การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า *Thalassia hemprichii*

Tissue culture of the seagrass *Thalassia hemprichii*

สุรินทร บุญรอด [1*] สมภพ ยี่สุ่น [2] และสุภาวดี กลับใหม่ [3]

Surinthon Bonrod [1*], Sompop Yeesun [2] and Supawadee Klabmai [3]

[1] สถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง, จังหวัดตรัง, 92150

[2] สถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง, จังหวัดตรัง, 92150

[3] สถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง, จังหวัดตรัง, 92150

[1] Natural Resources and Environment Institute Rajamangala University of Technology Srivijaya Trang Campus, Trang Province, 92150

[2] Natural Resources and Environment Institute Rajamangala University of Technology Srivijaya Trang Campus, Trang Province, 92150

[3] Natural Resources and Environment Institute Rajamangala University of Technology Srivijaya Trang Campus, Trang Province, 92150

*Corresponding author : Email : Surinthon12529@hotmail.com, Tel : 088-7544490

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า *Thalassia hemprichii*

Tissue culture of the seagrass *Thalassia hemprichii*

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า *Thalassia hemprichii* ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ โคนใบและลำต้นใต้ดินของหญ้าทะเล จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ในสูตรที่ 1-4 เป็นการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ที่ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5, 10, 15 และ 20 นาที และสูตรที่ 5-7 เป็นการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ครั้งที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และครั้งที่ 2 ที่ระดับความเข้มข้น 4, 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาที พบว่าวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือวิธีที่ 3 คือการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที มีการรอดชีวิตชิ้นส่วนใบ 8.00±0.41 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนโคนใบ 7.00±0.44 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนลำต้นใต้ดิน 6.33±0.50 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) บนสูตรอาหารอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม BA (6-Benzyl aminopurine) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA (Naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตชิ้นส่วนของใบ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของ BA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.23±0.40 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตชิ้นส่วนของโคนใบ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของ BA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.24±0.31 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตชิ้นส่วนของลำต้นใต้ดิน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของ BA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.26±0.33 เปอร์เซ็นต์ และมีการเจริญเป็นต้นใหม่จำนวน 1 ต้น

คำสำคัญ : หญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*), การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, การฟอกฆ่าเชื้อ, สารควบคุมการเจริญเติบโต

Tissue culture of the seagrass *Thalassia hemprichii*

Abstarct

Study on tissue culture of turtle sesame *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascherson. From the study of bleaching and sterilizing, In formulas 1-4, high-tech washing at level 20, cost-effective 5,10,15 and 20 minutes, and formula 5-7, high-tech washing at level 1, at level Intensive 8, 10 and 12 percent, peer 10 minutes, and Level 2 at levels 4, 5 and 6, peer 15 minutes. found that bleaching and sterilization the most suitable method was method 3, which was sterilized with 20 percent haiter for 15 min. Survival was from leaf parts 8.00±0.41 percent, leaf base parts with 7.00±0.44 percent and survival and stem fragments with survival 6.33±0.50 percent It was found that bleaching with haiter at 20 percent concentration for 15 minutes was the most effective method. is having the lowest microbial contamination and from the study of growth regulators that are suitable for tissue development of turtle leaches *(Thalassia hemprichii)* (Ehrenberg) Ascherson at various concentrations of BA (6-Benzyl aminopurine) at concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg/l and NAA (Naphthalene acetic acid) concentration levels 0 0.5 1.0 2.0 and 3.0 mg/l Within 2 months, the percentage of leaf fragment survival At various concentrations of BA at a concentration of 2.0 mg/l and NAA at a concentration of 2.0 mg/l, 0.23±0.40 percent percent survival of leaf base parts. at various concentrations of BA at a concentration of 2.0 mg/l. and NAA at concentrations of 2.0 mg/l, 0.24±0.31percent and percentage survival of underground stem fragments. at various concentrations of BA at a concentration of 2.0 mg/l and NAA at a concentration of 2.0 mg/l at 0.26±0.33 percent and a growth of 1 new plant.

Keyword : *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascheron, Tissue Culture,Sterilization, Growth regulator

บทนำ (Introduction)

ประเทศไทยมีการแพร่กระจายของหญ้าทะเลตลอดแนวชายฝั่ง เนื่องจากหญ้าทะเลสามารถเติบโตได้ดีในบริเวณชายฝั่งน้ำตื้น เช่น แหล่งน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำ ชายฝั่งน้ำตื้นที่มีพื้นทรายหรือทรายปนโคลน หรือขึ้นปะปนกับแนวปะการัง โดยพื้นที่การแพร่กระจายของหญ้าทะเลสามารถเคลื่อนย้ายไปมาได้ตลอด เนื่องจากหญ้าทะเลสามารถแพร่พันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ดังนั้นพื้นที่ที่เคยรายงานการพบหญ้าทะเล จึงถือเป็นพื้นที่ที่มีศักยภาพที่หญ้าทะเลสามารถเจริญเติบโตได้ หญ้าทะเลพบตามชายฝั่งทะเลในพื้นที่ 19 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และสตูล ไม่พบหญ้าทะเลในบริเวณพื้นที่อ่าวไทย เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโต แหล่งหญ้าทะเลผืนใหญ่ที่สุดในประเทศไทย คือ บริเวณเกาะลิบง จังหวัดตรัง และมีแหล่งหญ้าทะเลที่สำคัญในฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามันหลายพื้นที่ เช่น อ่าวทุ่งคา-สวี จังหวัดชุมพร อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี เกาะลิบง จังหวัดตรัง เกาะศรีบอยา-เกาะปู จังหวัดกระบี่ เกาะพระทองและพื้นที่ใกล้เคียง จังหวัดพังงา และบ้านป่าคลอก จังหวัดภูเก็ต ใน พ.ศ. 2561 พบว่ามีพื้นที่แหล่งหญ้าทะเล รวมทั้งหมด 98,912 ไร่ ลดลงจาก พ.ศ. 2560 ที่มีอยู่รวม 100,236 ไร่ และพบแหล่งหญ้าทะเลในพื้นที่ใหม่บริเวณเกาะช้าง จังหวัดระนอง และเกาะรังใหญ่ จังหวัดภูเก็ต (กองการจัดการความหลากหลายทางชีวภาพ, 2566)

หญ้าทะเลถือเป็นทรัพยากรที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นระบบนิเวศที่มีความสำคัญมาก ในปัจจุบันแหล่งหญ้าทะเล เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารอันอุดมสมบูรณ์ของสัตว์ทะเลและสัตว์น้ำเศรษฐกิจ อันได้แก่ กุ้ง หอย ปู และปลา หญ้าทะเลยังเป็นอาหารสำคัญของพะยูนและเต่าทะเล เป็นแหล่งวางไข่ แหล่งอนุบาลตัวอ่อน และที่อยู่อาศัยของปลา กุ้ง หมึก ปูม้า หอยชนิดต่างๆ ไส้เดือนทะเล ตลอดจนสัตว์เล็กๆ นานาชนิด และเป็นแหล่งอาหาร แหล่งทำมาหากินที่สำคัญของชุมชนชายฝั่งทะเล แหล่งหญ้าทะเลเป็นระบบนิเวศแรกที่รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงต่างๆ บนแผ่นดินทั้งที่เกิดจากมนุษย์และเกิดตามธรรมชาติ ชุมชนส่วนใหญ่จะตั้งบ้านเรือนอยู่ใกล้ชายฝั่งทะเล การพัฒนาด้านเกษตรกรรมต่างๆ ทั้งเพาะปลูก และเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กุ้งทะเล ล้วนมีผลกระทบต่อพื้นที่หญ้าทะเลทั้งสิ้น แหล่งหญ้าทะเลและป่าชายเลนจึงเสมือนเป็นประตูกั้นระหว่างกิจกรรมต่างๆ บนฝั่งกับทะเล ซึ่งรวมถึงแนวปะการังด้วย (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2552) จึงทำให้ต้องมีการขยายพันธุ์ให้มากขึ้นโดยการเพาะขยายพันธุ์แบบการเพาะเมล็ด อีกทั้งยังมีวิธีในการเพิ่มปริมาณให้มากยิ่งขึ้น โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่ง ด้วยการนำชิ้นส่วนของพืชที่ยังมีชีวิต เช่น ลำต้น ยอด ตาข้าง ก้านช่อดอก ใบ ก้านใบ อับละอองเกสร เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ และชิ้นส่วนนั้นสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ มีทั้งส่วนใบ ลำต้น และรากที่สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ สามารถผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว ต้นพืชที่ผลิตได้จะปลอดโรค ต้นพืชที่ผลิตได้จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ คือ มีลักษณะตรงตามพันธุ์ ด้วยการใช้เทคนิคของการเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด เพื่อพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยตรง ต้นพืชที่ผลิตได้จะมีขนาดสม่ำเสมอ และมีอัตราการเพิ่มปริมาณที่มากขึ้น จึงได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า โดยศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำชิ้นส่วนใบ โคนใบและ ลำต้นใต้ดิน มาศึกษาเทคนิคในการฟอกฆ่าเชื้อที่มีความเหมาะสมต่อชิ้นเนื้อเยื่อหญ้าทะเล และศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มี

ความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อหญ้าทะเล ทั้งนี้การวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาเชิงรุกที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเพิ่มจำนวนหญ้าทะเลให้มีปริมาณมาก เพิ่มศักยภาพในการใช้ประโยชน์และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเพิ่มปริมาณหญ้าทะเลที่พะยูนมีความต้องการมากที่สุด ได้แก่ หญ้าอำพันหรือหญ้าใบมะกรูด กุยช่ายทะเล หญ้าชะเงาใบมนและใบฟันเลื่อย ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาศักยภาพต่อไปในอนาคต (สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน, 2562)

วัตถุประสงค์ (Objective)

1. เพื่อศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ โคนใบ และลำต้นใต้ดินของหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)
2. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)

ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and Methodology)

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) คือ

1.1 สารอนินทรีย์

1.1.1 ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ เป็นต้น

1.1.2 ธาตุอาหารรอง ได้แก่ เหล็ก คลอรีน แมงกานิส ทองแดง สังกะสีโบรอนและโบลิดินัม เป็นต้น

1.2 สารอินทรีย์ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน น้ำตาล กรดอะมิโน ผงถ่าน วิตามินบี 1 และวิตามินบี 6 เป็นต้น

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อและทำความสะอาด ได้แก่ แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 20 น้ำยาล้างจาน

1.4 ผงวุ้น น้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล และโพลีเอทธิลีนไกลคอล

1.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบด้วย NAA และ BA

1.6 น้ำยาฟอกขาวไฮเตอร์ประกอบด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6 % w/w

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 เครื่องแก้ว ประกอบด้วย ขวดแก้ว กระบอกตวง ปิเปต บิกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง ขวดปรับปริมาตร ขวดเพาะเลี้ยง และขวดรูปชมพู่

2.2 อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัด pH เครื่องคนสารละลาย แท่งแม่เหล็ก ตู้อบแห้ง ตู้อบฆ่าเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบ ไมโครเวฟ และตู้เย็น

2.3 อุปกรณ์ในการเตรียมวัสดุพืช ประกอบด้วย กรรไกร ถุงพลาสติกใส

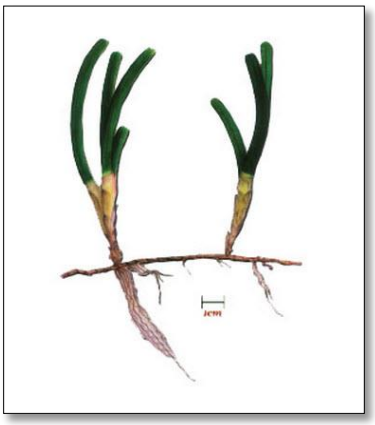
2.4 อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ตู้ย้ายเลี้ยง ถังแก๊ส แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ผ้าเช็ดตู้ ปากคีบ มีดผ่าตัดพร้อมใบมีด

2.5 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล

3. วิธีการทดลอง

3.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างและรวบรวมหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) จากบริเวณหาดมดตะนอย ตำบลเกาะลิบง อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ขณะน้ำลงโดยนำต้นหญ้าชะเงาเต่า นำมาล้างทำความสะอาดให้ปราศจากทรายและดินตะกอน แล้วนำมาห่อกระดาษบรรจุในถุงซิป และแช่เย็นเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างก่อนนำมาใช้ในการศึกษา เตรียมตัวอย่างฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยนำชิ้นส่วนใบ โคนใบและลำต้นใต้ดินของหญ้าชะเงาเต่า ไปล้างผ่านน้ำประปา เป็นเวลา 1 นาทีใช้พู่กันปัดทำความสะอาด แล้วแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง น้ำทะเลฆ่าเชื้อที่ใช้ตลอดการทดลองมีความเค็ม 28 psu



รูปภาพที่ 1. หญ้าชะเงาเต่า *Thalassia hemprichii*

ที่มา : กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง (2565)

3.2 ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของหญ้าทะเลที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)

การเตรียมสารฟอกฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ สารฟอกฆ่าเชื้อ Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6 % w/w เตรียมที่ระดับความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยใช้น้ำทะเลความเค็ม 28 psu ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแทนน้ำกลั่น วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) มีทั้งหมด 7 ชุดทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ โดยในชุดทดลองที่ 1-4 เป็นการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5,10,15 และ 20 นาที เพียงครั้งเดียว ชุดทดลองที่ 5-7 เป็นการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 1 จากนั้นย้ายชิ้นเนื้อเยื่อในตู้ปลอดเชื้อ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ ตัดแต่งชิ้นส่วนใบ ลำต้นใต้ดิน และโคนใบย้ายลงอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟเรืองแสงสีขาวความเข้มแสงประมาณ 40 µmol Photons m-2s-1 เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองอัตราการรอดชีวิตและนับจำนวนชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และการเจริญเป็นต้นใหม่ พร้อมบันทึกภาพ

ตารางที่ 1. สารฟอกฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ ของหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)

ชุดทดลอง	สารฟอกฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น V/V (%)	ระยะเวลา (นาที) ครั้งที่ 1 + 2	ส่วนที่นำมาใช้ศึกษาฟอกฆ่าเชื้อ		
			ใบ	โคนใบ	ลำต้นใต้ดิน
1	คลอรอกซ์ 20%	5+0	●	●	●
2	คลอรอกซ์ 20%	10+0	●	●	●
3	คลอรอกซ์ 20%	15+0	●	●	●
4	คลอรอกซ์ 20%	20+0	●	●	●
5	คลอรอกซ์ 8% ครั้งที่ 1 และ 4% ครั้งที่ 2	10+15	●	●	●
6	คลอรอกซ์ 10% ครั้งที่ 1 และ 5% ครั้งที่ 2	10+15	●	●	●
7	คลอรอกซ์ 12% ครั้งที่ 1 และ 6% ครั้งที่ 2	10+15	●	●	●

หมายเหตุ : ส่วนที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ 1 = ใบ, 2 = โคนใบ, 3 = ลำต้นใต้ดินของหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)

3.3 ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลจะต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญ เพื่อให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาเกิดการพัฒนาเป็นส่วนต่างๆ และสามารถเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งได้ทำการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของ BA ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2 มาผสมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อขวดละ 1 ชิ้น จากนั้นนำไปเลี้ยงห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง เปลี่ยนถ่ายอาหารให้ต้นอ่อนทุกเดือนบันทึกอัตราการรอดและความสูงลักษณะการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อ ภายในระยะเวลา 2 เดือน เพื่อให้ได้ปริมาณและอัตราส่วนของสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ CRD

ตารางที่ 2. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA กับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

BA (mg/l)	NAA (mg/l)				
	0	0.5	1.0	2.0	3.0
0	●	-	-	-	-
0.5	-	●	-	-	-
1.0	-	-	●	-	-
2.0	-	-	-	●	-
3.0	-	-	-	-	●

สรุปผล (Results)

1. ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของหญ้าทะเลที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* ด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ในชุดทดลองที่ 1-4 เป็นการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5,10,15 และ 20 นาที และชุดทดลองที่ 5-7 เป็นการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ครั้งที่ 1 ความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และครั้งที่ 2 ความเข้มข้น 4, 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาที พบว่าชิ้นส่วนใบของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* ชุดทดลองที่ 3 เป็นชุดทดลองที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที มีการรอดชีวิต 8.00±0.41 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนโคนใบของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* พบว่าชุดทดลองที่ 3 เป็นชุดทดลองที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที มีการรอดชีวิต 7.00±0.44 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนลำต้นใต้ดินของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* พบว่าชุดทดลองที่ 3 เป็นชุดทดลองที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที มีการรอดชีวิต 6.33±0.50 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3 พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อยอดในการเหนี่ยวนำด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของต้นพืชต่างๆได้

ตารางที่ 3. จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตจากการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ในระดับความเข้มข้นต่างๆจากชิ้นส่วนของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS วางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ชุดทดลอง	การรอดชีวิต (%)		
	ใบ	โคนใบ	ลำต้นใต้ดิน
1	1.33 ± 0.35e	2.00 ± 0.41d	1.33 ± 0.35e
2	2.67 ± 0.46d	3.67 ± 0.50c	3.67 ± 0.49c
3	8.00 ± 0.41a	7.00 ± 0.44a	6.33 ± 0.50a
4	5.67 ± 0.52b	5.00 ± 0.50b	5.67 ± 0.49b
5	3.67 ± 0.50c	3.33 ± 0.49c	3.67 ± 0.50c
6	3.33 ± 0.48c	2.67 ± 0.45d	2.33 ± 0.44d
7	1.67 ± 0.39e	2.00 ± 0.41d	2.33 ± 0.44d
F-test	*	*	*
C.V. (%)	**11.81**	**2.21**	**3.21**

หมายเหตุ : * แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ร่วมกันในทุกหน่วยทดลองเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

2. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*)) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตชิ้นส่วนใบของหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อ หญ้าชะเงาเต่าที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.23±0.40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตชิ้นส่วนโคนใบของหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.24±0.31 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตชิ้นส่วนลำต้นใต้ดินของหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.26±0.33 เปอร์เซ็นต์ และมีการอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่จำนวน 1 ต้น

ตารางที่ 4 จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA ร่วมกับ NAA เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้นและชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโต		**การรอดชีวิต (%)**		
BA (mg/l)	**NAA (mg/l)**	**ใบ**	**โคนใบ**	**ลำต้นใต้ดิน**
0.5	0.5	0.18±0.38c	0.12±0.32b	0.11±0.34b
1.0	1.0	0.12±0.31c	0.16±0.41b	0.19±0.27b
2.0	2.0	0.23±0.40a	0.24±0.31a	0.26±0.33a
3.0	3.0	0.21±0.38b	0.18±0.32b	0.13±0.32b
F-test		*	*	*
C.V.(%)		**82.31**	**93.81**	**46.05**

หมายเหตุ : * แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ร่วมกันในทุกหน่วยทดลองเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

รูปภาพที่ 2. การเจริญเติบโตเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนลำต้นใต้ดินของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

การอภิปรายผล (Discussion)

การฟอกฆ่าเชื้อในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของชัชรี แก้วสุรลิขิต และจันทนา ไพรบูรณ์ (2555) ได้ศึกษาวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่าเพื่อการอนุรักษ์หญ้าทะเล พบว่า วิธีการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการศึกษา โดยเก็บส่วนข้อลำต้นใต้ดิน ปลายยอดลำต้นใต้ดินและเมล็ด จากธรรมชาติมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า วิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อส่วนข้อและปลายยอดของลำต้นใต้ดิน คือการใช้ยาปฏิชีวนะ Cefotaxin 1000 mg/l เป็นเวลา 120 นาที 70% เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 30 วินาที และตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาที

สอดคล้องกับกฤติยา และคณะ(2557) มีการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของผลหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวชิ้นส่วนของผลหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* ที่มีประสิทธิภาพ คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที และ Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับโดยมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 16 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อจากชิ้นส่วนใบ โคนใบและลำต้นใต้ดินของหญ้าชะเงาเต่า *(Thalassia hemphichii)* พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ต่ำที่สุด จากนั้นนำผลดังกล่าวมาศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของ BA ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

References

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2552). *แนวทางการฟื้นฟูทรัพยากรแหล่งหญ้าทะเล.* http://www.mkh.in.th.

กองการจัดการความหลากหลายทางชีวภาพ. (2566, มกราคม). *ระบบแหล่งหญ้าทะเล*. https://chm-thai.onep.go.th/?page_id=427.

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. (2565). *คลังความรู้ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง หญ้าชะเงาเต่า* (*Thalassia hemprichii*). https://km.dmcr.go.th.

กฤติยา ธุระนนท์, จันทนา ไพรบูรณ์, ศุภพร เปรมปรีดิ์ และชัชรี แก้วสุรลิขิต. (2557). *การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของ หญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*).* กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัชรี แก้วสุรลิขิต และจันทนา ไพรบูรณ์ . (2555). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าชะเงาเต่า เพื่อการอนุรักษ์แหล่งหญ้าทะเล.* กรุงเทพมหานคร : สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน. (2562). *ปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าทะเล.* https://km.dmcr.go.th/th/c_4/d_770.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 437-497. Orpurt, P.A. and L.L. Boral. 1964. The flowers, fruits and seeds of *Thalassia testudinum* Konig. *Bulletin Marine Science Gulf Caribbean* 14: 296-302.