บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจาย

ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) มีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ของประเทศจีน และบางส่วนทางตอนเหนือของเวียดนาม ลิ้นจี่จัดอยู่ใน family Sapindaceae ใน genus *Litchi philippinensis* ซึ่งได้มีการพัฒนาในพื้นที่สูงของฟิลิปปินส์

ลิ้นจี่มีการปลูกมากในพื้นที่ส่วนใหญ่ของจีนมากกว่า 3,500 ปี และมีการคัดเลือกพันธุ์ที่ดีได้จากการเพาะเมล็ด มีการนำเข้าสู่พม่า ไทย และอินเดียในปลายศตวรรษที่ 17 และแพร่เข้าสู่อินเดียตะวันตกในศตวรรษที่ 18 ในศตวรรษที่ 19 มีการนำไปปลูกในแถบออสเตรเลีย แอฟริกา มาดากาสกา และออสเตรเลีย ลิ้นจี่มีส่วนสำคัญในการทำอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องทั้งในประเทศจีน ไต้หวัน และไทย (Subhadrabandhu,1990)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลิ้นจี่เป็นไม้ผลขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ทรงพุ่มแผ่กว้าง ไม่ผลัดใบ สามารถเจริญได้สูงถึง 10 เมตร หรือมากกว่า ใบเป็นใบประกอบมี 4-7 คู่ ขนาดความยาว 7-20 เซนติเมตร ผิวใบด้านบนสีเขียวเข้ม และด้านล่างสีเขียวอ่อน การเรียงตัวของใบย่อยจะเป็นแบบตรงกันข้ามหรือเรียงเฉียงกันเล็กน้อยตามก้านใบย่อยแต่ละอันซึ่งมีความยาว 3- 2.5 เซนติเมตร ใบแก่มีขนาดยาว 7.7 ถึง 13.4 เซนติเมตร และกว้าง 2.9 ถึง 3.9 เซนติเมตร ใบมีลักษณะเป็นรูปไข่จนถึงรูปหอก ฐานใบมีลักษณะกว้าง ความยาวของก้าน และจำนวนของคู่ใบย่อยรวมทั้งลักษณะของใบสามารถนำไปใช้จำแนกพันธุ์ของลิ้นจี่ได้

ดอก เกิดเป็นช่อแบบ panicle ช่อดอกขนาดใหญ่ ความยาวแล้วแต่พันธุ์ อาจยาวตั้งแต่ 10 ถึง 40 เซนติเมตร ช่อดอกแต่ละช่อมีดอกย่อยจำนวนมาก เป็นดอกที่มีเพศเดียว โดยมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียเกิดอยู่ในช่อดอกเดียวกัน แต่ดอกบานในเวลาต่างกัน ดอกย่อยมีก้านดอกยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร ดอกขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 – 6 มิลลิเมตร ดอกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงจำนวน 4 – 5 กลีบ ไม่มีกลีบดอก เกสรตัวผู้จำนวน 6 – 10 อัน เกสรตัวเมียมีรังไข่แบบ superior มี 2 ช่อ แต่ละช่อมีไข่อ่อน 1 อัน

ผล เกิดบนช่อ ช่อผลแต่ละช่อมีผลแก่จำนวน 1 – 30 ผลหรือมากกว่า ผลมีลักษณะทรงกลมหรือรูปหัวใจแล้วแต่ละพันธุ์ เปลือกบาง ผิวขรุขระ สีผิว มีตั้งแต่สีแดงสดจนถึงแดงเข้มขึ้นอยู่กับพันธุ์ เมื่ออากาศแห้งเปลือกจะเป็นสีน้ำตาลและจะเปราะ เนื้อจะพัฒนาจนสมบูรณ์ตามการพัฒนาของเมล็ด เนื้อมีสีขาวและใส รสชาติหวานอมเปรี้ยว (Subhadrabandhu,1990)

พันธุ์ลิ้นจี่ในประเทศไทย

พันธุ์ลิ้นจี่ที่ปลูกในประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม ตามพื้นที่ปลูกคือ

1. พันธุ์ที่ไม่ต้องอาศัยอากาศเย็นหรือต้องการเล็กน้อยเพื่อการออกดอก พันธุ์นี้บางครั้งจะจัดอยู่ในลิ้นจี่ที่ปลูกในพื้นที่ต่ำหรือในเขตร้อน ซึ่งจะปลูกเป็นการค้าในภาคกลางของประเทศ ซึ่งพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่จะปลูกมากที่อำเภออัมพวา และ อำเภอบางคณที ในจังหวัด สมุทรสงคราม พันธุ์ลิ้นจี่ที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น ค่อม กระโหลกใบยาว สาแหรกทอง สำเภาแก้ว กระโถนท้องพระโรง แห้วจีน จีน ไทยใหญ่ ไทย เขียวหวาน และช่อระกำ

2.พันธุ์ที่ต้องการอากาศเย็นยาวนานเพื่อการออกดอกพันธุ์นี้จะปลูกมากทางแทบภาคเหนือของไทยซึ่งมีสภาพอากาศกึ่งร้อน พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่จะอยู่ที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน และบางพื้นที่ในจังหวัดเพชรบูรณ์ น่าน และแพร่ ลิ้นจี่กลุ่มนี้จะนำเข้ามาในประเทศไทยช้ากว่าพันธุ์ลิ้นจี่ในกลุ่มแรก พันธุ์ลิ้นจี่ที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น ฮงฮวย โอเฮี๊ยะ กิมเจ็ง กิมจี จักรพรรดิ และกวางเจา (Subhadrabandhu,1990)

การเจริญเติบโตทางกิ่งใบ

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชชั้นสูงทั่ว ๆ ไปแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ ระยะการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ (vegetative stage) และระยะเจริญพันธุ์ (reproductive stage) การเจริญเติบโตทางกิ่งใบเริ่มจากการงอกของเมล็ด โดยมีปัจจัยภายในพืชและสิ่งแวดล้อมเป็นตัวควบคุม (สมบุญ, 2538)

พีรเดช (2537) ได้กล่าวถึงการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ โดยอธิบายว่าการเจริญเติบโตทางกิ่งใบประกอบไปด้วยการเจริญเติบโตของลำต้นและระบบราก การเจริญเติบโตของใบและการแตกกิ่งก้านสาขาของพืช ดังนี้

ก. การเจริญเติบโตของลำต้นมีความสัมพันธ์กับระบบราก ถ้ารากเจริญเติบโตดีก็จะส่งผลให้ลำต้น เจริญเติบโตดีเช่นกัน การเจริญเติบโตเหล่านี้มีพื้นฐานจากการแบ่งเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ และการสะสมอาหาร (พีรเดช , 2537)

ข. การเจริญเติบโตของใบพืชจะเริ่มด้วยการแบ่งเซลล์ของชั้นหนึ่งในสามของชั้นเซลล์ที่อยู่นอกสุดใกล้กับผิวของปลายยอด (shoot apex) เป็นการแบ่งเซลล์แบบ periclinal division ตามด้วยการเจริญเติบโตของเซลล์ลูกทำให้เกิดการโป่งออกนั่นคือบริเวณ leaf primordium (ส่วนที่จะเจริญเป็นใบต่อไป) ในระหว่างนั้นการแบ่งเซลล์แบบ anticlinal division จะเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการเพิ่มของผิว primordium การเจริญเติบโตทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของใบและส่วนอื่น ๆ ของพืชที่จะเกิดต่อไป (นพดล, 2537)

ค. การแตกกิ่งก้านสาขาของพืช การขยายขนาดของใบ และการยืดกิ่งเพื่อรับแสงควบคุมโดยออกซิน ในกรณีที่พืชมีตายอดอยู่มักจะไม่มีการแตกกิ่งแขนง แต่ถ้าจะทำให้ความเข้มข้นของออกซินในตาข้างลดลงจนอยู่ในระดับเหมาะสมและเจริญเติบโตออกมาเป็นกิ่งเพื่อทดแทนยอดเดิม (พีรเดช, 2537)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญทางกิ่งใบ

การเจริญเติบโตทางกิ่งใบควบคุมโดยปัจจัยต่าง ๆ ทั้งสภาพแวดล้อมและพันธุกรรมของพืช ซึ่งรายละเอียดของแต่ละปัจจัยมีดังนี้

1. ชนิดและพันธุ์พืช พืชหลายชนิดจะหยุดการเจริญทางกิ่งก้านสาขาเมื่อมีการสร้างดอกและผล เช่น ในกรณีข้าวโพดหรือธัญญพืชอื่น ๆ การออกดอกเป็นสัญญาณที่แสดงให้รู้ว่าส่วนอื่น ๆ ของพืชจะหยุดการเจริญเติบโต แต่ในกรณีของฝ้ายการเจริญของกิ่งก้านจะเจริญไปพร้อม ๆ กับการออกดอก (คนัย, 2539)

2. อายุของพืช การเจริญเติบโตของพืชในระยะแรกจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เพราะพืชยังมีขนาดเล็กมีจำนวนเซลล์ไม่มาก แต่เมื่อพ้นระยะนี้พืชจะโตอย่างรวดเร็ว (คนัย , 2539) อายุพืชจะมีความสัมพันธ์กับขนาดของต้นพืช ซึ่งเกี่ยวข้องกับปริมาณอาหารในพืชโดยตรง (สมบุญ, 2538) นอกจากนี้อายุของกิ่งและอายุใบยังมีความสัมพันธ์กับระดับของธาตุอาหารภายในใบ ใบพืชที่อายุต่างกันอาจแสดงการขาดธาตุอาหารได้ต่างกัน ซึ่งการขาดธาตุอาหารก็จะส่งผลต่อความสมบูรณ์ของกิ่งใบ Menzel *et al.* (1987) รายงานว่า ในลิ้นจี่ที่ไม่ติดผลโดยทั่วไปพบว่า ระดับของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และสังกะสี จะลดลงตามอายุของใบ (2-52 สัปดาห์) ในขณะที่ระดับของแคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม คลอรีน เหล็ก แมงกานีส และโบรอนจะเพิ่มขึ้น

3. แสง สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการพลังงานแสงเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและรักษาสภาพให้คงอยู่ แสงมีความจำเป็นต่อกระบวนการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช และบางครั้งอาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงเลย (คนัย, 2539)

4. อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่สำคัญมากอันหนึ่ง อุณหภูมิต่ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนภายในพืช และทำให้พืชชงักการเติบโตทางกิ่งใบ (พีรเดช , 2537) ในมะดาดาเมีย พบว่าในช่วงฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิต่ำ การเจริญเติบโตทางกิ่งใบเกิดได้ไม่เต็มที่ (Stephenson and Cull , 1986) นอกจากนี้ช่วงอุณหภูมิที่สูง (กลางวัน / กลางคืนที่ 20 / 15 , 25 / 20 และ 30 / 25 องศาเซลเซียส) มีผลต่อลิ้นจี่โดยจะเพิ่มความยาวของกิ่งและจำนวนใบต่อกิ่ง (Menzel and Simpson , 1991)

5. ความชื้นในดิน ในสภาพแล้ง ต้นพืชจะชงักการเติบโตทางกิ่งใบและเกิดการสะสมอาหารมากขึ้น (พีรเดช , 2537) ในลิ้นจี่ พบว่า การขาดแคลนน้ำจะส่งผลให้การใช้น้ำและการแลกเปลี่ยนก๊าซลดลง (Roe *et al.* , 1995) นอกจากนี้ Chaitrakulsup *et al.* (1987) รายงานว่า การพ่น SADH และ MH ให้กับต้นลำไยเพื่อกระตุ้นการแตกใบอ่อนของยอด พบว่า ต้นที่ปลูกในสวนที่แห้งแล้งและเกิดการแตกใบอ่อนของยอดได้ช้ากว่าต้นที่ปลูกในสวนที่ชื้น

6. การตัดแต่งกิ่ง วิธีนี้เป็นการลดการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ โดยมีการแตกใบใหม่ออกมา มีผลทำให้ต้นพืชสร้างอาหารได้ดีขึ้น (พีรเดช , 2537) ในลิ้นจี่ พบว่าถ้ามีการตัดแต่งกิ่งในช่วงหน้าร้อนจะทำให้การเจริญเติบโตของใบมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยจะทำให้การแตกใบอ่อนช้าไป 1-2 เดือน (Menzel *et al.* , 1996)

7. ฮอร์โมน ฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นเกี่ยวข้องกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ทั้งภายในและภายนอกของต้นพืช เพราะปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้จะมีผลต่อระดับฮอร์โมนและการสร้างฮอร์โมนพืช (สมบุญ , 2538) ในมะม่วงพบว่า ระดับของจิบเบอเรลลินใน xylem sap จะมีปริมาณสูงในระยะ leaf differentiation (Chen , 1987) และพบว่าปริมาณของไซโตไคนินเพิ่มขึ้นใน xylem sap ในระยะที่มีการสร้างตาดอกและระยะที่ดอกบาน (Chen , 1990) ส่วนในตาที่มีการพักตัวระดับไซโตไคนินจะต่ำและตาจะไม่ตอบสนองต่อไซโตไคนินที่เพิ่มให้จากภายนอก (Chen , 1991)

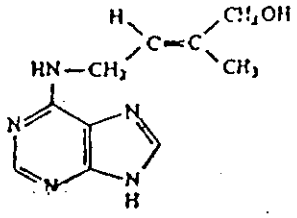
8. ปริมาณธาตุอาหารในพืช ถ้าปริมาณไนโตรเจนสูงจะส่งเสริมการสร้างใบและกิ่งหรือการเจริญด้านวัฒนภาค (สมบุญ , 2538) ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตลิ้นจี่คือการขาดแคลนธาตุอาหาร แต่ผลผลิตอาจต่ำเนื่องจากการเจริญเติบโตทางกิ่งใบมากเกินไปในช่วงฤดูหนาว เพราะมีปริมาณของไนโตรเจนมากเกินไป (Menzel and Simpson , 1987) Menzel *et al.* (1994) รายงานว่า ลิ้นจี่อายุ 4 ปี มีผลผลิตต่ำ เนื่องจากการเจริญเติบโตในช่วง 2 ปี แรกไม่สมบูรณ์ ปริมาณของไนโตรเจนในช่อดอก ใบ และกิ่งเล็กยังมีในปริมาณต่ำ ในการเพาะเมล็ดลิ้นจี่ถ้าเพิ่ม

ปริมาณไนโตรเจนจะทำให้มีการแตกใบอ่อนเพิ่มมากขึ้น และการให้ปุ๋ยไนโตรเจนจะเป็นการเพิ่มไนโตรเจนในใบอ่อน และในใบแก่ (Menzel *et al.*, 1995) นอกจากลิ้นจี่แล้วยังมีการศึกษาในพีแคน (Pecan) พบว่า เมื่อมีการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนจะทำให้มีการสะสมไนโตรเจนในใบเพิ่มขึ้น และจำนวนยอดที่เกิดใหม่จะเพิ่มขึ้น (Michael *et al.* , 1985)

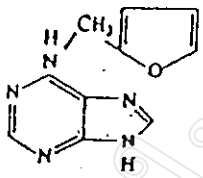
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ไซโตไคนิน

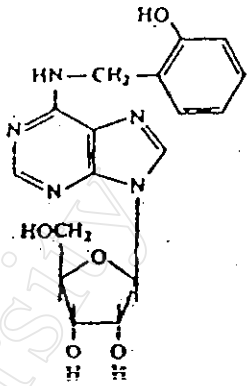
ไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตทางด้านกิ่งใบ การแตกแขนง (พีรเดช , 2537) ไซโตไคนินพบมากในผลอ่อน เมล็ด ใบอ่อน และปลายราก ซึ่งไซโตไคนินอาจจะสังเคราะห์ที่บริเวณดังกล่าวหรืออาจเคลื่อนย้ายมาจากส่วนอื่น ๆ (ดนัย , 2539) การค้นพบไซโตไคนินครั้งแรกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยวิธีปลอดเชื้อในปี ค.ศ. 1913 Haberlandt ได้ทดลองใช้น้ำที่สกัดจากท่ออาหารของพืชสามารถกระตุ้นการเจริญและแบ่งเซลล์ในชิ้นมันฝรั่งได้ (สมบุญ , 2538) จากการศึกษาของ Skoog โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อแกนกลางของลำต้น (pith) ของยาสูบ พบว่า การที่เนื้อเยื่อจะเจริญต่อไปได้นั้นจะต้องมีอาหารและฮอร์โมน เช่น ออกซิน และหากเพิ่มพิวรีนเบส (purine base) ชนิดอะดีนีน (adenine) ลงไปในอาหารรวมกับ IAA จะทำให้เนื้อเยื่อกลายเป็นกลุ่มเซลล์(callus) ทั้งนี้อะดีนีนเป็นพิวรีนเบสซึ่งมีสูตรเป็น 6-อะมิโนพิวรีน (6-aminopurine) (ดนัย , 2539) ปี ค.ศ. 1955 Miller ได้ศึกษาสารสกัดจาก DNA ของน้ำเชื้อของปลาแฮริ่งตัวผู้ พบว่า สารนี้คือ 6-อะมิโนพิวรีน (6-aminopurine) เนื่องจากสารนี้สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้จึงเรียกสารนี้ว่า ไคเนติน (kinetin) สำหรับในพืช Letham (1971) ได้สกัดสารจากผลอ่อนข้าวโพดและให้ชื่อว่า ซีอะติน (zeatin) ซึ่งต่อมา Skoog และคณะ ได้เสนอใช้ชื่อไซโตไคนินแทนซีอะติน และเรียกชื่อสารที่มีผลกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของพืชว่าไคเนติน (สมบุญ , 2538)



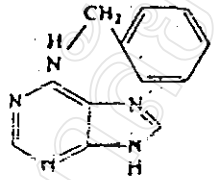
Zeatin



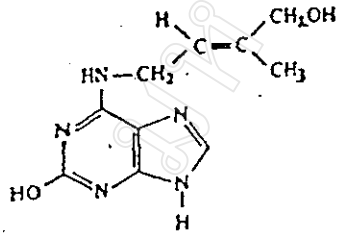
Kinetin



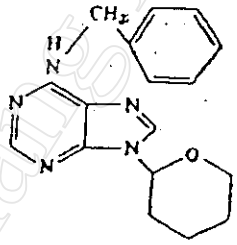
N^6 – (2 – Hydroxybenzyl) adenosine



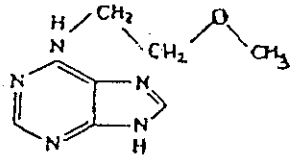
Benzyladenine (BA)



2 – Hydroxyzeatin



Tetrahydropyranylbenzyladenine (PBA)



Ethoxyethyladenine

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การตรวจสอบไซโตไคนินโดยวิธีชีววิธี

การตรวจสอบไซโตไคนินสามารถทำได้โดย

1. Tobacco callus test โดยเลี้ยงเซลล์แกนกลางของลำต้นของยาสูบบนอาหารที่มีไซโตไคนิน ไซโตไคนินจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชั่งน้ำหนักของเนื้อเยื่อ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากไซโตไคนิน วิธีนี้ใช้เวลาตรวจสอบนาน (คนัย , 2539)

2. Leaf senescence test โดยวางแผ่นใบพืชให้ลอยอยู่ในสารละลายที่มีไซโตไคนินในที่มืด ไซโตไคนินทำให้คลอโรฟิลล์ในแผ่นใบสลายตัว หาจำนวนคลอโรฟิลล์ที่เหลืออยู่หลังจากลอยแผ่นใบนาน 3 – 4 วัน (คนัย , 2539)

3. Radish cotyledon test โดยเลี้ยงเซลล์ใบเลี้ยงของแรดิช ไซโตไคนินมีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์ ชั่งน้ำหนักใบเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นการตอบสนองของใบเลี้ยงต่อระดับไซโตไคนิน (สมบุญ , 2538)

นอกจากวิธีการดังกล่าวแล้วการหาปริมาณของไซโตไคนินสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี ซึ่งสรุปเป็นตารางได้ (ตารางที่ 2) ดังนี้ คือ

ตารางที่ 2 สรุปผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการวิเคราะห์สารคล้ายไซโตไคนิน

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Gazit and Blumenfeld (1970) อิสราเอล	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr.	Soybean Cotyledon Callus Bioassay	ไม่ระบุ	1. นำแคลลัสถั่วเหลือง 3 ชิ้น แต่ละชิ้นหนักประมาณ 8 มก(ชิ้นส่วนถั่วเหลืองได้จาก stock culture ที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมไคเนติน 1 มก / ล เพาะบนอาหารสูตร Miller ที่มีวุ้น 0.8% (20 มล) ใน erlenmeyer flask ขนาด 100 มล 2. นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80 % นาน 25 – 30 วัน 3. ชั่งน้ำหนักแคลลัส
Hopping *et al.* (1979) สหรัฐอเมริกา	Radish *Raphanus sativus* L. cv. Long Scarlet Globe	Radish Cotyledon Bioassay	ไม่ระบุ	1. นำเมล็ด radish มาฆ่าเชื้อด้วย NaOCl 1 % แล้วล้างน้ำ 2. เพาะเมล็ดบนกระดาษเพาะที่ชื้น ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 40 ชั่วโมง 3. ใช้ inner cotyledon 5 ใบใส่ใน petridish ที่บรรจุ chromatogram strip และน้ำกลั่น 1 มล ซึ่งปรับให้มี pH เท่ากับ 6.0 ด้วย HCl 4. บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอด fluorescent (Cool White , ไม่ระบุความเข้มแสง) นาน 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
				5. ซับใบเลี้ยงและชั่งน้ำหนัก
Letham (1971) ออสเตรเลีย	Radish *Raphanus sativus* L. cv. Long Scarlet Globe, Market strain	Radish Cotyledon Bioassay	ไม่ระบุ	1. เพาะเมล็ด radish ในกล่องพลาสติกที่บรรจุกระดาษกรองชุบน้ำ และห่อกล่องด้วยถุงพลาสติกในที่มืด อุณหภูมิ 25 – 26 องศาเซลเซียส นาน 35 ชั่วโมง 2. เลือกใบเลี้ยงขนาดสม่ำเสมอ หนักประมาณ 6 มก วางลงใน petridish (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม) ที่รองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม) และมีสารละลาย cytokinin 3 มล 3. ใช้ใบเลี้ยง radish 8 – 10 ใบ ต่อ petridish โดยวางใบเลี้ยงให้ผิวด้านบนแตะกับสารละลาย 4. ห่อ petridish ด้วยถุงพลาสติก นำไปบ่มภายใต้แสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 540 ลักซ์ อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน 5. นำใบเลี้ยงมาซับให้แห้ง แล้วชั่งน้ำหนัก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Krasnuk *et al.* (1971) สหรัฐอเมริกา	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. var. Acme	Soybean Cotyledon Callus Bioassay	ไม่ระบุ	1. เพาะแคลลัสถั่วเหลือง 3 ชิ้น (2-5 มก / ชิ้น) ลงบนอาหารสูตร Miller ที่เติมสารสกัดจากตัวอย่างพืชหรือชิ้นส่วนของกระดาษ chromatogram ที่ตำแหน่ง R_f มี activity ของไซโตไคนิน ลงในอาหารวุ้น 50 มล ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 125 มล ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 2. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงความเข้ม 40 ft-c (ไม่ระบุชนิดหลอดไฟ) นาน 28 วัน 3. ชั่งน้ำหนัก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Short and Torrey (1972) สหรัฐอเมริกา	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. var. Acme	Soybean Callus Bioassay	ไม่ระบุ	1. นำแผ่น chromatogram มา dilute ด้วย ethanol 80 % และนำสารละลายที่ได้ใส่ในอาหารสูตร SCF แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 2. ใช้แคลลัสถั่วเหลือง 4 ชิ้น (8 มก สด / ชิ้น) ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 125 มล ที่บรรจุ 20 มล 3. บ่มที่ 23 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสีขาว 12 ชั่วโมง / วัน นาน 4 สัปดาห์ 4. ชั่งน้ำหนักสด

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Edwards and LaMotle (1975) สหรัฐอเมริกา	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. Var. Acme	Soybean Callus Bioassay	0 – 0.003 ส่วนต่อล้าน (ไม่ระบุว่าเป็น linear)	1.ฆ่าเชื้อผิวเมล็ดถั่วเหลืองด้วยสารละลาย sodium hypochlorite 5.25 % (V/V) นาน 10 นาที 2.แช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 15 ชั่วโมง 3..ตัด cotyledon ไปเลี้ยงในอาหารสูตร Miller ที่มี IAA 5 มก / ล และ kinetin 0.5 มก / ล นานประมาณ 5 สัปดาห์ จนเกิดเป็นแคลลัส 4.subculture แคลลัสทุก ๆ 3 สัปดาห์ เมื่ออายุครบ 6 สัปดาห์ นำมาทำ bioassay โดยอาหารที่ใช้ทำ bioassay จะไม่เติม kinetin 5.นำ chromatogram strip ใส่ใน flask ขนาด 500 มล และสกัดด้วย ethanol 80 % (V/V) ปริมาตร 10 มล และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
				6.เติมอาหารปริมาตร 200 มล ลงใน flask เดิมที่มี residue แห้งอยู่ แล้วนำไปต้มเพื่อละลายวุ้นและแบ่งใส่ flask ละ 50 มล จำนวน 4 flask แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 7.นำแคลลัสถั่วเหลืองย้ายใส่ใน flask ๆ ละ 3 ชิ้น (32 มก/ชิ้น) 8.นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 6 สัปดาห์ 9. ชั่งน้ำหนัก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Edwards and LaMotle (1975) สหรัฐอเมริกา	Radish *Raphanus sativus* L. cv. White Ioicle	Radish Cotyledon Bioassay และ Radish Hypocotyl Bioassay	ไม่ระบุ	1. เพาะเมล็ด radish บนกระดาษซับในที่มืด อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน 2. นำชิ้นส่วน inner cotyledon และ hypocotyl (ยาว 2 มม) ใส่ petridish (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม) ที่มีกระดาษ chromatogram และสารละลาย zeatin โดยวางใบเลี้ยงให้ผิวด้านบนแตะกับกระดาษ 3. ห่อ petridish ด้วยกระดาษกรองชุบน้ำและหุ้มด้วย plastic crisper line แล้วใส่ในถุง polyethylene 4. บ่มที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสีขาวความเข้ม 40 – 45 ft – c นาน 3 วัน 5. ซับใบเลี้ยงให้แห้ง และชั่งน้ำหนัก แล้ววัดความยาว hypocotyl ด้วยไม้บรรทัด

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Huff and Ross (1975) สหรัฐอเมริกา	Radish *Raphanus sativus* L. cv. Early Scarlet Globe	Radish Cotyledon Bioassay	ไม่ระบุ	1. ทำความสะอาดเมล็ดด้วย chlorox 10 % (V/V) แล้วล้างน้ำ 2. เพาะเมล็ดในที่มืดนาน 48 ชั่วโมง แล้วตัด smaller cotyledon จากเมล็ดที่คัดเลือก 3. ใช้ smaller cotyledon 5 ใบ (20-35 มก) เป็น 1 หน่วยการทดลอง วางลงใน petridish (เส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 ซม) โดยคว่ำส่วน cotyledon ลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ชุ่มด้วย potassium phosphate buffur 2 mM 1 มล (pH 6.4) 4. นำ petridish วางบนกระดาษเปียกซึ่งวางอยู่ในถาดแก้วแล้วหุ้มด้วยแผ่นพลาสติกใส แล้วหุ้มด้วย aluminum foil อีกชั้นหนึ่ง 5. บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด (ไม่ระบุเวลา) 6. ซับใบเลี้ยงให้แห้ง และชั่งน้ำหนัก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Manos and Goldthwaite (1976) สหรัฐอเมริกา	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. var. Kanrich or Kim	Soybean Hypocotyl Bioassay	0.0001 - 0.219 ส่วนต่อล้าน	1. ฆ่าเชื้อผิวของเมล็ดถั่วเหลืองในสารละลาย sodium hypochlorite 1.3% นาน 4 นาที และใช้แท่งแก้วคน 2. ล้าง 5 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ sterile แล้ว 3. บ่มในหลอดแก้วในสภาพปลอดเชื้อ โดยเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน 4. เมื่อ hypocotyl ยาวประมาณ 100 มม นำมาหั่นเป็นชิ้นหนา 1 มม ในสภาพปลอดเชื้อ 5. นำ hypocotyl ที่ตัดแล้ว 6 ชิ้น วางบน petridish ที่มี media สูตร Foshest and Torrey (1961) และฮอร์โมนที่ต้องการทดสอบ 6. วางในถาดพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว และทำซ้ำ (duplicate) 7. ห่อด้วย aluminum foil 8. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด (ไม่ระบุเวลา) 9. ชั่งน้ำหนักของ hypocotyl

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
Matsui and Nakamura (1979) ญี่ปุ่น	ยาสูบ cv. Wisconsin No. 38	Tobacco Callus Bioassay	ไม่ระบุ	1. นำแคลลัสยาสูบ 3 ชิ้น เลี้ยงใน flask ที่บรรจุอาหารสูตร Linsmaier and Skoog (1965) ปริมาตร 17 มล 2. ใส่กระดาษที่ strip สาร และเลี้ยงเนื้อเยื่อบนกระดาษ (ทำ tripicate) 3. เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน 4. ชั่งน้ำหนักสดแคลลัส
Fletcher *et al.* (1982) แคนาดา	แตงกวา *Cucumis sativus* L. cv. National Pickling	Cucumber Cotyledon Greening Bioassay	ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ 0.0001 มก / ล (ไม่ระบุช่วงที่เป็น linear)	1. เพาะเมล็ดแตงกวาในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยใช้วัสดุเพาะคือ vermiculite ผสมกับ peat 2. นำใบเลี้ยงที่มีอายุ 4 – 7 วันมาตัดส่วนของ hypocotyl ทิ้ง โดยทำในที่มีแสงสีเขียวสลัว 3. วาง cotyledon บน petridish ขนาด 5 ซม ที่มีสารละลายทดสอบ 3 มล ซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่น ไซโตไคนิน (ความเข้มข้นต่าง ๆ) KCl 40 mM $CaCl_2$ หรือ ส่วนผสมของไซโตไคนินกับ KCl และ $CaCl_2$ ที่ระดับต่าง ๆ 4. นำมาไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศา

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
				เซลเซียส นาน 12 , 16 , 20 , 24 และ 28 ชั่วโมง 5. จากนั้นนำไปไว้ใต้แสง fluorescent ความเข้มแสง 12.9 วัตต์ / ตารางเมตร นาน 3.5 ชั่วโมง 6. นำ cotyledon มาบดและแช่ใน acetone 80 % 8 มล 7. ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มล ด้วย acetone และ centrifuge 2500 รอบ/นาที นาน 10 นาที 8. วัดค่า Total Chlorophyll ด้วย nomogram
โรจน์รวี (2539) ไทย	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. cv. ชม. 60	Soybean Callus Bioassay	0.01 – 0.1 ส่วนต่อล้าน	1. ตัดแคลลัสให้ได้ขนาด 2 x 2 x 2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (5 – 10 มก) 2. ใส่ชิ้นแคลลัสในขวดที่มีแผ่น chromatogram ในอาหารวุ้นสูตร Miller ขวดละ 4 ชิ้น ปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP 3. บ่มที่อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงความเข้ม 500 ลักซ์ นาน 30 วัน 4. ชั่งน้ำหนักแคลลัส

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ทดลอง ปี ประเทศ	ชนิดพืช พันธุ์	วิธีการที่ใช้วัด	ช่วงที่วัดได้เป็นสมการเส้นตรง	วิธีการทำ bioassay
ครุณี (2539) ไทย	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. cv. สจ. 5	Soybean Hypocotyl Bioassay	0.00005 – 0.05 ส่วนต่อล้าน	1. ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วเหลืองด้วย chlorox 1.3 % นาน 4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง 2. บ่มในที่มืดนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส 3. ตัด hypocotyl หนาประมาณ 1 มม ใส่ขวดวัดซีนที่มีอาหารสูตร Miller (1965) ขวดละ 6 ชิ้น ระยะห่างประมาณ 3 – 5 มม 4. ปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 13 วัน 5. ชั่งน้ำหนักสดและแคลลัส
ชัยวัฒน์ (2542) ไทย	ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. cv. สจ. 5	Soybean Hypocotyl Bioassay	0.000005 – 0.005 ส่วนต่อล้าน	วิธีการเหมือนครุณี (2539)