การจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. โดยใช้ไอโซไซม์ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Identification of *Lansium domesticum* Correa. by Isozyme Technique and Its Tissue Culture for Propagation

วันทนา นวรังสรรค์

Wantana Nawarangsan

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2538

เลขหมู่ QK495.M52 D63 2538 ก.2

Bib Key 84516

ชื่อวิทยานิพนธ์ การจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. โดยใช้ไอโซไซม์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผู้เขียน นางสาววันทนา นวรังสรรค์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ สันติประชา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. โดยใช้ไอโซไซม์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ผู้เขียน	นางสาววันทนา นวรังสรรค์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2538

บทคัดย่อ

การจำแนก *Lansium domesticum* Correa. 3 พันธุ์ คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู จากต้นอายุแตกต่างกัน 3 ระยะ คือ ต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุประมาณ 4-6 เดือน ต้นอายุประมาณ 1.5 ปี และต้นอายุประมาณ 5 ปี โดยใช้เอนไซม์ 7 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส แอซิดฟอสฟาเทส เอสเตอเรส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์ 4 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส แอซิดฟอสฟาเทส เอสเตอเรส และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ย้อมเจลแล้วติดสี พืชทั้งสามพันธุ์และทุกอายุสามารถจำแนกได้ดีโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น เอนไซม์เอสเตอเรสสามารถแยกความแตกต่างได้รองลงมา ส่วนเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสให้แถบที่มีลักษณะเป็นปื้นไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ชัดเจน สำหรับเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสให้จำนวนแถบไม่คงที่ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการจำแนกพืชสกุล *Lansium* โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ให้แถบชัดเจนกว่า 15 นาที การสกัดเอนไซม์จากใบด้วยสารสกัดบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย tris-hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ polyvinylpyrroridone (PVP) เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ disodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เหมาะสมที่สุด และใช้เจลอะคริลาไมด์เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบคมชัดกว่าเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และที่สภาวะดังกล่าว สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชทั้งสามพันธุ์ได้ชัดเจนทั้งในต้นอายุประมาณ 1.5 ปี และ 5 ปี และต้นที่ใช้ตรวจสอบ คือ ต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี และต้นลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา

สำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดลองกองในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ดัดแปลงเติม benzyladenine (BA) เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด ส่วนการเลี้ยงตาข้างและยอดดูกูในอาหารสูตร Woody Plant Medium (WPM) เติม thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ยของตาข้างและยอดสูงสุด ตามลำดับ การเลี้ยงยอดและตาข้างลางสาดและลองกองในอาหารสูตร WPM หรือ MS ร่วมด้วย BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด การเติม gibberellic acid (GA_3) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารสูตรดังกล่าวทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยสูงขึ้นแต่ความแข็งแรงของยอดลดลง ส่วนการเติม naphthalene acetic acid (NAA) เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร WPM ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยของดูกูไม่แตกต่างกับสูตรที่ไม่เติม NAA การเติมน้ำมะพร้าว เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารดังกล่าวให้จำนวนยอดเฉลี่ยของดูกู ลองกองและลางสาดสูงขึ้น และชักนำรากได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการชักนำรากโดยกรีดฐานยอดยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร แล้วจุ่มแช่ในสารละลาย indolebutyric acid (IBA) ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 15 นาที ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารที่เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ IBA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ 40 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title Identification of *Lansium domesticum* Correa. by Isozyme Technique and Its Tissue Culture for Propagation

Author Miss Wantana Nawarangsan

Major Program Plant Science

Academic Year 1995

Abstract

Identification of 3 cultivars of *Lansium domesticum* Correa.: longkong, langsat and duku, was carried out using plants at 3 different ages. 4-6 months old seedlings, 1.5 years old seedlings and 5 years old trees were used for enzyme analyses. 7 enzyme systems; peroxidase, acid phosphatase, esterase, phosphoglucoisomerase, phosphoglucomutase, alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase were employed. The results showed that 4 enzyme systems; peroxidase, acid phosphatase, esterase and phosphoglucoisomerase gave a positive staining reaction. Among these enzymes, peroxidase gave the best system for identification of the differences among 3 cultivars of *Lansium*. Esterase, acid phosphatase and phosphoglucoisomerase gave less satisfactory results. However, zymograms of the latter two enzymes were not clear or constant. Suitable conditions of peroxidase system for identification of *Lansium* were also studied. 20 minutes centrifugation time for leaf extraction gave clearer bands than 15 minutes. Leaf extraction with buffer consisting of 0.5 M tris-hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl), 2% polyvinylpyrroridone (PVP), 2 mM disodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA) and 1% 2-mercapthoethanol were the most successful. Concentration of acrylamide at 12% gave clearer bands than at 10%. These conditions made it possible to identify 3 cultivars of *Lansium* at 1.5 years, 5 years, graft trees and seedlings, taken from Amphor Natawee and Amphor Sadao.

Tissue culture of *Lansium* was investigated. Maximum shoot numbers were induced from seeds of longkong cultured on modified Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.5 mg/l benzyladenine (BA). Axillary buds and apical shoots of duku gave highest shoot length when cultured on woody plant medium (WPM) supplemented with 0.01 and 0.05 mg/l thidiazuron (TDZ). In langsat and longkong, apical shoots and axillary buds gave the highest shoot length when cultured on WPM or MS medium supplemented with 1 mg/l BA. Addition of 0.5 mg/l gibberellic acid (GA_3) to the medium promoted higher

shoot numbers and shoot length, but the shoots were unhealthy. WPM medium supplemented with 0.025 and 0.05 mg/l TDZ or 0.25 and 0.5 mg/l BA in the presence or absence of napthaleneacetic acid (NAA) gave similar results in duku. Addition of 15% coconut water to the medium promoted higher shoot numbers and 10% roots were also induced. By another method, 40% roots were induced by dipping the basal part of longkong shoot in 2,000 mg/l indolebutyric acid (IBA) solution for 15 minutes before culturing in MS medium containing 0.2% activated charcoal and 10 mg/l IBA.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้โดยได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการทำวิจัย การเขียนและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยเพื่อใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้ จึงขอขอบพระคุณยิ่งมาณ.โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ สันติประชา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความรู้ ชี้แนะแนวทางในการเรียนการทำวิจัยตลอดจนถึงการเขียนวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาพืชศาสตร์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและให้ความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณทุกท่านที่ให้การสนับสนุนตลอดจนให้กำลังใจในการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีการศึกษา 2537 และได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประจำปีการศึกษา 2537

วันทนา นวรังสรรค์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
บทที่	
1. บทนำ	
. . บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	20
2. วิธีการวิจัย	
วัสดุ	21
อุปกรณ์	22
วิธีดำเนินการ	25
3. ผล	30
4. วิจารณ์	72
5. สรุป	82
เอกสารอ้างอิง	84
ภาคผนวก	97
ประวัติผู้เขียน	105

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์จากใบลองกอง ลางสาด และดูกู	26
2	ผลของระบบเอนไซม์ที่ใช้ศึกษาการจำแนกต้นลองกอง ลางสาด และดูกู อายุต่างกัน	30
3	ผลของ BA ต่อการสร้างยอดรวมจากเมล็ดลองกองที่เลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	48
4	ผลของ TDZ หรือ BA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	50
5	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด	52
6	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด	53
7	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลองกอง	55
8	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลองกอง	56
9	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 ที่มีต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด	59
10	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด	60
11	ผลของ TDZ หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำพังหรือใช้ร่วมกับ NAA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างดูกู หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์	63
12	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าวและ TDZ หรือ BA 2 ระดับความเข้มข้นต่อความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์	65
13	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าว และ TDZ หรือ BA 2 ระดับความเข้มข้นต่อจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาดและลองกอง หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์	67
14	ผลการจุ่มและไม่จุ่ม IBA ต่อการชักนำรากของลองกอง	69

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 4 เดือน (ก) ใบจากต้นดูกู ลองกอง และดูกูแปรแมร์ อายุ 5 เดือน (ข) ใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 6 เดือน (ค)	32
2	รูปแบบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 4 เดือน (ก) ใบจากต้นดูกู ลองกอง และดูกูแปรแมร์ อายุ 5 เดือน (ข)	33
3	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลางสาด อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และ และใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี ทดลองครั้งที่ 2 (ข)	34
4	รูปแบบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของใบจากต้นลางสาด ดูกู อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวี	35
5	รูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรสของใบจากต้นลางสาด ดูกู อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี ทดลองครั้งที่ 2 (ข)	36
6	รูปแบบเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี	37
7	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 5 ปี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)	38
8	รูปแบบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 5 ปี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)	39
9	รูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 5 ปี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)	40
10	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวีและสะเดา โดยทำการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์ เป็นเวลา 15 นาที (ก) และ 20 นาที (ข)	41
11	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวีและสะเดา ซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ชนิดที่ 1 (ก) ชนิดที่ 2 (ข) และชนิดที่ 3 (ค)	42

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวีและสะเดาซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 ทำการแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 12 เปอร์เซ็นต์ (ข) ต้นอายุ 5 ปี ซึ่งสกัดด้วย บัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 ทำการแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 12 เปอร์เซ็นต์ (ง)	44
13	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด เปรียบเทียบกับต้นลองกองเสียบยอดจากนาทวี	45
14	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกองและลางสาด เปรียบเทียบกับ ต้นกล้าลองกองเพาะเมล็ดจากสะเดา ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)	46
15	จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดลองกอง ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม BA เข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	48
16	ลักษณะยอดลองกองที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	49
17	ลักษณะยอดลองกองหลังย้ายเลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	49
18	ผลของ TDZ หรือ BAในอาหารสูตร WPM ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	51
19	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	54
20	ยอดลางสาดที่ได้จากการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	54
21	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลองกอง หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	57
22	ยอดลองกองที่ได้จากการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	57

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด	61
24	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด	61
25	ยอดลางสาดที่ได้จากการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	62
26	ผลของ TDZ หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำพัง ในอาหารสูตร WPM หรือใช้ร่วมกับ NAA ต่อ ความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู	64
27	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ TDZ หรือ BA 2 ระดับความเข้มข้นต่อความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู	66
28	ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ TDZ หรือ BA 2 ระดับความเข้มข้น ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดลางสาดและลองกอง หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์	68
29	ต้นลองกองออกรากที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA 2 ระดับความเข้มข้น เป็นเวลา 12 สัปดาห์	68
30	รากที่ชักนำจากยอดที่จุ่มแช่ IBA 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	70
31	รากที่ชักนำจากการเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 3-12 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	71

ตัวย่อและสัญลักษณ์

DK	=	duku
LK	=	lonkong
LS	=	langsat
NT	=	Natawee (longkomg)
PM	=	duku paremare
SD	=	Sadao (longkong)
ACP	=	acid phosphatase
ADH	=	alcohol dehydrogenase
EST	=	esterase
MDH	=	malate dehydrogenase
PER	=	peroxidase
PGI	=	phosphoglucoisomerase
PGM	=	phosphoglucomutase
Na_2EDTA	=	disodium ethylenediaminetetraacetate
PVP	=	polyvinylpyrroridone
Tris-HCl	=	tris-hydroxylmethyl aminomethane
BA	=	benzyladenine
KN	=	kinetin
2-iP	=	2-isopentenyl adenine
TDZ	=	thidiazuron
IAA	=	indole acetic acid
IBA	=	indole butyric acid
NAA	=	naphthaleneacetic acid
GA_3	=	gibberellic acid
CW	=	coconut water
DKW	=	Driver and Kuniyoki's Walnut Medium
GD	=	Gressholf and Doy Medium
MS	=	Murashige and Skoog Medium
WPM	=	Woody Plant Medium
QL	=	Quoirin and Lepoivre Medium

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ลองกอง ลางสาด และดูกู เป็นไม้ผลเมืองร้อนจัดอยู่ในอันดับ Meliales วงศ์ Meliaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lansium domesticum* Correa. เต็ม สมิตินันท์ (2523) ได้จัดแบ่งพืชสกุล *Lansium* ว่าอยู่ในสกุล *Aglaia* และให้ชื่อวิทยาศาสตร์ลองกองและดูกูว่า *Aglaia dookkoo* Griff. และให้ชื่อวิทยาศาสตร์ลางสาดว่า *Aglaia domestica* Pelleg. พืชสกุลดังกล่าวมีถิ่นกำเนิดในหมู่เกาะมาลายู ปลูกกันมากในประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย สามารถเจริญได้ดีในเขตร้อนชื้น สำหรับประเทศไทยในปัจจุบันมีแหล่งปลูกลางสาด และลองกองอยู่ในภาคใต้ ภาคตะวันออกและภาคเหนือบางจังหวัดที่มีอากาศชุ่มชื้น ส่วนดูกูปลูกในบางจังหวัดของภาคใต้ เช่น ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส ลองกองเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากผลมีรสชาติหอมหวาน มียางและเมล็ดจำนวนน้อย จึงทำให้ลองกองมีราคาสูงกว่าลางสาด โดยราคาที่เกษตรกรขายจากสวนสูงสุด 130 บาทต่อกิโลกรัม ราคาต่ำสุด 35 บาท ราคาเฉลี่ย 50-70 บาทต่อกิโลกรัม (สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคใต้, 2537) ปัจจุบันลองกองเป็นไม้ผลที่เกษตรกรสนใจปลูกกันมากและได้รับการส่งเสริมให้ปลูกจากหน่วยงานภาครัฐบาล พื้นที่ปลูกลองกองของภาคใต้ ในปี 2524/2525 มีทั้งหมด 26,985ไร่ และมีการเพิ่มพื้นที่ปลูกทั้งหมดเป็น 41,642 ไร่ ในปี 2531/2532 ส่วนพื้นที่ที่ให้ผลผลิตแล้วเพิ่มจาก 12,564 ไร่ ในปี 2524/2525 เป็น 24,961ไร่ ในปี 2531/2532 (ชาย โฆรวิส และวรรณจันทร์ โฆรวิส, 2537) ในปี 2536 มีพื้นที่ปลูกทั้งหมด 86,323 ไร่ เป็นพื้นที่ให้ผลผลิตแล้ว 33,679 ไร่ และพื้นที่ยังไม่ให้ผลผลิต 52,644 ไร่ (สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคใต้, 2537) ดังนั้นความต้องการต้นกล้าลองกองจึงมีสูง เนื่องจากลองกองมีการพัฒนาของผลส่วนใหญ่โดยไม่มีการปฏิสนธิ (parthenocarpic fruit) หรืออาจเกิดการปฏิสนธิได้ในอัตราต่ำ จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์น้อยมากแม้ว่าดอกลองกองเป็นดอกสมบูรณ์เพศ แต่ละอองเกสรมีเปอร์เซ็นต์เป็นหมันสูง ผลลองกองจึงมีเมล็ดน้อยหรือไม่มีเมล็ดเลย เมล็ดที่เกิดขึ้นเกิดจากการพัฒนาของเซลล์นิวเซลลัส (nucellus) (ภูวดล บุตรรัตน์, 2532) และเฉพาะเมล็ดที่มีขนาดใหญ่เท่านั้นที่สามารถงอกและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นจึงมีข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด แต่เกษตรกรบางรายมีความต้องการปลูกต้นกล้าที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

เนื่องจากต้นจากเมล็ดมีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นที่ทาบกิ่งหรือเสียบยอด ประกอบกับต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันทำให้เกิดปัญหาในการคัดเลือกต้นกล้าลองกองไปปลูก นอกจากนี้การขยายพันธุ์โดยการทาบกิ่งหรือเสียบยอดมีข้อควรระวัง คือ ยอดพันธุ์ที่นำมาใช้ต้องเป็นยอดลองกองพันธุ์แท้ การใช้พันธุ์ไม่แท้เป็นการเสียเวลาและได้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจต่ำ (ชาย โฆรวิส และวรรณจันทร์ โฆรวิส, 2537)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบลองกอง ลางสาด และดูกู จากต้นอายุ 4 เดือนหลังงอก พบว่าใบลองกองและใบดูกู มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก คือใบมีรูปไข่ (ovate) ปลายใบมนกลมมีติ่งหนาม (macronate) โคนใบมน (round) ผิวใบลองกองเป็นคลื่น ส่วนผิวใบดูกูค่อนข้างเรียบ สำหรับใบลางสาดมีรูปร่างรี (elliptical) หรือรูปเรียวยาว (oblong) ซึ่งแตกต่างจากใบลองกองและดูกู ผิวใบลางสาดเป็นคลื่นเหมือนผิวใบลองกอง (มงคล ศรีวัฒนวรชัย และคณะ, 2524) และจากการศึกษาการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้าลองกองอายุ 11 เดือน พบว่าลองกองและดูกูมีอัตราส่วนใบรูปไข่ : รูปรี ใกล้เคียงกันคือ 1 : 1 แต่ลองกองมีรอยคลื่นบนผิวใบมากและขอบใบมีลักษณะที่เรียกว่า ubdulate มากกว่าดูกู ส่วนลางสาดมีอัตราส่วนใบรูปไข่ : รูปรี 1 : 3 และรอยคลื่นบนผิวใบมีน้อยกว่าลองกองแต่มากกว่าดูกู ส่วนลักษณะการเกิดใบ การจัดเรียงใบ และการจัดเรียงเส้นใบของพืชทั้งสามพันธุ์ไม่แตกต่างกัน (ประพันธ์ อรรจนกุล, 2534) จากที่กล่าวมาเห็นได้ว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานในการจำแนกพันธุ์พืชทั้ง 3 พันธุ์นี้ยังให้ผลที่ไม่ชัดเจนถูกต้องแน่นอน การใช้ไอโซไซม์ (isozymes) โดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสเป็นตัวตรวจสอบทางชีวเคมีซึ่งเป็นผลจากลักษณะพันธุกรรมของพืชโดยตรงสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชได้ในระยะเวลาอันสั้นและให้ความถูกต้องแน่นอนกว่า มีรายงานความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล ท้อ ราสเบอรี่ มะม่วง และส้ม เป็นต้น ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้จึงคาดว่าสามารถช่วยแก้ปัญหาในการคัดเลือกต้นกล้าลองกองได้ และช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการใช้ต้นกล้าลองกองที่ไม่ตรงตามพันธุ์ นอกจากนี้การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์ลองกองต้นที่ดีมีความจำเป็นสูง ซึ่งอาจช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนต้นกล้าพันธุ์ดี ดังมีรายงานความสำเร็จในไม้ผลยืนต้นเมืองหนาวหลายชนิด และในไม้ผลยืนต้นเมืองร้อนบางชนิด

ตรวจเอกสาร

1. หลักการตรวจสอบพันธุ์พืชโดยใช้ไอโซไซม์

ไอโซไซม์หรือไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) หมายถึง เอนไซม์ที่มีรูปร่างโมเลกุลหลายแบบ แต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ซึ่งไอโซไซม์มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิต (Markert and Moller, 1959) การศึกษาการใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสอาศัยหลักการที่สำคัญ คือ ไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงลำดับกัน ลำดับของกรดอะมิโนนี้ถูกแปลรหัสมาจากพันธุกรรมบนสายนิวคลีโอไทด์ ไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนแตกต่างกันมีขนาดประจุสุทธิและรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกัน เมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของเอนไซม์เคลื่อนที่ในอัตราแตกต่างกันด้วย หลังจากทำการย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับไอโซไซม์แต่ละชนิด ปรากฏแถบสีของเอนไซม์รูปแบบต่าง ๆ (Bailey, 1983) แถบสีที่ปรากฏนี้เรียกว่า รูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme patterns) ไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิมากกว่าเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าไอโซไซม์ที่มีประจุน้อยกว่า (Doehlert and Duke,1983) อนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าลบเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยอัตราการเคลื่อนที่ขึ้นกับความเข้มในสนามไฟฟ้า และจำนวนประจุไฟฟ้ารวมของอนุภาค การเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันนั้นเป็นผลโดยตรงจากลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Crawford, 1983)

2. สภาวะที่เหมาะสมของระบบเอนไซม์ในการตรวจสอบพันธุ์พืช

นอกจากพันธุกรรมแล้วสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ เช่น ระยะเวลาในการปั่นตกตะกอนสารสกัด องค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากใบ สภาวะที่เหมาะสมในแยกโมเลกุลของเอนไซม์ เช่น องค์ประกอบของเจลบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของเจล องค์ประกอบของอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ แรงเคลื่อนไฟฟ้า ระยะเวลาในการแยกโมเลกุลของเอนไซม์ ตลอดจนถึงขั้นตอนในการย้อมสีปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเอนไซม์และความคมชัดของแถบ

2.1 ระยะเวลาการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์

Shields, *et al.* (1983) รายงานว่าในการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์ ระยะเวลาที่ใช้อยู่ในช่วง 10-20 นาที ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ปุณฑริกา มะริณสุต (2534) ใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ในการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์จากใบมะม่วง ส่วน

ในพืชอื่น ๆ มีการปั่นตกตะกอนที่ความเร็วและระยะเวลาแตกต่างกัน เช่น คัมควอท ใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที (Rahman and Nito, 1994b) วอลนัท ใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที (Arulsekar, *et al.*, 1985) ฝ้าย ใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 10 นาที (Kloth, 1992) มันฝรั่ง ใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 15 นาที (Cardy, *et al.*, 1981 อ้างโดย Shields, *et al.*, 1983) ทิวลิป ใช้ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที (Booy, *et al.*, 1993) เป็นต้น

2.2 บัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์

องค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากพืชโดยทั่วไปประกอบด้วย tris-HCl เข้มข้น 0.05-0.5 โมลาร์ pH อยู่ในช่วง 6.8-8.5 หรืออาจใช้ Na_2PO_4 บัฟเฟอร์แทน tris-HCl นอกจากนี้มีการเติม PVP เข้มข้น 2-10 เปอร์เซ็นต์ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ cystein เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Shield, *et al.*, 1983) การเติม PVP 2-mercapthoethanol cystein หรือ diethyl dithiocarbarmate (DIECA) เพื่อยับยั้งเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการออกซิไดส์เอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชให้เกิดเป็นควิโนนและแทนนิน ซึ่งมีผลให้แถบของเอนไซม์เป็นปื้น ส่วนการเติม Na_2EDTA ลงไปเพื่อป้องกันอันตรายจากโลหะหนักที่อาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (จริงแท้ ศิริพานิช, 2531) ในการสกัดเอนไซม์ในพืชต่างชนิดกันหรือในพืชชนิดเดียวกันแต่ชิ้นส่วนพืชต่างกันอาจใช้องค์ประกอบของบัฟเฟอร์ต่างกัน เช่น ในการสกัดเอนไซม์จากใบของแอปเปิ้ล บัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วย tris-HCl เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไบซัลเฟต 0.08 กรัม โซเดียมเตตราซัลเฟต 0.28 กรัม PVP เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 0.176 เปอร์เซ็นต์ (Korban and Bournival, 1987) แต่ในการสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อส่วนเปลือกไม้ ใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.3 Na_2EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ diothioerythritol เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ phenylmethyl sulfonyl fluoride เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 14 มิลลิโมลาร์ triton X-100 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ PVP เข้มข้น 2 กรัม (Menendez, *et al.*, 1986)

2.3 ความเข้มข้นของเจล

ความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์ที่ใช้อยู่ในช่วง 6-12 เปอร์เซ็นต์ (Shields, *et al.*, 1983) แตกต่างกันตามชนิดของพืชและระบบเอนไซม์ที่ใช้ศึกษา เช่น การศึกษาเอนไซม์ชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส (shikimate dehydrogenase) และฟอสโฟกลูโคมิวเทส (phosphoglucomutase) ในกล้วยใช้เจลเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ศึกษาเอนไซม์ เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ใช้เจลเข้มข้น 8.5

เปอร์เซ็นต์ (Jarret and Litz,1986) การศึกษาเอนไซม์กลูตาเมทออกซาโลอะซีเททรานอะมิเนส (glutamate oxaloacetate transaminase) ในส้มใช้เจลเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (Rahman and Nito, 1994a) การศึกษาเอนไซม์หลายชนิด ในกัมควอทใช้เจลเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (Rahman and Nito, 1994b) การศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในหน่อไม้ฝรั่งใช้เจลเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (Colby and Peirce, 1988) การศึกษาเอนไซม์ลูซีนอะมิโนเบปทิเดส (leucine aminopeptidase) ในคาร์เนชั่นใช้เจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (Messeguer and Arus, 1985) การศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) ในทิวลิปใช้เจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (Booy *et al*, 1993)

2. ระบบไอโซไซม์ในการตรวจสอบพันธุ์พืช

ในการศึกษาความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชหลายพันธุ์โดยใช้ไอโซไซม์สามารถใช้ไอโซไซม์เพียงระบบเดียว แสดงความแตกต่างของพันธุ์พืชได้ เช่น การศึกษาความแตกต่างของท้อพันธุ์ต่าง ๆ (*Prunus perisa* L. Batsch) โดยใช้เอนไซม์คะตะเลส (catalase) พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างได้ (Werner, 1992) แต่บางพืชพบว่าอาจต้องใช้ไอโซไซม์หลายระบบตรวจสอบความแตกต่างของพืช เช่น การศึกษาในราสเบอรี่ (*Rubus idaeus* L.) จำนวน 104 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ 6 ระบบ คือ มาเลทดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) ฟอสโฟกลูโคไอโซ-เมอเรส (phosphoglucoisomerase) ฟอสโฟกลูโคมิวเทส ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส และไทรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (triosphosphate isomerase) พบว่าราสเบอรี่ 75 พันธุ์ (72 เปอร์เซ็นต์) มีรูปแบบไอโซไซม์เฉพาะตัวและสามารถตรวจสอบความแตกต่างได้โดยใช้ไอโซไซม์ทั้ง 6 ระบบ (Cousineau, *et al.*, 1993)

การศึกษาไอโซไซม์ในพืชนั้นพบว่า นอกจากเกี่ยวข้องกับชนิดพืชแล้วยังมีความสัมพันธ์กับชนิดและอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดเอนไซม์ด้วย การศึกษาในแอปเปิ้ล (*Malus domestica* Borkh) จำนวน 54 พันธุ์ โดยสกัดเอนไซม์จากส่วนของใบแก่ ใบอ่อน กลีบเลี้ยงละอองเกสร และผลสุก ตรวจสอบโดยใช้เอนไซม์ 6 ระบบ คือ ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ไอโซซิเตรท-ดีไฮโดรจีเนส ไทรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส ไดอะฟอเรส (diaphorase) 6-ฟอสโฟกลูโคเนท-ดีไฮโดรจีเนส (6-phosphogluconate dehydrogenase) และแอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรส (aspartate aminotransferase) พบว่า กลีบเลี้ยง ผลและใบ มีรูปแบบของไอโซไซม์เหมือนกันแม้ว่าจะสกัดจากเนื้อเยื่อต่างกัน อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่สกัดจากใบอ่อนมีแถบชัดเจนกว่าใบแก่ กลีบเลี้ยง และละอองเกสรให้แถบชัดเจนเฉพาะบางเอนไซม์ ส่วนผลให้แถบชัดเจนน้อยที่สุด แสดงว่าปริมาณเอนไซม์มีความเกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อเช่นกันและในการศึกษานี้ยังพบว่าสภาพแวดล้อมและ

อายุของต้นพืชไม่มีผลต่อตำแหน่งแถบของไอโซไซม์ (Weeden and Lamb, 1985) ต่อมามีการศึกษาจำแนกพันธุ์แอปเปิ้ลที่ใช้เป็นต้นตอ จำนวน 33 พันธุ์ พบว่า ตัวอย่างพืชที่เก็บจากสถานที่ต่างกันและช่วงเวลาต่างกันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของไอโซไซม์ (Menendez, *et al.*, 1986) แต่ในการตรวจสอบพันธุ์ท้อโดยใช้เอนไซม์ 10 ระบบ สามารถจำแนกพันธุ์ได้สมบูรณ์ที่สุดในระยะต้นกล้ามีอายุ 1 เดือน ซึ่งรูปแบบของไอโซไซม์ แตกต่างกันขึ้นกับระยะการเจริญเติบโต (Mowrey and Werner, 1990) ดังนั้นสภาพแวดล้อมอาจมีผลต่อจำนวนไอโซไซม์บ้างแต่การทดลองส่วนใหญ่ยังยืนยันได้ว่าไอโซไซม์มีความคงตัวและไม่เป็นข้อจำกัดในการจำแนกพันธุ์พืช

3. การใช้ไอโซไซม์ในการตรวจสอบพันธุ์พืช

การจำแนกพันธุ์ไม้ผลโดยการใช้ไอโซไซม์มีการพัฒนามาเป็นลำดับ ในระยะแรกมีการใช้ไอโซไซม์ในการตรวจสอบลักษณะและพันธุ์ของไม้ผล แต่ต่อมามีการศึกษาแหล่งกำเนิดของต้นกล้าในการตรวจสอบลูกหลานที่เกิดจากการผสมตัวเองและผสมข้ามเพื่อใช้เป็นหลักฐานในการรวบรวมพันธุ์และความคล้ายคลึงของพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้กับงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืชได้ถูกต้องยิ่งขึ้นและสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการคัดเลือกได้โดยทำการตรวจสอบในช่วงเป็นต้นกล้า ส่งผลให้โครงการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ๆ มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในระยะหลังมีการใช้ไอโซไซม์ตรวจสอบลูกผสมจากการรวมเซลล์ การถ่ายยีนและจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (Torres, 1983 ; Ollitrault, 1990)

การศึกษาไอโซไซม์ในพืชสกุล *Prunus* ซึ่งเป็นไม้ผลเขตอบอุ่นที่สำคัญ ได้แก่ เชอรี่ พลัม แอปริคอต ท้อ อัลมอนด์ เมื่อใช้ไอโซไซม์เป็นตัวตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมมีประโยชน์เหนือกว่าการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานคือ สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน โดยสามารถแยกได้ในระยะต้นกล้า ช่วยให้ประหยัดเวลาและพื้นที่ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ต่อการศึกษาความผันแปรของประชากร ประเมินอัตราการผสมข้าม ศึกษาวิวัฒนาการและสามารถตรวจสอบพันธุ์ ชนิด และลูกผสม (Arulsekar, *et al.*, 1986a) การตรวจสอบท้อ 290 พันธุ์โดยใช้เอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าสามารถตรวจสอบได้ และจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเอนไซม์ดังกล่าวในลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมชั่วที่ 2 พบว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจึงสามารถใช้เอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสเป็นตัวตรวจสอบทางพันธุกรรม (genetic marker) ในท้อได้ (Arulsekar, *et al.*,1986a)

การศึกษารูปแบบของเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสของใบพืชสกุล *Prunus* 7 ชนิด คือ เชอรี่เปรี้ยว (*Prunus cerasus* L.) เชอรี่หวาน (*P. avium*) กราวด์เชอรี่ (ground cherry) (*P.fruticosa*

Pall.) และ ลูกผสมเปิดของ *P. mahaleb* L., *P. canescens* Thumb., *P. canescens* Bois.และ *P. subhirtella* Miq. พบว่าเชอรี่เปรี้ยวมีรูปแบบเอนไซม์กึ่งกลางระหว่างเชอรี่หวานและกราวด์เชอรี่ ซึ่งสนับสนุนสมมติฐานว่าเชอรี่เปรี้ยวคือลูกผสมระหว่างเชอรี่หวานกับกราวด์เชอรี่ และไม่พบความแปรปรวนภายในชนิดของเชอรี่เปรี้ยว เชอรี่หวาน กราวด์เชอรี่ ลูกผสมเปิด *P. mahaleb* และลูกผสมเปิด *P. canescens* แต่พบความแปรปรวนในลูกผสมเปิด *P. subhirtella* และลูกผสมเปิด *P. incisa* ซึ่งมีรูปแบบเอนไซม์ 2 แบบ ดังนั้นเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสมีโพลีมอร์ฟีซึม (polymorphism) เพียงพอในการใช้เป็นตัวตรวจสอบทางพันธุกรรมของลูกผสมระหว่างชนิดของพืชในสกุลนี้ได้ (Hancock and Iezzoni, 1988)

การศึกษาเปรียบเทียบความแปรปรวนของไอโซไซม์ในพันธุ์ของท้อและอัลมอนด์ โดยใช้เอนไซม์แอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส มาเลทดีไฮโดรจีเนส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส พบว่าในท้อที่ผสมตัวเองมีรูปแบบของเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสแตกต่างจากอัลมอนด์ซึ่งเกิดจากการผสมข้าม โดยพบว่ารูปแบบเอนไซม์ในท้อมีโพลีมอร์ฟีซึมเพียง 1 โลไซ แต่อัลมอนด์มีโพลีมอร์ฟีซึม 9 โลไซ จากทั้งหมด 12 โลไซ ของเอนไซม์ 6 ระบบ นอกจากนี้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของท้อและอัลมอนด์มีประโยชน์ในการพัฒนาการแหล่งเชื้อพันธุกรรมและการพัฒนาพันธุกรรมของท้อและอัลมอนด์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ (Arulsekar, *et al.*, 1986b)

การถ่ายทอดลักษณะของเอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนสของท้อ ลูกผสมข้ามระหว่างท้อและอัลมอนด์ พบว่า เป็นไปตามกฎของเมนเดล ส่วนชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส สามารถใช้ในการตรวจสอบท้อ ลูกผสมข้ามระหว่างท้อและอัลมอนด์ได้ โดยลูกผสมข้ามระหว่างท้อและอัลมอนด์มีรูปแบบเอนไซม์ลักษณะเป็นเฮตเทอโร-ไซกัส (Mowrey and Werner, 1990)

การใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพืชในสกุล *Prunus* subgenus *Amygdalus* โดยใช้เอนไซม์ 17 ระบบ พบว่า เอนไซม์ แอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรส สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ส่วนเอนไซม์ไอโซซิเตรท-ดีไฮโดรจีเนส และลูซีนอะมิโนเปปทิเดส สามารถจำแนกได้บางชนิด ในขณะที่เอนไซม์เปอร์ออก-ซิเดส ไม่สามารถใช้ในการจำแนกได้เลย (Mowrey, *et al.*, 1990)

จากการศึกษาระดับความแปรปรวนของไอโซไซม์ในท้อ แอปริค็อต อัลมอนด์ และพลัมเปรียบเทียบกับพืชยืนต้นอื่น ๆ โดยใช้เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ลูซีนอะมิโน-เปปทิเดส กลูตาเมทออกซาโลอะซีเททรานอะมิเนส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส มาเลทดีไฮโดรจีเนส

เปอร์ออกซิเดส ไดอะฟอเรส ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส และชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส พบว่ามีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการผสมพันธุ์ (mating behavior) และพื้นฐานทางพันธุกรรม อัลมอนด์และพลัมซึ่งเกิดจากการผสมข้ามมีความแปรปรวนสูงสุด แต่มีค่าต่ำกว่าแอปเปิ้ล อาโวกาโด และคาเมลเลีย อย่างไรก็ตามความแปรปรวนดังกล่าวมีค่าสูงกว่าความแปรปรวนเฉลี่ยของพืช ยืนต้นที่ไม่ใช่พันธุ์ปลูก นอกจากนี้ความแปรปรวนของประชากรพันธุ์ปลูกอาจสัมพันธ์กับสภาพพื้นที่ปลูก การผสมข้ามชนิด การคัดเลือก เป็นต้น (Byrne, 1990)

การศึกษาความแปรปรวนภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มของท้อ ได้แก่ ฟรีสโตน คลิง-สโตน และเนคทารีน จากสารสกัดจากใบ 26 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์เอสเตอเรส เปอร์ออกซิเดส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่ามีความแปรปรวนของรูปแบบเอนไซม์ 2, 3 และ 4 แถบ ในเอนไซม์แต่ละระบบและมีความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม 20 เปอร์เซ็นต์ ความแปรปรวนภายในกลุ่มเนคทารีนต่ำสุด แสดงว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำ (Ibanez, *et al.*, 1993)

การตรวจสอบพลัม (*Prunus salicina* Lindl.) แอปริค็อต (*P. armeniaca*) และพลัมค็อต ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพลัมกับแอปริค็อต โดยใช้เอนไซม์ 6 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส ฟอสโฟ-กลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส ลูซีนอะมิโนเปปทิเดส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส สามารถตรวจสอบพลัมค็อตในชั่วแรกได้ดีที่สุด ส่วนเอนไซม์ระบบอื่นๆแสดงอัลลิลเฉพาะของพลัมและแอปริค็อต ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจสอบการกระจายตัวรุ่นลูกในชั่วต่อไป (Byrne and Littleton, 1989a)

การตรวจสอบแอปริค็อต 2 สปีชีส์ คือ *Prunus armeniaca* L. และ *P. mandshurica* Maxim., Kochne. 69 โคลน โดยใช้เอนไซม์ 7 ระบบคือ เปอร์ออกซิเดส ไทรโอสฟอสโฟกลูโค-ไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ลูซีนอะมิโนเปปทิเดส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และ 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส เพื่อศึกษาความแปรปรวนของเอนไซม์และตรวจสอบความแตกต่างระหว่างโคลน พบว่า 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส และฟอสโฟกลูโคมิวเทส สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 17 โคลน และพบว่าความผันแปรของเอนไซม์ในแอปริค็อตมีสูงกว่าในท้อแต่น้อยกว่าพลัมหรืออัลมอนด์ (Byrne and Littleton, 1989b)

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของยีน 5 โลไซในแอปริค็อตโดยใช้เอนไซม์ 3 ระบบ คือ มาเลทดีไฮโดรจีเนส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส พบว่าความแปรปรวนควบคุมโดย 2 หรือ 3 อัลลิล ตามกฎของเมนเดลและไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งโลคัส MDH-1 และ MDH-2 (Byrne, 1989)

การศึกษาความแปรปรวนของวอลนัทจากเอนไซม์สกัดจากใบของวอลนัท 17 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ คือ มาเลทดีไฮโดรจีเนส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส เปอร์ออก-ซิเดส และแอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรส และศึกษาเอนไซม์สกัดจากละอองเกสรของวอลนัท 15 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ 2 ระบบ คือ มาเลทดีไฮโดรจีเนส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส พบว่าวอลนัทพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดต่างกันปรากฏจำนวนแถบต่างกันและมีอัตราการคลื่อนที่สัมพัทธ์ต่างกันซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบกลุ่มได้ เอนไซม์ที่สกัดจากละอองเกสรมีความแปรปรวนมากกว่าเอนไซม์สกัดจากใบเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 15 พันธุ์ การตรวจสอบเอนไซม์จากละอองเกสร 15 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสจัดแบ่งได้ 10 กลุ่ม และหากใช้เอนไซม์ 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนสจัดแบ่งได้ 14 กลุ่ม ส่วนการตรวจสอบวอลนัท 17 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์จากใบพบว่า มีเพียง 10 พันธุ์ที่ตรวจสอบความแตกต่างได้โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และ 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส ซึ่งสามารถแบ่งแยกได้ 9 กลุ่ม และ 7 กลุ่ม ตามลำดับ และไม่สามารถใช้เอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอสปาเททอะมิโนทราน-เฟอเรสตรวจสอบความแปรปรวนของพันธุ์ได้ (Solar, *et al.*, 1994)

การตรวจสอบลักษณะพันธุ์เปอร์เซียนวอลนัท (*Juglans regia* L.) โดยการใช้เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส และเอสเตอเรส พบว่าเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส ควบคุมโดยยีน 2 โลไซ คือ PGM-1 และ PGM-2 โดย PGM-1 มี 3 อัลลิล และ PGM-2 มี 1 อัลลิล ส่วนเอสเตอเรส ควบคุมโดยยีน 1 โลไซ มี 3 อัลลิล ตำแหน่ง EST-2 ปรากฏรูปแบบของแถบชัดและคงที่ การกระจายตัวของ EST-2 ควบคุมโดย 2 อัลลิล (Arulsekar, *et al.*, 1986c)

การตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมของไอโซไซม์ในเปอร์เซียนวอลนัท (*J. regia*) และนอทเธินแบล็ควอลนัท (*J. hindsii*) ใช้เอนไซม์ 2 ระบบ คือ ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส และแอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรส จากสารสกัดจากแคลลัสและใบจากต้นที่มีอายุน้อยจนถึงต้นอายุมากให้ผลไม่แตกต่างกัน การวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ พบว่าที่ตำแหน่ง PGI-2 AAT-1 และ AAT-2 มีการถ่ายทอดลักษณะเป็นไปตามกฎของเมนเดล การทดสอบความสัมพันธ์ของยีนพบว่ามีการแยกตัวอย่างอิสระทั้งในฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส และแอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรส ดังนั้นการใช้เอนไซม์เหล่านี้มีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์วอลนัท (Arulsekar, *et al.*,1985)

การศึกษาเอนไซม์คะตะเลส เอสเตอเรส และเปอร์ออกซิเดสในเมล็ดและใบของแอปเปิ้ล (*Malus domestica* Borkh.) อายุ 3-5 สัปดาห์ พบว่า เอนไซม์คะตะเลสจากเมล็ดและใบให้แถบคล้ายกัน ส่วนเอนไซม์เอสเตอเรสและเปอร์ออกซิเดสจากเมล็ดและใบให้แถบต่างกัน (Korban and Bournival, 1987) ส่วนการตรวจสอบพันธุ์แอปเปิ้ล 54 พันธุ์ พบว่า 6-ฟอสโฟ-

กลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส และแอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรสมีความเหมาะสมที่สุด (Weeden and Lamb, 1985) การตรวจสอบต้นตอแอปเปิ้ลจำนวน 13 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดร-จีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส มาเลท-ดีไฮโดรจีเนส และเปอร์ออกซิเดส พบว่าเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทสและ 6-ฟอสโฟกลูโคเนท-ดีไฮโดรจีเนสสามารถตรวจสอบได้ดี (Samimy and Cummins, 1992) ในขณะที่ Menendez, *et al.*, (1986) รายงานการตรวจสอบต้นตอแอปเปิ้ลจำนวน 33 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิ-เดส เอสเตอเรส แอซิดฟอสฟาเทส และอินโดลอะซีติกแอซิดออกซิเดส (idoleacetic acid oxidase) พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และแอซิดฟอสฟาเทสได้ผลดี

การตรวจสอบลูกผสมองุ่นระหว่าง *Vitis vinifera* ซึ่งมีโครโมโซม 2n = 38 และ *V. rotundifolia* ซึ่งมีโครโมโซม 2n = 40 โดยใช้เอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโค-ไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่และลูกผสมได้ชัดเจน (Goldy, *et al.*, 1989) Chaparro, *et al.* (1989) รายงานการตรวจสอบลูกผสมระหว่างสกุลของ *Vitis vinifera* และ *Muscadinia rotundifolia* โดยใช้เอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่า โพลีมอร์ฟีซึม ขององุ่น 2 สกุล ที่ตรวจสอบได้แตกต่างกันเมื่อใช้เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส และเอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ที่ตำแหน่ง PGI-1 PGM-2 และ IDH-1 ตามลำดับ การใช้เอนไซม์ 2 ระบบ คือ ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส เหมาะสำหรับการตรวจสอบลูกผสมชั่วแรกสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วในขณะที่ต้นมีอายุน้อยก่อนระยะออกดอก

การตรวจสอบราสเบอรี่ (*Rubus idaeus*) 78 พันธุ์ ใช้เอนไซม์ 6 ระบบ คือ ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส และมาเลทดีไฮโดร-จีเนส ชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส และไทรโอสฟอตเฟตดีไฮโดรจีเนส พบว่า เอนไซม์ที่มีประโยชน์มากที่สุดคือฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทสและมาเลทดีไฮโดรจีเนส โดยใช้เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส ตรวจสอบพันธุ์ได้ดีที่สุดถึง 55 พันธุ์ ส่วนอีก 23 พันธุ์ ไม่สามารถตรวจสอบได้ (Cousineau and Donnelly, 1992)

อาโวกาโด (*Persea americana* Mill.) เป็นพืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ แต่ในบางครั้งเกสรตัวผู้ หรือเกสรตัวเมียผิดปกติ ระบบการผสมพันธุ์จึงเป็นแบบ synchronous dichogamy ทำให้เกิดการผสมข้าม ดังนั้นเพื่อให้ตรงกับวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ จึงควรมีการตรวจสอบ

ลูกที่ได้ซึ่งอาจเกิดจากการผสมตัวเองหรือผสมข้าม การจำแนกจากละอองเกสรของพ่อแม่โดยใช้ไอโซไซม์ไม่สามารถตัดสินได้ชัดเจน จึงควรใช้ใบหรือผล ใบที่ใช้มีอายุประมาณ 5-6 สัปดาห์หลังจากเมล็ดงอก ส่วนผลใช้ได้เมื่อมีอายุ 5-8 ปี เนื่องจากใบเลี้ยงมีพันธุกรรมเช่นเดียวกับใบและผล ดังนั้นจึงใช้ใบเลี้ยงในการตรวจสอบ (Torres and Bergh, 1980) และจากการตรวจสอบโดยใช้เอนไซม์ 6 ระบบ พบว่า สามารถตรวจสอบพันธุ์อาโวกาโดได้โดยใช้เอนไซม์ กลูตาเมทออก-ซาโลอะซีเททรานอะมิเนส ลูซีนอะมิโนเบปทิเดส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส (Torres, 1984)

การใช้ไอโซไซม์เป็นตัวตรวจสอบทางพันธุกรรมในมะคาเดเมีย 2 ชนิด คือ *Macadamia integrifolia* Maiden. and Betch. และ *Macadamia ternifolia* F. Muell. 73 จีโนไทป์ โดยใช้เอนไซม์ 9 ระบบ พบว่า เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสสามารถตรวจสอบได้ดีที่สุดและพบความแปรปรวนของแถบในแต่ละพันธุ์นับว่ามีประโยชน์ต่อการศึกษาวิวัฒนาการของแหล่งพันธุกรรม การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์และการพัฒนาพันธุ์ (Vithanage and Winks, 1992)

สำหรับประเทศในเขตร้อนนั้นการใช้ไอโซไซไซม์ในการตรวจสอบพันธุ์ไม้ผลยืนต้นที่ความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ มะม่วง และส้ม ปุณฑริกา หะริณสุต (2534) ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบมะม่วง 18 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์มะม่วงส่วนใหญ่มีความแตกต่างกันทั้งจำนวนแถบและแถบหลัก (major band) แต่มะม่วงพันธุ์อกร่องใหญ่และมะม่วงพันธุ์แห้วมีจำนวนแถบและตำแหน่งของแถบคล้ายกัน ส่วนมะม่วงพันธุ์อกร่อง 2 พันธุ์ที่ใช้ศึกษาคือ อกร่องทองและอกร่องเขียว มีแนวโน้มว่าจำนวนเปอร์ออกซิเดสน้อยกว่ามะม่วงพันธุ์อื่นๆ ที่ศึกษา ในการตั้งชื่อโคลนหรือพันธุ์มะม่วงมีความยุ่งยาก เนื่องจากในโคลนหรือพันธุ์เดียวกันมีชื่อต่างกันหรือโคลนต่างกันมีชื่อเดียวกัน ดังนั้นจึงมีการใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกโคลนหรือพันธุ์ดังกล่าว เพื่อให้ผู้ซื้อต้นพันธุ์มั่นใจว่าตรงตามโคลนหรือพันธุ์ เอนไซม์ที่ใช้ศึกษามี 4 ระบบ คือ เอสเตอเรส กลูตาเมทออกซาโลอะซีเททรานอะมิเนส แอซิดฟอสฟาเทส และแอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) โดยทำการศึกษาจาก 6 โคลน จำนวน 244 ตัวอย่าง พบว่ามีความผันแปรภายในโคลน แสดงว่าตัวอย่างที่ต่างกันไม่อยู่ในโคลนเดียวกัน และควรใช้พันธุ์แทนโคลน (Torres, 1983) Degani และ El-Batsri (1990) ศึกษาพันธุ์มะม่วง 41 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์อะโค-นิเทส (aconitase) ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ลูซีนอะมิโนเปปทิเดส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส และไทรโอสฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส พบว่า เอนไซม์ ฟอสโฟกลูโคไอโซ-เมอเรสสามารถแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด และในการศึกษาต่อมาได้ใช้เอนไซม์นี้ในการจำแนกพันธุ์มะม่วง (Degani, *et al.*, 1992) นอกจากใช้ไอโซไซม์ในการตรวจสอบพันธุ์แล้วยังใช้ตรวจ

สอบต้นกล้าที่เกิดจากเซลล์นิวเซลลัสและไซโกตเพื่อใช้ต้นกล้าจากเซลล์นิวเซลลัสเป็นต้นตอขยายพันธุ์ให้ตรงตามพันธุ์ (Schnell, *et al.*, 1992 , 1994)

เนื่องจากเมล็ดส้มมีลักษณะเป็นโพลีเอ็มบริโอนี โดยที่ใน 1 เมล็ด มีแหล่งกำเนิดต้นกล้าหลายต้นซึ่งมีกำเนิดจากไซโกตและเซลล์นิวเซลลัส การใช้ลักษณะสัณฐานไม่สามารถตรวจสอบแหล่งของต้นกล้าได้ชัดเจน จึงมีการศึกษาไอโซไซม์ในส้มเพื่อจำแนกต้นกล้าจากเซลล์นิวเซลลัสและต้นกล้าจากไซโกตของส้ม ทั้งนี้เพื่อใช้ต้นกล้าจากเซลล์นิวเซลลัสเป็นต้นตอเพราะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ มีความสม่ำเสมอสูง Anderson, *et al.* (1991) รายงานการตรวจสอบต้นกล้าจากไซโกตในส้มพันธุ์ Swingle Citrumelo (*Citrus paradisi* X *Poncirus*) ซึ่งเป็นส้มที่นิยมใช้เป็นต้นตอที่ฟลอริด้า โดยศึกษาเอนไซม์สกัดจากส่วนใบและเนื้อไม้ 5 ระบบ พบว่าทุกเอนไซม์สามารถแยกความแตกต่างได้ โดยที่เอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส และ ฟอสโฟเฮกโซสไอโซ-เมอเรส สามารถจำแนกต้นจากไซโกตได้ชัดเจนที่สุด Moore และ Castle (1988) ได้ใช้เอนไซม์ 6 ระบบ ในการจำแนกส้มพันธุ์การค้าซึ่งใช้เป็นต้นตอ 15 พันธุ์ พบว่า Rough lemon มีสภาพเป็นเฮทเตอโรไซกัสที่ตำแหน่ง MDH-2 และ PER ส่วนส้มอีก 14 พันธุ์ มีสภาพเป็นเฮทเตอโรไซกัสที่ตำแหน่ง PGM ส่วนส้มสามใบมีสภาพเป็นเฮทเตอโรไซกัสที่ตำแหน่ง MDH-2 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการจำแนกพันธุ์ส้มโดยใช้เอนไซม์เอสเตอเรส เปอร์ออกซิเดส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส สามารถตรวจสอบได้ดีที่สุด (Lee, *et al.*, 1993.)

ในด้านการศึกษาความหลากหลายของอัลลิลและเฮตเทอโรไซกัส มีการใช้ไอโซไซม์ในการวิเคราะห์ส้ม 74 พันธุ์ พบว่าส้มมีโครงสร้างทางพันธุกรรมแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ ดังนี้ คือ *Citrus medica* มีความหลากหลายต่ำ มีความเป็นพันธุ์แท้สูง *C. paradisi C. sinensis* และ *C. aurantifolia* มีความเป็นพันธุ์ทางสูง *C. limon* ส่วนใหญ่มีความเป็นพันธุ์ทางสูง *C. grandis* มีจีโนไทป์และความหลากหลายระหว่างพันธุ์ปานกลาง *C. reticulata* มีความเป็นพันธุ์ทางต่ำแต่มีความหลากหลายของอัลลิลสูงทำให้มีความหลากหลายของจีโนไทป์สูง (Ollitrualt, 1990) ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ส้ม Niedz, *et al.* (1992) ได้จำแนกต้นกล้าลูกผสมระหว่างแมนคาริน (Temple X Orlando) และ *Citrus tachibana* โดยใช้เอนไซม์กลูตาเมทออกซาโลอะซีเทททรานอะมิเนส พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของลูกผสมได้ชัดเจน Grosser, *et al.* (1992) ได้จำแนกลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ 2 คู่ คู่แรกเป็นลูกผสมระหว่างส้มแทนเจลโล (*C. reticulata* X *C. paradisi*) พันธุ์ Nova กับส้มเขียวหวาน (*C. sinensis*) พันธุ์ Succari และคู่ที่สองลูกผสมระหว่างส้มเขียวหวานพันธุ์ Hamlin กับแทนเจอรีน (*C. reticulata*) พันธุ์ Dancyโดยใช้เอนไซม์ฟอสโฟ-กลูโคมิวเทส ร่วมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส Rahman และ Nito (1994a) ได้จำแนกลูกผสมส้ม

ระหว่างสกุล *Microcitrus* (*Microcitrus indora*) กับ *Eremocitrus* (*Eremocitrus glauca*) *Microcitrus* (*Microcitrus warburgiana*) กับ *Fortunella* (*Fortunella margarita*) *Fortunella* (*F. magarita*) กับ *Microcitrus* (*M. warburgiana*) และ *Citrus* (*Citrus grandis* พันธุ์Tosa-buntan) กับ *Poncirus* (*Poncirus trifoliata*) โดยใช้เอนไซม์กลูตาเมทออกซาโลทรานอะมิเนส และพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวควบคุมโดย 2 โลไซ มี 6 อัลลิล ที่ตำแหน่ง GOT-1 และ 4 อัลลิล ที่ตำแหน่ง GOT-2

การศึกษาวิวัฒนาการของคัมควอท (*Fortunella*) 6 ชนิด โดยใช้เอนไซม์ 9 ระบบ คือ เอสเตอเรส กลูตาเมทออกซาโลอะซีเทททรานสะมิเนส ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส มาเลทดีไฮโดรจีเนส มาลิกเอนไซม์ ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส ชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส ซุปเปอร์ออกไซด์ไดมิวเทส (superoxide dimutase) พบว่า คัมควอทแต่ละชนิดเป็นอิสระซึ่งกันและกัน เอนไซม์ชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส สามารถแยกความแตกต่างได้ทั้ง 6 ชนิด ในขณะที่กลูตาเมทออกซาโลอะซีเทททรานอะมิเนส แยกได้เพียง 4 ชนิด และอีก 2 ชนิด ให้แถบเหมือนกัน (Rahman and Nito, 1994b)

4. การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีโคลนอลพรอพาเกชัน

โคลนอลพรอพาเกชัน (clonal propagation) หมายถึง การขยายพันธุ์กลุ่มของพืชที่มีกำเนิดมาจากส่วนไม่ใช้เพศรวมทั้งอะโปแกมมี (เมล็ดที่พัฒนาโดยไม่ได้รับการผสม) ดังนั้นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศโดยการติดตา ต่อกิ่งก็นับเป็นตัวอย่างที่เรียกว่า clonal propagation โดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึงวิธีการ clonal propagation ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่นำมาใช้ในการเลี้ยง คือ ปลายยอดและตาข้าง สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่โดยตรงโดยไม่ผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวใช้เนื้อเยื่อเจริญตาข้างและตายอดซึ่งมีขนาดเล็กจึงอาจเรียกการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้อีกชื่อหนึ่งว่า ไมโครพรอพาเกชัน (micropropagation) (สมปอง เตชะโต, 2536) ขั้นตอนและวิธีการในการขยายพันธุ์แบบไมโครพรอพาเกชัน มี 4 ขั้นตอน คือ การเลือกชิ้นส่วนพืช การทำให้ปราศจากเชื้อและการเริ่มต้นเลี้ยง การทวีจำนวนต้นพืชหรือเพิ่มจำนวนต้นพืช การชักนำรากและการเตรียมต้นกล้าลงดินปลูก (Murashige, 1974 อ้างโดย สมปอง เตชะโต, 2536)

4.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ผลยืนต้นเมื่องร้อนจากส่วนเมล็ด ในมังคุดสามารถชักนำยอดรวมจำนวนมากโดยการเลี้ยงเมล็ดมังคุดในอาหารสูตรดัดแปลง Murashige และ Skoog (MS) เติม

benzyladenine (BA) เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดรวมสูงสุด 10.5 ยอด (สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง, 2532)

Goh, *et al.* (1988) รายงานผลสำเร็จจากการเลี้ยงปลายยอด ข้อและปล้องบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง 4 สัปดาห์ ให้ตายอดบนอาหารแข็งได้ 45 เปอร์เซ็นต์ และ 11 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว ไม่พบความแตกต่างในการชักนำตายอดระหว่างสูตรอาหาร MS Woody Plant Medium (WPM) และ Gamborg (B_5) BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ยอดรวมเพิ่มขึ้น การเลี้ยงยอดและข้อบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย napthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร giberellic acid (GA_3) เข้มข้น 0.3 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดจากฐานยอดและจากตาข้างยอดใหม่มีความสูง 2-3 เซนติเมตร มีใบ 4-5 คู่ และสามารถชักนำยอดจากใบได้ 23 เปอร์เซ็นต์

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ (2531) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มโอพันธุ์ทองดี (*Citrus grandis* Osbeck.) ในอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.44 ยอด เปอร์เซ็นต์การเลี้ยงเมล็ดลองกองและลางสาดในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 72 และ 79 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 3.36 และ 4.90 ยอด ตามลำดับ (สธน เสนาสวัสดิ์, 2534)

4.2 การเพาะเลี้ยงปลายยอดและตาข้าง

Roa, *et al.* (1981) Rahman, (1988) Rahman and Blake, (1988a, 1988b) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนุนช่วงแรกไม่ประสบผลสำเร็จ Roy, *et al.* (1990) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงขนุนจากส่วนข้อของต้นที่มีอายุมากสามารถชักนำพืชเป็นต้นได้แต่เป็นโคลนที่ไม่ได้คัดเลือกและยังทำได้ในปริมาณน้อย ธวัชชัย วรรธนะวลัญช์ (2532) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดขนุนในอาหารสูตร WPM เติม GA_3 เข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดยืดยาวได้ดีที่สุด เมื่อนำส่วนปลายยอดและตาข้างที่ชักนำจากสูตรอาหารข้างต้นมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติม BA เข้มข้น 0-20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่วนปลายยอดเกิดยอดรวมมากที่สุดเมื่อเติม BA เข้มข้น 18 มิลลิกรัมต่อลิตร และความยาวยอดมากที่สุดเมื่อลดความเข้มข้นของ BA ลงเป็น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนตาข้างเกิดยอดมากที่สุดเมื่อเติม BA เข้มข้น 14 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดยาวที่สุดในอาหารที่ปราศจาก BA

การเพาะเลี้ยงปลายยอดและข้อของ *Syzygium cuminii* L. บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดได้ 5.2 และ 19.2 ยอด ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงบน

อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1.12 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดได้ 35.7 ยอด ยอดยาว 2-4 เซนติเมตร (Yadav, *et al.*, 1990b)

การเพาะเลี้ยงปลายยอดส้ม *Citrus reticulata* Blanco. และ *Citrus limon* Burmf. จากต้นอายุ 5-6 ปี บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย kinetin (KN) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ 6 ยอด ยอดที่ได้มีความยาว 2 เซนติเมตร หลังจากเลี้ยง 7 สัปดาห์ (Singh, *et al.*, 1994)

การเพาะเลี้ยงตาข้างขององุ่นมัสคาดีน (*Vitis rotundifolia*) พันธุ์ Calos, Noble, Regale และ Tarheel บนอาหารดัดแปลงสูตร MS เติม thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 2.3 และ 4.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย BA เข้มข้น 1.0 และ 5.0 ไมโครโมลาร์ หรือ KN เข้มข้น 1.0 และ 5.0 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดได้ 2.5 ยอด (Sodarsono and Goldy, 1991)

การเพาะเลี้ยงตาข้างเกาลัดจีน (Chinese chestnut) (*Castanea mollissima* Blume.) บนอาหารสูตรดัดแปลง WPM เติม BA เข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดรวมได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA เป็น 4.44 และ 44.4 ไมโครโมลาร์ ยับยั้งการแตกยอดและส่งเสริมการสร้างแคลลัส zeatin เข้มข้น 4.56 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้ยอดยาวและแข็งแรงกว่า BA แต่ไม่เกิดยอดรวม (Qi-Quang, *et al.*, 1986)

การเลี้ยงปลายยอดและข้อของมัลเบอรี่ (*Morus nigra* L.) อายุ 12 ปี บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้ 4.2 และ 11.3 ยอด ความยาว 6.0 และ 6.8 เซนติเมตร ตามลำดับ (Yadav, *et . al.*, 1990a)

ไมโครพรอพาเกชันของไม้ดอกและไม้ประดับที่เป็นไม้ยืนต้น ได้แก่ การเลี้ยงส่วนข้อของ *Euphorbia fulgens* Karw. ex Klotsch พันธุ์ Scarlet plume บนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม zeatin เข้มข้น 9.1 ไมโครโมลาร์ หลังเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชักนำยอดได้ 14 ยอดมี ความยาว 5 มิลลิเมตร และหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ชักนำยอดได้ 40 ยอด (Zhang, *et al.*, 1987)

การเพาะเลี้ยงข้อของบาร์เบอรี่ พันธุ์ Crimson pygmy บนอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 5 หรือ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 เดือน ชักนำยอดได้ 20 ยอด (Uno and Preece, 1987)

การเพาะเลี้ยงปลายยอดของแครนเบอรี่ (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) 4 พันธุ์ บนอาหารซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลักจากสูตร Anderson ธาตุอาหารรองและสารอินทรีย์จากสูตร MS เติม 2-isopentenyl adenine (2i-P) เข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย indolebutyric acid (IBA) เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดรวมในแต่ละพันธุ์ได้สูงสุด ประมาณ 4-6 ยอด และ

สามารถชักนำรากนอกหลอดทดลองได้โดยปราศจากออกซินในสภาพการให้แสงความเข้มข้นสูง (Marcotrigiano and McGlew, 1991)

การเพาะเลี้ยงปลายยอดและข้อของ *Fraxinus angustifolia* Vahl. บนอาหารสูตร Driver and Kuniyoki's Walnut (DKW) เติม BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย IBA เข้มข้น 8.9 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดได้ 5.3 ยอด ในขณะที่การเลี้ยงบนอาหารสูตร Quoirin and Lepoivre (QL) เติม BA เข้มข้น 8.9 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย IBA เข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดได้ 5.6 ยอด (Perez-Parron, *et al.*, 1994)

การเพาะเลี้ยงลำต้นของ *Eriostemon myoporoides* DC. บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดได้ 6.3 ยอด ยอดที่ได้มีความยาว 14.2 เซนติเมตร ส่วนการเลี้ยงลำต้นของ *Eriostemon* พันธุ์ Stardust บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดได้ 27.8 ยอด ยอดยาว 15.7 เซนติเมตร (Ault, 1994)

ในการเพาะเลี้ยงข้อของ Tree paeony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) พบว่า ระยะเวลาที่ทำการย้ายเลี้ยงมีผลต่ออัตราการทวีจำนวนต้น การย้ายเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 3 ให้ยอดสั้นกว่าการย้ายเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 (Harris and Mentell, 1991)

ไมโครพรอพาเกชันของไม้ป่า ได้แก่ การเลี้ยงกิ่งของต้นโอ๊ค (*Quercus robur* L.) อายุ 70-300 ปี บนอาหารสูตร Gressholf and Doy (GD) เติม BA เข้มข้น 0.89 ไมโครโมลาร์ ทำการย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ หลายครั้งทำให้อัตราการทวีจำนวนยอดสูงขึ้นประมาณ 26-49 ยอด ความยาวยอดประมาณ 30-64 มิลลิเมตร (Vieitez, *et al.*, 1994)

การขยายพันธุ์โคลน Pacific dogwood (*Cornus nuttallii* Audubon.) ที่ต้านทานโรค มีประโยชน์ในทางพืชสวนและเป็นการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ บนอาหารสูตร WPM เติม calcium gluconate ร่วมด้วย BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดได้ 3.1 ยอด (Edson, *et al.*, 1994)

การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงยูคาลิปตัส (*Eucalyptus tereticornis* Sm.) บนอาหารสูตร B_5 เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 3 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มืดชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง WPM เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ชักนำยอดได้ 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเลี้ยงในอาหารสูตร B_5 เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดโดยตรงไม่ผ่านการสร้างแคลลัส ยอดที่ชักนำได้มีจำนวน 30-50 ยอด หลังจากเลี้ยง 30-40 วัน (Subbaiah and Minocha, 1990) การเลี้ยงส่วนข้อของยูคาลิปตัสบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 5.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย IAA เข้มข้น 1.1 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ และทำการย้ายเลี้ยงต่อไปบนอาหารเติม BA เข้มข้น 0.44-0.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดจำนวนมากประมาณ 200 ยอด (Rao, 1988) การเลี้ยงยอดยูคาลิปตัสพันธุ์ทนหนาว 2 พันธุ์ บนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA เข้มข้น

0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้มากที่สุด (Le Roux and Van Staden, 1991)

การเลี้ยงปลายยอดของ Endod (*Phytolacca dodecandra*) บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดได้ 3.1 ยอด ภายในเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่การเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดได้ 4.7 ยอด (Demeke and Hughes, 1990)

การเพาะเลี้ยงตาข้างของ *Bauhinia variegata* ซึ่งเป็นพืชยืนต้นตระกูลถั่ว จากต้นอายุ 6-8 ปี บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 7.8 ยอด ส่วนการเพาะเลี้ยงตาข้างของ *Parkinsonia aculeata* บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 8.9 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 11.2 ยอด (Mathur and Mukunthakumar, 1992)

การเพาะเลี้ยงข้อของ *Caesalpinia pulcherrima* บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 5.5 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 5.8 ยอด (Rahman, *et al.*, 1993)

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของโสน (*Sesbania*) 4 ชนิด บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.22-8.88 ไมโครโมลาร์ร่วมด้วย IBA 0.25-0.49 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดโดยตรง (Yan-Xiu, *et al.*, 1993)

4.3 การชักนำราก

การชักนำรากจากยอดมังคุดให้ผลสำเร็จ 7 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง 2 สัปดาห์ ส่วนการเลี้ยงในอาหารเติม IBA เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ชักนำรากได้ 24 เปอร์เซ็นต์ (Goh, *et al.* 1988)

การชักนำรากยอดส้มโอพันธุ์ทองดี บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ หรือเติมออกซินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำรากได้ 88.8 เปอร์เซ็นต์ (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2531)

การชักนำรากลองกองและลางสาด บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ให้ผลสำเร็จ 68 เปอร์เซ็นต์ (สธน เสนาสวัสดิ์, 2534)

การชักนำรากจากยอดขนุนเป็นไปได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร WPM เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธวัชชัย วรรธนะวลัญช์, 2532)

การชักนำรากจากยอด *Syzygium cuminii* L. บนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ให้ผลสำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์ รากที่ได้มีความยาว 2 เซนติเมตร และหลังจากย้ายปลูกมีชีวิตรอด 60 เปอร์เซ็นต์ (Yadav, *et al.*, 1990b)

การชักนำรากยอดส้ม *Citrus reticulata* Blanco. และ *Citrus limon* Burmf. ทำได้โดยการตัดแยกยอดที่มีความยาว 2 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากในส้มทั้งสองชนิดได้ 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Singh, *et al.*, 1994)

Roubelakis-Angelakis และ Zivanovitc (1991) รายงานการชักนำรากองุ่น (*Vitis vinifera*) ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม IBA เข้มข้น 3-5 ไมโครโมลาร์ ว่ามีความเหมาะสมสำหรับการชักนำรากองุ่น ส่วนการชักนำรากในองุ่น *Vitis labrusca* พันธุ์ Delaware บนอาหารสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย IBA เข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลสำเร็จ 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 10 วัน และหลังจากย้ายปลูกมีชีวิตรอด 95 เปอร์เซ็นต์ (Lewandowski, 1991)

การชักนำรากเกาลัดจีนโดยการจุ่มยอดในสารละลาย IBA เข้มข้น 9.8 และ 14.8 มิลลิโมลาร์ และย้ายเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเลี้ยงในกล่องพลาสติกใส่ทรายที่ควบคุมความชื้นสูง รากพัฒนาภายใน 30 วัน (Qi-Quang, *et al.*, 1986)

การชักนำรากของยอดมัลเบอรี่บนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ดีกว่าการใช้ NAA และ IAA ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Yadav, *et al.*, 1990a)

การชักนำรากจากยอด *Euphorbia fulgens* Karw. ex Klotsch พันธุ์ Scarlet plume ให้ผลสำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ จำนวน 4 รากต่อยอด รากที่ได้มีความยาว 8.1 เซนติเมตร (Zhang, *et al.*, 1987)

การชักนำรากจากยอดบาร์เบอรี่ พันธุ์ Crimson pygmy โดยการจุ่มยอดในสารละลาย IBA เข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 1-100 ไมโครโมลาร์ และผงถ่าน 10 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้โดยไม่เกิดแคลลัส และประสบผลสำเร็จในการย้ายปลูก (Uno and Preece, 1987)

การชักนำรากจากยอด *Fraxinus angustifolia* Vahl. ให้ผลสำเร็จ 62-84 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร WPM เติม IBA เข้มข้น 0.98-4.9 ไมโครโมลาร์ และหลังจากย้ายปลูกมีชีวิตรอด 85 เปอร์เซ็นต์ (Perez-Parron, *et al.*, 1994)

การชักนำรากจากยอด *Eriostemon myoporoides* DC. และ *Eriostemon* พันธุ์ Stardust ให้ผลสำเร็จ 30 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ault, 1994)

การชักนำรากจากยอด Tree paeony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) พบว่า ระยะเวลาที่ทำการย้ายเลี้ยงมีผลต่อการชักนำราก การย้ายเลี้ยงที่ 5 สัปดาห์ ให้รากยาวที่สุด (Harris and Mentell, 1991)

การชักนำรากจากยอดโอ๊ค ให้ผลสำเร็จ 15-46 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร GD เติม IBA เข้มข้น 14.8 ไมโครโมลาร์ โดยเลี้ยงในที่มืดก่อนเป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในที่มีแสง (Vieitez, *et al.*, 1994)

การชักนำรากจากยอด Pacific dogwood นอกหลอดทดลองทำโดยการจุ่มแช่ยอดในสารละลาย IBA เข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการชักนำรากได้ 62 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 5 สัปดาห์ ต้นกล้าเกิดยอดใหม่ภายใน 2 เดือนหลังย้ายปลูก หลังจากนั้นประมาณ 1 ปี มีชีวิตรอด 70 เปอร์เซ็นต์ วิธีนี้ขยายพันธุ์ได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการปักชำ (Edson, *et al.*, 1994)

การชักนำรากจากยอดยูคาลิปตัส (*Eucalyptus tereticornis* Sm.) ให้ผลสำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตรดัดแปลง WPM เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และประสบผลสำเร็จในการย้ายปลูก (Subbaiah and Minocha, 1990) การชักนำรากยูคาลิปตัสทำได้โดยการเลี้ยงยอดในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย IAA เข้มข้น 5.5 ไมโครโมลาร์ และ NAA เข้มข้น 5.3 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมผงถ่านปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารเหลวที่ปราศจากผงถ่านและสารควบคุมการเจริญเติบโต วิธีการนี้เหมาะสมสำหรับชักนำรากยูคาลิปตัสซึ่งออกรากยาก (Rao, 1988) การชักนำราก ยูคาลิปตัสพันธุ์ทนหนาว 2 พันธุ์ เป็นไปได้ดีบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และประสบผลสำเร็จในการย้ายปลูก (Le Roux and Van Staden, 1991)

การชักนำรากจากยอด Endod ให้ผลสำเร็จ 90 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ (Demeke and Hughes, 1990)

การชักนำรากจากยอด *Bauhinia variegata* ให้ผลสำเร็จ 96 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ (Mathur and Mukunthakumar, 1992)

การชักนำรากจากยอด *Parkinsonia aculeata* ทำได้ 88 เปอร์เซ็นต์ บนสูตรอาหาร MS เติม IBA เข้มข้น 9.8 ไมโครโมลาร์ หลังจากย้ายปลูกมีชีวิตรอดสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Mathur and Mukunthakumar, 1992)

การชักนำรากจากยอด *Caesalpinia pulcherrima* ให้ผลสำเร็จ 65 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร 1/2 MS เติม IAA เข้มข้น 5.5 ไมโครโมลาร์ หลังเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (Rahman, *et al.*, 1993)

การชักนำรากจากยอดโสนให้ผลสำเร็จบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือร่วมด้วย IBA เข้มข้น 2.46-9.84 ไมโครโมลาร์ และประสบผลสำเร็จในการย้ายปลูก (Yan-Xiu, *et al.*, 1993)

Central Library
Prince of Songkla University

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. ที่สำคัญ คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู โดยใช้ไอโซไซม์จากส่วนใบด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส
2. เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์ลองกอง ลางสาด และดูกู

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. วัสดุพืช

1.1 วัสดุพืชที่ใช้ในการตรวจสอบพันธุ์

ใช้ใบจากต้น ลองกอง ลางสาด และ ดูกูมีอายุแตกต่างกัน ดังนี้คือ

1.1.1 ต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง อายุ 4 - 6 เดือน

1.1.2 ต้นกล้าที่ปลูกในถุงเพาะชำ อายุประมาณ 1.5 ปี วางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.1.3 ต้นลองกอง ลางสาด และดูกู อายุประมาณ 5 ปี ในแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.1.4 ต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี และต้นกล้าลองกองจากอำเภอสะเดา ซึ่งปลูกในถุงเพาะชำ นำมาเลี้ยงในเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.2 วัสดุพืชที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.1 เมล็ดจากผลสุกของลองกอง ลางสาด และดูกู

1.2.2 ปลายยอด และตาข้างของต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง

2 วัสดุสารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกไอโซไซม์ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ ประกอบด้วย tris-hydroxymethyl aminomethane (tris-HCl), polyvinylpyrrolidone (PVP), 2-mercapthoethanol และ disodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA),

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลประกอบด้วย acrylamide, N,N'-methylene bis-acrylamide, tris-HCl, ammonium peroxydisulfate และ TEMED

2.1.3 สารเคมีที่ใช้ในเป็นอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ ประกอบด้วย tris-HCl และ glycine

2.1.4 สารเคมีที่ใช้เป็นสีย้อมเจล (รายละเอียดในภาคผนวก)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร MS, สูตร MS ดัดแปลง และสูตร WPM (รายละเอียดในภาคผนวก)

2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน คือ NAA และ IBA

2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน ได้แก่ BA และ TDZ

2.2.4 สารอื่นๆ ได้แก่ น้ำมะพร้าว ผงถ่าน (activated charcoal) ผงวุ้น น้ำตาล

3 วัสดุอื่น ๆ

3.1 เครื่องแก้ว ประกอบด้วย บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ไปเปต และขวด

3.2 โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืช

3.3 กระติกน้ำแข็ง

3.4 เครื่องแก้วที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิววัสดุพืช ได้แก่ ขวดน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อ และจานเลี้ยง สำหรับใช้ตัดเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.5 เครื่องมือผ่าตัด ประกอบด้วย มีดผ่าตัด ด้ามมีด และปากคีบ

อุปกรณ์

1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกไอโซไซม์ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

1.1 เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีสแบบชนิดแนวตั้ง แบบ Midgel Multicast รุ่น 2050-200

1.2 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Pharmacia รุ่น GPS 200/400

1.3 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

1.4 เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์ TOMY รุ่น MC 150

1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.7 เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติและแท่งแม่เหล็ก

1.8 เครื่องวัดสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ 50 และ 200 ไมโครลิตร

2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

2.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.3 หม้อนึ่งไฟฟ้าอัตโนมัติ

2.4 ตู้ไมโครเวฟ

2.5 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

2.6 เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติและแท่งแม่เหล็ก

3 อุปกรณ์ในการเลี้ยง

3.1 ตู้ย้ายเลี้ยง

3.2 ชั้นเลี้ยง

วิธีการ

1 การสกัดเอนไซม์

นำตัวอย่างใบลองกอง ลางสาด และดูกูจากต้นอายุต่าง ๆ ซึ่งเป็นใบเพสลาดอายุประมาณ 3 สัปดาห์หลังจากแตกใบใหม่ มาสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ (tris-buffer) ความเข้มข้นและความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมร่วมด้วยสาร 2-mercapthoethanol, PVP และ Na_2EDTA ความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างพืช 0.5 กรัมน้ำหนักสดต่อสารละลายสกัดเอนไซม์ปริมาตร 0.5-1.0 มิลลิลิตร ทำการบดตัวอย่างพืชในโกร่งที่แช่แข็งจนตัวอย่างพืชละเอียด เทใส่หลอด Eppendorf นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน โดยเครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20-30 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ใส่หลอด Eppendorf ที่สะอาด เติมกลีเซอรอล (glycerol) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมเจลและการแยกโมเลกุลเอนไซม์

เตรียมเจลโดยใช้เครื่องอิเลกโตรโฟรีซีสชนิด slab gel เตรียมเจลแบบไม่ต่อเนื่อง (DISC : discontinuous) ใช้ตัวกลางเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ซึ่งประกอบ ด้วย stacking gel (upper gel) ความเข้มข้น 3.7 เปอร์เซ็นต์ และส่วน separating gel (lower gel) ความเข้มข้น 7-12 เปอร์เซ็นต์ แผ่นเจลที่ใช้เตรียมให้มีความหนา 0.75 มิลลิเมตร เตรียมเจล ตาม สูตรดัดแปลงของ Hame และ Rickwood (1981) (ดังรายละเอียดในภาคผนวก) นำสารสกัด เอนไซม์มาใส่ในหลุมของเจล (loading) ทำการแยกเอนไซม์ในสารละลายอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ที่ เหมาะสม โดยใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ จากเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ภายใต้การ ให้อุณหภูมิเย็นที่ 10-14 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

3. การย้อมสีเอนไซม์

นำเจลที่ได้มาทำการย้อมสี เพื่อตรวจสอบเอนไซม์บนแผ่นเจล สีย้อมเอนไซม์ที่ศึกษา ได้แก่ เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส แอซิดฟอสฟาเทส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโค-มิวเทส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส การย้อมสีเอนไซม์ทำในที่มืด เมื่อ เจลติดสีชัดเจนแล้วทำการตรึง (fix) เอนไซม์และล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายที่มีส่วนผสม ของกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซีติก 7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทำการแช่แผ่นเจลใน สารละลายที่มีส่วนผสมของเมทธานอล (methanol) 60 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ นานประมาณ 30 นาที นำแผ่นเจลไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อทำให้แผ่นเจลแห้ง

4. การแปลผลรูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบของเอนไซม์ของลองกอง ลางสาด และดูกู นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ หรือจำแนกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู

5. การเพาะเลี้ยงเมล็ด

นำผลลองกอง ลางสาด และดูกู มาแกะเนื้อผลออก ล้างเมล็ดให้สะอาด ทำการฟอกฆ่า เชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และคลอร็อกซ์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (โดย ปริมาตร) ร่วมด้วยทวีน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟอกฆ่าเชื้อนาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่า เชื้อ 3 ครั้ง นำมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ในหลอดทดลอง วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศา

เซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากต้นกล้างอกประมาณ 3 เดือน ทำการตัดปลายยอดและตาข้างเพื่อใช้ในการเลี้ยงปลายยอดและตาข้างในข้อ 6

6. การเพาะเลี้ยงยอดและตาข้าง

การเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างนั้นใช้ชิ้นส่วนพืชจากต้นกล้าเพาะเมล็ดในข้อ 5 โดยนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมไซโตไคนินในรูป BA หรือ TDZ เพียงลำพัง หรือใช้ร่วมกับ NAA หรือน้ำมะพร้าว ดังรายละเอียดในวิธีการศึกษาข้อ 2.2 ทำการเพิ่มปริมาณยอดและพัฒนายอดให้สมบูรณ์และชักนำรากจากยอดที่เจริญสมบูรณ์ดังวิธีการศึกษาข้อ 2.3 และข้อ 2.4 ตามลำดับ

7. การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS)

วิธีดำเนินการ

1 การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ของลองกอง ลางสาด และดูกู

1.1 การศึกษาระบบไอโซไซม์ของต้นอายุต่างกัน

ในการศึกษานี้ใช้ต้นดูกู ลองกอง และลางสาด 3 อายุ คือ

1.1.1 ต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง อายุ 4 - 6 เดือน

1.1.2 ต้นกล้าในถุงเพาะชำ อายุประมาณ 1.5 ปี วางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.1.3 ต้นอายุประมาณ 5 ปี ในแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นำใบอ่อนในระยะเพสลาดของลองกอง ลางสาด และดูกูมาสกัดเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 1 นำไปแยกโมเลกุลเอนไซม์ ดังวิธีการในข้อ 2 จากนั้นนำไปย้อมสีเอนไซม์ 7 ระบบ ดังวิธีการในข้อ 3 จากนั้นทำการแปลผลรูปแบบไอโซไซม์เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของพืช

1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบเอนไซม์เพื่อการจำแนกพืชสกุล *Lansium*

1.2.1 การศึกษาระยะเวลาการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์

นำใบของลองกอง ลางสาด และดูกู อายุประมาณ 1.5 ปี ในระยะเพสลาดมาสกัดเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 1 ในขั้นตอนนี้ทำการปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 และ 20 นาที นำสารสกัดเอนไซม์ไปแยกตามวิธีการในข้อ 2 และแปลผล เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเวลาการปั่น

1.2.2 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์

นำใบเพสลาดของลองกอง ลางสาด และ ดูกู อายุประมาณ 1.5 ปี มาสกัดเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ดังตารางที่ 1 นำมาแยกเอนไซม์ และย้อมสีด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุด ทำการเปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากบัฟเฟอร์สกัดแต่ละชนิด

ตารางที่ 1 ชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์จากใบลองกอง ลางสาด และ ดูกู

ชนิดของบัฟเฟอร์	องค์ประกอบ
1	Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 2-Mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)
2	Tris-HCl เข้มข้น 0.25 โมลาร์ pH 7.5 PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 2- Mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)
3	Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.5 PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 2- Mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

1.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของเจล

ทำการสกัดเอนไซม์จากใบลองกอง ลางสาด และดูกูของต้นที่มีอายุประมาณ 1.5 ปี และต้นอายุประมาณ 5 ปี โดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 1.3.2 ทำการปั่นตกตะกอนโดยใช้เวลาเหมาะสมที่สุดจากข้อ 1.2.1 มาแยกเอนไซม์บนตัวกลางเจลมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ และย้อมสีด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุด เปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ

1.3 การศึกษาเอนไซม์ของต้นกล้าลองกองจากอำเภอนาทวี และอำเภอสะเดา

1.3.1 ต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี

นำใบเพสลาดจากต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวีและใบเพสลาดจากต้นลองกอง ลางสาด และดูกู อายุประมาณ 1.5 ปี ซึ่งเป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบมาสกัดเอนไซม์ ดังวิธีการในข้อ 1 นำมาแยกเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 2 นำมาย้อมสีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากนั้นทำการแปลผลรูปแบบไอโซไซม์เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของพืช

1.3.2 ต้นกล้าลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา

นำใบเพสลาดจากต้นกล้าลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา และใบเพสลาดจากต้นลองกอง ลางสาด และดูกู อายุประมาณ 1.5 ปี ซึ่งเป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบมา สกัดเอนไซม์ ดังวิธีการในข้อ 1 นำมาแยกเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 2 นำมาย้อมสีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากนั้นทำการแปลผลรูปแบบไอโซไซม์ เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของพืช

2. การศึกษาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ด ยอดและตาข้างจากต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู

2.1 การศึกษาการชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดลองกองและลางสาด

นำเมล็ดลองกองและลางสาดที่ล้างสะอาดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และคลอร็อกซ์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ร่วมด้วยทวีน 20 เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ฟอกฆ่าเชื้อนาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำเมล็ดมาตัดแบ่งตามรอยแยกที่ปรากฏบนเมล็ด วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงเติม BA ความเข้มข้น 6ระดับคือ 0, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจผลการสร้างยอดรวมและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 เมล็ด

2.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างของลองกอง ลางสาด และดูกู

2.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ และ BA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างดูกู

ทำการเลี้ยงชิ้นส่วนยอดและตาข้างจากต้นกล้าดูกูในอาหารสูตร WPM เติม TDZ เข้มข้น 3 ระดับคือ 0.01, 0.025 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 3 ระดับคือ 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการตรวจวัดความยาวยอดของที่ชักนำจากการเลี้ยงเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ TDZ หรือ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนยอดหรือตาข้าง 1 ชิ้นส่วน คิดเป็น 1 ซ้ำ

2.2.2 การศึกษาอิทธิพลของ BA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างลองกองและลางสาด

ทำการเลี้ยงชิ้นส่วนยอดและตาข้างจากต้นกล้าลองกองและลางสาด ในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA เข้มข้น 4 ระดับคือ 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ทำการตรวจผลการเกิดยอดและความยาวยอดจากทั้งสองชิ้นส่วนเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนยอดหรือตาข้าง 1 ชิ้นส่วน คิดเป็น 1 ซ้ำ

2.2.3 การศึกษาอิทธิพลของ BA ร่วมด้วย GA_3 ต่อการเจริญของยอดและตาข้างลางสาด

ทำการเลี้ยงชิ้นส่วนยอดและตาข้างของลางสาดจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA เข้มข้น 4 ระดับคือ 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นของ BA ใช้ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ทำการตรวจผลการเกิดยอดและความยาวยอดของทั้งสองชิ้นส่วนเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA ร่วมด้วย GA_3 โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนยอดหรือตาข้าง 1 ชิ้นส่วน คิดเป็น 1 ซ้ำ

2.2.4 การศึกษาอิทธิพลของ NAA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างของดูกู

การเลี้ยงชิ้นส่วนยอดและตาข้างของดูกูจากยอดที่พัฒนาจากการศึกษาที่ 2.2.1 ในอาหารสูตร WPM เติม NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย TDZ เข้มข้น 2 ระดับคือ 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 2 ระดับคือ 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ ทำการตรวจวัดความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การแตกยอดใหม่เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ TDZ หรือ BA ที่เติมหรือไม่เติม NAA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนยอดหรือตาข้าง 1 ชิ้นส่วน คิดเป็น 1 ซ้ำ

2.3 การศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดและพัฒนายอดให้สมบูรณ์

ทำการตัดแยกยอดที่เจริญจากยอดและตาข้างมาเลี้ยงในอาหารสูตร WPM หรือ MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ TDZ เข้มข้น 2 ระดับคือ 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 2 ระดับ คือ 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ ทำการตรวจผลการสร้างยอดรวมและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดแต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนยอดหรือตาข้าง 1 ชิ้นส่วน คิดเป็น 1 ซ้ำ

2.4 การศึกษาการชักนำราก

ทำการตัดแยกยอดที่มีสภาพสมบูรณ์จากการศึกษาที่ 2.3 มาทำการกรีดโคนต้นยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร 2 รอยให้รอยกรีดอยู่ตรงกันข้ามกัน จุ่มแช่ใน IBA ซึ่งผ่านการกรองเพื่อให้ปลอดเชื้อ เข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จุ่มแช่ในที่มืดนาน 15 นาที นำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร MS เติมผงถ่าน เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ IBA เข้มข้น 4 ระดับคือ 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวันความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบความสามารถในการเกิดรากในแต่ละความเข้มข้น IBA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนยอด 1 ยอด คิดเป็น 1 ซ้ำ

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ของลองกอง ลางสาด และดูกู

1.1 การศึกษาระบบของไอโซไซม์ของต้นอายุต่างกัน

จากการศึกษาเอนไซม์ 7 ระบบ จากใบลองกอง ลางสาด และดูกูในระยะเพสลาด พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แอซิดฟอสฟาเทส เอสเตอเรส และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ย้อมเจลติดสี ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส ย้อมเจลไม่ติดสี ดังรายละเอียดในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของไอโซไซม์ พบว่ารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของลองกอง ลางสาด และดูกูแตกต่างกันชัดเจนที่สุด รองลงมาคือรูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรส ส่วนรูปแบบของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสแยกความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสมีรูปแบบของพืชทั้ง 3 ชนิดไม่คงที่

ตารางที่ 2 ผลของระบบเอนไซม์ที่ใช้ศึกษาการจำแนกต้นลองกอง ลางสาด และดูกู อายุต่างกัน

ชนิดระบบเอนไซม์	อายุของต้น		
	4 และ 5 เดือน	1.5 ปี	5 ปี
PER	ติดสีชัดเจนดี	ติดสีชัดเจนดี	ติดสีชัดเจนดี
ACP	ติดสีชัดเจน แต่เป็นปื้น	ติดสีชัดเจน แต่เป็นปื้น	ติดสีชัดเจน แต่เป็นปื้น
EST	ติดสีไม่ชัดเจน	ติดสีชัดเจนปานกลาง	ติดสีชัดเจนปานกลาง
PGI	ไม่ติดสี	ติดสีชัดเจนปานกลาง	ติดสีชัดเจนปานกลาง
PGM	ไม่ติดสี	ไม่ติดสี	ไม่ติดสี
ADH	ไม่ติดสี	ไม่ติดสี	ไม่ติดสี
MDH	ไม่ติดสี	ไม่ติดสี	ไม่ติดสี

PER : เปอร์ออกซิเดส ACP : แอซิดฟอสฟาเทส EST : เอสเตอเรส

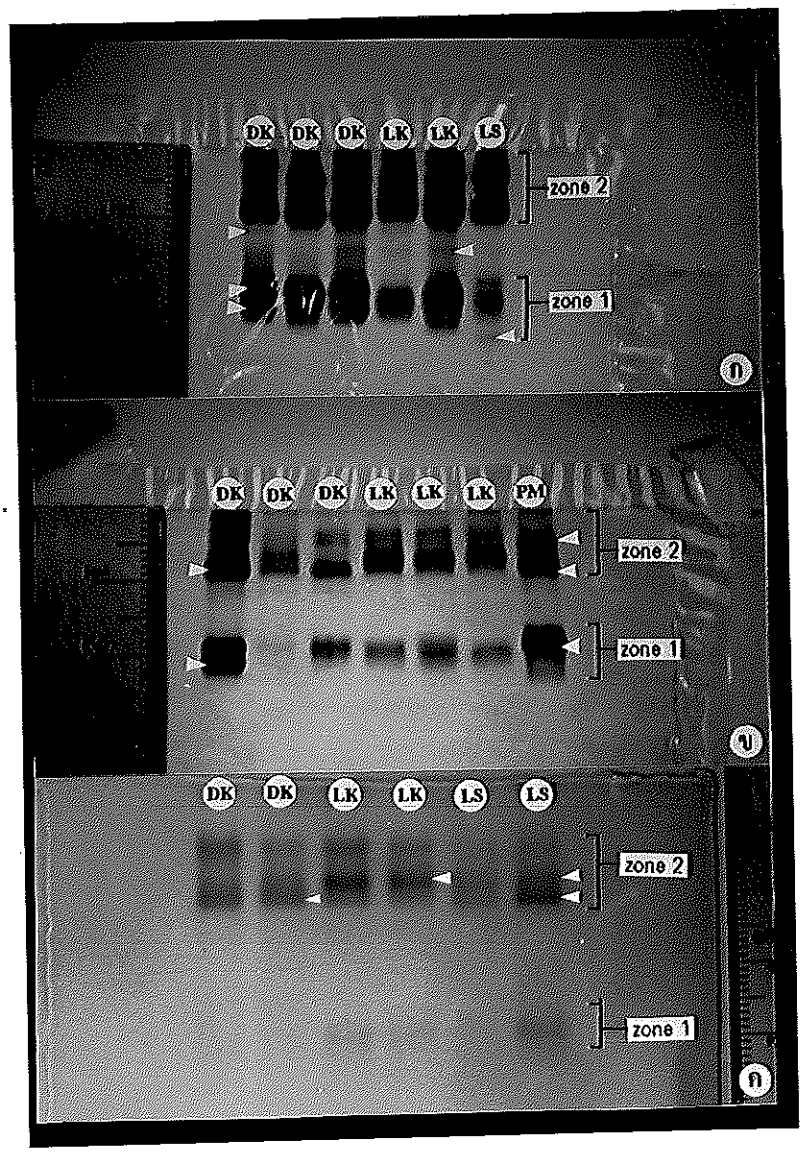
PGI : ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส PGM : ฟอสโฟกลูโคมิวเทส

ADH : แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส MDH : มาเลทดีไฮโดรจีเนส

1.1.1 ต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 4, 5 และ 6 เดือน

1.1.1.1 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีการเคลื่อนที่ของแถบเป็น 2 zone คือ แถบที่เคลื่อนที่ ได้เร็ว จัดเป็น zone 1 และแถบที่เคลื่อนที่ช้า จัดเป็น zone 2 เมื่อพิจารณาต้นอายุ 4 เดือน พบว่าดูกูต้นที่ 1 แตกต่างจากลองกองและลางสาดที่ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 ดังศรชี้ ส่วนต้นที่ 2 ไม่มีแถบนี้ ต้นที่ 3 มีแถบที่ตำแหน่งเดียวกับลองกองดังศรชี้ ลองกองต้นที่ 1 และ 2 แตกต่างกันที่ความเข้มตรงตำแหน่ง zone 2 สำหรับลางสาดมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 จำนวน 1 แถบ แตกต่างจากดูกูและลองกอง (ภาพที่ 1ก) ส่วนต้นอายุ 5 เดือนพบความแตกต่างระหว่างดูกู 3 ต้น ตรงตำแหน่ง zone 1 และ zone 2 ลองกองต้นที่ 1 และ 2 เป็นต้นจากเมล็ดของต้นในแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ ส่วนต้นที่ 3 เป็นต้นจากเมล็ดลองกองจากจังหวัดนราธิวาส พบว่า มีแถบสีจางกว่าต้นที่ 1 และ 2 อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน สำหรับการทดลองนี้ไม่มีตัวอย่างลางสาดเนื่องจากไม่มีใบที่อยู่ในระยะที่ทำการทดลองได้ แต่ได้ทำการตรวจสอบดูกูแปรแมร์ พบว่ามีแถบที่ตำแหน่ง zone 2 แตกต่างจากดูกูและลองกองชัดเจนดังศรชี้ (ภาพที่ 1ข) ส่วนต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 6 เดือน มีความแตกต่างกันชัดเจนที่ตำแหน่ง zone 2 ดังศรชี้ (ภาพที่ 1ค)

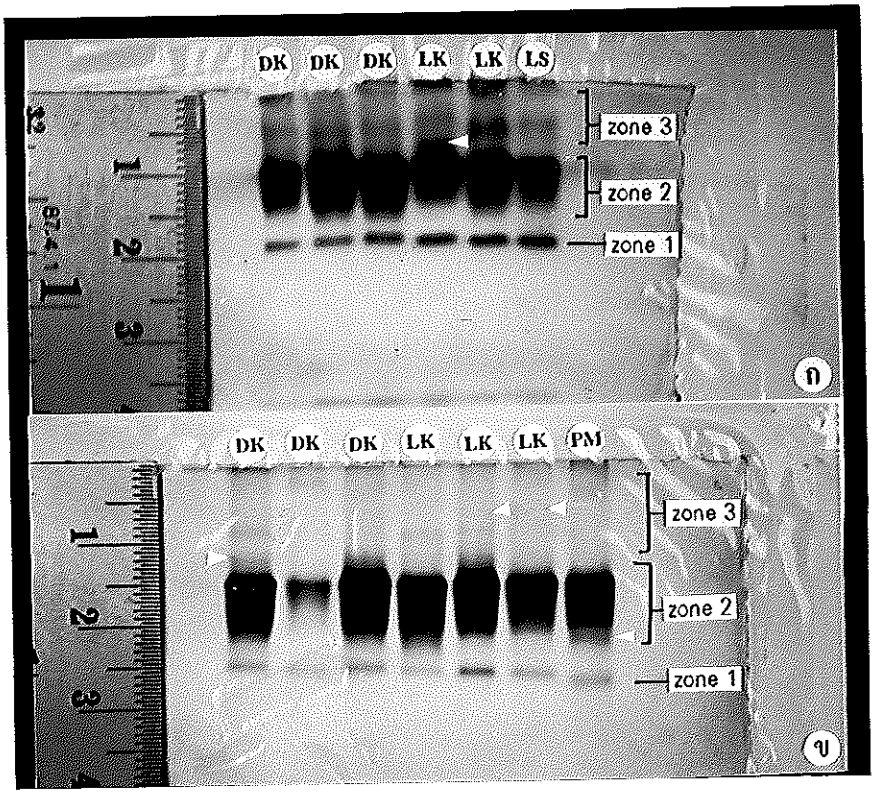


ภาพที่ 1 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 4 เดือน (ก) ใบจากต้นดูกู ลองกอง และดูกูแปรแมร์ อายุ 5 เดือน (ข) ใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 6 เดือน (ค)

DK = duku LK = longkong LS = langsat PM= duku paremare

1.1.1.2 เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส

รูปแบบของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสมีการเคลื่อนที่ของแถบ 3 zone คือ zone 1 zone 2 และ zone 3 ดังศรชี้ ในตำแหน่ง zone 1 ต้นพืชทั้ง 3 ชนิด มีแถบเดียวเหมือนกันหมด ตำแหน่ง zone 2 มีแถบเป็นปื้นขนาดใหญ่ แยกความแตกต่างของพืชทั้ง 3 ชนิดได้ยาก ส่วน zone 3 พบว่าดูกูต้นที่ 1, 2 และ 3 มีแถบ 1 แถบ ลองกองต้นที่ 1 มี 2 แถบ ส่วนต้นที่ 2 มี 1 แถบ และมีสีเข้ม ส่วนลางสาดมีจำนวนและลักษณะแถบคล้ายดูกู (ภาพที่ 2 ก) ต้นอายุ 5 เดือน ดูกูต้นที่ 1 มีแถบแตกต่างจากดูกูต้นที่ 2 และ 3 ที่ตำแหน่ง zone 3 ดังศรชี้ และแถบที่ 2 อยู่ในตำแหน่งเดียวกับแถบของลองกองทั้ง 3 ต้น ลองกองต้นที่ 1 และ 2 เป็นต้นจากเมล็ดของต้นในแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ ต้นที่ 3 เป็นต้นจากเมล็ดจากจังหวัดนราธิวาส ต้นที่ 2 และ 3 มีแถบเพิ่มขึ้นจากต้นที่ 1 อีก 1 แถบ ดังศรชี้ สำหรับดูกูแปรแมร์มีแถบคล้ายต้นลองกองจากเมล็ด จังหวัดนราธิวาส แต่มีแถบที่ตำแหน่ง zone 2 เพิ่มขึ้น ดังศรชี้ (ภาพที่ 2 ข)



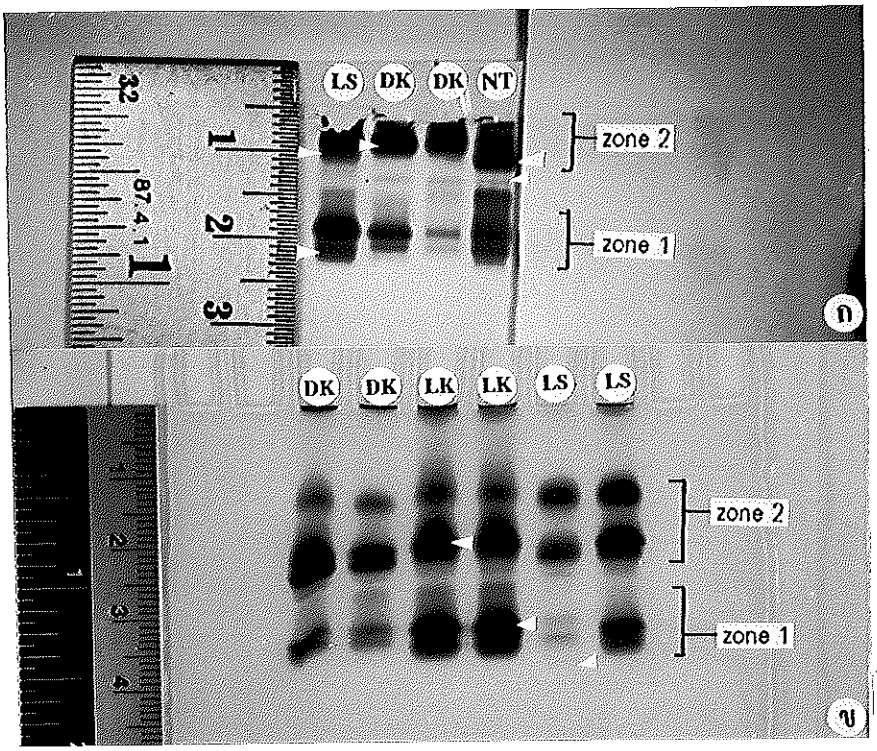
ภาพที่ 2 รูปแบบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 4 เดือน (ก) ใบจากต้นดูกู ลองกอง และดูกูแปรแมร์ อายุ 5 เดือน (ข)

DK = duku LK = longkong LS = langsat PM = duku paremare

1.1.2 ต้นกล้าในถุงเพาะชำ อายุประมาณ 1.5 ปี

1.1.2.1 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีการเคลื่อนที่ของแถบเป็น 2 zone เช่นเดียวกันกับต้นอายุ 4, 5 และ 6 เดือน ในการทดลองครั้งแรก พบว่า ลางสาดมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 และ zone 2 แตกต่างจากดูกูและลองกอง ดูกูต้นที่ 1 และ 2 มีจำนวนแถบเท่ากัน แต่แถบ ที่ตำแหน่ง zone 1 ของต้นที่ 1 มีสีเข้มกว่าต้นที่ 2 และลองกองเสียบยอดจากนาทวี (NT) มีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 มีสีเข้มเป็นปื้น มีแถบระหว่าง zone 1 และ 2 คล้ายดูกู ดังศรชี้ แต่แถบที่ zone 2 เคลื่อนที่ได้มากกว่าดูกู (ภาพที่ 3 ก) ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 ต้นมีอายุมากขึ้นประมาณ 2.5 เดือน ดูกู ลองกอง และลางสาด มีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 และ zone 2 แตกต่างกัน โดยลองกองมีแถบสีเข้มขนาดใหญ่ที่สุด ลางสาดต้นที่ 1 มีแถบแตกต่างจากต้นที่ 2 ที่ตำแหน่ง zone 1 โดยมีจำนวนแถบมากกว่า 1 แถบ ดังศรชี้ (ภาพที่ 3 ข)

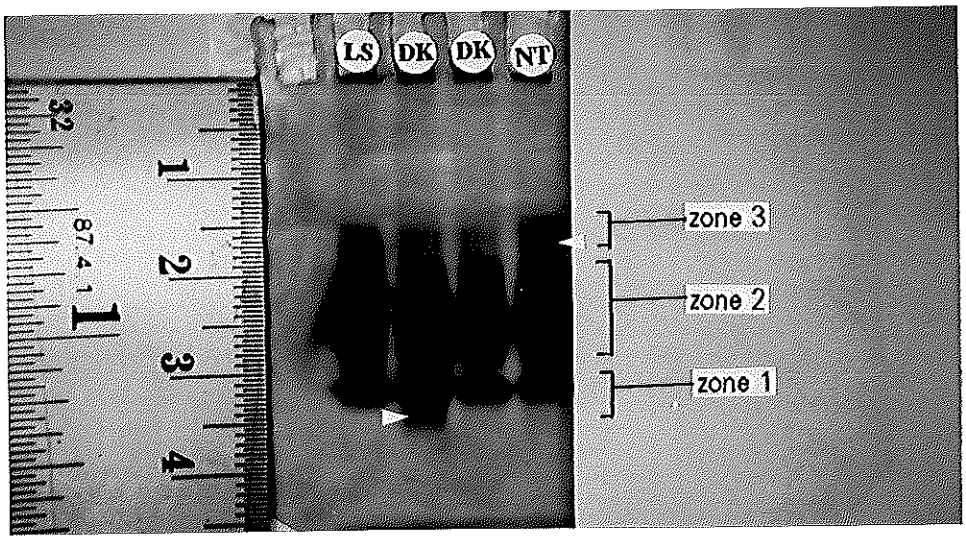


ภาพที่ 3 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นลางสาด ดูกู อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) ใบจากต้นดูกู ลองกองและลางสาด อายุ 1.5 ปี ทดลองครั้งที่ 2 (ข)

DK = duku LK = longkong LS = langsat NT = Natawee (longkong)

1.1.2.2 เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส

รูปแบบของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส มีการคลื่อนที่ของแถบเป็น 3 zone เช่นเดียวกันกับต้นอายุ 4 และ 5 เดือน ลางสาดมีแถบที่ตำแหน่ง zone 2 และ zone 3 เป็นปื้นมาก ไม่สามารถแยกความแตกต่างจากดูกูและลองกองได้ ดูกูต้นที่ 1 มีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 แตกต่างจากต้นที่ 2 ลองกองเสียบยอดจากนาทวีมีแถบที่ตำแหน่ง zone 3 แตกต่างจากดูกูและลางสาด ดังศรชี้ (ภาพที่ 4)

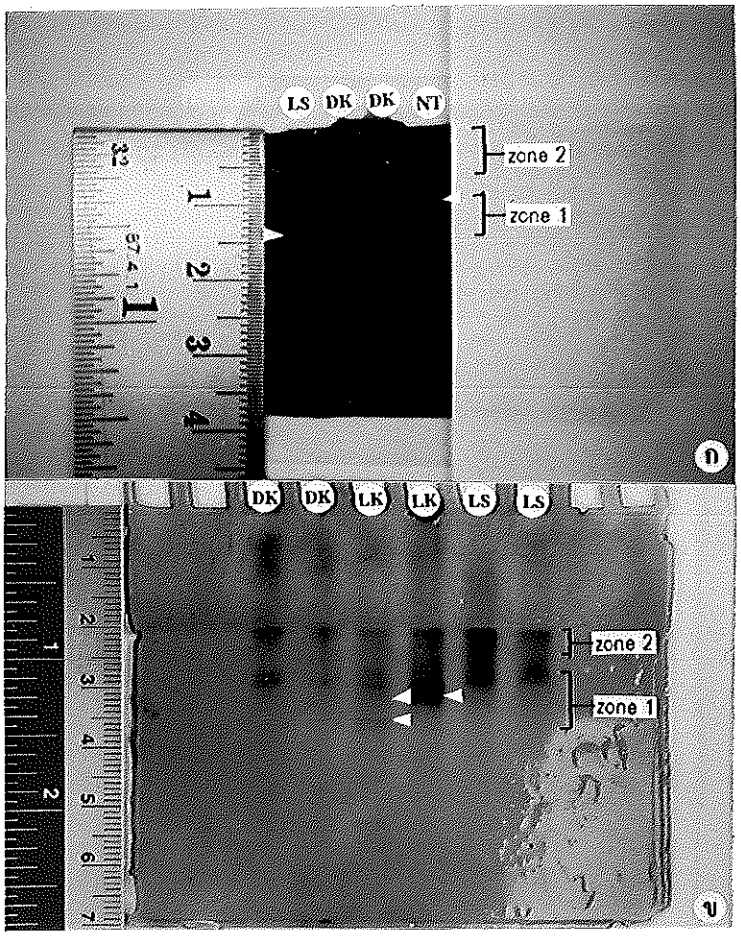


ภาพที่ 4 รูปแบบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของใบจากต้นลางสาด ดูกู อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวี

LS = langsat DK = duku NT = Natawee (longkong)

1.1.2.3 เอนไซม์เอสเตอเรส

รูปแบบของเอนไซม์เอสเตอเรสแตกต่างกันระหว่างดูกู ลองกอง และลางสาด ในการทดลองครั้งแรก มีการเคลื่อนที่ของแถบ 2 zone คือ zone 1 และ zone 2 พบความแตกต่างของดูกู ลองกองและลางสาด คือ ลางสาดมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 จำนวน 4 แถบ แต่ ดูกูและลองกองมี 3 แถบ ดูกูต้นที่ 1 มีแถบสีเข้มกว่าต้นที่ 2 ส่วนลองกองมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 คล้ายดูกูต้นที่ 2 แต่แตกต่างจากดูกูต้นที่ 1 และลางสาด (ภาพที่ 5 ก) ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อต้นมีอายุมากขึ้นประมาณ 2.5 เดือน ลองกองมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 มากกว่า 1 แถบและแถบมีสีเข้มกว่าลองกองต้นที่ 1 มีแถบที่แตกต่างจากต้นที่ 2 ตรงตำแหน่งศรชี้ ส่วนดูกูและลางสาดมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 ใกล้เคียงกันแต่ดูกูมีแถบชัดเจนกว่าลางสาด (ภาพที่ 5 ข)

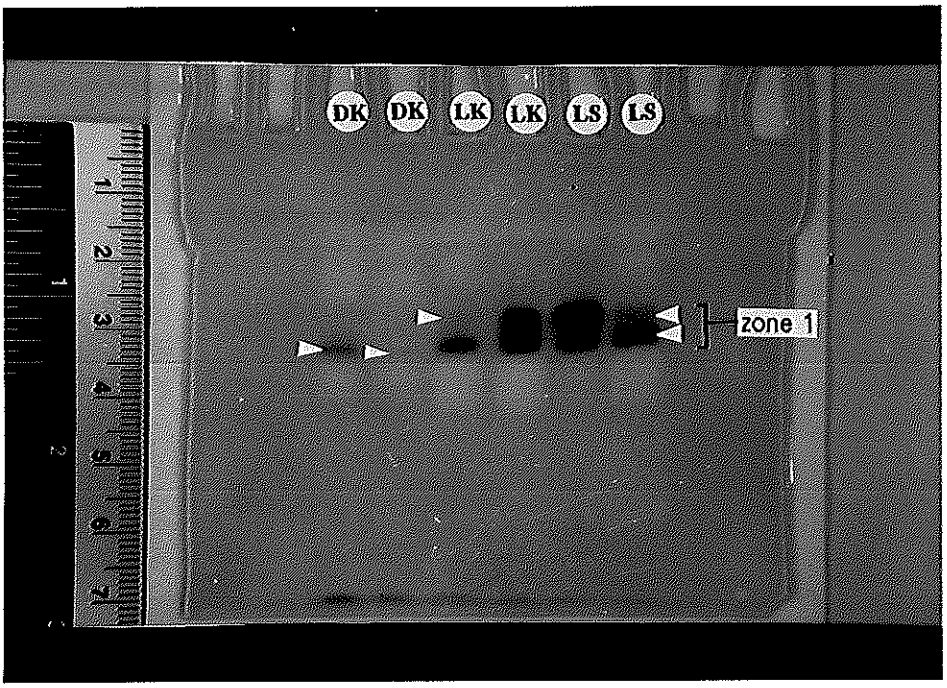


ภาพที่ 5 รูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรสของใบจากต้นลางสาด ดูกู อายุ 1.5 ปี และลองกอง จากนาทวี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) ใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี ทดลองครั้งที่ 2 (ข)

DK = duku LK = longkong LS = langsat NT = Natawee (longkong)

1.1.2.4 เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส

รูปแบบของเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสมีเฉพาะ zone 1 มี 2 แถบ ดูกูต้นที่ 1 มี 1 แถบ ส่วนต้นที่ 2 มีแถบปรากฏไม่ชัดเจน ลองกองต้นที่ 1 มีแถบ 2 แถบ แถบบนมีสีไม่ชัดเจน ต้นที่ 2 มี 2 แถบมีสีชัดเจน ส่วนลางสาดต้นที่ 1 มี 2 แถบ ที่ตำแหน่งเดียวกันกับลองกองต้นที่ 2 และมีสีชัดเจน ต้นที่ 2 แถบบนมีสีไม่ชัดเจน (ภาพที่ 6)



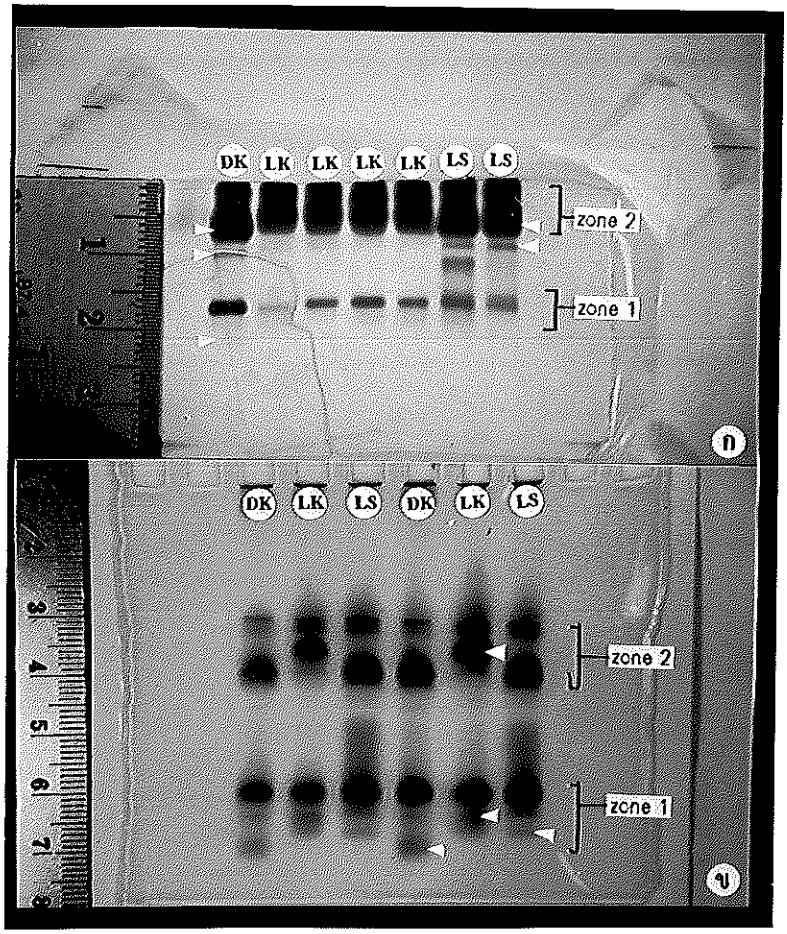
ภาพที่ 6 รูปแบบเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี

DK = duku LK = longkong LS = langsat

1.1.3 ต้นอายุประมาณ 5 ปี

1.1.3.1 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสประกอบด้วยจำนวนแถบ zone 1 และ zone 2 ดูกู ลองกองและลางสาด มีแถบแตกต่างกันชัดเจนที่ตำแหน่งศรชี้ ดูกูและลางสาดมีแถบ ที่ตำแหน่ง zone 1 เคลื่อนที่ได้ไกลกว่าลองกอง (ภาพที่ 7 ก) สำหรับรูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิ-เดส ที่ทำการตรวจสอบในครั้งที่ 2 เมื่ออายุเพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เดือน พบว่าดูกู ลองกอง และลางสาด แตกต่างกันชัดเจน โดยที่ดูกูมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 เคลื่อนที่ได้ไกลกว่าลางสาดและลองกอง ตามลำดับ ส่วน zone 2 นั้นดูกูมีแถบที่ตำแหน่งเดียวกับลางสาด แต่เคลื่อนที่ได้ไกลกว่าลองกอง (ภาพที่ 7 ข)

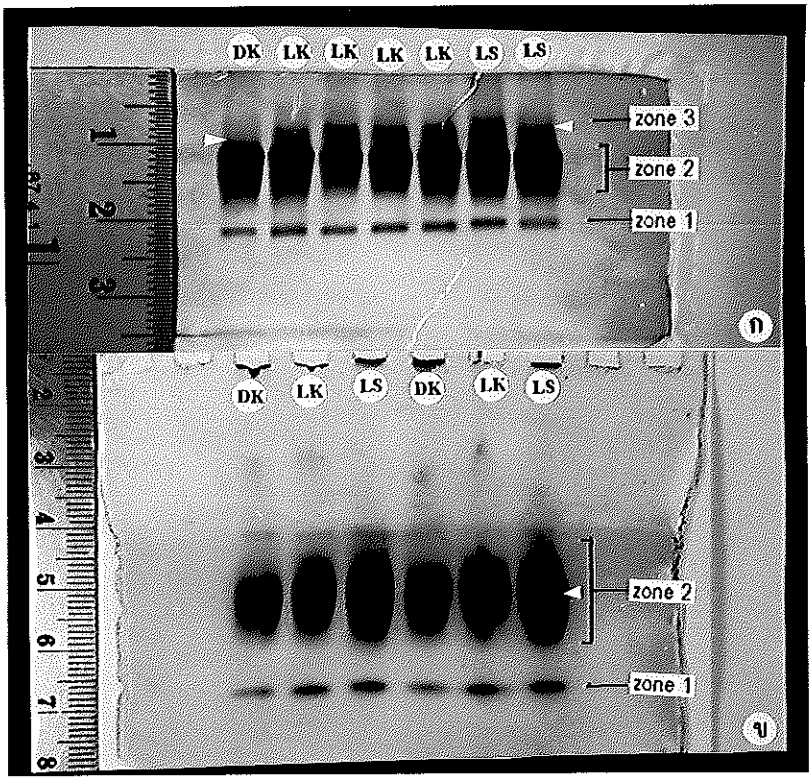


ภาพที่ 7 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 5 ปี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)

DK = duku LK = longkong LS = langsat

1.1.3.2 เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส

รูปแบบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสมีการเคลื่อนที่ของแถบ 3 zone คือ zone 1, zone 2 และ zone 3 เป็นไปในทำนองเดียวกับต้นอายุ 4-5 เดือน และ 1.5 ปี ดูกูมีความแตกต่างจากลองกองและลางสาดที่ตำแหน่ง zone 3 โดยที่ดูกูไม่มีแถบที่ตำแหน่งนี้ ส่วนในลางสาดต้นที่ 1 มีแถบนี้ยาวกว่าในลองกองเล็กน้อย ส่วนต้นที่ 2 ไม่แตกต่างจากลองกอง จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน (ภาพที่ 8 ก) เมื่อทำการทดลองในครั้งที่ 2 ต้นมีอายุเพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เดือน พบว่าดูกู ลองกอง และลางสาดมีความแตกต่างกันที่ความยาวของแถบที่ตำแหน่ง zone 2 โดยดูกูมีแถบสั้นที่สุด ลองกองมีแถบยาวปานกลาง ส่วนลางสาดมีแถบยาวที่สุด ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน (ภาพที่ 8 ข)

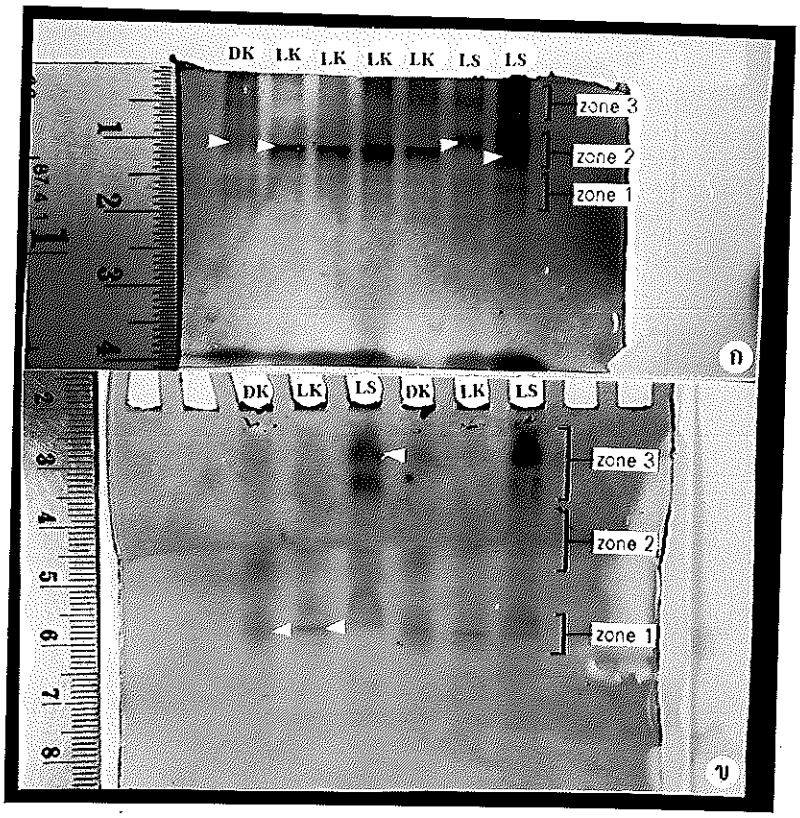


ภาพที่ 8 รูปแบบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 5 ปี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)

DK = duku LK = longkong LS = langsat

1.1.3.3 เอนไซม์เอสเตอเรส

รูปแบบของเอนไซม์เอสเตอเรสมีการเคลื่อนที่ของแถบ 3 zone คือ zone 1, zone 2 และ zone 3 ลองกองมีแถบ 2 แถบ ที่ตำแหน่ง zone 2 แถบมีความเข้มมากที่สุด และตำแหน่งของแถบแตกต่างจากดูกู และลางสาด ลางสาดต้นที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกัน โดยที่ต้นที่ 2 มีแถบที่ตำแหน่ง zone 2 มากกว่าต้นที่ 1 จำนวน 1 แถบ (ภาพที่ 9 ก) ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อต้นมีอายุเพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เดือน พบว่า ดูกูและลางสาดมีแถบที่ตำแหน่ง zone 1 ไม่ชัดเจน ส่วนลองกองมี 1 แถบชัดเจน และลางสาดมีแถบที่ตำแหน่ง zone 2 จำนวน 2 แถบ (ภาพที่ 9 ข)



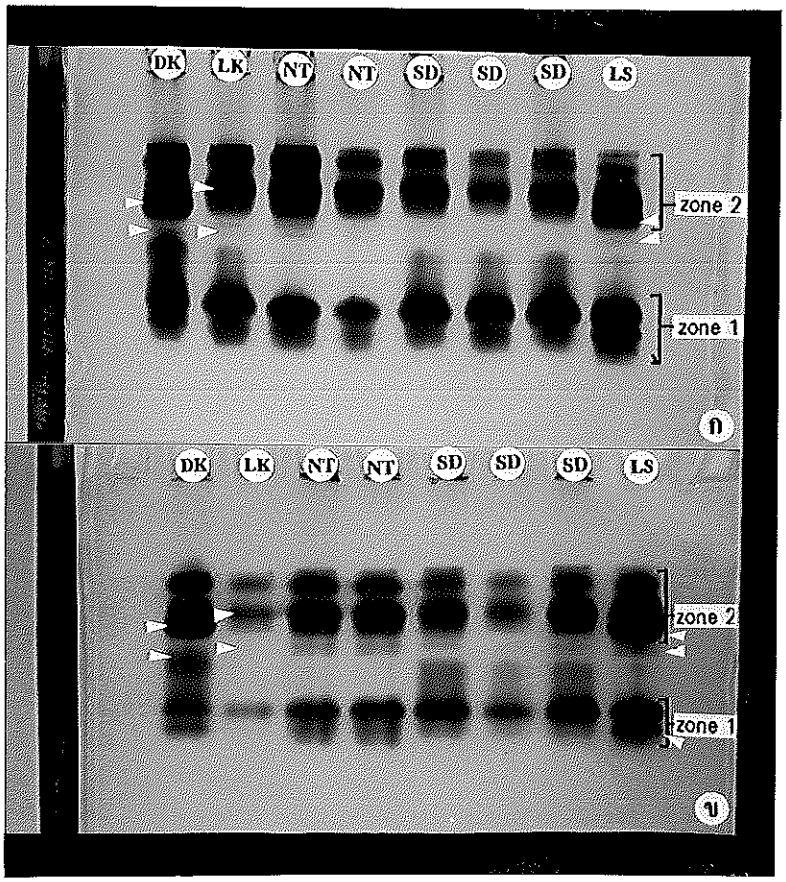
ภาพที่ 9 รูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 5 ปี ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)

DK = duku LK = longkong LS = langsat

1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบเอนไซม์เพื่อจำแนกพืชสกุล *Lansium*

1.2.1 การศึกษาระยะเวลาการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์

การปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 15 นาที ให้แถบเป็นปื้นมากกว่าและแถบมีสีเข้มกว่าการปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 20 นาที แต่การปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 20 นาที ให้แถบคมชัดกว่าการปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 15 นาที เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่า ดูกูมีแถบที่ตำแหน่ง zone 2 เคลื่อนที่มากกว่า ลองกอง และลางสาด ดูกูและลางสาดมีแถบที่ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 จำนวน 1 แถบ ส่วนลองกองมี 2 แถบ ดังศรชี้ และพบว่าลองกองต้นที่ทำการตรวจสอบ คือ ลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี 2 ต้น และลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา 3 ต้นมีรูปแบบเอนไซม์เหมือนกับต้นลองกองที่ใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ (ภาพที่ 10 ก และ ข)



ภาพที่ 10 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวีและสะเดาโดยทำการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที (ก) และ 20 นาที (ข)

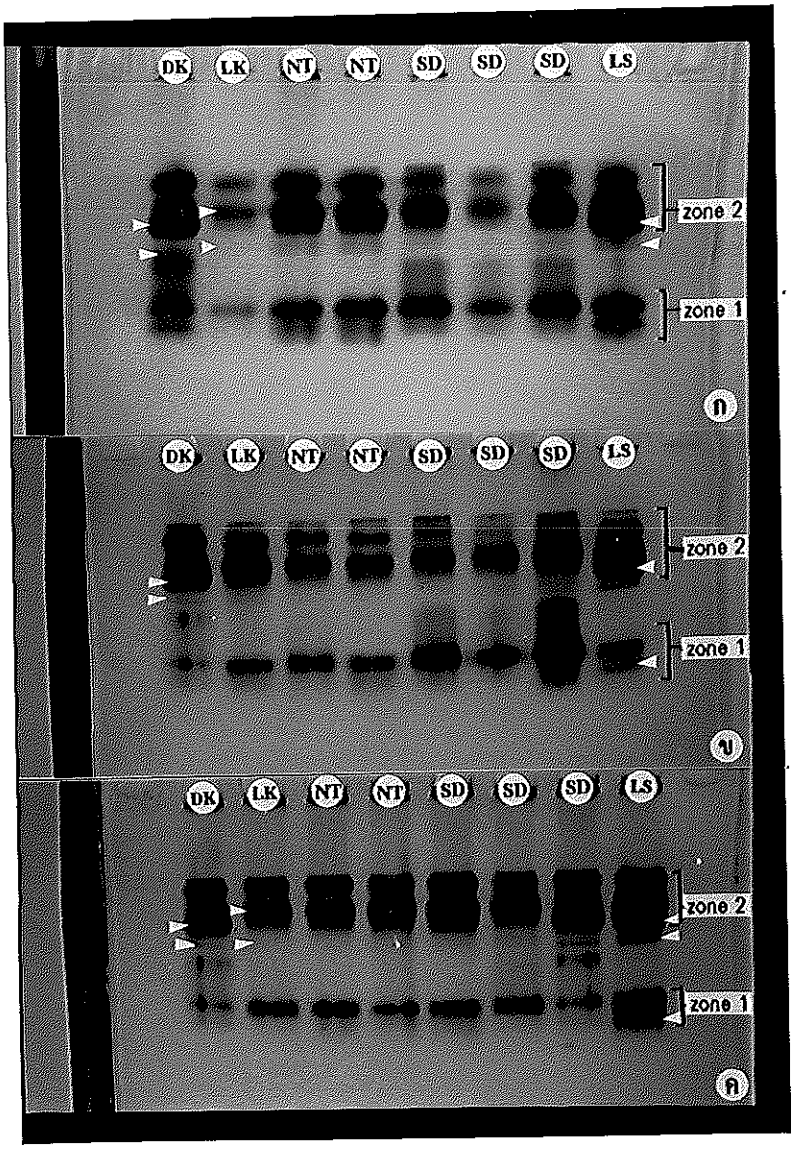
DK = duku LK = longkong LS = langsat NT = Natawee (longkong)

SD = Sadao (longkong)

1.2.2 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์

การนำใบเพสลาดของลองกอง ลางสาด และ ดูกู อายุประมาณ 1.5 ปี มาทำการสกัดด้วยสารสกัดเอนไซม์บัฟเฟอร์ 3 ชนิด (ตารางที่ 1) ทำการปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำมาแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และย้อมสีด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากการใช้สารสกัดเอนไซม์ต่างกัน ผลจากการทดลองพบว่า บัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 ให้แถบชัดเจนกว่าบัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 และ 1

ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่า ดูกู ลองกอง และลางสาด มีแถบแตกต่างกันชัดเจนเช่นเดียวกับในข้อ 1.2.1 ดังศรชี้ และพบว่าลองกองต้นที่ทำการตรวจสอบคือ ลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี 2 ต้น และลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา 3 ต้นมีรูปแบบเอนไซม์เหมือนกับต้นลองกองที่ใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ (ภาพที่ 11 ก ข และ ค)



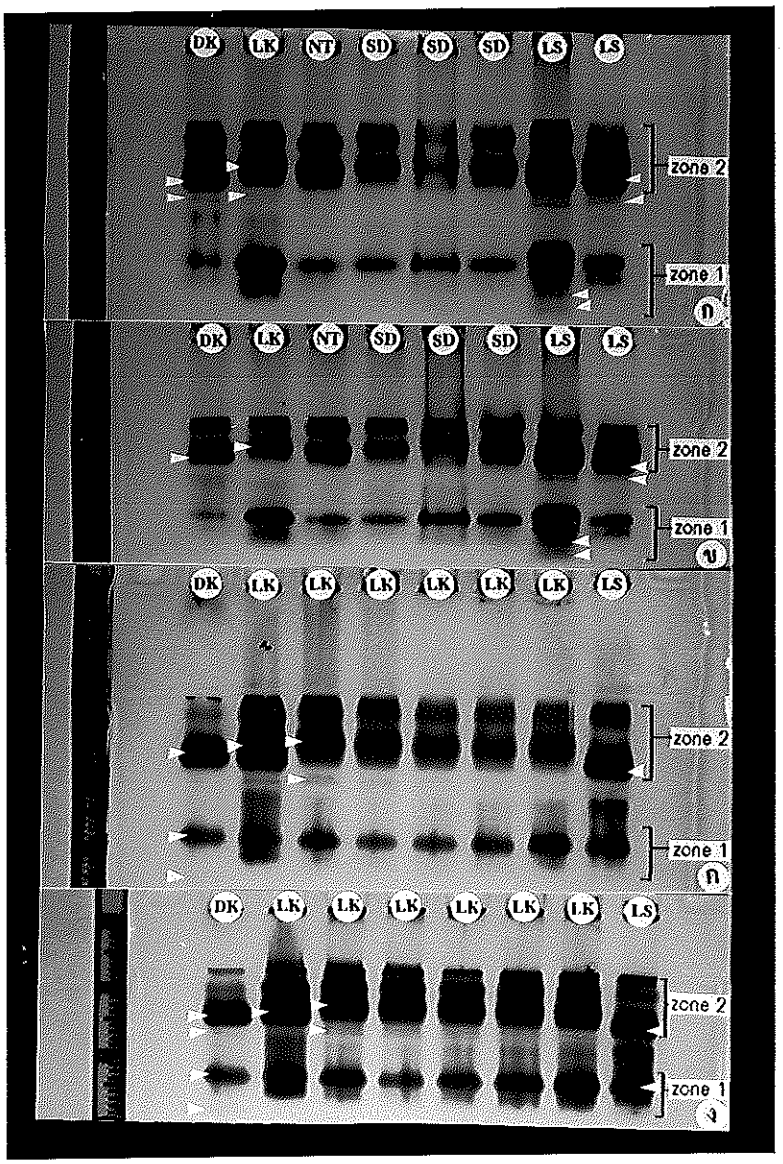
ภาพที่ 11 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 1.5 ปี ลองกองจากนาทวีและสะเดาซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ ชนิดที่ 1 (ก) ชนิดที่ 2 (ข) และชนิดที่ 3 (ค)

DK = duku LK = longkong LS = langsat NT = Natawee (longkong)

SD = Sadao (longkong)

1.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของเจล

ทำการสกัดเอนไซม์จากใบลองกอง ลางสาด และดูกูของต้นที่มีอายุประมาณ 1.5 ปี และต้นอายุประมาณ 5 ปี โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 ทำการปั่นตกตะกอนโดยใช้เวลา 20 นาที มาแยกเอนไซม์บนตัวกลางเจลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ความเข้มข้น คือ 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ และย้อมสีด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เปรียบเทียบความชัดเจนของรูปแบบเอนไซม์จากการใช้เจลความเข้มข้นต่างกัน พบว่า เจลมีความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบชัดเจนกว่า เจล 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในต้นอายุ 1.5 ปี และ 5 ปี เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้นอายุ 1.5 ปี และ 5 ปี พบว่า ต้นอายุ 5 ปี มีแถบทั้งหมดเข้มกว่าต้นอายุ 1.5 ปี โดยเฉพาะแถบระหว่าง zone 1 และ zone 2 ต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี 1 ต้น และต้นลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา 3 ต้น มีแถบเหมือนกับต้นลองกองที่ใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบและแตกต่างจากดูกูและลางสาดชัดเจนที่ตำแหน่ง zone 2 และตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 ดังศรชี้ (ภาพที่ 12 ก ข ค และ ง)



ภาพที่ 12 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาดอายุ 1.5 ปี และลองกองจากนาทวีและสะเดาซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ ชนิดที่ 3 ทำการแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 12 เปอร์เซ็นต์ (ข) ต้นอายุ 5 ปี ซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ ชนิดที่ 3 ทำการแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ค) และ 12 เปอร์เซ็นต์ (ง)

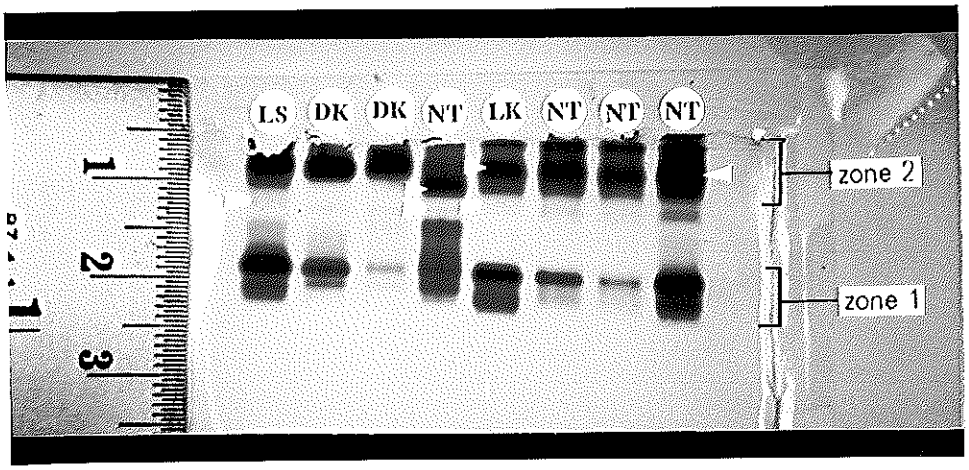
DK = duku LK = longkong LS = langsat NT = Natawee (longkong)

SD = Sadao (longkong)

1.3 การศึกษาเอนไซม์ของต้นลองกองจากอำเภอนาทวีและอำเภอสะเดา

1.3.1 ต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี

การใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการตรวจสอบต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี พบว่าต้นลองกองเสียบยอดต้นที่ 1 มีแถบแตกต่างจากต้นกล้าลองกองซึ่งเป็นหน่วยทดลองเปรียบเทียบ และลองกองเสียบยอด 3 ต้น มีลักษณะคล้ายต้นกล้าลองกองซึ่งเป็นหน่วยทดลองเปรียบเทียบ โดยมีแถบที่ตำแหน่งแตกต่างจาก ดูกู และลางสาด ที่ตำแหน่ง zone 2 และที่ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ 2 ดังศรชี้ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาดเปรียบเทียบกับต้นลองกองเสียบยอดจากนาทวี

DK = duku LK = longkong LS = langsat NT = Natawee (longkong)

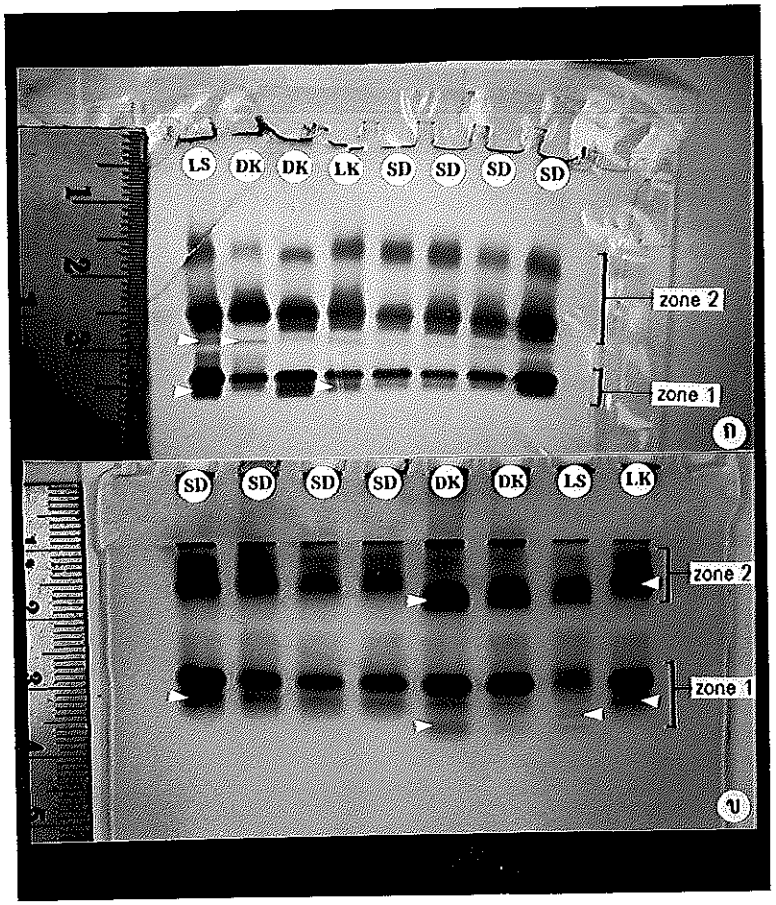
1.3.2 ต้นลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา

1.3.2.1 ต้นลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา ครั้งที่ 1

การใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตรวจสอบต้นกล้าลองกองจากสะเดาครั้งที่ 1 พบว่า ต้นที่ 1 2 และ 3 มีลักษณะแถบเหมือนต้นลองกองที่ใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ ส่วนต้นที่ 4 มีแถบเข้มกว่า (ภาพที่ 14 ก)

1.3.2.2 ต้นลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา ครั้งที่ 2

การใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตรวจสอบเป็นต้นกล้าลองกองชุดเดียวกับครั้งที่ 1 แต่อายุมากขึ้น ประมาณ 6 เดือน พบว่า ลองกองต้นที่ 1-4 มีแถบคล้ายต้นลองกองที่ใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ และมีแถบแตกต่างจากดูกูและลางสาดชัดเจนที่ตำแหน่ง zone 1 และ zone 2 ดังศรชี้ (ภาพที่ 14 ข)



ภาพที่ 14 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้นดูกู ลองกอง และลางสาดเปรียบเทียบกับต้นกล้าลองกองเพาะเมล็ดจากสะเดา ทดลองครั้งที่ 1 (ก) และทดลองครั้งที่ 2 (ข)

DK = duku LK = longkong LS = langsat SD = Sadao (longkong)

2. การศึกษาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ด ยอดและตาข้างของต้นกล้าลองกอง ลางสาดและดูกู

2.1 การศึกษาการชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดลองกองและลางสาด

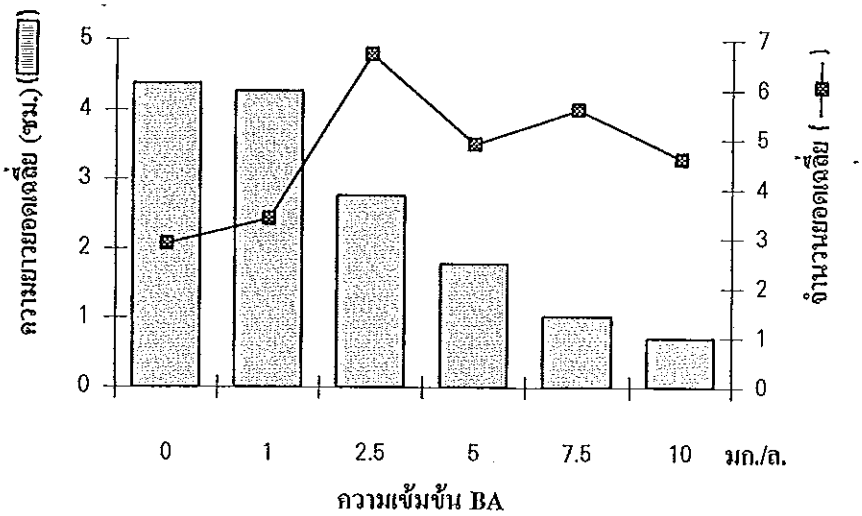
การเลี้ยงเมล็ดลองกองในอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม BA ให้จำนวนยอดรวมสูงกว่าอาหารที่ปราศจาก BA BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.7 ยอด เมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้นมีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ยลดลงเล็กน้อย BA ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติ ยอดที่ชักนำในอาหารเติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์และมีความยาวเหมาะสมในการชักนำรากรองลงมา ได้แก่ สูตรอาหารเติม BA ความเข้มข้น 5 และ 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีบางยอดสามารถชักนำรากได้ ส่วนยอดขนาดเล็กเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดที่สมบูรณ์ในเวลาต่อมา ในขณะที่อาหารเติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดสั้นมาก ยอดมีความสมบูรณ์ต่ำมีการเจริญช้าที่สุด (ตารางที่ 3 และภาพที่ 15-17)

การเลี้ยงเมล็ดลางสาดในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.5 5.0 และ 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.45±2.80 ยอด และความยาวยอดเฉลี่ย 2.25±2.55 เซนติเมตร ส่วน BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยรองลงมาคือ 0.71± 0.60 ยอด และความยาวยอดเฉลี่ย 1.24±1.68 เซนติเมตร และ BA เข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่ำสุด คือ 0.52± 0.93 ยอด และความยาวยอดเฉลี่ย 0.54±0.32 เซนติเมตร จากนั้นทำการย้ายเลี้ยงยอดที่มีขนาดเล็กพร้อมด้วยเมล็ดไปยังอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า สามารถชักนำยอดรวมได้เพิ่มขึ้น โดยให้ยอดที่มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวนยอดเฉลี่ย 4.60±2.50 ยอด ยอดที่มีขนาดประมาณ 1.0 เซนติเมตร จำนวนยอดเฉลี่ย 1.93±1.05 ยอด ยอดที่มีขนาดประมาณ 2.0 เซนติเมตร จำนวนยอดเฉลี่ย 1.80±0.89 ยอด ยอดที่มีขนาดประมาณ 3.0-4.0 เซนติเมตร จำนวนยอดเฉลี่ย 1.79±0.83 ยอด และยอดที่มีขนาดตั้งแต่ 5.0 เซนติเมตรเป็นต้นไป จำนวนยอดเฉลี่ย 1.25±0.46 ยอด

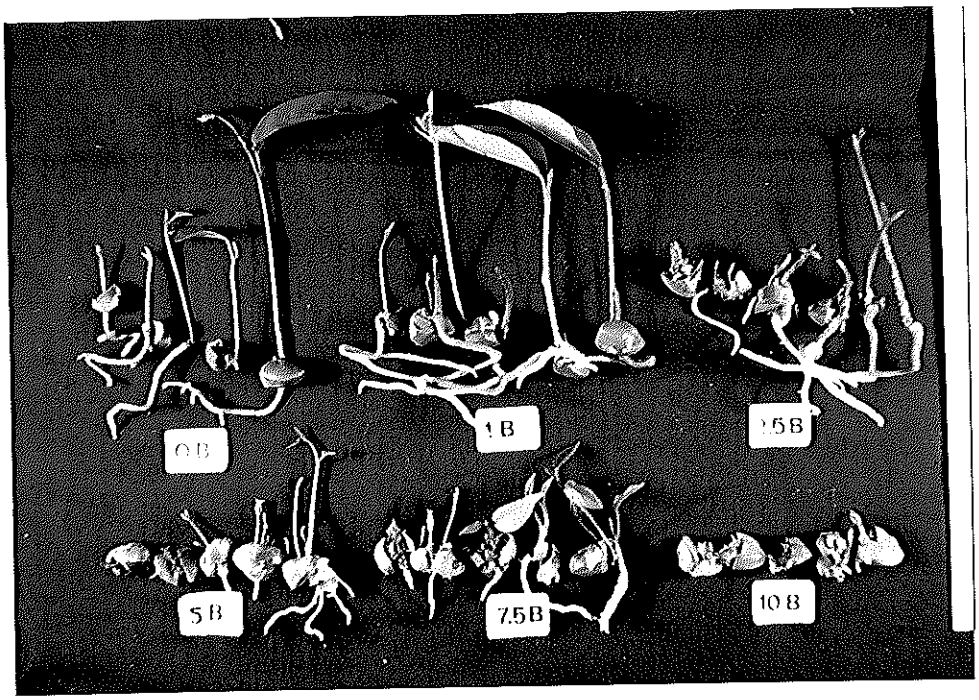
ตารางที่ 3 ผลของ BA ต่อการสร้างยอดรวมจากเมล็ดลองกองที่เลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

BA (มก./ล.)	จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)
0	2.9 b	4.37 a
1.0	3.4 b	4.26 a
2.5	6.7 a	2.76 ab
5.0	4.9 ab	1.78 bc
7.5	5.6 ab	1.02 bc
10.0	4.6 ab	0.71 c
F- test	*	**
C.V. (%)	43.40	44.37

*, ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P< 0.05) และมีนัยสำคัญยิ่ง (P< 0.01) ตามลำดับ ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 15 จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดลองกองในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม BA เข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 16 ลักษณะยอดลองกองที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ภาพที่ 17 ลักษณะยอดลองกองหลังย้ายเลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

2.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างลองกอง ลางสาด และดูกู

2.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ และ BA ต่อการจริญของยอดและตาข้างดูกู

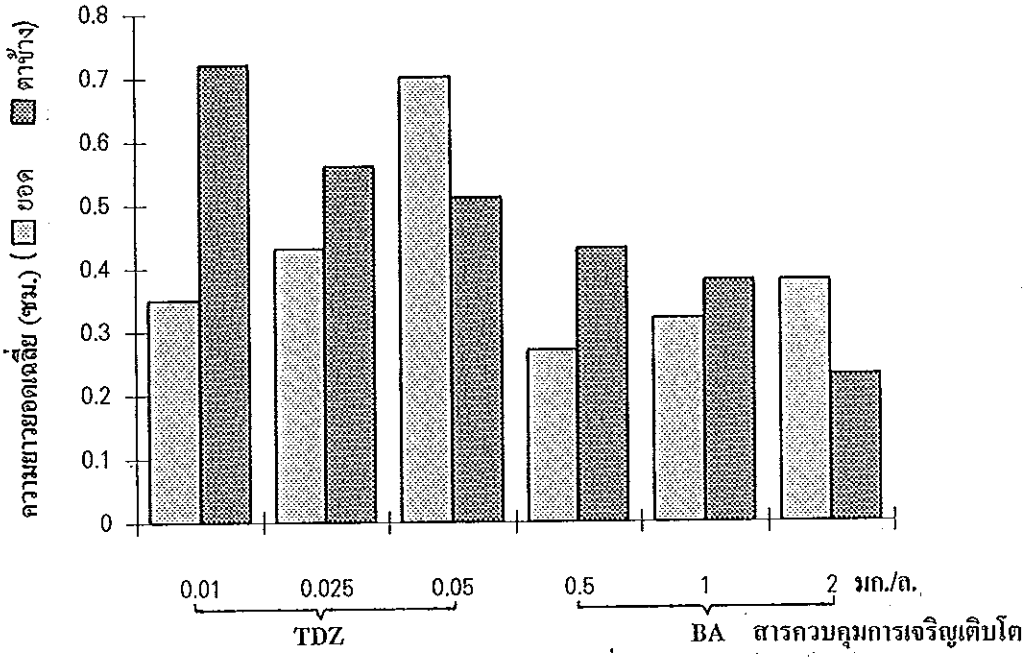
ในการเลี้ยงยอดและตาข้างดูกูในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01, 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TDZ เข้มข้นเพิ่มขึ้น มีผลให้ยอดมีความยาวยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น แต่ตาข้าง ที่พัฒนามีความยาวเฉลี่ยลดลง TDZ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด (0.70 เซนติเมตร) ส่วนตาข้างมีความยาวเฉลี่ยสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลสอดคล้องกับ TDZ แต่ BA ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสั้นกว่า TDZ โดย BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การพัฒนาการยืดยาวของตาข้างดีที่สุด 0.43 เซนติเมตร ในขณะที่ BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การพัฒนาการยืดยาวของยอดดีที่สุด 0.38 เซนติเมตร (ตารางที่ 4 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 4 ผลของ TDZ หรือ BA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

TDZ (มก./ล.)	BA	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ยอด	ตาข้าง
0.01	0	0.35 b	0.72 a
0.025	0	0.43 b	0.56 b
0.05	0	0.70 a	0.51 bc
0	0.5	0.27 b	0.43 bc
0	1.0	0.32 b	0.38 c
0	2.0	0.38 b	0.23 d
F-test		**	**
C.V. (%)		25.27	31.60

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง($P< 0.01$)

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 18 ผลของ TDZ หรือ BA ในอาหารสูตร WPM ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

2.2.2 การศึกษาอิทธิพลของ BA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างของลางสาดและลองกอง

ยอดและตาข้างของลางสาดที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ WPM ร่วมด้วย BA เข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 2 และ 4 สัปดาห์ พบว่า หลังจากเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างไม่แตกต่างกันในทำนองเดียวกับการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ยกเว้นในอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งยอดตายทั้งหมด ส่วนความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลดลงเมื่อความเข้มข้น BA สูงขึ้นเป็นไปในทำนองเดียวกันในอาหารทั้งสองสูตร ความยาวยอดเฉลี่ยของตาข้างสูงสุดในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างกับสูตรอาหาร WPM เติม BA ความเข้มข้นเดียวกัน การใช้ BA ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร WPM ยอดตายทั้งหมด (ตารางที่ 5-6 และภาพที่ 19-20)

ตารางที่ 5 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	จำนวนยอดเฉลี่ย			
		ยอด		ตาข้าง	
		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
MS	1	1	1	0.67	1 a
	5	1	1	1	1 a
	10	1	1	1	1 a
	20	1	1	1	1 a
WPM	1	1	1	1	1 a
	5	1	1	1	1 a
	10	1	1	1	1 a
	20	1	1	1	0 b
F-test		ns	ns	ns	**
C.V. (%)		18.41	0	27.03	0

ns , ** ไม่แตกต่างทางสถิติ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

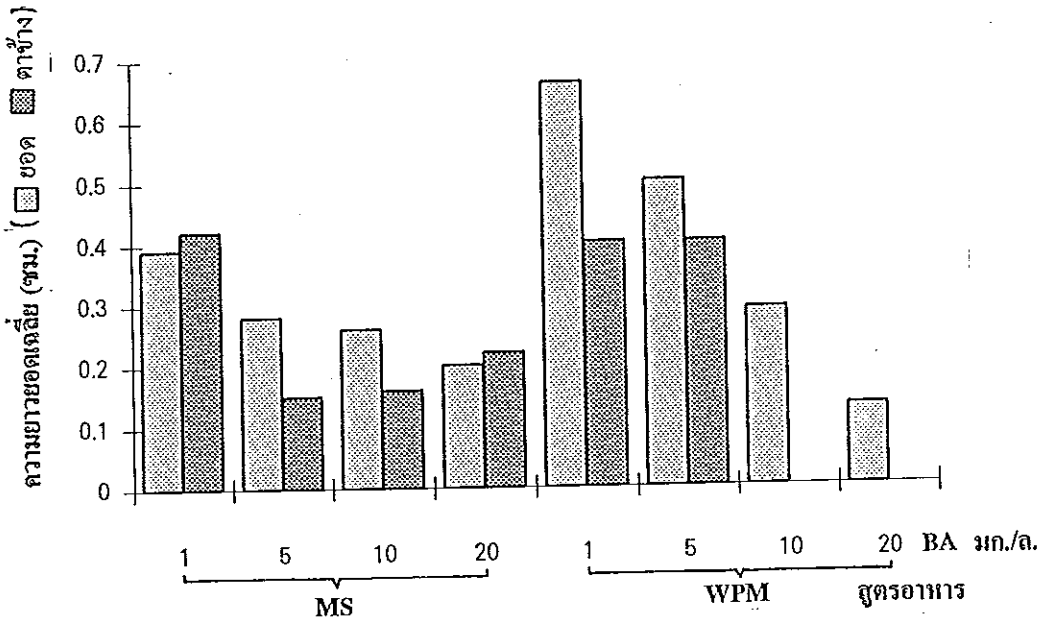
ตารางที่ 6 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ยอด สัปดาห์ที่ 2	ยอด สัปดาห์ที่ 4	ตาข้าง สัปดาห์ที่ 2	ตาข้าง สัปดาห์ที่ 4
MS	1	0.33	0.39 abc	0.03	0.42 a
	5	0.20	0.28 bc	0.11	0.15 ab
	10	0.30	0.26 bc	0.016	0.16 ab
	20	0.10	0.20 bc	0.00	0.22 ab
WPM	1	0.07	0.66 a	0.08	0.40 a
	5	0.10	0.50 ab	0.11	0.40 a
	10	0.03	0.29 bc	0.00	0.00 b
	20	0.00	0.13 c	0.02	0.00 b
F-test		ns	**	ns	*
C.V. (%)		98.88	70.39	106.13	84.21

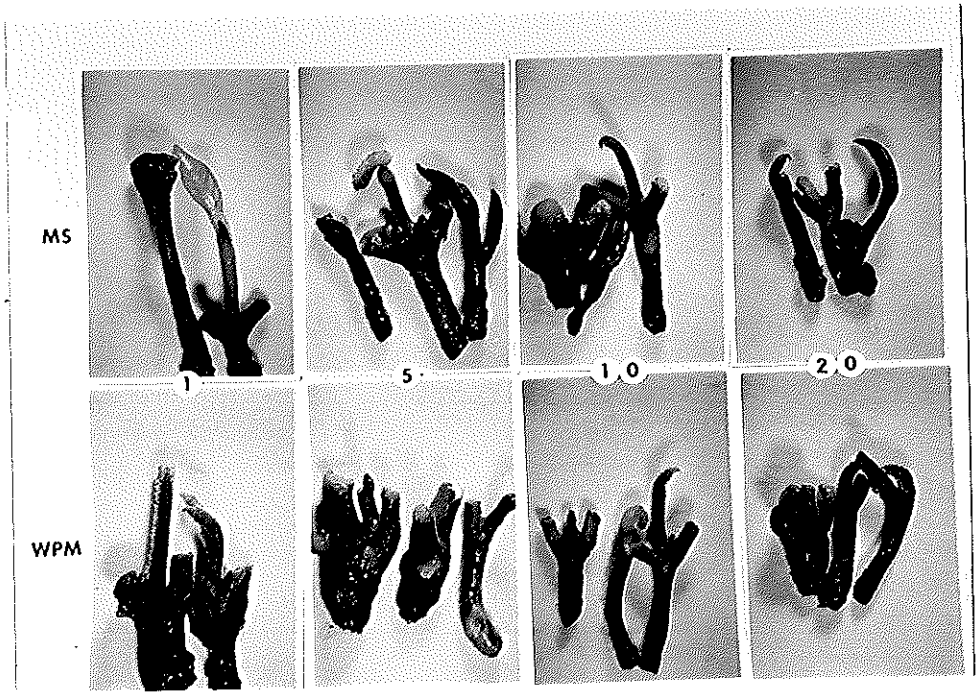
ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

*, ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ตามลำดับ

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 19 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 20 ยอดลางสาดที่ได้จากการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ส่วนในลองกองหลังจากเลี้ยง 2 สัปดาห์ ในอาหารทั้งสูตร MS และ WPM นั้น พบว่ายอดและตาข้างมีจำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันที่ทุกระดับความเข้มข้นของ BA ความยาวยอดเฉลี่ยลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น เป็นไปในทำนองเดียวกัน หลังจากเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 7-8 และภาพที่ 21-22)

ตารางที่ 7 ผลของสูตรอาหาร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลองกอง

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	จำนวนยอดเฉลี่ย			
		ยอด		ตาข้าง	
		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
MS	1	0.75	1	1	1 a
	5	1	0.88	1	1 a
	10	1	1.4	1	1 a
	20	1	1	1	1 a
WPM	1	1	1	1	1 a
	5	1	1	1	1 a
	10	1	1	1	1 a
	20	1	1	1	0 b
F-test		ns	ns	ns	**
C.V. (%)		17.49	31.65	0	0

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

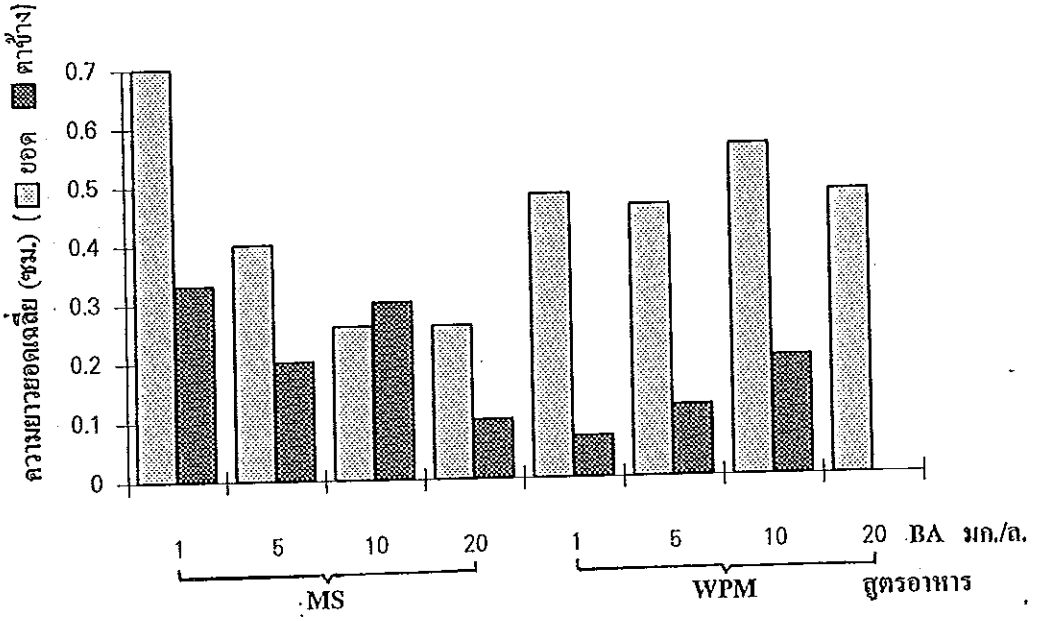
ตารางที่ 8 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างของลองกอง

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)			
		ยอด		ตาข้าง	
		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
MS	1	0.40	0.70 a	0.03 b	0.33
	5	0.50	0.40 ab	0.34 a	0.20
	10	0.36	0.26 b	0.12 ab	0.30
	20	0.27	0.26 b	0.10 ab	0.10
WPM	1	0.35	0.48 ab	0.04 b	0.07
	5	0.24	0.46 ab	0.01 b	0.12
	10	0.35	0.56 ab	0.00 b	0.20
	20	0.60	0.48 ab	0.00 b	0.00
F-test		ns	**	*	ns
C.V. (%)		53.28	38.17	200.95	91.78

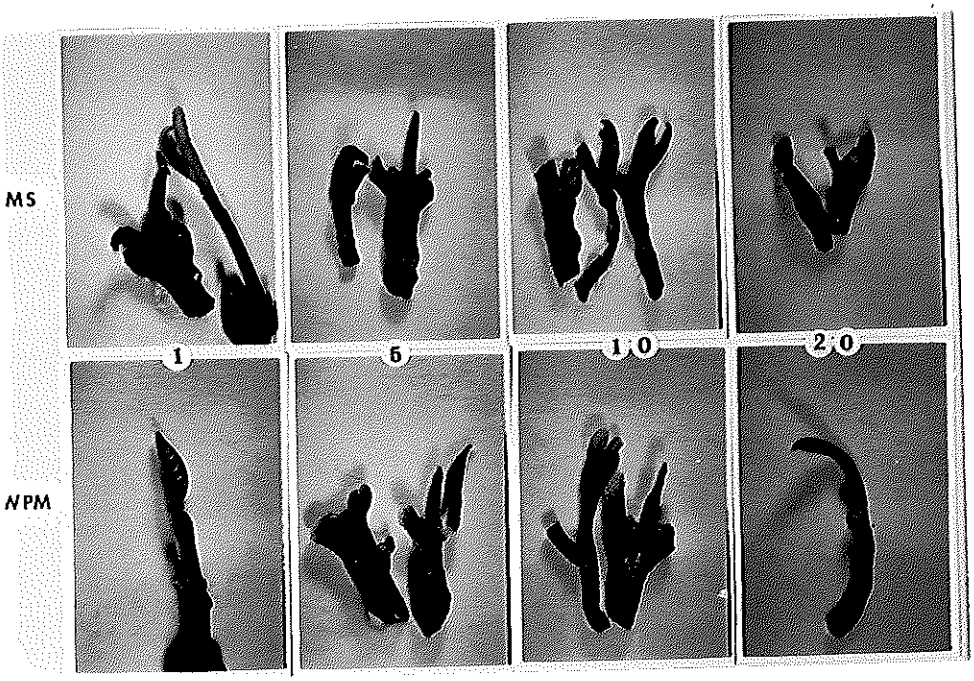
ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

*, ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ตามลำดับ

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 21 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลองกอง หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 22 ยอดลองกองที่ได้จากการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

2.2.3 การศึกษาอิทธิพลของ BA ร่วมด้วย GA_3 ต่อการเจริญของยอดและตาข้างลางสาด

การเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA เข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ส่วนยอดมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอดไม่แตกต่างกันในทุกระดับความเข้มข้นของ BA ส่วนตาข้างมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงขึ้นในอาหารเติม BA เข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 ยอดที่เลี้ยงในสูตรอาหารเติม BA เข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงขึ้น ส่วนตาข้างมีจำนวนยอดเฉลี่ยลดลง ทั้งนี้เนื่องจากมีการตายเพิ่มขึ้น การใช้ BA เข้มข้นสูงถึง 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ยังมีผลให้เนื้อเยื่อเกิดการตายมากขึ้น เมื่อพิจารณาถึงความยาวยอดเฉลี่ย พบว่ายอดมีการยืดยาวได้เร็วในสัปดาห์ที่ 2 และยาวขึ้นเรื่อย ๆ ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับตาข้าง (ตารางที่ 9-10 และภาพที่ 23-25)

ตารางที่ 9 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 ที่มีต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด

สูตรอาหาร	BA	GA_3	จำนวนยอดเฉลี่ย			
			ยอด		ตาข้าง	
	(มก./ล.)		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
MS	1	0.5	1	1.0 abc	1.4	0.86 ab
	5	0.5	1	1.4 ab	1.6	0.67 ab
	10	0.5	1	0.8 abc	1.5	0.66 ab
	20	0.5	1	1.4 ab	1.0	0.56 ab
WPM	1	0.5	1	1.4 ab	1.6	1.00 a
	5	0.5	1	1.8 a	1.4	1.25 a
	10	0.5	1	0.4 bc	1.0	0.13 b
	20	0.5	1	0.0 c	1.0	0.44 ab
F-test			ns	*	ns	**
C.V. (%)			18.41	61.91	59.56	82.94

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

*, ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ตามลำดับ

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

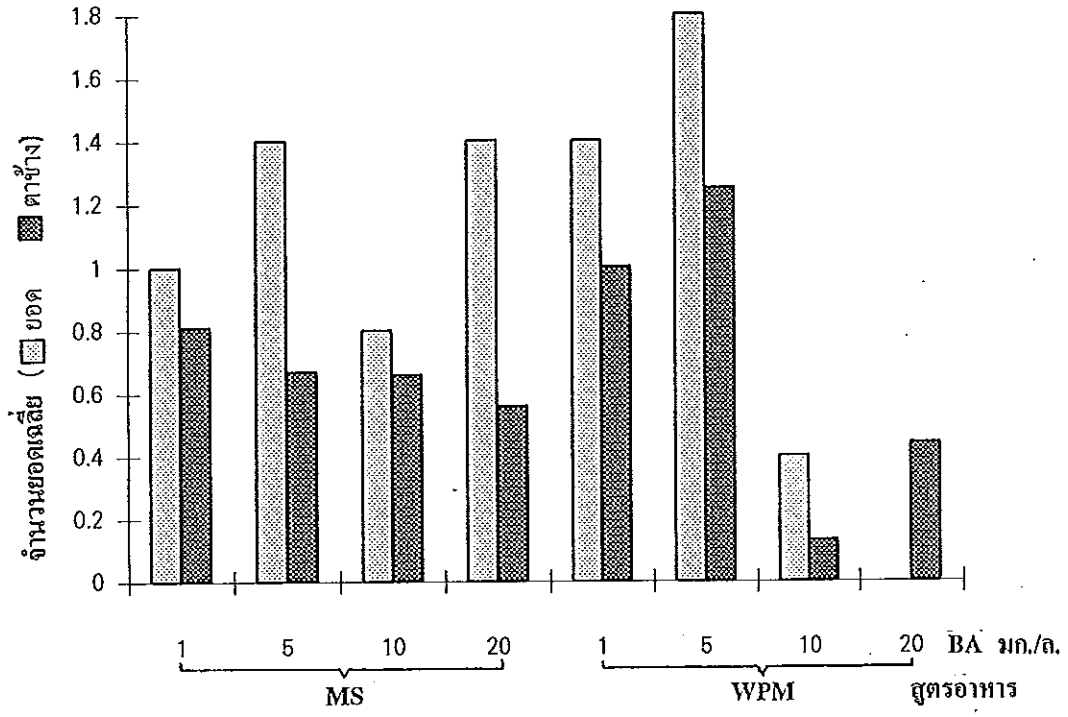
ตารางที่ 10 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างของลางสาด

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	GA_3	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ยอด สัปดาห์ที่ 2	ยอด สัปดาห์ที่ 4	ตาข้าง สัปดาห์ที่ 2	ตาข้าง สัปดาห์ที่ 4
MS	1	0.5	0.64	0.90	0.08 ab	1.30 a
	5	0.5	0.63	0.72	0.10 ab	0.52 bcd
	10	0.5	0.56	0.86	0.06 ab	0.68 bc
	20	0.5	0.52	0.83	0.02 b	0.14 cd
WPM	1	0.5	0.47	0.99	0.09 ab	0.83 ab
	5	0.5	0.53	1.16	0.20 a	0.63 bc
	10	0.5	0.50	0.65	0.06 ab	0.30 cd
	20	0.5	0.53	0.80	0.05 ab	0.00 d
F-test			ns	ns	**	**
C.V. (%)			33.94	36.05	117.66	55.17

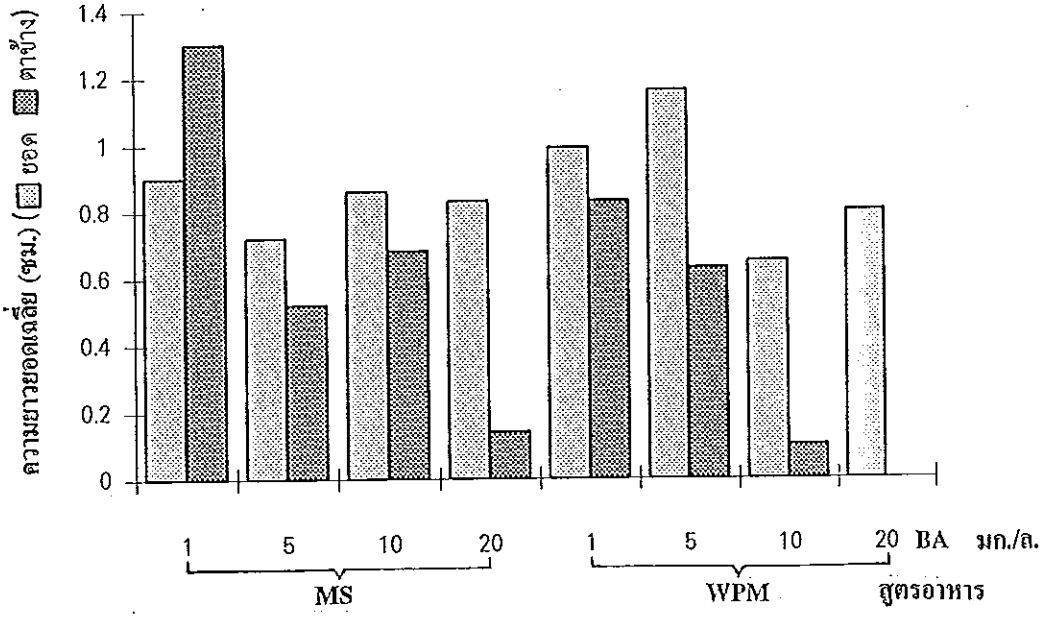
ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

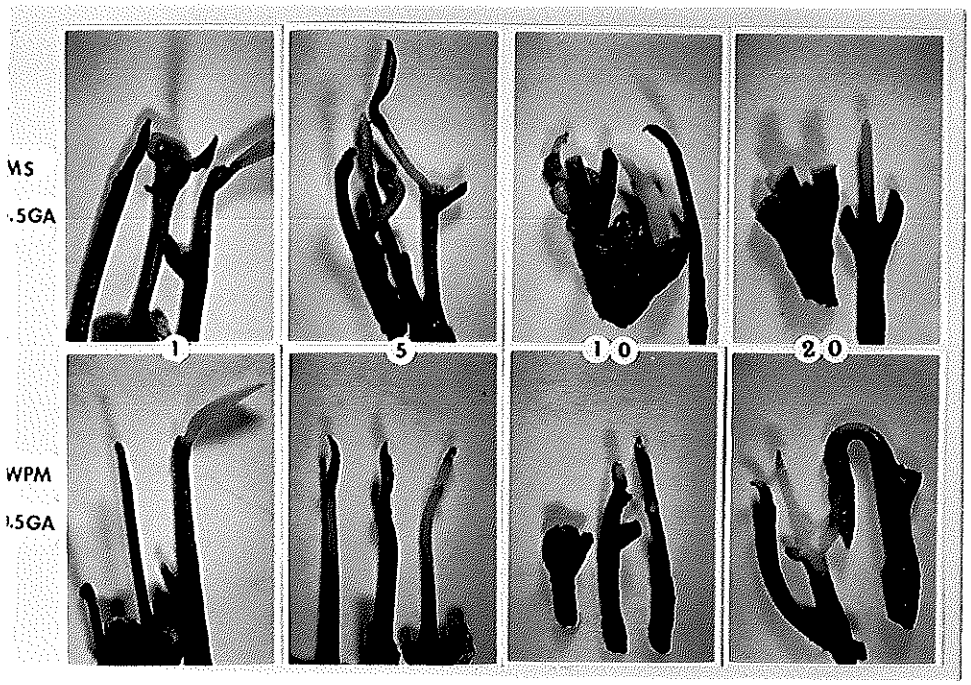
ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 23 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด



ภาพที่ 24 ผลของสูตรอาหาร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาด



ภาพที่ 25 ยอดลางสาดที่ได้จากการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการย้ายเลี้ยงยอดที่พัฒนาจากยอดและตาข้างไปยังอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดมีการพัฒนาได้ดีกว่ามีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.2 ยอด มีความยาวยอด 1.43±0.52 เซนติเมตร ส่วนในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.0 ยอด มีความยาวยอด 1.19±0.62 เซนติเมตร

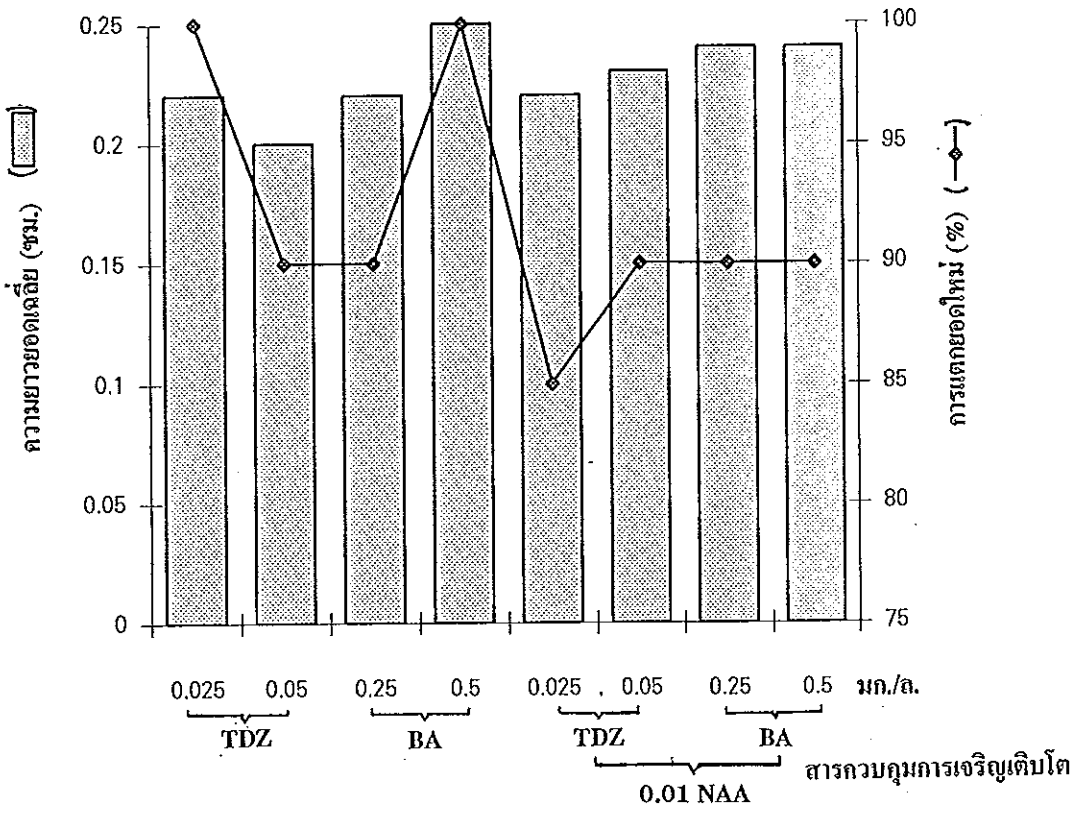
2.2.4 การศึกษาอิทธิพลของ NAA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างของดูกู

การเลี้ยงยอดและตาข้างจากยอดที่พัฒนาใหม่ชุดที่ 1 ในอาหารสูตร WPM เติมTDZ เข้มข้น 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัม เพียงลำพังหรือเติม NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การแตกยอดใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเติมหรือไม่เติม NAA ไม่มีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 11 และภาพที่ 26) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ หรือ BA ทำให้ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น โดย BA ให้ใบสีเขียวเข้มกว่า TDZ

ตารางที่ 11 ผลของ TDZ หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำพังหรือใช้ร่วมกับ NAA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างของยอดดูกูหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต			ความยาวยอดเฉลี่ย	การแตกยอดใหม่
TDZ	BA	NAA	(ซม.)	(%)
	(มก./ล.)			
0.025	0	0	0.22	100
0.05	0	0	0.20	90
0	0.25	0	0.22	90
0	0.5	0	0.25	100
0.025	0	0.01	0.22	85
0.05	0	0.01	0.23	90
0	0.25	0.01	0.24	90
0	0.5	0.01	0.24	90
F-test			ns	ns
C.V. (%)			19.52	30.15

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 26 ผลของ TDZ หรือ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำพังในอาหารสูตร WPM หรือใช้ร่วมกับ NAA ต่อการเจริญของยอดจากยอดและตาข้างดูกู

2.3 การศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดและพัฒนายอดให้สมบูรณ์

การเลี้ยงยอดที่พัฒนาจากยอดและตาข้างดูกู ในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วย TDZ เข้มข้น 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดจากตายอดมีความยาวเฉลี่ยสูงสุดในอาหารสูตร WPM เติม TDZ เข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ตาข้างมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ หรือ BA มีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 12 และภาพที่ 27)

ตารางที่ 12 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าวและ TDZ หรือ BA 2 ระดับความเข้มข้นต่อความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกูหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์

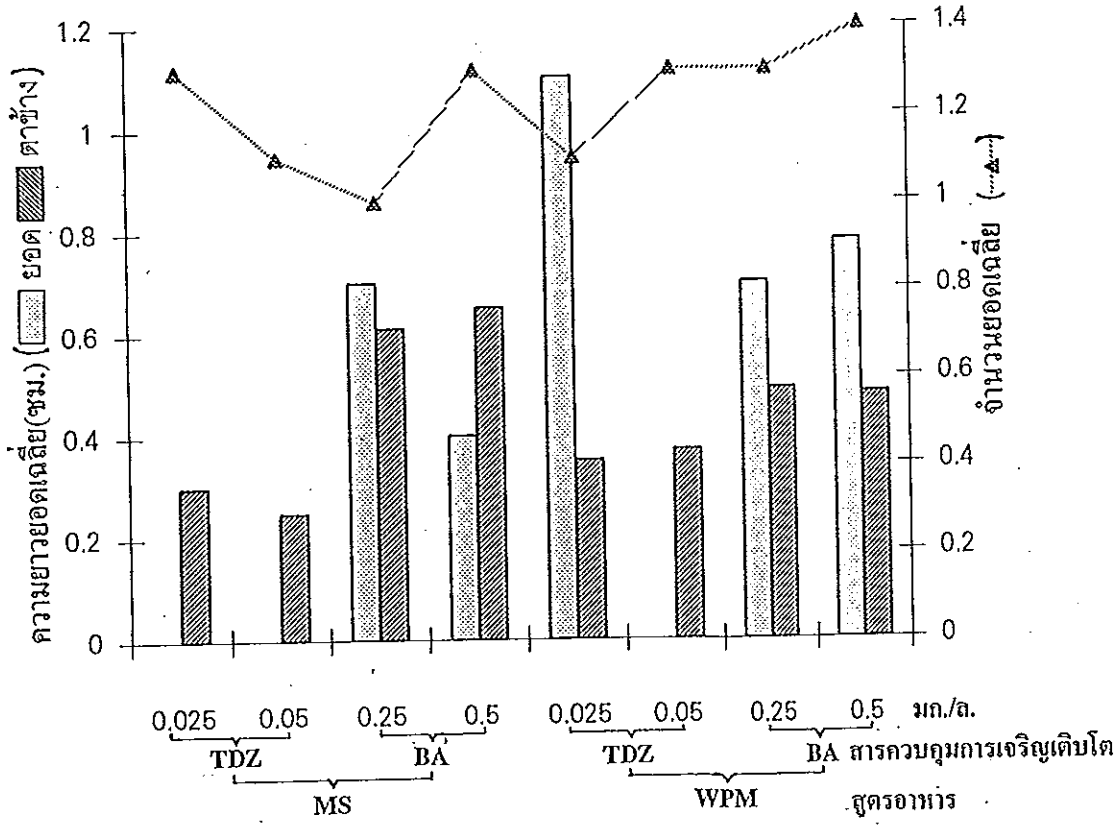
สูตรอาหาร	CW (%)	TDZ (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ยอด	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ตาข้าง	จำนวนยอดเฉลี่ย
MS	15	0.025	0	-	0.30 b	1.3
	15	0.05	0	-	0.33 b	1.1
	15	0	0.25	0.70 b	0.61 a	1.0
	15	0	0.5	0.40 c	0.65 a	1.3
WPM	15	0.025	0	1.10 a	0.35 b	1.1
	15	0.05	0	-	0.37 b	1.3
	15	0	0.25	0.70 b	0.49 ab	1.3
	15	0	0.5	0.78 b	0.48 ab	1.4
F-test				**	**	ns
C.V. (%)				19.64	34.60	33.74

- ไม่ได้ทำการทดลอง

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P< 0.01$)

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 27 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์และ TDZ หรือ BA 2 ระดับความเข้มข้น ต่อความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างดูกู

การเลี้ยงยอดที่พัฒนาจากยอดและตาข้างลองกองและลางสาดในอาหารสูตรเดียวกับการเลี้ยงดูกู พบว่า มีจำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนความยาวยอดเฉลี่ยของลองกองสูงสุดในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในลางสาดให้ความยาวยอดสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA ความเข้มข้นเดียวกัน (ตารางที่ 13 และภาพที่ 28) จากการเลี้ยงยอดในอาหารสูตรดังกล่าวและเติมน้ำมะพร้าว พบว่าสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์แข็งแรง และชักนำให้เกิดรากได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29)

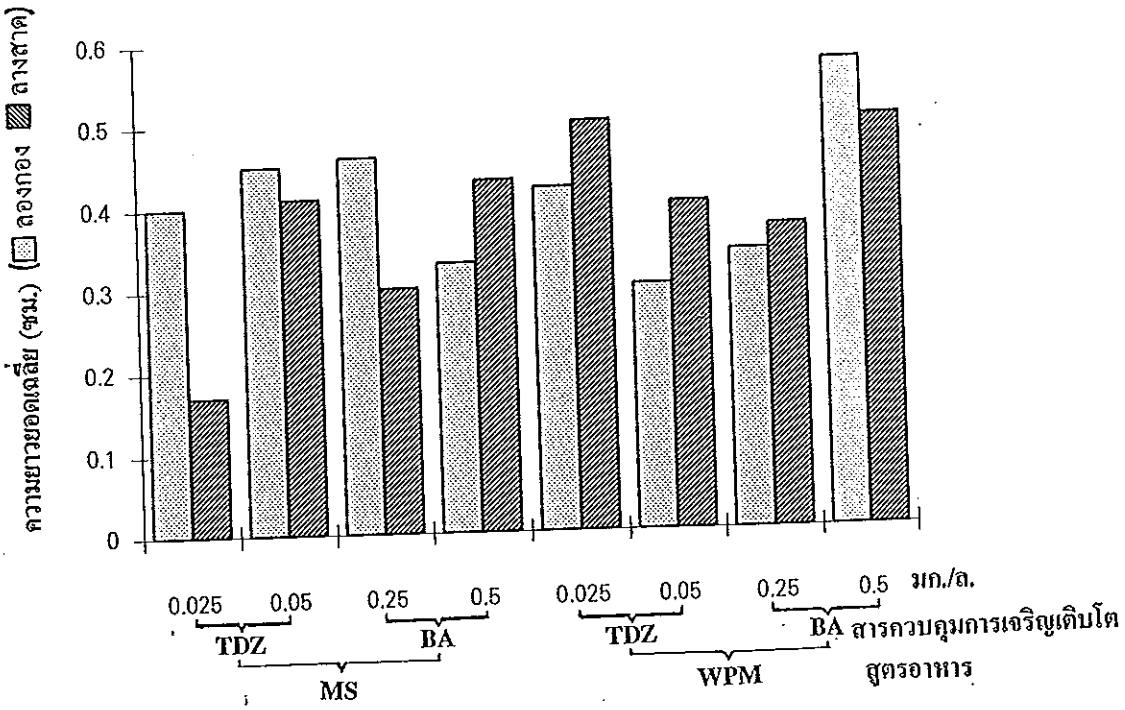
ตารางที่ 13 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าว และ TDZ หรือ BA 2 ระดับ-ความเข้มข้นต่อจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยของยอดและตาข้างลางสาดและลองกอง หลังจากเลี้ยง เป็นเวลา 7 สัปดาห์

สูตรอาหาร	CW (%)	TDZ (มก/ล.)	BA	จำนวนยอดเฉลี่ย		ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	
				ลองกอง	ลางสาด	ลองกอง	ลางสาด
MS	15	0.025	0	1.0	1.0	0.40 b	0.17 c
	15	0.05	0	1.0	1.2	0.45 ab	0.41 ab
	15	0	0.25	1.1	1.1	0.46 ab	0.30 bc
	15	0	0.5	1.0	1.1	0.33 b	0.43 ab
WPM	15	0.025	0	1.1	1.0	0.42 ab	0.50 a
	15	0.050	0	1.1	1.0	0.30 b	0.40 ab
	15	0	0.25	1.0	1.1	0.34 b	0.37 ab
	15	0	0.5	1.0	1.0	0.57 a	0.50 a
F-test				ns	ns	**	**
C.V. (%)				18.66	23.00	30.93	29.23

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 28 ผลของอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ TDZ หรือ BA 2 ระดับความเข้มข้น ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดลางสาดและลองกอง หลังจากเลี้ยง เป็นเวลา 7 สัปดาห์

ภาพที่ 29 ต้นลองกองออกรากที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และBA 2 ระดับความเข้มข้น เป็นเวลา 12 สัปดาห์

2.4 การศึกษาการชักนำราก

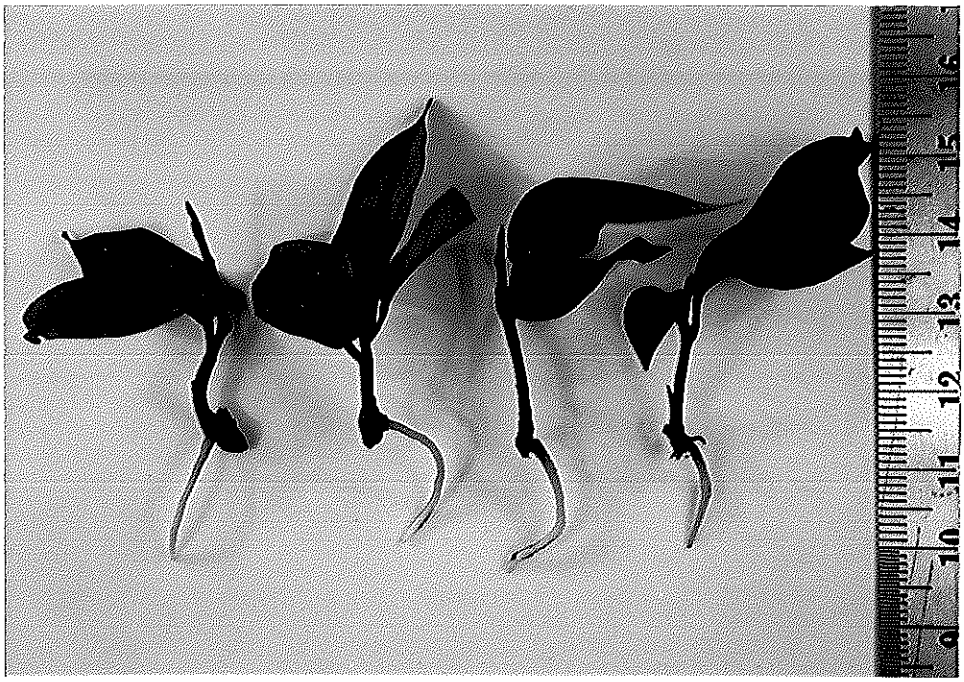
การนำยอดที่มีสภาพสมบูรณ์จากการเลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าวและ TDZ หรือ BA มาทำการกรีดที่โคนต้นจำนวน 2 รอยกรีดแต่ละรอยกรีด มีความยาว 0.5 เซนติเมตร และจุ่มแช่ใน IBA เข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการไม่จุ่มแช่ใน IBA ก่อนการเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการจุ่มแช่โคนต้นที่มีรอยกรีดใน IBA แล้วเลี้ยงในอาหารเติม IBA เข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากต้นลองกองได้ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่หน่วยการทดลองที่ไม่มีการการจุ่มแช่รอยกรีดที่โคนต้นไม่สามารถชักนำรากได้ (ตารางที่ 14 ภาพที่ 30)

ตารางที่ 14 ผลการจุ่มและไม่จุ่ม IBA ต่อการชักนำรากของลองกอง

สูตรอาหาร MS		การชักนำราก (%)	
IBA (มก./ล.)	ผงถ่าน (%)	ไม่จุ่มใน IBA 2,000 มก./ล.	จุ่มใน IBA 2,000 มก./ล.
2.5	0.2	0	0
5.0	0.2	0	20
7.5	0.2	0	0
10.0	0.2	0	40

ภาพที่ 30 รากที่ชักนำจากยอดที่จุ่มแช่ IBA 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

การชักนำรากของยอดจากยอดและตาข้างและยอดจากเมล็ดในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 3 6 9 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ IBA สามารถชักนำรากจากยอดและตาข้างได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ยอดจากเมล็ดสามารถชักนำรากได้ประมาณ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติม IBA เข้มข้น 9 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 รากที่ชักนำจากการเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 3-12 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ของลองกอง ลางสาด และดูกู

1.1 การศึกษาระบบเอนไซม์ของต้นอายุต่างกัน

การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ของลองกอง ลางสาดและดูกู ระบบเอนไซม์ที่ศึกษามี 7 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส แอซิดฟอสฟาเทส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส โดยทำการแยกเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ จากผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส แอซิดฟอสฟาเทส และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส มีปฏิกิริยาสามารถย้อมเจลติดสีได้ ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนสไม่มีปฏิกิริยาโดยย้อมเจลไม่ติดสี เอนไซม์ เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส และแอซิดฟอสฟาเทส นิยมใช้กับเจลอะคริลาไมด์ (เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์, 2531) ส่วนฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส มีรายงานการใช้กับเจลแป้ง (Shields, *et al*, 1983) ระบบเอนไซม์ที่ใช้กับเจลแป้งมีเจลบัฟเฟอร์ และอิเลคโตรดบัฟเฟอร์เฉพาะเจาะจงในแต่ละระบบเอนไซม์แตกต่างกับเจลอะคริลาไมด์ซึ่งใช้เจลบัฟเฟอร์เหมือนกันทุกระบบเอนไซม์ ดังนั้นในการศึกษานี้ส่วนของเจลบัฟเฟอร์และอิเลคโตรดบัฟเฟอร์อาจไม่เหมาะสมกับระบบเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส มาเลทดีไฮโดรจีเนสและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งอาจเป็นสาเหตุประการหนึ่งให้เกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์จึงย้อมเจลไม่ติดสี นอกจากนี้การย้อมเจลไม่ติดสีอาจเกิดจากวิธีการ เตรียมสีย้อมและขั้นตอนในการย้อมเจลไม่เหมาะสม

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส แอซิดฟอสฟาเทส และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส พบว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ที่สุดและรวดเร็วที่สุดให้แถบชัดเจนและแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด เอนไซม์เอสเตอเรสเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ปานกลางและใช้เวลานานที่สุด บางครั้งให้แถบไม่ชัดเจน แต่สามารถแยกความแตกต่างได้รองลงมา เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์กว่าและใช้เวลาน้อยกว่าเอนไซม์เอสเตอเรสแต่ให้แถบเป็นปื้นแยกความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ปานกลางและใช้เวลาน้อยกว่าเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและเอสเตอเรสให้แถบชัดเจนปานกลาง แถบมีน้อยที่สุดและให้ความแตกต่างระหว่างพืชไม่แน่นอน

จากการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการจำแนกต้นดูกู ลองกอง และลางสาด อายุ 4 5 และ 6 เดือน พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนและชัดเจนมากขึ้นตามอายุของต้นที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากพืชแต่ละชนิดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างเด่นชัดมากขึ้น รูปแบบของไอโซไซม์แตกต่างกันขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตของพืชสอดคล้องกับรายงานของ Mowrey และ Werner (1990) ในการศึกษานี้ต้นอายุ 4 เดือน แตกต่างกันน้อยกว่าต้นอายุ 5 เดือน และต้นอายุ 6 เดือนตามลำดับ ในทำนองเดียวกับต้นที่มีอายุประมาณ 1.5 ปี และต้นอายุ 5 ปี ซึ่งต้นอายุ 5 ปีให้แถบแตกต่างชัดเจนที่สุด โดยพบความแตกต่างของแถบที่ตำแหน่ง zone 1 ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 และตำแหน่ง zone 2 เอนไซม์ที่ให้ความชัดเจน รองลงมาคือ เอนไซม์เอสเตอเรส ส่วนเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสแยกความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน สำหรับเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสแยกความแตกต่างของดูกูได้แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลองกองและลางสาดได้

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแยกความแตกต่างพืชทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุดสอดคล้องกับผลการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืชหลายชนิด เช่น มะม่วง (ปุณฑริกา หะริณสุต, 2534) มะขาม (เสาวณี สุริยาภณานนท์, 2538) ลูกผสมระหว่างพลัมและแอปริค๊อต (Byrne and Littleton, 1989) อินทผลัม (Baaziz *et al*., 1994) เป็นต้น และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพียงระบบเดียวสามารถแยกความแตกต่างของพืชทั้ง 3 ชนิดได้เป็นไปในทำนองเดียวกับการใช้เอนไซม์คะตะเลสแยกความแตกต่างของท้อ ส่วนเอนไซม์เอสเตอเรส แอซิดฟอสฟาเทส และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส แม้ว่ามีรายงานการตรวจสอบพืชบางชนิดได้แต่ไม่สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ดี ทั้งนี้เพราะความจำเพาะของระบบเอนไซม์ต่อชนิดพืชหรือพันธุ์พืช (Werner, 1992) จากการศึกษานี้พบว่าในการจำแนกพืชทั้งสามชนิดโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ต้นที่ใช้ ตรวจสอบควรมีอายุตั้งแต่ 5-6 เดือนขึ้นไป จึงสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน

จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของต้นดูกู ลองกอง และลางสาดสามารถพบความแปรปรวนของรูปแบบเอนไซม์ได้ใน 2 ลักษณะคือ จำนวนแถบหรือตำแหน่งแถบ และความเข้มแถบ โดยความแปรปรวนต้นดูกูสูงกว่าลองกองและลางสาด ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการใช้ไอโซไซม์ในการศึกษาความแปรปรวนของพืชในสกุล *Prunus* ได้แก่ ท้อ อัลมอนด์ พลัม แอปริค๊อต เป็นต้น (Byrne, 1980 ; Arulsekar *et al*.,1986; Ibanez, *et al*., 1993) วอลนัท (Solar, *et al*., 1994) ความแปรปรวนของรูปแบบเอนไซม์สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของอัลลิลในส้ม (Ollitrualt, 1990) ซึ่งมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์

1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบเอนไซม์เพื่อจำแนกพืชสกุล *Lansium*

1.2.1 การศึกษาระยะเวลาการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์

จากทดลองนี้ปั่นตกะกอนสารสกัดเอนไซม์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 และ 20 นาที พบว่า ที่เวลา 20 นาที ให้ผลดีกว่าที่ 15 นาที โดยเมื่อนำมาแยกบนเจลแล้วให้แถบเอนไซม์คมชัดกว่าซึ่งสอดคล้องกับการทดลองโดยปุณฑริกา หะริณสุต (2534) ซึ่งใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ในการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์จากใบมะม่วง แต่แตกต่างกับพืชอื่น ๆ เช่น คัมควอท ซึ่งใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที (Rahman and Nito, 1994b) วอลนัท ใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที (Arulsekar, *et al.*, 1985) เป็นต้น เมื่อพิจารณารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของดูกู ลองกอง ลองกองจากนาทวีและสะเดา และลางสาด พบว่ามีความแตกต่างกันชัดเจน

1.2.2 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์

องค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ในการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของซึ่งใช้ tris-HCl อยู่ในช่วง 0.05-0.5 โมลาร์ pH อยู่ในช่วง 6.8-8.5 Na_2EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PVP เข้มข้น 2-10 เปอร์เซ็นต์ และ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (Shields *et al.*; 1983; Korban and Bourmival, 1987) จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดชนิดที่ 3 ซึ่งมีองค์ประกอบของ Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.5 PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้ผลดีกว่าบัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 และ 1 ซึ่งมี Tris-HCl เข้มข้น 0.25 โมลาร์ และ 0.1 โมลาร์ ร่วมด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยที่ตำแหน่ง zone 1 และ zone 2 บัฟเฟอร์ชนิดที่ 1 ให้แถบเป็นปื้นมากที่สุด บัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 ให้แถบชัดน้อยที่สุด ส่วนบัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 ให้แถบเป็นปื้นน้อยกว่าบัฟเฟอร์ชนิดที่ 1 แต่ให้แถบชัดกว่าบัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 ที่ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 บัฟเฟอร์ชนิดที่ 1 ให้แถบชัดที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเก็บสารสกัดเอนไซม์จากใบในตู้แช่แข็งเป็นระยะเวลาสั้นที่สุด เมื่อเก็บสกัดเอนไซม์จากใบเป็นเวลานานมากขึ้นมีผลให้เอนไซม์เสื่อมจึงให้ความชัดเจนของแถบลดลงดังเช่นในบัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 และ 3 แต่พบว่ายังสามารถจำแนกลองกอง ลางสาด และดูกูได้ชัดเจน โดยพบแถบที่แตกต่าง 2 แถบ ที่ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 และตำแหน่ง zone 2

1.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของเจล

ในการทดลองนี้ใช้เจลอะคริลาไมด์เข้มข้น 10-12 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับในรายงานซึ่งใช้อยู่ในช่วง 6-12 เปอร์เซ็นต์ (Shields, *et al.*, 1983) เจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมี 3 ตำแหน่ง คือตำแหน่ง zone 1 ตำแหน่ง zone 2 และตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 ทั้งในต้น 1.5 ปี และ 5 ปี แยกห่างกันกว่าเจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ แต่แถบมีความคมชัดน้อยกว่าเจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบที่ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 ชิดกับตำแหน่ง zone 2 มาก มีผลให้แถบของลองกองต้นที่ 1 และลางสาด ต้นอายุ 5 ปี ปรากฏไม่ชัดเจน ในขณะที่แถบนี้ของดูกูลองกองต้นที่ 2-6 ปรากฏชัดเจนกว่าในเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนดูกู และลองกองต้นที่ 1 อายุ 1.5 ปี ซึ่งมีแถบนี้ชัดเจนในเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ แต่ไม่ปรากฏแถบนี้ในเจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามในลางสาดทั้ง 2 ต้น ปรากฏแถบที่ตำแหน่งนี้ชัดเจน ดังนั้นการใช้เจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกความแตกต่างของลองกอง ลางสาด และดูกูได้ ผลการศึกษาขั้นต้นแตกต่างจากการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในหน่อไม้-ฝรั่งซึ่งใช้เจลเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (Colby and Peirce, 1988) และกล้วยซึ่งใช้เจลเข้มข้น 8.5 เปอร์เซ็นต์ (Jarret and Litz, 1986) แต่สอดคล้องกับการศึกษาเอนไซม์กูซีนอะมิโนเบปทิเดสในคาร์เนชั่น (Messeguer and Arus, 1985) และการศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสในทิวลิป (Booy, *et al.*, 1993) ซึ่งใช้เจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษานี้ พบว่าการใช้เจล 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบคมชัดกว่าแต่แถบชิดกัน ดังนั้นจึงควรใช้เวลาในการแยกเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 30 นาที หลังจากสีมาร์คเกอร์หลุดพ้นจากเจล

1.3 การศึกษาเอนไซม์ของต้นกล้าลองกองจากอำเภอนาทวี และอำเภอสะเดา

ในการตรวจสอบต้นกล้าลองกองโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของลองกองต้นเสียบยอดจากอำเภอนาทวี ในการศึกษาที่ 1.3.1 พบว่าลองกองเสียบยอด 4 ต้น มีแถบคล้ายกับลองกองอายุประมาณ 1.5 ปี ซึ่งใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ แสดงว่าต้นลองกองที่ตรวจสอบเป็นต้นลองกองที่แท้จริง แต่มีลองกองเสียบยอด 1 ต้น มีแถบระหว่าง zone 1 และ zone 2 คล้ายดูกู แต่มีแถบที่ตำแหน่ง zone 2 แตกต่างจากดูกู ซึ่งรูปแบบเอนไซม์เช่นนี้อาจเกิดจากอิทธิพลของต้นตอดูกูที่มีต่อยอดลองกอง ส่วนการตรวจสอบต้นกล้าลองกองเพาะเมล็ดจากสะเดาในการศึกษาที่ 1.3.2 ทั้ง 2 ครั้ง พบว่ามีแถบคล้ายต้นลองกองซึ่งใช้เปรียบเทียบ ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงสามารถใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการตรวจสอบต้นลองกองได้สอดคล้องกับการใช้เอนไซม์เป็นตัวตรวจสอบเพื่อจำแนกพันธุ์พืชหรือชนิดพืชดังได้กล่าวมาแล้ว เช่น การใช้เอนไซม์

คะตะเลสในการตรวจสอบพันธุ์ท้อ (Werner, 1990) การใช้เอนไซม์ 6 ระบบคือ มาเลทดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ชิกคิเมทดีไฮโดรจีเนส และไทรโอสฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ตรวจสอบพันธุ์ราสเบอรี่ (Cousineau and Donnelly, 1992) การใช้เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ไทรโอสฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ไดอะฟอเรส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทดีไฮโดรจีเนส และแอสปาเททอะมิโนทรานเฟอเรส ตรวจสอบพันธุ์แอปเปิ้ล (Weeden and Lamb, 1985) เป็นต้น นอกจากนี้อาจมีประโยชน์ต่อการศึกษาอิทธิพลของต้นตอดูกูที่มีต่อยอดลองกอง และการศึกษาความแปรปรวนของพืชเหล่านี้

2. การศึกษาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ด ยอดและตาข้างของต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู

ในการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการไมโครพรอพาเกชันนั้น ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จ คือ ชนิดของชิ้นส่วนพืช มีความสัมพันธ์กับอายุและการเจริญเติบโตของพืช อาหารใช้เลี้ยงที่เหมาะสม ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ไซโตไคนิน ออกซิน จิบเบอเรลลิน และสารอินทรีย์บางชนิด ได้แก่ น้ำมะพร้าว และผงถ่าน เป็นต้น รวมทั้งปริมาณน้ำตาล วุ้น ตลอดจนความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสม สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ และความเข้มแสง วิธีการและสภาพแวดล้อมในการย้ายปลูกและอนุบาลต้นกล้าที่เหมาะสม ปัจจัยประการสำคัญที่นอกเหนือจากนี้ คือ เทคนิคต่าง ๆ เช่น การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืช เพื่อให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อซึ่งขึ้นกับชนิด ความเข้มข้น ระยะเวลา และเทคนิคในการฟอกฆ่าเชื้อ ส่วนขั้นตอนที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะเวลาที่เหมาะสมและปลอดเชื้อซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเพื่อความสำเร็จของงานทางด้านนี้

ในการศึกษาการขยายพันธุ์ลองกอง ลางสาด และดูกู ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบไมโครพรอพาเกชันในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาจากชิ้นส่วนพืช 3 ชนิด คือ เมล็ด ยอดและตาข้าง

2.1 การชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดลองกอง

การเลี้ยงเมล็ดลองกองบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA เข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.7 ยอด และเมื่อความเข้มข้นของ BA สูงขึ้นมีผลให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง การทดลองนี้ต่างจากการทดลองโดย สธน เสนาสวัสดิ์ (2534) ซึ่งรายงานว่าการลี้ยงเมล็ดลองกองบนอาหารสูตรเดียวกัน คือ สูตรดัดแปลง MS เติม BA เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.36 ยอด แต่ผลการทดลองทั้งสองสอดคล้องในทำนองเดียวกัน คือ ในอาหารที่ปราศจาก BA ให้

จำนวนยอดเฉลี่ยต่ำสุด จำนวนยอดเฉลี่ยสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้น และเมื่อระดับความเข้มข้นของ BA สูงเกินระดับที่เหมาะสม มีผลยับยั้งการสร้างจำนวนยอด ดังนั้นจำนวนยอดเฉลี่ยจึงลดลง เมื่อพิจารณาถึงความยาวของยอด พบว่า ถ้าปราศจาก BA ยอดมีความยาวเฉลี่ยสูงสุด และยอดมีความยาวเฉลี่ยลดลงตามระดับความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA เข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ พบว่า BA เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 10.5 ยอด (สมปอง เตชะโต และวันทนา เอ้งย่อง, 2531) และการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดบนอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 30 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วย BA เข้มข้น 20 และ 50 ไมโครโมลาร์ พบว่า สามารถชักนำยอดเฉลี่ย 3 และ 6.8 ยอด และยอดมีความยาวเฉลี่ย 0.7 และ 0.46 เซนติเมตร ตามลำดับ (ธิดารัตน์ น้อยรักษา, 2533)

2.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างลองกอง ลางสาด และดูกู

2.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ และ BA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างดูกู

ในการเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างได้ทำการศึกษาอิทธิพลของ BA และ TDZ ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน ไซโตไคนินมีหลายอนุพันธ์ เช่น N^6-Substituted adenine ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ BA KN และ 2iP thidiazolyl urea เป็นอนุพันธุ์ของ thidiazuron (TDZ) ซึ่งอนุพันธุ์ยูเรียมีกิจกรรมของไซโตไคนินเช่นเดียวกัน (Nielsen, *et al.*, 1993)

การเลี้ยงยอดและตาข้างบนอาหารสูตร WPM เติม TDZ เข้มข้น 0.01-0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ยอดในอาหารสูตร WPM เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวสูงสุด ส่วนตาข้างที่เลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดมีความยาวสูงสุด จากการทดลองนี้พบว่า TDZ ให้ยอดจากยอดและตาข้างมีความยาวเฉลี่ยสูงกว่า BA แต่ TDZ มีผลให้ใบเกิด chlorosis โดยใบแก่และร่วงสูงกว่า BA และอาการ chlorosis ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ TDZ หรือ BA เพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับการทดลองใน *Miscanthus sinensis* (Nielsen, *et al.*, 1993) แต่มีรายงานว่า TDZ มีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ BA มีการใช้ TDZ แทน BA ในพืชที่เป็นไม้เนื้อแข็งหลายชนิด เช่น ในองุ่น พบว่า TDZ มีประสิทธิภาพชักนำยอดสูงกว่าการใช้ BA 2-100 เท่า (Gray and Klein, 1989 อ้างโดย Nielsen, *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ TDZ ในไม้เนื้อแข็งอีกหลายชนิด เช่น *Acer rubrum A. sacchrinum, Cereis canadensis, C. occidentalis, Fraxinus americana, Malus domestica, Populus* sp., *Pyrus communis, Quercus robur, Rhododendron* sp. และ *Theobroma cacao* เป็นต้น (Huetteman and Preece, 1993) ความ

เข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 1 นาโนโมลาร์ ถึง 10 ไมโครโมลาร์ ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดพืช ชิ้นส่วนพืช และวัตถุประสงค์ อย่างไรก็ตาม TDZ ความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำยอดรวมแต่ TDZ ความเข้มข้นสูงชักนำการสร้างแคลลัสในไม้ยืนต้น เช่น Black Wulnut และ Silver Maple และการใช้ TDZ ร่วมด้วยไซโตไคนินชนิดอื่น มีประสิทธิภา พดีกว่าการใช้ TDZ ตามลำพังในพืชหลายชนิด ในบางกรณีมีการเลี้ยง 2 ระยะ คือ ในระยะแรกเลี้ยงในอาหารเติม TDZ ซึ่งชักนำยอดหรือตาข้าง ในระยะที่สองเลี้ยงในอาหารเติม TDZ ลดลง หรือเติมไซโตไคนินชนิดอื่นเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของยอด แต่ในบางพืช TDZ มีผลกระทบต่อการชักนำราก ทำให้การชักนำรากช้าออกไป เช่น ในองุ่น TDZ ทำให้เกิดต้นอวบน้ำ (vitrification) (Huetteman and Preece, 1993) และชักนำให้เกิดเอทธิลีน (Kanakis and Demetriou, 1993)

2.2.2 การศึกษาอิทธิพลของ BA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างลองกองและลางสาด

การเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA เข้มข้น 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดทั้งในลองกองและลางสาด ความยาวยอดเฉลี่ยลดลงตามความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มขึ้น การใช้ BA เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้เนื้อเยื่อตายสูงสุด ผลที่ตามมาคือค่าความยาวเฉลี่ยของยอดลดลงมาก ค่า C. V. ที่คำนวณได้จึงสูง การทดลองนี้สอดคล้องกับการเลี้ยงใบมังคุดในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ยอดแคระแกร็น (Goh, *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลายยอดขนุนบนอาหารสูตร WPM ต้องใช้ BA เข้มข้นสูงถึง 18 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีรายงานว่าให้จำนวนยอดรวมมากที่สุด ส่วนการเลี้ยงตาข้างบนอาหารสูตรเดียวกัน เติม BA เข้มข้น 14 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด (ธวัชชัย วรรธนะวลัญช์, 2532) และผลจากการทดลองนี้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงปลายยอดขนุนในอาหารสูตร MS เติม BA หรือ KN เข้มข้น 4.5 และ 9.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำพังหรือใช้ร่วมกันให้ผลดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ เมื่อความเข้มข้น BA หรือ KN สูงกว่า 9.0-36.0 ไมโครโมลาร์ มีผลให้การแตกตาข้างลดลง และชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับเกาลัดจีน คือ เมื่อใช้ BA ความเข้มข้นต่ำชักนำการแตกตาข้างในขณะที่ความเข้มข้นสูงเกินระดับที่เหมาะสมมีผลชักนำการสร้างแคลลัสและยับยั้งการเกิดตาข้าง (Yang, *et al.*, 1986 อ้างโดย Amin and Jaiswal, 1993) ในเกาลัด (*Castanea mollissima*) พบว่า BA เข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ ชักนำการแตกตาข้าง แต่ที่ระดับความเข้มข้น 4.44 และ 44.4 ไมโครโมลาร์ ยับยั้งการสร้างตาและการยืดยาวของตา นอกจากนี้ยังชักนำให้เกิดแคลลัส และในการเลี้ยงยอดของ *C. sativa* Mill. พบว่า BA เป็นไซโตโคนินที่เหมาะสมที่สุด (Vieitez and Vieitez, 1980 อ้างโดย Qi-Quang, *et al.*, 1986) ในการเพาะเลี้ยง

มัลเบอรี่ (*Morus nigra*) พบว่า BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุด และ BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ (Yadav, *et al.*, 1990a)

จากผลการทดลองนี้พบว่ายอดลองกองและลางสาดให้ผลดีกว่าตาข้างสอดคล้องกับการเลี้ยงแอปเปิ้ล ซึ่งพบว่าปลายยอดเหมาะสมที่สุด (Barghchi and Alderson, 1982 อ้างโดย Yadav, *et al.*, 1990a) แต่ในมัลเบอรี่ พบว่า ปลายยอดมีการแตกยอดและยืดยาวน้อยกว่าตาข้างซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากสภาวะทางด้านสรีรวิทยาของตาจากลำต้นที่แตกต่างกัน (Vieitez, *et al.*, 1985 อ้างโดย Yadav, *et al.*, 1990a)

2.2.3 การศึกษาอิทธิพลของ BA ร่วมด้วย GA_3 ต่อการเจริญของยอดและตาข้างลางสาด

การเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม BA เข้มข้น 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยสูงขึ้นยกเว้นตาข้าง อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 4 มีผลให้จำนวนยอดลดลง สาเหตุเนื่องมาจากการตายของยอด ส่วนความยาวยอดเฉลี่ยลดลงเมื่อเติม BA เข้มข้นสูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ BA เข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ยอดจากตาข้างตาย ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงแครนเบอรี่ การเติม GA_3 ทำให้ยอดยืดยาว (Murashige, 1964 ; Nickell and Tulecka, 1959 อ้างโดย Macrotrigiano and McGlew, 1991) และการเติม GA_3 เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในการเพาะเลี้ยงบาร์เบอรี่มีผลให้ยอดจากตาข้างยาวกว่าการเติม GA_3 เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (Uno and Preece., 1987) ในการเพาะเลี้ยงข้อ *Phytolacea dodecandra* บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย GA_3 เข้มข้น 0.27 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.7 ยอด (Tigst and Harrison, 1990) การใช้ GA_3 มีผลส่งเสริมการแตกตาข้างเร็วขึ้น ยอดยืดยาวมีขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน และให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงขึ้น เนื่องจาก GA_3 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการยืดยาวของเซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์ ช่วยทำลายการพักตัวของตา เร่งให้มีการแตกตาข้างเร็วขึ้น (พีรเดช ทองอำไพ, 2537)

2.2.4 การศึกษาอิทธิพลของ NAA ต่อการเจริญของยอดและตาข้างดูกู

จากการเลี้ยงยอดและตาข้างดูกูบนอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมหรือไม่เติม NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย TDZ หรือ BA พบว่า การเติม NAA ไม่มีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ยและการแตกยอดใหม่แตกต่างทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการเติม NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดมีความยาวเฉลี่ยสูงกว่าเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงยูคาลิปตัส

ในอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย BA เข้มข้น 1.12 ไมโครโมลาร์ การเติม NAA ร่วมด้วย BA ทำให้ยอดจากปลายยอดแข็งแรงขึ้น (Sita, 1981 อ้างโดย Yadav, *et al.*, 1990 a) และการเลี้ยงตาข้างของต้นกล้ายูคาลิปตัสบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการชักนำยอดใหม่ (Le Roux and Van Staden, 1991) แต่มีรายงานว่าการเติมออกซินความเข้มข้นสูงลงในอาหารที่มี BA มีผลให้เกิดแคลลัสที่ฐานของยอด (Yadav, *et al.*, 1990a) การเลี้ยงยอดและตาข้างส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata*) พันธุ์ Cleopatra บนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้ (Pasqual and Audo, 1989 อ้างโดย Singh, *et al.*,1994)

2.3 การศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดและพัฒนายอดให้สมบูรณ์

การเลี้ยงยอดที่เจริญจากยอดและตาข้างบนอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วย TDZ เข้มข้น 0.025-0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า จำนวนยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วยให้จำนวนยอดสูงกว่าซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Al-Khayri, *et al.* (1992) ซึ่งรายงานว่าน้ำมะพร้าวช่วยในการชักนำยอดให้มีปริมาณมากขึ้น ขยายพันธุ์ได้เร็วขึ้น ยอดลองกอง ลางสาด และดูกูที่เลี้ยงในอาหารเติมน้ำมะพร้าวสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงขึ้น ใบมีสีเขียวเข้ม และสร้างรากได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพราะน้ำมะพร้าวมีฮอร์โมนไซโตไคนิน กรดอะมิโน วิตามิน และน้ำตาล (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2523) ช่วยในการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนยอด และสามารถชักนำรากได้สอดคล้องกับการชักนำต้นขนุนไพศาลทักษิณที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ออกรากในสภาพ *ex vitro* โดยการเลี้ยงยอดขนุนในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-4 สัปดาห์ ก่อนนำไปชำในวัสดุปลูก พบว่าให้ผลดีกว่าต้นที่นำไปชักนำรากโดยตรงโดยไม่มีการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว (มณฑา วงศ์มณีโรจน์ และคณะ, 2537)

2.4 การศึกษาการชักนำราก

การชักนำรากโดยการกรีดโคนต้นให้เป็นแผลยาว 0.5 เซนติเมตร จุ่มในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 15 นาที ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 2.5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการจุ่มในสารละลาย IBA สามารถชักนำรากได้ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การชักนำรากโดยการกรีดโคนต้นแล้วจุ่มแช่ในสารละลาย IBA ความ

เข้มข้นสูงในระยะเวลาอันสั้น ช่วยร่นระยะเวลากว่าการไม่กรีดโคนต้นและจุ่มแช่ในสารละลาย IBA ความเข้มข้นต่ำ โดย IBA ซึมเข้าไปสู่ต้นพืชทางรอยแผล ช่วยกระตุ้นในการเกิดรากได้ แต่ในพืชบางชนิดสามารถชักนำรากได้โดยไม่กรีดโคนต้น เช่น ยางพารา โดยการจุ่มยอดในสารละลาย IBA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (อรุณี ม่วงแก้วงาม, 2535) ส่วนในยูคาลิปตัส ทำการเลี้ยงยอดในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม IBA เข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ และ NAA เข้มข้น 5.3 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมผงถ่านปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารเหลวที่ปราศจากผงถ่านและสารควบคุมการเจริญเติบโต (Rao, 1988)

ส่วนการชักนำรากลองกองโดยการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 3-12 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ ผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีการจุ่มในสารละลาย IBA พบว่า IBA ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำรากจากกตาข้างและยอดประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ยอดที่ได้จากการเลี้ยงเมล็ดชักนำรากได้ประมาณ 12.5 เปอร์เซ็นต์ การชักนำรากขององุ่น *Vitis labrusca* พันธุ์ Delaware พบว่า การเติม NAA เข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยให้การชักนำรากดีกว่าการเติม IBA ตามลำพัง (Veronica, 1991) ในทำนองเดียวกับการชักนำรากกุหลาบในอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (Khosh-Khui and Sink, 1982) ซึ่งสอดคล้องกับการชักนำรากลองกองในอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 3-12 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ โดยไม่ต้องจุ่มแช่ยอดในสารละลาย IBA

นอกจากนี้การเติมผงถ่านทำให้รากเจริญได้รวดเร็วขึ้น ผงถ่านมีความสำคัญทำให้อยู่ในสภาพมืดป้องกันไม่ให้ออกซินสลายตัวเมื่อได้รับแสง ช่วยดูดซับสารพิษจากอาหารหรือเนื้อเยื่อพืชที่ปล่อยออกมาและช่วยรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างในอาหารให้คงที่ (Amin and Jaiwal, 1987 อ้างโดย Loh and Rao, 1989 ; Weatherheed, *et al.*, 1978 อ้างโดย Ebert, *et al.*, 1993) การเติมผงถ่านในอาหารสูตรชักนำราก ทำให้พืชหลายชนิดสามารถชักนำรากได้ดี เช่น มังคุด (สมปอง เตชะโต และวันทนา เอ้งย่อง, 2532 ; ธิดารัตน์ น้อยรักษา, 2533) ยางพารา (อรุณี ม่วงแก้วงาม, 2535) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พืชบางชนิดชักนำรากได้ดีในสภาพมืด เช่น อัลมอนด์ พลัม และเชอรี่ เป็นต้น (Nemeth, 1986)

บทที่ 5

สรุป

1. ในการจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู โดยใช้สารสกัดเอนไซม์จากใบ พบว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด เอนไซม์เอสเตอเรสให้ผลดีรองลงมา เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสแยกความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน และเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสไม่สามารถแยกความแตกต่างของลองกองและลางสาดได้

2. ในการจำแนกลองกอง ลางสาด และดูกู ต้นอายุ 4 -6 เดือน ต้นอายุประมาณ 1.5 ปี และต้นอายุประมาณ 5 ปี พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถแยกความแตกต่างของต้นอายุประมาณ 5 ปี ได้ชัดเจนที่สุด โดยที่ทุกอายุมีแถบหลักเหมือนกันที่ตำแหน่ง zone 1 ตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 และตำแหน่ง zone 2 และมีความแตกต่างชัดเจนมากขึ้นตามอายุของต้น

3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม ในการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที พบว่า เวลา 20 นาที ให้แถบชัดเจนกว่าการปั่นตกตะกอนที่ความเร็วเดียวกันเป็นเวลา 15 นาที

4. การสกัดเอนไซม์จากใบด้วยบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุด

5. การแยกสารสกัดเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบคมชัดที่สุด

6. เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส สามารถจำแนกความแตกต่างของพืชทั้งสามชนิดในต้นอายุ 1.5 ปี และ 5 ปี ได้ชัดเจน และต้นลองกองอายุ 1.5 ปี และ 5 ปีมีแถบคล้ายกัน และนอกจากนี้พบว่าต้นลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี และลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดามีแถบเหมือนกับต้นลองกองอายุ 1.5 ปี ซึ่งใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ

7. รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในต้นอายุ 1.5 ปี ดูกู และลองกองมีแถบ 6 แถบ ส่วนลางสาดมี 6-7 แถบ ดูกูและลองกองมีแถบแตกต่างที่ตำแหน่ง zone 2 และตำแหน่งระหว่าง

zone 1 และ zone 2 ส่วนลางสาดมีแถบแตกต่างเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง zone 1 ในต้นอายุ 5 ปี ดูกูและลองกองมีแถบ 6 แถบ ลางสาดมีแถบ 5-6 แถบ ลองกองและลางสาดมีแถบแตกต่างที่ตำแหน่ง zone 2 และตำแหน่งระหว่าง zone 1 และ zone 2 ส่วนดูกูมีแถบแตกต่างเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง zone 1

8. ในการตรวจสอบต้นกล้าลองกองเสียบยอดจากอำเภอนาทวี และต้นเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดาทั้งสองครั้ง พบว่าให้แถบคล้ายต้นลองกองซึ่งมีอายุประมาณ 1.5 ปี

9. การเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.7 ยอด

10. การเลี้ยงตาข้างและยอดลางสาดและลองกองในอาหารสูตร WPM หรือ MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด

11. การเลี้ยงตาข้างและยอดลางสาดในอาหารสูตร WPM หรือ MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยให้แตกตายอดและตาข้างได้เร็วขึ้นในช่วง 2 - 4 สัปดาห์

12. การเลี้ยงยอดดูกูที่พัฒนาจากยอดและตาข้างในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว ให้ต้นมีความสมบูรณ์และชักนำรากได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

13. การชักนำรากยอดลองกองโดยการกรีดโคนต้นและจุ่มแช่ในสารละลาย IBA เข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำรากได้ 40 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2523. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2531. เอนไซม์ในพืชกับการศึกษาและตรวจสอบพันธุ์. รายงานการฝึกอบรมทางวิชาการเรื่อง เทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกพันธุ์พืช. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 18-20 กรกฎาคม 2531. หน้า 14-17.

ชาย โฆรวิส และวรรณจันทร์ โฆรวิส. 2537. ลองกอง. ว. เกษตรก้าวหน้า 9 : 1-14.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด พันนีพับลิชชิง.

ธวัชชัย วรรธนะวลัญช์. 2532. การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์ขนุนในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชิดารัตน์ น้อยรักษา. 2533. การขยายพันธุ์มังคุดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ สุมน มาสุธน. 2531. การเกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในส้มโอ. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 21: 367-374.

ประพันธ์ อรรจนกุล. 2534. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของลองกอง (*Aglaia dookkoo* Griff.) ดูกู (*Aglaia dookkoo* Griff.) และลางสาด (*Aglaia domestica* Pelleg.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปุณฑริกา หะริณสุต. 2534. ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสในมะม่วงต่างสายพันธุ์. รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องชีวเคมีทางการเกษตร. ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ. 7-9 พฤษภาคม 2534. หน้า 107-109.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์แนวทางในการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กรุงเทพฯ.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531. คู่มือปฏิบัติการเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส. รายงานการฝึกอบรมทางวิชาการเรื่อง เทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกพันธุ์พืช ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 18-20 กรกฎาคม 2531. หน้า 45-72.

ภูวดล บุตรรัตน์. 2532. การศึกษาพัฒนาการของดอก ผล และเมล็ดลองกอง. รายงานผลการวิจัย สาขาพืช การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27. มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์. 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2532. หน้า 379-391.

มงคล ศรีวัฒนวรชัย, พิมพรรณ ตันสกุล และอธิจิตต์ ตะเวทีกุล. 2524. การศึกษาสภาวะการออกดอกติดผล และคุณภาพผลของลองกองบางพันธุ์ในภาคใต้. รายงานการวิจัย ภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มณฑา วงศ์มณีโรจน์, ศิริวรรณ บุรีคำ และอโนชา โลกร่วม. 2537. การชักนำต้นขนุนไพศาลทักษิณที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ออกรากในสภาพ *ex vitro*. รายงานการประชุมทางวิชาการ เรื่อง วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม เพื่อการพัฒนาชนบท ณ. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 21-23 ธันวาคม 2537, หน้า 48-49.

สธน เสนาสวัสดิ์. 2534. การขยายพันธุ์ลองกองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง. 2532. การขยายพันธุ์มังคุดจำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว.สงขลานครินทร์ 10 : 7-11.

สมปอง เตชะโต. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาตร์ คณะทรัพยากร-ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคใต้. 2537. ข้อมูลสภาพการปลูกไม้ผลไม้ยืนต้นในภาคใต้ประจำปี 2536. งานพืชสวน ฝ่ายส่งเสริมและพัฒนาการผลิต.สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคใต้.

เสาวณี สุริยาภณานนท์. 2538. การตรวจสอบสายพันธุ์มะขามโดยใช้ไอโซไซม์. ว. เคหการเกษตร 19 : 119-122.

อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะยางพาราพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอ และการทวีจำนวนต้นตอด้วยวิธีไมโครคัตติง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Al-khayri, J. M., Huang, F. H., Morelock, T. E. and Busharar, T. A. 1992. Spinach tissue culture improved with coconut water. HortScience 27 : 357-358.

Amin, M. N. and Jaiswal, V. S. 1993. *In vitro* response of apical bud from mature trees of jackfruit (*Arthocarpus heterophyllus*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 59-65.

Anderson, C. M., William, S.C. and Moore, G. A. 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swing Citrumelo *Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata* and field populations. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 : 322-326.

Arulsekar, S., Parfitt, D. E. and McGranahan, G. H. 1985. Isozyme gene markers in *Juglans* species. The Journal of Heredity 76 : 103-106.

Arulsekar, S., Parfitt, D. E., Beres, W. and Hansche, P. E. 1986a. Genetic of malate dehydrogenase isozymes in the peach. The Journal of Heredity 77 : 49-51.

Arulsekar, S., Parfitt, D. E. and Kester, D. E. 1986b. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. The Journal of Heredity 77 : 272-274.

Arulsekar, S., McGranahan, G. H. and Parfitt, D. E. 1986c. Inheritance of phosphoglucomutase and esterase isozymes in Persian walnut. The Journal of Heredity 77 : 220-221.

Ault, J. R. 1994. *In vitro* propagation of *Eriostemon myoporoides* and *Eriostemon* 'Stardust' HortScience 29 : 686-688.

Baaziz, M., Aissam, F., Brakez, Z., Bendiab, K., El Hadrami, I. and Cheikh, R. 1994. Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. Euphytica 76 : 159-168.

Bailey, D.C. 1983. Isozymic variation and plant breeder rights. *In* Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. (eds. S. D. Tankley and T. J. Orton). pp. 425-441. Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

Booy, G., Donkers-Venne, R. D. and Wilson, H. D. 1993. Identification of tulip cultivars based on polymorphism in esteraes isozymes from bulb scales. Euphytica 69 : 167-176.

Brown, A. H. D., Nevo, E., Zohany, D. and Dagan, O. 1978. Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). Genetics 49 : 97-108.

Byrne, D. H. 1989. Inheritance of five isozyme loci in apricot. HortScience 24 : 1015-1016.

Byrne, D. H. 1990. Isozyme variability in four diploid fruits compared with other woody perrennial plants. The Journal of Heredity 81 : 68-71.

Byrne, D. H. and Littleton, T. G. 1989a. Interspceific hybrid verification of plum X apricot hybrids via isozyme analysis. HortScience 24 : 132-134.

Byrne, D. H. and Littleton, G. T. 1989b. Characterization of isozyme variability in apricots. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114 : 674-678.

Chaparro, J. M., Goldy, R. G., Mowrey, B. D. and Werner, D. J. 1989. Identification of *Vitis vinifera* L. X *Muscadine rotundifolia* small hybrids by starch gel electrophoresis. HortScience 24 : 128-130.

Colby, L.W. and Peirce, L.C. 1988. Using an isozyme marker to identify double haploids from anther culture of asparagus. HortScience 23 : 761-763.

Cousineau, J. C. and Donnelly, D. J. 1992. Use of isozyme analysis to characterize rasberry cultivars and detect cultivar mislabeling. HortScience 27 : 1023-1025.

Cousineau, J. C., Anderson, A. K. and Daubeny, H. A. 1993. Characterization of red raspberry cultivars and selections using isoenzyme analysis. HortScience 28 : 1185-1186.

Crawford, D. J. 1983. Phylogenetic and systematic interferences from electrophoretic studies. *In* Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. (eds. S. D. Tankley and T. J. Orton). p. 418. Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

Degani, C. and El-Batsri, R. 1990. Enzyme polymorphism in mango. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 844-847.

Degani, C., Cohen, M. El-Batsri, R. and Gazit, S. 1992. PGI isozyme diversity and its genetic control in mango. HortScience 27 : 252-254.

Demeke, T. and Hughes, H. G. 1990. Micropropagation of *Phytolacca dodecandra* through shoot-tip and nodal cultures. Plant Cell Reports 9 : 390-392.

Doehlert, D.C. and Duke, S.H. 1983. Specific determination of α-amylase activity in crude plant extracts containing α-amylase. Journal of Plant Physiology 71: 229-284.

Ebert, A., Taylor, F. and Blake, J. 1993. Change of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid concentration in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 157-162.

Edson, J. L., Wenny, D. L. and Leege-Brusven, A. 1994. Micropropagation of pacific dogwood. HortScience 29 : 1355-1356.

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

Goldy, R. G., Ramming, D. W. Emershad, R. L. and Chaparro, J. X. 1989. Increasing production of *Vitis vinifera* X *V. rotundifolia* hybrids through embryo rescue. HortScience 24 : 820-822.

Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Louzada, E. S. and Chandler, J. L. 1992. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. HortScience 27 : 1125-1127.

Hame, B. D. and Rickwood, D. 1981. Gel electrophoresis of protein. Oxford : IRI. Press.

Hancock, A. M. and Iezzoni, A. F. 1988. Malate dehydrogenase isozyme pattern in seven *Prunus* species. HortScience 23 : 381-383.

Harris, R. A. and Mantell, S. H. 1991. Effects of stage II subculture durations on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of paeony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). Journal of Horticultural Science 66 : 95-102.

Huetteman, C. A. and Preece, J. E. 1993. Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 105-109.

Ibanez, M. A., Di Renzo, M. A. and Poverene, M. M. 1993. Isozyme diversity among and within peach groups: freestone, clingstone and nectarines. Scientia Horticulturae 53 : 281-288.

Jarret, R. L. and Litz, R. E. 1986. Enzyme polymorphism in *Musa acuminata* Colla. The Journal of Heredity 77 : 183-188.

Kanakis, A. G. and Demetriou, K.. 1993. *In vitro* shoot regeneration of globe artichoke from shoot apices with thidiazuron and from mature zygotic embryos treated with cytokinins. Journal of Horticultural Science 68 : 439-445.

Khosh-Khui, M. and Sink, K. C. 1982. Rooting enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. Scientia Horticulturae 17 : 371-375.

Kloth, R. H. 1992. Variability of malate dehydrogenase among cotton cultivars with differing fiber traits. Crop Science 32 : 617-621.

Korban, S. S. and Bournival, B. L. 1987. Catalase, esterase and peroxidase enzymes in seeds and leaves of *Malus domestica* Borkh. Scientia Horticulturae 32 : 213-219.

Le Roux, J. J. and Van Staden, J. 1991. Micropropagation of *Eucalyptus* species. HortScience 26 : 199-200.

Lee, M. L., Ryu, Y. J., Chung, T. V. and Park, Y. H. 1993. Identification of *Citrus* spp. in cheju using isozymes, RFLP and RAPD markers. RNA Journal of Agriculture Science, Biotechnology 35: 193-197.

Lewandowski, V. T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* 'Delaware'. HortScience 26 : 586-589.

Loh, C.S. and Rao, A. N. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedling and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Scientia Horticulturae 39 : 31-39.

Marcotrigiano, M. and McGlew, S. P. 1991. A two-stage micropropagation system for cranberries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 : 911-916.

Markert, C. L. and Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic and species specific. Proc. Nat. Acad. Sci. 45 : 753-763.

Mathur, J. and Mukunthakumar, S. 1992. Micropropagation of *Bauhinia variegata* and *Parkinsonia aculeata* from nodal explants of mature trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28 : 119-121.

Menendez, R. A., Larsen, F. E. and Fritts, R. Jr. 1986. Identificatin of apple rootstock cultivars by isozymes analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111 : 933-937.

Messeguer, R. and Arus, P. 1985. Electrophoretic identification of carnation cultivars. HortScience 20 : 372-373.

Moore, G. A. and Castle, W. S. 1988. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated citrus rootstock populations. The Journal of Heredity 79 : 59-63.

Mowrey, B. D. and Werner, D. J. 1990. Inheritance of isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and shikimate dehydrogenase in peach and peach x almond hybrids. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 312-319.

Mowrey, B. D., Werner, D. J. and Byrne, D. H. 1990. Isozyme survey of various species of *Prunus* in the subgenus *Amygdalus*. Scientia Horticulturae 44 : 251-560.

Nemeth, G. 1986. Induction of rooting. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 1 : Trees 1. (ed. Y. P. S., Bajaj) pp. 46-64. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag.

Niedz, R. P., Bausher, M. G. and Hearn, C. J. 1992. Use of stored pollen to hybridize a mandarin hybrid and *Citrus tachibana*. HortScience 27 : 43-44.

Nielsen, J. M., Brandt, K. and Hansen, J. 1993. Long-term effects of thidiazuron are intermediate between benzyladenine, kinetin or isopentenyladenine in *Miscanthus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35 : 173-179.

Ollitrault, P. 1990. Isozymes and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP's) as genetic markers in citrus selection. Proceeding of the 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation Chiang Mai, Thailand. 4-10th Feb. 1990. 57-68.

Perez-Parron, M. A., Gonzalez-Bentio, M. E. and Perez, C. 1994. Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37 : 297-302.

Qi-Quang, Y., Read, P. E., Fellman, C. D. and Hosier, M. A. 1986. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on chinese chestnut cultured *in vitro*. HortScience 21 : 133- 134.

Rahman, M. A. 1988. Effects of nutrient on the growth and survival of *in vitro Artocarpus heterophyllus* Lam. plantlets after transfer to *ex vitro* condition in the glasshouse. Journal of Horticultural Science 63 : 329-335.

Rahman, M. A. and Blake, J. 1988a. Factors affecting *in vitro* proliferation and rooting of shoots of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13 : 179-187.

Rahman, M. A. and Blake, J. 1988b. The effects of medium composition on *in vitro* rooting and *ex vitro* establishment of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13 : 189-200.

Rahman, M. M. and Nito, N. 1994a. Use of glutamate-oxaloacetate transaminase isozymes for detection of hybrids among genera of the 'true citrus fruit trees'. Scientia Horticulturae 58 : 197-206.

Rahman, M. M. and Nito, N. 1994b. Phylogenetic relationships in the kumquat (*Fortunella*) as revealed by isozyme analysis. Scientia Horticulturae 57 : 17-28.

Rahman, S. M., Hossain, M., Biswas, B. K., Joarder, O. I. and Islam, R.. 1993. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of mature tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32 : 363-365.

Rao, K. S. 1988. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Plant Cell Reports. 7 : 546-549.

Rao, N. K. S., Narayanswamy, S. Chacko, E. K. and Doreswamy, R. 1981. Tissue culture of jackfruit tree. Current Sci. 50 : 310-312.

Roubelakis-Angelakis, K. A. and Zivanovitc, S. B. 1991. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. HortScience 26 : 1551-1553.

Roy, S. K., Rahman, S. L. and Majumdar, R. 1990. *In vitro* propagation of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). J. Hort. Sci. 65 : 355-358.

Samimy, C. and Cummins, J. N. 1992. Distinguishing apple rootstocks by isozyme banding patterns. HortScience 27 : 829-831.

Scandalious, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of isozyme in plants. Biochemical Genetics 3 : 37-79.

Schnell, R. J., Robert, J. and Knight, R. J. 1992. Frequency of zygotic seedlings from five polyembryonic mango rootstocks. HortScience 27 : 174-176.

Schnell, R. J., Knight, R. J. and Harkins, D. M. 1994. Eliminating zygotic seedling in 'Turpentine' mango rootstock populations by visual roguing. HortScience 29 : 319-320.

Shields, C. R., Orton, T. J. and Stuber, C. W. 1983. An culture of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. *In* Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. (eds. S. D. Tanksley and T. J. Orton). pp. 443-468. Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

Singh, S., Ray, B. K., Bhattacharyya, S. and Deka, P. C. 1994. *In vitro* propagation of *Citrus reticulata* Blanco. and *Citrus limon* Burmf. HortScienec 29 : 214-216.

Sodarsono and Goldy, R.G. 1991. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. HortScience 26 : 304-307.

Solar, A. Smole, J., Stampar, F. and Virscek-Marn, M. 1994. Characterization of isozyme variation in walnut (*Juglans regia* L.). Euphytica 77 : 105-112.

Subbaiah, M. M. and Minocha, S. C. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Reports 9 : 370 373.

Tanksley, S. D. 1979. Linkage, chromosome association, and expression of Adh-1 and Pgm-2 in tomato. Biochemical Genetics 17 : 1159-1167.

Thom, M. and Maretzki, A. 1970. Peroxidase and esterase isozyme in Hawaiian sugarcane. Hawaiian Planter's Record 58 : 81-84.

Tigst, D. and Harrison, G. H. 1990. Micropropagation of *Phytolacca dodecandra* through shoot-tip and nodal cultures. Plant Cell Reports 9 : 390-392.

Torres, A. M., and Bergh, B. O. 1980. Fruit and leaf isozymes as genetic markers in avocado. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 : 614-619.

Torres, A. M. 1983. Fruit tree. *In* Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B. (eds. S. D. Tankley and T. J. Orton). pp. 412-428. Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

Torres, A. M. 1984. Isozymes from avocado cotyledons. The Journal of Heredity 75 : 300-302.

Uno, S. and Preece, J. E. 1987. Micro-and cutting propagation of 'Crimson Pygmy' barberry. HortScience 22 : 488-491.

Veronica, T. L. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* 'Delaware'. HortScience 17 : 333-341.

Vieitez, A. M., Sanchez, M. C., Amo-Marco, J. B. and Ballester, A. 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37 : 287-295.

Vithanage, V. and Winks, C. W. 1992. Isozymes as genetic markers for *Macadamia*. Scientia Horticulturae 49 : 103-115.

Weeden, N. F. and Lamb, R. C. 1985. Identification of apple cultivars by isozymes phenotype. J. Amer. Soc. Hort. 110 : 509-515.

Werner, D. W. 1992. Catalase polymorphism and inheritance in peach. HortScience 27 : 41-43.

Yadav, U., Lai, M. and Jaiswal, V. S. 1990a. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. Journal of Horticultural Science 44 : 61-67.

Yadav, U., Lai, M. and Jaiswal, V. S. 1990b. *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Syzygium cuminii*. L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21 : 87-92.

Yan-Xiu, Z., Dun-Yi, Y. and Harris, P. J. C. 1993. Plant regeneration from callus and explants of *Sesbania* spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 253-260.

Zhang, B., Stoltz, L. P. and Snyder, J. C. 1987. *In vitro* propagation of *Euphorbia fulgens*. HortScience 22 : 486-488.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 1 แสดงส่วนประกอบของเจลเพื่อใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับแยกไอโซไซม์ ตามสูตรดัดแปลงของ Hames และ Rickwood (1981)

Stock solution	Stacking gel	Resolving gel (%)			
	3.7 (%)	7	10	12	
H_2O	2.35	5.7	4.6	3.8	ml
30% acrylamide + 0.8% bisacrylamide	0.46	2.63	3.75	4.5	ml
1.5 M tris-HCl pH 8.8	-	2.81	2.81	2.81	ml
0.5 M tris-HCl pH 6.8	0.94	-	-	-	
TEMED	3.8	3.75	3.75	3.75	ul
10% ammonium-peroxydisulfate	0.05	112.5	112.5	112.5	ul

สีย้อมที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์

1. สีย้อมแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (E.C. 1.1.1.1) (Tanksley, 1979)

<u>สารเคมี</u>	1. 0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
	2. β-nicotinamide adenine dinuclotide monohydrate (NAD^{+})	30	มิลลิกรัม
	3. methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT)	20	มิลลิกรัม
	4. N-methyl-phenazonium methyl sulfate (PMS)	4	มิลลิกรัม
	5. ethanol	6	มิลลิลิตร

<u>วิธีการ</u> ละลายสารในข้อ 2-5 ในสารละลายข้อ 1 ย้อมสีเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15-60 นาที

2. สีย้อมแอซิดฟอสฟาเทส (E.C. 3.1.3.2) (Scandalious, 1969 ดัดแปลงโดย Tanksley (person comunication)

สารเคมี	1. 50 mM Na acetate pH 5.5	100	มิลลิลิตร
	2. 1 M magnesium chloride ($MgCl_2.6H_2O$)	1	มิลลิลิตร
	3. fast black K salt หรือ fast garnet GBC salt	100	มิลลิกรัม
	4. 1% α- napthyl acid phosphate (in 50% acetone)	3	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3 ในสารสารละลายข้อ 1 แล้วเติม สารละลายในข้อ 2 และ 4 ย้อมสีเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 1-5 ชั่วโมง

3. สีย้อมเอสเตอเรส (E.C. 3.1.1.2) (Thom and Maretzki, 1970)

สารเคมี	1. 0.1 M phosphate buffer pH 6.0	100	มิลลิลิตร
	2. fast blue B Salt	150	มิลลิกรัม
	3. 1% α- napthyl acetate in absolute alcohol	3	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3 ในสารละลายข้อ 1 ให้เข้ากันแล้วกรองในที่มืดก่อนย้อม 30 นาที และเติมสารละลายในข้อ 3 ในทันทีที่ย้อมเจล ย้อมนานจนเจลติดสีชัดเจน

4. สีย้อมมาเลทดีไฮโดรจีเนส (E.C. 1.1.1.37) (Brown, *et al.*, 1978)

สารเคมี	1. 0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
	2. 1 M DL-malate pH 7.5	3	มิลลิลิตร
	3. NAD^+	30	มิลลิกรัม
	4. MTT	20	มิลลิกรัม
	5. PMS	4	มิลลิกรัม

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3-5 ในสารละลายข้อ 1 และเติมสารละลายในข้อ 2 ซึ่งเตรียมเก็บไว้ในตู้แช่แข็งในทันทีที่ย้อม ย้อมเจลในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 15-60 นาที

หมายเหตุ สารละลายในข้อ 2 ไม่ควรเตรียมและเก็บไว้นาน

5. สีย้อมเปอร์ออกซิเดส (E.C. 1.11.1.7) (Thom and Maretzki, 1970)

สารเคมี Stock A

1. 3-amino-9-ethylcarbazole	420	มิลลิกรัม
2. β-napthol	290	มิลลิกรัม
3. acetone	200	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 1 และ 2 ใน acetone ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ในขวดสีชา

สารเคมี Stock B (0.0125 M Tris-acetate buffer, pH 4.0)

1. tris-HCl	1.5	กรัม
2. acetic acid	1.7	มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	1	ลิตร

สารเคมี Stock C (3 % hydrogen peroxide (H_2O_2)

1. 30% H_2O_2	0.1	มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น	0.9	มิลลิลิตร

วิธีการ ใช้ Stock A:B:C เท่ากับ 20:80:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนย้อมเจล ย้อมเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 30-60 นาที

6. สีย้อมฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส (E.C.2.7.5.1) (Tanksley, 1979)

สารเคมี 1. 0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
2. 1 M $MgCl_2.6H_2O$	1	มิลลิลิตร
3. fructose-6-P(Na)	80	มิลลิกรัม
4. β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$)	20	มิลลิกรัม
5. MTT	20	มิลลิกรัม
6. PMS	4	มิลลิกรัม
7. glucose-6-phosphate dehydrogenase (glucose-6-P DH)	20	ยูนิต

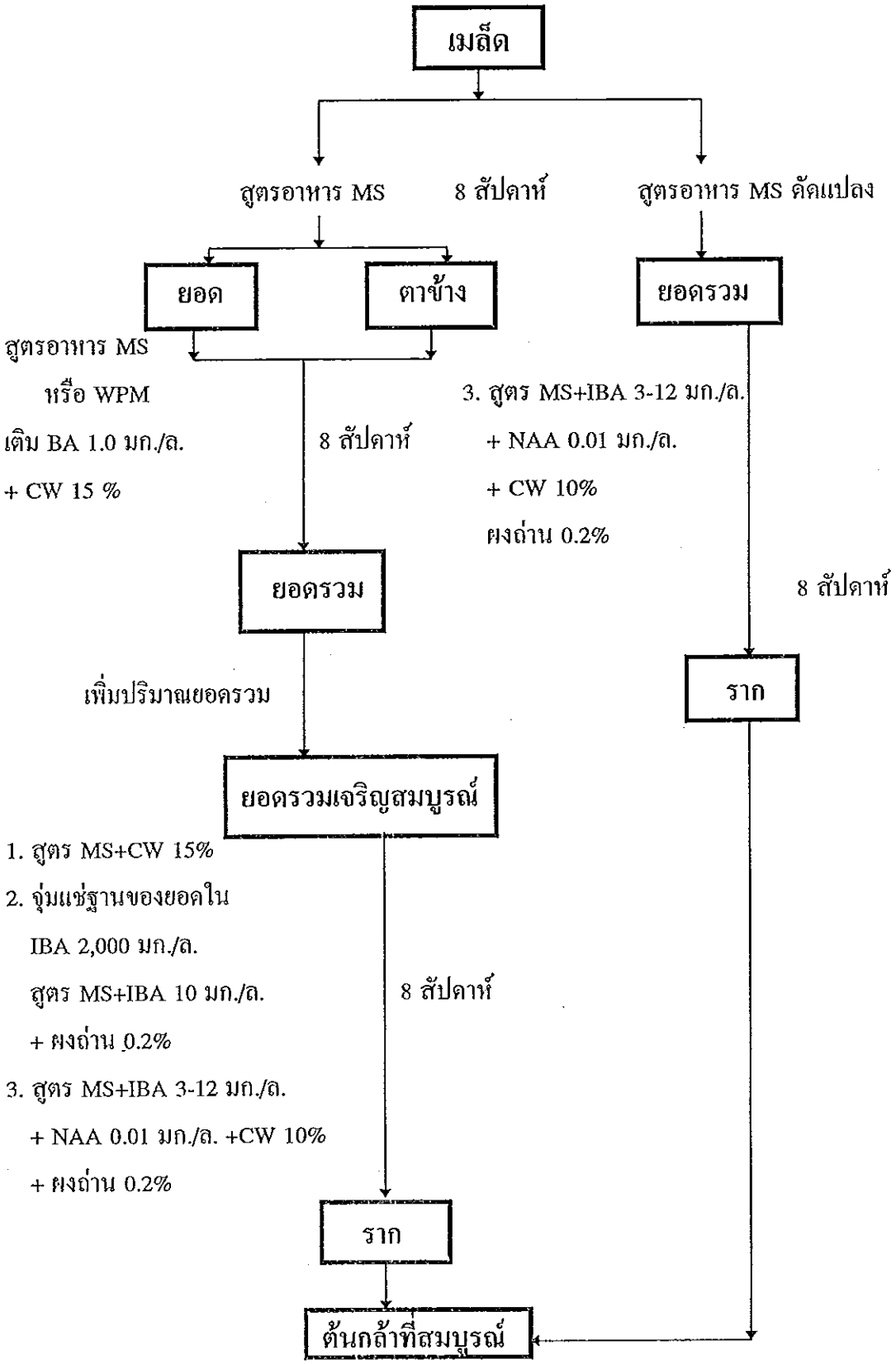
วิธีการ ละลายสารในข้อ 3-6 ในสารละลายข้อ 1 เติมสารละลายในข้อ 2 และ 7 ก่อนย้อมเจล ย้อมเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30-60 นาที

7. สีย้อมฟอสโฟกลูโคมิวเทส (E.C.2.7.5.1) (Tanksley, 1979)

สารเคมี	1. 0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
	2. 1 M $MgCl_2.6H_2O$	1	มิลลิลิตร
	3. α D-glucose-1- phosphate (glucose-1-P)	150	มิลลิกรัม
	4. $NADP^+$	15	มิลลิกรัม
	5. MTT	20	มิลลิกรัม
	6. PMS	4	มิลลิกรัม
	7. glucose-6-P DH	40	ยูนิต

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3-6 ในสารละลายข้อ 1 เติมสารละลายในข้อ 2 และ 7 ก่อนย้อมเจล ย้อมเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30-60 นาที

ภาคผนวกที่ 2



ภาพภาคผนวกที่ 1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเมล็ด ยอดและตาข้างของพืชสกุล *Lansium*

ตารางภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$MnSO_4.1H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
$FeSO_4.7H_2O$	28.70
Na_2EDTA	37.30
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
pH	5.8

ตารางภาคผนวกที่ 3 องค์ประกอบของสูตรอาหารดัดแปลง Murashige and Skoog

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	12.40
KI	1.70
$MnSO_4.1H_2O$	33.80
$ZnSO_4.7H_2O$	21.00
$CuSO_4.5H_2O$	0.05
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.05
$CoCl_2.6H_2O$	0.05
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
$FeSO_4.7H_2O$	13.90
Na_2EDTA	18.60
Myo-inositol	500.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	5.00
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
pH	5.8

ตารางภาคผนวกที่ 4 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Woody Plant medium

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	400.00
$Ca(NO_3)_2$	556.00
$CaCl_2.2H_2O$	96.00
KH_2PO_4	170.00
K_2SO_4	990.00
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
H_3BO_3	6.20
$CuSO_4.5H_2O$	6.25
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	1.00
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
pH	5.8

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววันทนา นวรังสรรค์

วัน เดือน ปี เกิด 20 พฤษภาคม 2506

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2529

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ทุนสนับสนุนจากโครงการทุนบัณฑิตศึกษาในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีการศึกษา 2537