893. เอกสารวิชาการฉบับที่ /2554.* กรุงเทพฯ: กรมประมง, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, สนธิพันธ์ ผาสุขดี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, และสุภารัตน์ศรีสังข์.(2555). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอเมซอน (Echinodorus Osiris Rataj, 1970). เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2555*. กรุงเทพฯ: กรมประมง, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ.

เกศสุดา แสงมณี. (2552). *การสำรวจพรรณไม้น้ำในร้านจำหน่ายของอำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาการประมง, คณะวิทยาศาสตร์การประมง, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร.

กรมควบคุมมลพิษ. (2553). *เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของสารเคมีเฉพาะเรื่อง 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2,4-D)*. กรมควบคุมมลพิษ. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิพวดี วิเศษสุวรรณ.(2544). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออมนาค (Syngonium sp.)*. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และชัยวัฒน์ เคารพ. (2546). ผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของแตงเทศในระบบปลูกโดยไม่ใช้ดิน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2,* 62-70.

นลินี จักรกริชกูล. (2545). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสันตะวาใบพาย (Crytocoryne wendtii De Wit).* ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญยืน กิจวิจารณ์. (2544). *เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ* (พิมพ์ครั้งที่ 2). ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

บุษราภรณ์ งามปัญญา. (2548). *เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิคพื้นฐาน.* นครปฐม: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ฝ่ายกองบรรณาธิการกสิกร. (2553). การฉายรังสีและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ. *วารสารกสิกร, 83* (3)*,* 82-83.

พิชญ์นรี สิงห์สุวรรณ์. (2550). *การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ลานไพลิน [Bacopa carolinniana (Watt.) Rob.] ในสภาพปลอดเชื้อ.* โครงการปัญหาพิเศษ, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และอรุณี รอดลอย.(2542). *ผลของ α naphthalene acetic acid และ 6-benzylaminopurine ต่อการเกิดต้นอ่อนของใบพายศรีลังกา Crytocoryne wendtii. เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/2542.* กรุงเทพฯ: กรมประมง, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ.

มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ. (2546). *การขยายพันธุ์ใบพายเขาใหญ่โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 16.* กรุงเทพฯ: กรมประมง, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ.

รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, กาญจนรี พงษ์ฉวี และวรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. (2553). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาว Microsorium pteropus (Blume) Ching, 1933. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2553.* กรุงเทพฯ: กรมประมง, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ.

ลักขณา ต่างใจ. (2545). *การขยายพันธุ์แอมมาเนีย (Ammannia senegalensis Lamarck) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ*. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพฤกษาศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.

วัชรพันธ์ พงษ์รักไทย. (2552). *พิษของตะกั่วที่มีผลต่อเซลล์ของลานไพลิน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาการประมง,คณะวิทยาศาสตร์การประมง, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร.

ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์.(2550). *ผลของสารควบคุมการเจริญเติบที่มีต่อการเจริญเป็นต้นใหม่และการสร้างสารซูโดจูจูโบจินินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุภาพร สุทิน. (2555). *พรรณไม้น้ำประดับตู้ปลา*. กรุงเทพฯ:โอเดียนสโตร์.

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. (2547). *คู่มือปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. (2546). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. อุดรธานี: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

อุดม นวพานิช. (2549). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

อุไร เรืองณรงค์. (2542). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายในต้นอเมซอนโดยใช้รังสีแกมมา*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะชีววิทยาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Çinar, A., Karataş, M., & Aasim, M. (2013). High frequency plant regeneration of Dwarf Hygro [*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson] on liquid culture. *Journal of Applied Biological Sciences, 2013* (3), 75-78.

Fellman, C., Read, P., & Hosier, M. (1987). Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. *Hort. Sci*, *22*, 1197-1200.

Fiola, J., Mahmoud. A., Hassan, M.A., Swartz, H.J., Bors, R.H., & McNicols, R. (1990). Effects of thidiazuron, light fluence rate and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised Rubus cotyledons and leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult, 20,* 223-228.

Junyan, Z., Ma, H., Guo, F., & Lao, X. (1994). Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, *36*, 73-79.

Kane, M., Davis, G., McConnell, D., & Peak, K. (1999). Micorpropagation of *Cryptocoryne wendtii. Aquatic Botany*, *1999* (63), 197-202.

Karataş, M., Aasim, M., Çinar, A., & Dogan, M. (2013). Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Explant of Dwarf Hygro [*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson]. *The Scientific World Journal*, *2013*, 7.

Naik, P., Manohar, S., Praveen, N., & Murthy, H. (2010). Effect of sucrose and pH levels on in vitro shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenenration shoots. *Plant Cells Tiss Organ Cult, 2010* (100), 235-239.

Pandiyan, P., & Selvaraj, T. (2012). In vitro multiplication of *Bacopa monnieri* (L.)Pennell from shoot tip and nodal explants.*Journal of Agricultural Technology 2012, 8* (3), 1099-1108.

Praveen, N., Naik, P. M., Manohar, S. H., Nayeem, A., & Murthy, H. N. (2009). In vitro regeneration of brahmi shoots using semisolid and liquid cultures and quantitative analysis of bacoside A. *Actaphysiol plant, 31*, 723-728.

Rout, R., Mahato, A., & Senapati, S. (2007). *In vitro*clona; propagation of *Nyctanthesarbortristis*Linn. A medical tree. *Hort Sci.* Prague, *34* (2), 84-89.

Tiwari, V., Singh, B. D., & Tiwari, K. Nath. (1998). Shoot regeneration and somatic embryogenesisfrom different explants of Brahmi [*Bacopa monniera* (L.) Wettst.]. *Plant Cell Reports*, *1998* (17), 538–543.

Van Nieuwkerk, J.P., Zimmerman, R.H., & Fordham, I. (1986). Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. *Hort. Sci, 21*, 516-518.

Wang, S.Y., Ji, J.L., Sun, T., & Faust, M. (1986). Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulatorthidiazuron. *Phytochemistry*, *25*, 311-317.

Zaerr, J., & Mapes, M. (1982). Action of growth regulators. *Tissue Culture in Forestry*, *1982* (1), 231–255.

Zhou, J.Y., & Collet, G. F. (1989). Studies on cytokinin-activity of thidiazuron I. Effect on callus induction and shoot growth in tissue culture of *Caricapontagona*. *Acta Bot. BorealiOccidentalia Sin, 9*, 203-211.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารสูตร MS

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 ส่วนประกอบของสูตรอาหารดัดแปลง MS (อารยา บุตดี, 2555)

Stock solution	**สาร**	**ความเข้มข้นที่ชั่งในการเตรียมอาหาร (กรัม)**	**ปริมาตรที่ใส่ในอาหาร1 ลิตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)**	**หมายเหตุ**
Stock I	$CaCl_2.2H_2O$	22	10	100X ต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร
Stock II	$MnSO_4.4H_2O$	2.23	1	1,000X ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.86		
	H_3BO_3	0.62		
	$Na_2MoO_42H_2O$	0.025		
	$CuSO_4.4H_2O$	0.0025		
	$CoCl_2.6H_2O$	0.0025		
Stock III	KI	0.083	1	1,000X ต่อ100 มิลลิลิตร
Stock IV	Glycine	0.2	1	1,000X ต่อ 100 มิลลิลิตร
	Nicotinic acid	0.05		
	Pytidoxine-HCl	0.05		
	Thiamin-HCl	0.01		
	Myo-inositol	10.00		
Stock V (iron/EDTA)	$FeSO_44H_2O$	0.557	5	ต่อ 100 มิลลิลิตร
	$Na_2EDTA2H_2O$	0.745		
	KNO_3	-	1.90 กรัม	
	NH_4NO_3	-	1.65 กรัม	
	$MgSO_47H_2O$	-	0.37 กรัม	
	KH_2PO_4	-	0.17 กรัม	
	Sucrose	-	30 กรัม	
	Agar	-	7 กรัม	
	pH	5.8		

<u>หมายเหตุ</u> การเตรียม Stock V ชั่ง $FeSO_4$ และ $Na_2EDTA2H_2O$ แยกกัน แล้วจึงละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ความร้อนประมาณ 60 องศาเซลเซียส จนละลายดีแล้วจึงเทรวมกัน Stock solution ทุกขวดต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหารสูตร MS (อารยา บุตดี, 2555)

ก. ชั่งสารต่อไปนี้แยกไว้ในบิกเกอร์ขนาด 50 มิลิลิตร

Potassium nitrate (KNO_3)	1.90 กรัม
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1.65 กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4 7H_2O$)	0.37 กรัม
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	0.17 กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ข. เติมสารเคมีที่ละลายไว้แล้วลงในบิกเกอร์ขนาด 2000 มิลิลิตร ที่เติมน้ำกลั่น 400 มิลิลิตรคนสารละลายให้เข้ากันตลอดเวลา

ค. เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม

ง. เติม Stock solution ตามปริมาตรดังต่อไปนี้

Stock solution I	10 มิลิลิตร
Stock solution II	1 มิลิลิตร
Stock solution III	1 มิลิลิตร
Stock solution IV	1 มิลิลิตร
Stock solution V	5 มิลิลิตร

จ. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ถ้าต้องการใส่)

ฉ. ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ช. ปรับ pH ให้ได้ ด้วย NaOH 0.5 - 1 N หรือ HCl 0.5 - 1 N

ซ. เติมวุ้น 7 กรัม แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลาย

ฌ. เทใส่ขวดที่เตรียมไว้ ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการชักนำให้เกิดยอดจากอาหารสูตร MS โดยใช้ชิ้นส่วนที่แตกต่างกันร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

Source	**Type III Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F**	**Sig.**
Hormone	7521.938	8	940.242	99.739	.000
Explant	1537.705	3	512.568	54.372	.000
Hormone * Explant	575.830	24	23.993	2.545	.000
Error	2922.378	310	9.427		
Total	29894.000	346			
Corrected Total	12771.584	345			

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยโดยเปรียบเทียบชิ้นส่วน 4 ชิ้นส่วน โดยวิธีการ Multiple Comparisons ของการชักนำให้เกิดยอดหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Shoot

Explants (I)	Explants (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
shoot tip	leaf	-5.23*	.474	.000	-6.16	-4.30
	node 2	.01	.462	.985	-.90	.92
	node 3	-.17	.462	.711	-1.08	.74
leaf	shoot tip	5.23*	.474	.000	4.30	6.16
	node 2	5.24*	.473	.000	4.31	6.17
	node 3	5.06*	.473	.000	4.13	5.99
node 2	shoot tip	.00	.462	.985	-.92	.90
	leaf	-5.24*	.473	.000	-6.17	-4.31
	node 3	-.18	.460	.696	-1.09	.73
node 3	shoot tip	.17	.462	.711	-.74	1.08
	leaf	-5.06*	.473	.000	-5.99	-4.13
	node 2	.18	.460	.696	-.73	1.09

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 9.427.

* คือ ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 การจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยจำนวนยอดโดยเปรียบเทียบชิ้นส่วน 4 ชิ้นส่วน โดยวิธีการ Duncan Multiple Rang Test (DMRT) ของการชักนำให้เกิดยอด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Post Hoc Tests

Duncan[a]

Explants	**N**	**Subset**	
		1	**2**
node 2	89	5.78	
shoot tip	88	5.78	
node 3	89	5.96	
leaf	80		11.01
Sig.		.720	1.000

Means for explants in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 9.427.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 86.327.

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยโดยเปรียบเทียบอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินระดับความเข้มข้นที่แตกต่างโดยวิธีการ Multiple Comparisons ของการชักนำให้เกิดยอด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Shoot

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BAP 0.1	BAP 0.2	-5.25*	.687	.000	-6.60	-3.90
	BAP 0.4	-6.56*	.696	.000	-7.93	-5.19
	BAP 0.6	-13.17*	.687	.000	-14.53	-11.82
	Kinetin 0.1	1.16	.705	.102	-.23	2.54
	Kinetin 0.2	.36	.696	.602	-1.01	1.73
	Kinetin 0.4	.45	.691	.519	-.91	1.81
	Kinetin 0.6	.18	.705	.795	-1.20	1.57
	control	1.65*	.691	.017	.29	3.01
BAP 0.2	BAP 0.1	5.25*	.687	.000	3.90	6.60
	BAP 0.4	-1.31	.696	.061	-2.68	.06
	BAP 0.6	-7.92*	.687	.000	-9.28	-6.57
	Kinetin 0.1	6.41*	.705	.000	5.02	7.79
	Kinetin 0.2	5.61*	.696	.000	4.24	6.98
	Kinetin 0.4	5.70*	.691	.000	4.34	7.06
	Kinetin 0.6	5.43*	.705	.000	4.05	6.82
	control	6.90*	.691	.000	5.54	8.26

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Shoot

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BAP 0.4	BAP 0.1	6.56*	.696	.000	5.19	7.93
	BAP 0.2	1.31	.696	.061	-.06	2.68
	BAP 0.6	-6.62*	.696	.000	-7.99	-5.25
	Kinetin 0.1	7.71*	.714	.000	6.31	9.12
	Kinetin 0.2	6.92*	.704	.000	5.54	8.31
	Kinetin 0.4	7.00*	.700	.000	5.63	8.38
	Kinetin 0.6	6.74*	.714	.000	5.34	8.15
	control	8.21*	.700	.000	6.83	9.59
BAP 0.6	BAP 0.1	13.17*	.687	.000	11.82	14.53
	BAP 0.2	7.92*	.687	.000	6.57	9.28
	BAP 0.4	6.62*	.696	.000	5.25	7.99
	Kinetin 0.1	14.33*	.705	.000	12.94	15.72
	Kinetin 0.2	13.54*	.696	.000	12.17	14.91
	Kinetin 0.4	13.62*	.691	.000	12.26	14.98
	Kinetin 0.6	13.36*	.705	.000	11.97	14.75
	control	14.83*	.691	.000	13.47	16.19

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Shoot

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kinetin 0.1	BAP 0.1	-1.16	.705	.102	-2.54	.23
	BAP 0.2	-6.41*	.705	.000	-7.79	-5.02
	BAP 0.4	-7.71*	.714	.000	-9.12	-6.31
	BAP 0.6	-14.33*	.705	.000	-15.72	-12.94
	Kinetin 0.2	-.79	.714	.268	-2.20	.61
	Kinetin 0.4	-.71	.710	.318	-2.11	.69
	Kinetin 0.6	-.97	.724	.180	-2.40	.45
	control	.50	.710	.485	-.90	1.89
Kinetin 0.2	BAP 0.1	-.36	.696	.602	-1.73	1.01
	BAP 0.2	-5.61*	.696	.000	-6.98	-4.24
	BAP 0.4	-6.92*	.704	.000	-8.31	-5.54
	BAP 0.6	-13.54*	.696	.000	-14.91	-12.17
	Kinetin 0.1	.79	.714	.268	-.61	2.20
	Kinetin 0.4	.08	.700	.906	-1.29	1.46
	Kinetin 0.6	-.18	.714	.801	-1.58	1.23
	control	1.29	.700	.067	-.09	2.67

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Shoot

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kinetin 0.4	BAP 0.1	-.45	.691	.519	-1.81	.91
	BAP 0.2	-5.70*	.691	.000	-7.06	-4.34
	BAP 0.4	-7.00*	.700	.000	-8.38	-5.63
	BAP 0.6	-13.62*	.691	.000	-14.98	-12.26
	Kinetin 0.1	.71	.710	.318	-.69	2.11
	Kinetin 0.2	-.08	.700	.906	-1.46	1.29
	Kinetin 0.6	-.26	.710	.711	-1.66	1.13
	control	1.21	.695	.084	-.16	2.57
Kinetin 0.6	BAP 0.1	-.18	.705	.795	-1.57	1.20
	BAP 0.2	-5.43*	.705	.000	-6.82	-4.05
	BAP 0.4	-6.74*	.714	.000	-8.15	-5.34
	BAP 0.6	-13.36*	.705	.000	-14.75	-11.97
	Kinetin 0.1	.97	.724	.180	-.45	2.40
	Kinetin 0.2	.18	.714	.801	-1.23	1.58
	Kinetin 0.4	.26	.710	.711	-1.13	1.66
	control	1.47*	.710	.039	.07	2.86

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Shoot

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	BAP 0.1	-1.65*	.691	.017	-3.01	-.29
	BAP 0.2	-6.90*	.691	.000	-8.26	-5.54
	BAP 0.4	-8.21*	.700	.000	-9.59	-6.83
	BAP 0.6	-14.83*	.691	.000	-16.19	-13.47
	Kinetin 0.1	-.50	.710	.485	-1.89	.90
	Kinetin 0.2	-1.29	.700	.067	-2.67	.09
	Kinetin 0.4	-1.21	.695	.084	-2.57	.16
	Kinetin 0.6	-1.47*	.710	.039	-2.86	-.07

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 9.427.

* คือ ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 การจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยจำนวนยอดโดยเปรียบเทียบอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินระดับความเข้มข้นที่แตกต่างโดยวิธีการ Duncan Multiple Rang Test (DMRT) ของการชักนำให้เกิดยอด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Post Hoc Tests

Duncan

Media	N	Subset			
		1	2	3	4
control	39	2.95			
Kinetin 0.1	36	3.44	3.44		
Kinetin 0.2	39	4.15	4.15		
Kinetin 0.4	38	4.24	4.24		
Kinetin 0.6	36	4.42	4.42		
BAP 0.1	40		4.60		
BAP 0.2	40			9.85	
BAP 0.4	38			11.16	
BAP 0.6	40				17.78
Sig.		.077	.168	.078	1.000

Means for media in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 10.474.

ตารางภาคผนวกที่ ข-6 การจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยจำนวนยอดโดยเปรียบเทียบอิทธิพลร่วมกันระหว่างชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชกับอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างโดยวิธีการ Duncan Multiple Rang Test (DMRT) ของการชักนำให้เกิดยอด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Post Hoc Tests

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05								
		a	b	c	d	e	f	g	h	i
MS node2	10	1.50								
MS node3	10	1.50								
kinetin 0.4 shoot tip	10	1.70								
kinetin 0.2 node2	9	1.78								
kinetin 0.1 node2	9	1.89								
kinetin 0.2 node3	9	1.89								
kinetin 0.1 node3	10	2.10								
kinetin 0.2 shoot tip	10	2.30								
MS shoot tip	10	2.30								
kinetin 0.4 node3	10	2.40								
kinetin 0.6 node2	10	2.50								
bap 0.1 node2	10	2.80								
kinetin 0.6 node3	10	2.90								
kinetin 0.1shoot tip	10	3.00								
bap 0.1 node3	10	3.10								
kinetin 0.6 shoot tip	9	3.11								

ตารางภาคผนวกที่ ข-6 (ต่อ)

Post Hoc Tests

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05								
		a	b	c	d	e	f	g	h	i
kinetin 0.4 node2	10	4.00	4.00							
bap 0.1 shoot tip	10	4.60	4.60							
MS leaf	9		6.89	6.89						
bap 0.1 leaf	10			7.90	7.90					
kinetin 0.1 leaf	7			8.00	8.00					
bap 0.2 shoot tip	10			8.20	8.20					
kinetin 0.4 leaf	9			9.00	9.00					
bap 0.2 node2	10			9.40	9.40	9.40				
bap 0.4 shoot tip	9			9.78	9.78	9.78				
bap 0.4 node3	10			9.90	9.90	9.90				
kinetin 0.2 leaf	10				10.50	10.50				
bap 0.2 node3	10				10.80	10.80				
bap 0.2 leaf	10				11.00	11.00				
kinetin 0.6 leaf	7				11.00	11.00				
bap 0.4 leaf	9					12.33	12.33			
bap 0.4 node2	10					12.60	12.60			

ตารางภาคผนวกที่ ข-6 (ต่อ)

Post Hoc Tests

Duncan

Treatments	N	Subset for alpha = 0.05								
		a	b	c	d	e	f	g	h	i
bap 0.6 node2	10						15.10	15.10		
bap 0.6 shoot tip	10							17.20	17.20	
bap 0.6 node3	10								18.60	18.60
bap 0.6 leaf	10									20.20
Sig.		.080	.054	.070	.070	.056	.065	.139	.324	.259

Means for treatments in homogeneous subsets are displayed.

ตารางภาคผนวกที่ ข-7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการชักนำให้เกิดรากจากอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของออกซินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable : Root

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hormone	52640.691	8	6580.086	12.871	.000
Error	39364.611	77	511.229		
Total	241700.000	86			
Corrected Total	92005.302	85			

a. R Squared = .572 (Adjusted R Squared = .528)

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 การวิเคราะห์หาความแปรปรวนของจำนวนรากเฉลี่ยโดยเปรียบเทียบอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบในกลุ่มของออกซินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยวิธีการ Multiple Comparisons ของการชักนำราก หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Root

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
NAA 0.1	NAA 0.2	-2.36	10.987	.830	-24.24	19.52
	NAA 0.4	-35.81*	10.389	.001	-56.50	-15.12
	NAA 0.6	-55.81*	10.389	.000	-76.50	-35.12
	IAA 0.1	21.33*	10.659	.049	.11	42.56
	IAA 0.2	9.49	10.389	.364	-11.20	30.18
	IAA 0.4	6.49	10.389	.534	-14.20	27.18
	IAA 0.6	4.79	10.389	.646	-15.90	25.48
	MS	20.59	10.389	.051	-.10	41.28
NAA 0.2	NAA 0.1	2.36	10.987	.830	-19.52	24.24
	NAA 0.4	-33.45*	10.725	.003	-54.81	-12.09
	NAA 0.6	-53.45*	10.725	.000	-74.81	-32.09
	IAA 0.1	23.69*	10.987	.034	1.82	45.57
	IAA 0.2	11.85	10.725	.273	-9.51	33.21
	IAA 0.4	8.85	10.725	.412	-12.51	30.21
	IAA 0.6	7.15	10.725	.507	-14.21	28.51
	MS	22.95*	10.725	.036	1.59	44.31

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Root

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
NAA 0.4	NAA 0.1	35.81*	10.389	.001	15.12	56.50
	NAA 0.2	33.45*	10.725	.003	12.09	54.81
	NAA 0.6	-20.00	10.112	.052	-40.13	.13
	IAA 0.1	57.14*	10.389	.000	36.46	77.83
	IAA 0.2	45.30*	10.112	.000	25.17	65.43
	IAA 0.4	42.30*	10.112	.000	22.17	62.43
	IAA 0.6	40.60*	10.112	.000	20.47	60.73
	MS	56.40*	10.112	.000	36.27	76.53
NAA 0.6	NAA 0.1	55.81*	10.389	.000	35.12	76.50
	NAA 0.2	53.45*	10.725	.000	32.09	74.81
	NAA 0.4	20.00	10.112	.052	-.13	40.13
	IAA 0.1	77.14*	10.389	.000	56.46	97.83
	IAA 0.2	65.30*	10.112	.000	45.17	85.43
	IAA 0.4	62.30*	10.112	.000	42.17	82.43
	IAA 0.6	60.60*	10.112	.000	40.47	80.73
	MS	76.40*	10.112	.000	56.27	96.53

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Root

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
IAA 0.1	NAA 0.1	-21.33*	10.659	.049	-42.56	-.11
	NAA 0.2	-23.69*	10.987	.034	-45.57	-1.82
	NAA 0.4	-57.14*	10.389	.000	-77.83	-36.46
	NAA 0.6	-77.14*	10.389	.000	-97.83	-56.46
	IAA 0.2	-11.84	10.389	.258	-32.53	8.84
	IAA 0.4	-14.84	10.389	.157	-35.53	5.84
	IAA 0.6	-16.54	10.389	.115	-37.23	4.14
	MS	-.74	10.389	.943	-21.43	19.94
IAA 0.2	NAA 0.1	-9.49	10.389	.364	-30.18	11.20
	NAA 0.2	-11.85	10.725	.273	-33.21	9.51
	NAA 0.4	-45.30*	10.112	.000	-65.43	-25.17
	NAA 0.6	-65.30*	10.112	.000	-85.43	-45.17
	IAA 0.1	11.84	10.389	.258	-8.84	32.53
	IAA 0.4	-3.00	10.112	.768	-23.13	17.13
	IAA 0.6	-4.70	10.112	.643	-24.83	15.43
	MS	11.10	10.112	.276	-9.03	31.23

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Root

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
IAA 0.4	NAA 0.1	-6.49	10.389	.534	-27.18	14.20
	NAA 0.2	-8.85	10.725	.412	-30.21	12.51
	NAA 0.4	-42.30*	10.112	.000	-62.43	-22.17
	NAA 0.6	-62.30*	10.112	.000	-82.43	-42.17
	IAA 0.1	14.84	10.389	.157	-5.84	35.53
	IAA 0.2	3.00	10.112	.768	-17.13	23.13
	IAA 0.6	-1.70	10.112	.867	-21.83	18.43
	MS	14.10	10.112	.167	-6.03	34.23
IAA 0.6	NAA 0.1	-4.79	10.389	.646	-25.48	15.90
	NAA 0.2	-7.15	10.725	.507	-28.51	14.21
	NAA 0.4	-40.60*	10.112	.000	-60.73	-20.47
	NAA 0.6	-60.60*	10.112	.000	-80.73	-40.47
	IAA 0.1	16.54	10.389	.115	-4.14	37.23
	IAA 0.2	4.70	10.112	.643	-15.43	24.83
	IAA 0.4	1.70	10.112	.867	-18.43	21.83
	MS	15.80	10.112	.122	-4.33	35.93

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 (ต่อ)

Multiple Comparisons

Dependent Variable : Root

Media (I)	Media (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MS	NAA 0.1	-20.59	10.389	.051	-41.28	.10
	NAA 0.2	-22.95*	10.725	.036	-44.31	-1.59
	NAA 0.4	-56.40*	10.112	.000	-76.53	-36.27
	NAA 0.6	-76.40*	10.112	.000	-96.53	-56.27
	IAA 0.1	.74	10.389	.943	-19.94	21.43
	IAA 0.2	-11.10	10.112	.276	-31.23	9.03
	IAA 0.4	-14.10	10.112	.167	-34.23	6.03
	IAA 0.6	-15.80	10.112	.122	-35.93	4.33

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 511.229.

* คือ ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ข-9 การจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยจำนวนรากโดยเปรียบเทียบอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างโดยวิธีการ Duncan Multiple Rang Test (DMRT) ของการชักนำราก หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Duncan[a]

		Subset	
Media	**N**	**1**	**2**
IAA 0.1	9	16.56	
MS	10	17.30	
IAA 0.2	10	28.40	
IAA 0.4	10	31.40	
IAA 0.6	10	33.10	
NAA 0.1	9	37.89	
NAA 0.2	8	40.25	
NAA 0.4	10		73.70
NAA 0.6	10		93.70
Sig.		.050	.058

Means for media in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 511.229.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.501.