สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ชื่อโครงการวิจัย การเพิ่มปริมาณต้นสบู่ดำเพื่อการเพาะปลูกด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

Mass Propagation of *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture for Agricultural and Studies on Genetic Diversity

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2553 ถึง 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 500,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ 2553 ถึง 2554

1. หัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 55 %
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
โทร. 02-3298000 ต่อ 6223 โทรสาร 02-3298427
E-mail : kpanurug@kmitl.ac.th

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 15 %
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ.ฉลองกรุง เขต ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
โทรศัพท์ 02-3298000 ต่อ 6268 โทรสาร 02-3298427
Email: poeaim@hotmail.com

3. ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 15 %
ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 02-5625444
Email: fscipdp@ku.ac.th

4. ผู้ร่วมโครงการวิจัย นาย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 15 %
สมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์

คำสำคัญ สบู่ดำ, แคลลัส, เซลล์แขวนลอย, การเจริญเป็นต้นใหม่, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ดี เอ็นเอ เครื่องหมาย, เอเอฟแอลพี, อาร์เอพีดี และ ความหลากหลายทางพันธุกรรม

(Keywords) *Jatropha curcas* L , callus, suspension, regeneration, DNA fingerprint, DNA markers, AFLP, RAPD and genetic diversity

RdH
@1997
2553-2554

b 12623295
i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลขหมู่
เลขทะเบียน 137313
วัน เดือน ปี 22 มิ.ย. 2558

บทคัดย่อ

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนใบและก้านใบของสบู่ดำ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ยโสธร, อินเดีย, โคราช, A5, A28, A34, A72, B14, B15 และ B19 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส พบว่าจากทั้งส่วนใบและก้านใบของสายพันธุ์ยโสธร และ B14 จะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสายพันธุ์ A5 A28 และ B19 จะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ B15 ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรจะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด และสำหรับสายพันธุ์อินเดีย, โคราช, A34 และ A72 ส่วนของก้านใบ เจริญได้ดีที่สุดที่ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และใบจะเจริญได้ดีที่สุดที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของสบู่ดำ 5 สายพันธุ์ จากประเทศลาว ขอนแก่น แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) สำโรง (เขมร) และอเมริกา บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม อะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดการพัฒนายอดของสบู่ดำสายพันธุ์ ขอนแก่น สำโรง (เขมร) และอเมริกา คืออาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสบู่ดำสายพันธุ์จากประเทศลาวเจริญดีที่สุดใน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) จะสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดได้ดีที่สุดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอของสบู่ดำ 6 สายพันธุ์ คือ A69, A73, B12, B20, B22 และน่าน ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเอ็มบริโอของทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ โดยที่เอ็มบริโอสายพันธุ์ A69, B12, B20, B22 และน่าน มีพื้นที่แคลลัสเฉลี่ยสูงสุดที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ A73 มีพื้นที่แคลลัสเฉลี่ยสูงสุดที่ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงลำต้นของสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. สายพันธุ์ KJ1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าการศึกษาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตดีที่สุดวันที่ 21 มีน้ำหนักสด 1.56 กรัม ต่ออาหาร 30 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้ง 0.11 กรัม ต่ออาหาร 30 มิลลิลิตร เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 7-21 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase เมื่อนำเซลล์แขวนลอยอายุ 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นสบู่ดำจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย โดยศึกษาจากเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ DNA Sequenceing บริเวณ non-coding regions ของ chloroplast DNA (cpDNA) ที่ยีนตำแหน่ง *trn*L และเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD; Random Amplification of Polymorphic DNA) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ พบว่าสบู่ดำไม่แตกต่างในระดับสปีชีส์ ยกเว้น A 72, B 20, Chiangmai และ Bangkok 1 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างสบู่ดำที่นำมาศึกษามีความเหมือนกันทางพันธุกรรมสูง ยกเว้นสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดลำปางที่แตกต่างไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Study medium formula that was appropiate in tissue culture for 10 varieties of *Jatropha curcas*, varieties: Yasothon, India, Khorat, A5, A28, A34, A72, B14, B15 and B19 by used the part of leaf and leaf stalk cultured on MS medium supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/L 2,4-D in combination. The results shown that explant of Jatropha which cultured on MS supplemented with 3 mg/L 2,4-D can formed callus higher than other media in Yasothon and B14. In A5, A28 and B19, MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D could formed callus higher than other media. B15 which cultured on MS medium with supplemented 0.5 mg/l 2,4-D could formed callus formation higher than other media. Leaf stalk of India, Khorat, A34 and A72 can formed callus in MS medium supplemented with 3 mg/l 2,4-D and the part of leaf of India 0.1 mg/l BA and 5 mg/l 2,4-D could formed callus higher than other media.

Axillary buds of *Jatropha curcas* L. 5 varieties: Laos, Khonkaen, MeePingNoi (ChiangMai) Somrong (Khmer) and America were cultured on solid MS medium supplemented with 10 mg/l adeninesulphate with BA at different concentrate of 1 3 5 and 7 mg/l in combination. The results shown that explant of Axillary buds of Khonkaen , Somrong (Khmer) and America were cultured on MS supplemented with 3 mg/l BA can developed of shoot higher than other media. In Laos 1 mg/l BA and MeePingNoi (ChiangMai) MS medium supplemented with 5 mg/l BA ererdeveloped of shoot higher than other media.

Study medium formula that was appropriate in embryo culture for 6 varieties of *Jatropha curcas* L., varieties: A69, A73, B12,B20, B22 and Nan on MS medium supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2,4-D in combination. The results shown that embryo of Jatropha which culture on MS supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D can formed callus higher than other media in A69, B12, B20, B22 and Nan. In A73 MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D could formed callus higher than other media.

Embryogenic calli of *Jatropha curcas* L. variety " KJ1" were cultured in liquid MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 30 g/l sucrose, for 28 days, with shaking speed at 120 rpm/min, temperature conditions at 25±2°C. Cell growth was determined by measuring the fresh weight and dry weight of the cell. The results showed fresh weight and dry weight of cell suspension with the best growth for 21 days to be 1.56 g/30 ml and 0.11 g/30 ml, respectively. Cell suspension has grown rapidly during the period of 7-21 days, log phase in 7-21 days.

The present investigation was undertaken to asses the genetic diversity of *Jatropha curcas* collected from distinct geographical areas in Thailand. Twenty samples were investigate

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phylogenetic relationships of the non-coding regions in the trnL (UAA) of chloroplast DNA (cpDNA) and sequencing and Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) technique. The PCR product was a unique fragment of approximately 600 bp. Phylogenetic tree was constructed and the major clustering pattern was found to be similar; however, changes in minor grouping were observed in A 72, B 20, Chiangmai and Bangkok 1. The mean genetic similarity was observed by RAPD. Low genetic diversity observed in *J. curcas* and among the germplasm from Lampang found to be the most diverged one.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ 1). ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ (ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2553 ถึง 2554

2). สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้สถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

3). ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ.ฉลองกรุง เขต ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

4). ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ
ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร

5). ผู้ร่วมโครงการวิจัย นาย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร
สมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์

6). ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ฉัตรแก้ว หัวหน้าโครงการเพาะปลูกสบู่ดำเพื่อทดแทนพลังงาน ที่ได้ให้สายพันธุ์สบู่ดำในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... V
กิตติกรรมประกาศ.....VII
บทนำ.....1
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1
1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2
1.2 ขอบข่ายของงานวิจัย.....2
1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 2
1.4 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง.....3
1.5 ประวัติและข้อมูลทั่วไปของสบู่ดำ 3
1.6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Jatropha*..... 23
1.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความหลากหลายของสบู่ดำโดยเทคนิคต่างๆ 27
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....29
1.9 วัสดุ อุปกรณ์..... 31
1.10 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย.....33
1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบ.....33
2. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนชิ้นก้านใบ.....34
3.การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้าง.....34
4. การเพาะเลี้ยงเมล็ดหรือ เอ็มบริโอ.....35
5. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย.....35
6. การชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์.....36
7. วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม.....37
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....40
4.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส
4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส 51
4.3 ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของยอดจากชิ้นส่วนตาข้าง.....62
4.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำ
แคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่.....79
4.5 ศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย.....85
4.6. การชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์.....87
4.7 วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม.....88
สรุปผลการทดลอง.....99
ภาคผนวก.....102
เอกสารอ้างอิง.....103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สบู่ดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. โดยมีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า Jatropha หรือ Physic nut ส่วนภาษาไทยนั้นมีชื่อตามท้องถิ่นแตกต่างกันไป คนไทยภาคกลางเรียก สบู่ดำ ภาคเหนือเรียก มะหุ่งฮั้ว ภาคใต้เรียก มะหงเทศ ภาคอีสานเรียก สีหลอด หรือ มะเยา และในปัจจุบันสบู่ดำจัดเป็นพืชน้ำมันที่รัฐบาลมีนโยบายให้ใช้เป็นพลังงานทดแทน ดังนั้นสบู่ดำจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจของไทยในอนาคต ในประเทศไทยได้ให้ความสนในมาในระยะเวลาพอสมควรแต่ยังขาดความเข้าใจเกี่ยวกับสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพอันที่จะนำไปสู่การส่งเสริมการเพาะเลี้ยงปลูกอย่างยั่งยืน เดิมนั้นพันธุ์ของสบู่ดำเป็นพันธุ์ที่มักมาจากการนำมาจากต้นพันธุ์ที่ชาวบ้านปลูกไว้ตามริมรั้ว และจากการที่มีการส่งเสริมการปลูกสบู่ดำจึงมีการนำมาเพาะเมล็ดและนำออกจำหน่ายสู่เกษตรกร โดยวิธีการตรวจ สอบสายพันธุ์นั้นต้องปลูกเพื่อตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและรอจนเกิดผลผลิตซึ่งต้องใช้เวลานาน และ ไม่แม่นยำ และโดยทั่วไปมักพบว่าลักษณะของสบู่ดำสายพันธุ์ต่างๆจะแบ่งแยกจากกันได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อชนิด (species) จะสามารถจำแนกชนิดได้ โดยเฉพาะชนิดที่สามารถให้น้ำมันในปริมาณมากและหรือที่มีความบริสุทธิ์ ทั้งยังเป็นการค้นหาจำนวนของแหล่งพันธุ์ (stock) ของสบู่ดำที่มีอยู่ในประเทศไทย จากเหตุผลที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงจำเป็นต้องใช้ความรู้และความเข้าใจในการศึกษาสายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue cultures) ทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetic) และพันธุศาสตร์เชิงประชากร (population genetic) ในการตรวจสอบสายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) ต้องใช้ระยะเวลานาน ทำให้สิ้นเปลืองทั้งแรงงานและต้นทุน และเพื่อนำไปสู่การเพาะปลูกสบู่ดำที่ให้ผลผลิตสูง รวมทั้งการคัดเลือกเพื่อการผสมพันธุ์ต่อไป ซึ่งงานวิจัยด้านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยอาศัยข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทยนี้มีอยู่ค่อนข้างจำกัด

ในปัจจุบันสายพันธุ์สบู่ดำมีอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ และจากการผสมพันธุ์โดยมนุษย์ ซึ่งสายพันธุ์ที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นมีผลต่อปริมาณน้ำมันที่อยู่ในเมล็ดและเป็นปัญหาต่อสายพันธุ์ที่แท้จริง จึงได้มีการศึกษาและรวบรวมสายพันธุ์ของสบู่ดำ มีรายงานของ Ranade และคณะ (2008) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของ *J. curcas* ที่ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศอินเดีย ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ขึ้นตามธรรมชาติและจากแหล่งเก็บรวบรวมพันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) และ DAMD พบว่ากลุ่มตัวอย่างสายพันธุ์ที่รวบรวมจากป่าในธรรมชาติมีความหลากหลายมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Ganesh และคณะ (2007) และ Subramanyam และคณะ (2009) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *J. curcas* ที่เก็บ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆในประเทศอินเดีย โดยใช้เทคนิค RAPD และยังมีรายงานของ Sudhee และคณะ (2008) ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์และความแปรผันทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Jatropha* ได้แก่ *Jatropha curcas*, *J. glandulifera*, *J. gossypifolia*, *J. integerrima*, *J. multifida*, *J. podagrica* และ *J. tanjorensis* โดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) โดยพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากระหว่าง *J. curcas* และ *J. integerrima* ซึ่งอาจจะเกิดจากการผสมกันของสองสายพันธุ์ และสามารถสรุปได้ว่าทั้งวิธี RAPD และ AFLP สามารถใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ได้

การปรับปรุงพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ที่ดีมีความจำเป็นอย่างมากในปัจจุบันและมีผลทำให้ภาครัฐบาล และภาคเอกชน มีความต้องการที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเพิ่มพื้นที่ในการปลูกสบู่ดำให้มากขึ้น เพื่อใช้เมล็ดมาผลิตเป็นน้ำมัน สำหรับใช้เป็นพลังงานทดแทน สบู่ดำขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดและปักกิ่งชำ สบู่ดำเป็นพืชไม่สามารถผสมตัวเองได้ จึงทำให้เมล็ดที่ได้มีความแปรปรวนและไม่ตรงตามพันธุ์ ดังนั้นการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการผลิตต้นพันธุ์สบู่ดำ และสามารถเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ที่ดีได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันที่รวดเร็วกว่าการขยายพันธุ์โดยธรรมชาติ ตรงตามสายพันธุ์ที่ต้องการ และพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตอันใกล้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ด ใบ และก้านใบ ให้เกิดเป็นแคลลัสและชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์
2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงตาข้าง ให้เกิดเป็นยอดหลายยอด และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์
3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสในอาหารเหลวให้ได้ปริมาณเป็นจำนวนมาก และชักนำเซลล์แขวนลอยให้กลายเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์
4. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ
5. เพื่อค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประโยชน์ต่อการคัดเลือกเพื่อการผสมพันธุ์
6. เพื่อตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ
7. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สบู่ดำที่มีลักษณะพึงประสงค์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ด ใบ และก้านใบ ให้เป็นแคลลัส และพัฒนาแคลลัสให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างให้เจริญเกิดยอดหลายๆยอด และพัฒนายอดให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยให้เพิ่มปริมาณมากขึ้น และชักนำให้เป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการคัดเลือกสายพันธุ์โดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชในสกุล Euphorbiaceous และ ทุกส่วนของต้นสบู่ดำจะมีความสำคัญทางเภสัชวิทยา นอกจากนี้ยังสามารถนำเมล็ดสบู่ดำมาใช้เพื่อการผลิตไบโอดีเซล แต่ยังประสบปัญหาในการผลิตในปริมาณมาก รวมทั้งยังมีความหลากหลายของสายพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ซึ่งมีผลต่อผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ของน้ำมัน (ชำนาญ, 2549) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยมีสายพันธุ์ของสบู่ดำที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมข้าม ที่รวบรวมโดย ศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ฉัตรแก้ว หัวหน้าโครงการเพาะปลูกสบู่ดำเพื่อทดแทนพลังงาน โดยได้ทำการปลูกสบู่ดำในหลายๆ พื้นที่ และได้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพ มีปริมาณน้ำมันสูงเหมาะแก่การผลิตไบโอดีเซล และในการเพิ่มผลผลิตต้นสบู่ดำในปริมาณมากๆ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้ คณะผู้วิจัยจึงต้องทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนเมล็ด ใบ ก้านใบ และตาข้าง ในการที่จะผลิตแคลลัส ต้นที่มีจำนวนหลายยอด และเซลล์แขวนลอย เพื่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ และนำออกปลูกในแปลง โดยงานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่จากสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก รวมทั้งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการคัดเลือกสายพันธุ์โดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี อันนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1. ประวัติและข้อมูลทั่วไปของสบู่ดำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. มีชื่อสามัญคือ barbadose nut, physic nut และ purging nut พืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* นี้มีมากกว่า 470 ชนิด (species) จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นพืชกลุ่มเดียวกับยางพารา โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม น้ำนมราชสีห์ และมะไฟ เป็นต้น มีถิ่นกำเนิดที่อเมริกากลาง (Latin America) การแพร่กระจายทั่วไปในแอฟริกาและเอเชีย สบู่ดำเป็นพืชที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่แห้งแล้ง และทนทานต่อโรคพืช จึงสามารถกระจายพันธุ์ได้ดีในหลายเขตภูมิอากาศทั้งในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน เขตอบอุ่น และเขตที่มีปริมาณน้ำฝนต่ำ (Heller, 1996) ซึ่งสบู่ดำจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom) Plantae
ส่วน (Division) Embryophyta
ชั้น (Class) Spermatopsida
อันดับ (Order) Malpighiales
วงศ์ (Family) Euphorbiaceae
สกุล (Genus) *Jatropha*
สปีชีส์ (Species) *J. curcas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สบู่ เป็นภาษาโปรตุเกส หมายถึง ต้นไม้ชนิดหนึ่งที่ใช้น้ำมันจากเมล็ดมาเป็นส่วนผสมในการทำสบู่สำหรับชำระล้างร่างกาย ซักล้างเสื้อผ้า และของใช้ มีบันทึกไว้ว่าค้นพบโดย พ่อค้าชาวโปรตุเกสที่เดินเรือไปทวีปอเมริกากลาง และนำเข้ามาในทวีปเอเชีย

การปลูกสบู่ดำในประเทศไทยนั้น เริ่มจากชาวโปรตุเกสนำเข้ามาในช่วงปลายกรุงศรีอยุธยา เพื่อนำเมล็ดไปบีบอัดเอาน้ำมันสำหรับทำสบู่ และใช้น้ำมันจากเมล็ดของสบู่ดำมาจุดตะเกียงโดยเฉพาะสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ซึ่งเวลานั้นขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงอย่างมาก จึงมีการปลูกสบู่ดำแพร่กระจายไปทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ทำให้พืชนี้มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามท้องถิ่น โดยภาคกลางเรียกว่า สบู่ดำ ภาคเหนือเรียก มะหุ่งฮั้ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียก มะเยาหรือสีหลอด ภาคใต้เรียก มะหงเทศหรือยาเคาะ แม้สบู่ดำจะเป็นพืชที่ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยมากกว่า 300 ปี มาแล้ว แต่ประเทศไทยยังมีความรู้เกี่ยวกับสบู่ดำน้อยมาก เนื่องจากไม่ค่อยมีคนให้ความสนใจ เพียงปลูกเป็นพืชริมรั้วเท่านั้น (พรชัย, 2549)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ

สบู่ดำมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ (รูปที่ 1) ทรงพุ่มมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร มีอายุไม่ต่ำกว่า 50 ปี

1.1.1 ลำต้น (stem) เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 2-7 เมตร มีอายุยืนไม่น้อยกว่า 20 ปี ลำต้นและยอดคล้ายละหุ่งแต่ไม่มีขน ลำต้นเกลี้ยงเกลาอวบอ้วน เป็นไม้เนื้ออ่อนใช้มือหักออกได้ง่ายเพราะเนื้อไม้ไม่มีแก่น ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ขึ้นในที่ดอนดินลูกรัง ถิ่นทุรกันดาร หากปลูกในที่ลุ่มน้ำท่วมขังใบจะเหี่ยว และต้นเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนเขียว ลำต้นและกิ่งจะมียาง (http://aopdm04.doae.go.th/saboo/saboo.htm)

รูปที่ 1 ต้นสบู่ดำ

ที่มา : ภาพจากคณะผู้วิจัย

1.1.2. ใบ (leaf) สบู่ดำเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เมล็ดที่โผล่พ้นดินมีใบเลี้ยง 2 ใบ มีลักษณะกลมรี ขอบใบเรียบต่อจากนั้นจึงจะแตกใบจริงขึ้นมา โดยใบเป็นใบเดี่ยว แบบฝ่ามือ (palmate) เรียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวแบบสลับ (alternate) รูปร่างใบเป็นรูปหัวใจกว้างถึงรูปไล่ คล้ายๆ ใบฝ้าย ใบพุดตาล หรือใบละหุ่ง แต่หนากว่า เพราะมีไข (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิว แผ่นใบเรียบ ขอบใบหยักเป็นพู มี 5-7 แฉก พูข้างปลายมน พูปลายหรือพูกลางรูปหัวใจปลายแหลม การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแห

1.1.3. ดอก (flower) ดอก ออกบริเวณปลายกิ่งลักษณะเป็นช่อดอกแบบ compound dichasia เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่แยกกัน (monoecious) แต่อยู่ภายในช่อดอกเดียวกัน (รูปที่ 2) โดยออกเป็นช่อบริเวณซอกใบส่วนปลายของยอด ช่อดอกยาวประมาณ 6-10 เซนติเมตร ลักษณะดอกเป็นรูปถ้วย ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียมีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกจำนวน 5 กลีบ เท่าๆ กัน กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อนอมเหลือง กลีบดอกมีสีเหลืองอมขาว มีต่อมน้ำหวานติดอยู่ที่โคนด้านในของกลีบดอก ดอกตัวผู้มีจำนวนเกสรตัวผู้จำนวน 10 อัน เรียงเป็นวงวงละ 5 อัน 2 ชั้น ดอกตัวเมียประกอบด้วยรังไข่ และยอดเกสรตัวเมียเป็นรูปสามง่าม ส่วนของรังไข่แบ่งออกเป็น 3 พู (carpel) อัตราส่วนของตัวผู้ : ดอกตัวเมีย ประมาณ 7:1 สบู่จัดเป็นพืชผสมข้าม ดอกตัวผู้ในช่อเดียวกันบานก่อนที่ดอกตัวเมียพร้อมที่จะรับการผสม (receptive) จึงต้องมีแมลงช่วยในการผสมพันธุ์ เช่น ผีเสื้อกลางคืน และผึ้ง โดยดอกตัวผู้และตัวเมียจะมีความพร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ในช่วงกลางคืน ดอกสมบูรณ์เพศหรือดอกกะเทยที่สามารถผสมตัวเองได้ จะพบในปริมาณน้อย ปริมาณดอกย่อยประมาณ 70-120 ดอก ต่อ 1 ช่อ แต่จะติดผลเพียง 6-15 ผลเท่านั้น (http://it.doa.go.th/vichakan/new.php/newsid=15)

รูปที่ 2 ดอกของสบู่ดำ

ที่มา : ภาพจากคณะผู้วิจัย

1.1.4 ผล (fruit) ผลโตเกลี้ยง รูปทรงของผลค่อนข้างจะเป็นรูป 6 เหลี่ยม ผลจะออกเป็นช่อพวง ผลดิบสีเขียวอ่อนเวลาสุกจะมีสีเหลืองสดคล้ายลูกจันทร์ผลหนึ่งมี 3 พู แต่ละพูจะทำหน้าที่ห่อหุ้มเมล็ดเอาไว้ (http://aopdm04.doae.go.th/saboo/saboo.htm)

1.1.5 เมล็ด (seed) เมล็ดมีสีดำขนาดเล็กกว่าเมล็ดละหุ่งพันธุ์ลายขาวดำเล็กน้อย (รูปที่ 3) สีตรงปลายของเมล็ดมีจุดกำเนิดสีขาวเล็กๆ ติดอยู่พอนานๆ ไปจุดนี้จะหดตัวเหี่ยวแห้งลง และเมื่อแกะเปลือกชั้นนอกที่หุ้มเมล็ดออกจะพบเนื้อในสีขาว แบบเนื้อในของเมล็ดละหุ่ง ขนาดของเมล็ดสบู่ดำยาว 17-19 มิลลิเมตร หนา 8-9 มิลลิเมตร น้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 69.8 กรัม ภายใน

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อสีขาวของเมล็ดสบู่ดำประกอบด้วยธาตุต่างๆ และเมล็ดของสบู่ดำนั้นมีสารเคอร์ซิน (curcin) กรดไซยานิค (cyanic acid) และโพโบเลสเตอร์ (phorbolester) ซึ่งเป็นสารพิษพวกหนึ่ง

รูปที่ 3 เมล็ดและผลของสบู่ดำ

ที่มา : ภาพจากคณะผู้วิจัย

1.2 ประโยชน์ของสบู่ดำ ประโยชน์ของสบู่ดำมีหลายประการ คือ

1.2.1 เป็นแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ โดยการนำเมล็ดของสบู่ดำมาสกัดน้ำมัน โดยสามารถใช้น้ำมันของสบู่ดำแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องยนต์ทางการเกษตร เนื่องจากสามารถนำน้ำมันสบู่ดำมาใช้ได้โดยไม่ต้องผสมกับน้ำมันดีเซล และมีราคาไม่แพง ต่างจากน้ำมันชีวภาพอื่นๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม จะต้องผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้ นอกจากนี้การใช้น้ำมันสบู่ดำยังให้ผลดีกว่าน้ำมันแก๊ส (gas oil) เพราะน้ำมันสบู่ดำมีค่าออกซิเจนสูงและมีสารหล่อลื่นให้เครื่องยนต์ทำงานได้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำแสดงอยู่ในตารางที่ 1 (ระพีพันธุ์ และสุขสันต์, 2544)

1.2.2 ประโยชน์จากลักษณะของการปลูกสบู่ดำ (รังษี และอมรรัชฎ์, 2548)

- เป็นรั้วล้อมรอบพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจหลักๆ เพื่อป้องกันสัตว์เลี้ยงเข้ามาทำความเสียหายต่อพืชชนิดนั้น เนื่องจากมีกรดไฮโดรไซยานิด (hydrocyanic) มีกลิ่นเหม็นเขียว

- การปลูกสบู่ดำช่วยลดการกัดเซาะของหน้าดินจากลมและน้ำ รากของสบู่ดำช่วยยึดเกาะผิวดิน เปรียบเสมือนสมอเรือ และยังทำให้อัตราการไหลของน้ำลดลงอีกด้วย เมื่อเกิดภาวะน้ำท่วม

- ปลูกพืชอื่นแซมในแปลงปลูกสบู่ดำ สารเคมีจากต้นสบู่ดำจะปลดปล่อยออกมาขับไล่แมลงศัตรูของพืชนั้น

1.2.3 การใช้เป็นอาหารของคน ส่วนของใบอ่อนหรือยอดอ่อนเมื่อนำไปนึ่งด้วยไอน้ำร้อน เพื่อทำลายกรดไฮโดรไซยานิคซึ่งเป็นสารพิษ จึงสามารถนำไปรับประทานได้อย่างปลอดภัย บางพื้นที่ของประเทศเม็กซิโกนำเมล็ดสบู่ดำมาต้มและคั่วด้วยความร้อนสามารถนำรับประทานได้

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 สมบัติทางฟิสิกส์และทางเคมีของน้ำมันสบู่ดำ

คุณสมบัติทางฟิสิกส์และทางเคมี	ร้อยละ
ความชื้น	7.13
น้ำมันทั้งเมล็ด	34.96
น้ำมันเนื้อในเมล็ด	54.68
กรดไขมันอิ่มตัว	21.28
- palmitic(C 18:0)	16.7
- stearic(C 18:0)	5.11
ดัชนีหักเหที่ 25 องศาเซลเซียส	1.4670
ค่ากรด (กรดไขมันอิสระโอเลอิก)	4.8
ความถ่วงจำเพาะที่ 25 องศาเซลเซียส	0.9136
กรดไขมันไม่อิ่มตัว	78.72
- oleic (C 18:1)	44.88
- linoleic (C 18:2)	33.83
ค่ากรด (กรดไขมันอิสระโอเลอิก)	4.8
ค่าสปอนนิฟิเคชั่น	197.13
ค่าไอโอดีน	97.08
ปริมาณน้ำและสิ่งระเหยได้ที่ 0.107	105 องศาเซลเซียส
ความหนืดที่ 25 องศาเซลเซียส	50GS

1.2.4 การใช้เป็นอาหารสัตว์ กากสบู่ดำ (press cake) ที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมีคุณค่าทางอาหารสูง แต่ประกอบไปด้วยสารพิษมากมายได้แก่ เคอร์ซิน (curcin), โฟโบลิค เอสเตอร์ (phorbolic ester), แซฟโพนิน (saponin) โปทิเอส (protease) และไฟเทท (phytates) จำเป็นต้องนำกากสบู่ดำมาผ่านความร้อนร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมี หรือการหมักกากน้ำมันสบู่ดำด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เพื่อทำลายพิษของสบู่ดำออกเสียก่อนนำไปผสมเป็นอาหารสัตว์

1.2.5 การใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรค

- ต้น ใช้เป็นยาถ่าย
- ลำต้น ใช้เป็นยารักษาโรคซางหรือตาลขโมย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปลือก ใช้เป็นยาถ่าย ขับพยาธิ แก้ปวดท้อง

- กิ่งก้าน ใช้ห้ามเลือด รักษาโรคฟัน โรคผิวหนัง

- ใบ ใช้เป็นยารักษาอาการไอและมีฤทธิ์เป็นสารต้านจุลินทรีย์ แก้พิษตานซาง แก้ปากและลิ้นพุพอง แก้ลิ้นเป็นฝ้าละออง ถอนพิษที่ทำให้ตัวร้อน

- เมล็ด ใช้เป็นยาระบาย ยาถ่ายชนิดรุนแรง แก้ปวดตามข้อ แก้โรคผิวหนัง

- น้ำมัน ใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง บรรเทาอาการเจ็บปวดจากโรคไขข้อหรือโรคปวดกล้ามเนื้อ และใช้เป็นยาถ่าย ซึ่งมีฤทธิ์รุนแรง

- น้ำยาง ใช้เป็นยารักษาอาการของโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด ต่อต้านการติดเชื้อ แก้ปวดฟัน แก้ปากเปื่อย พุพอง และผสมกับน้ำนมมารดากวาดป้ายลิ้นเด็กที่มีฝ้าขาวหรืออคอเป็นตุ่ม

1.2.6 การใช้เป็นสารป้องกันกำจัดโรค แมลงศัตรูพืช และหอย

- สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช (insecticides)

- สารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicides)

- สารป้องกันกำจัดหอย (molluscicides)

1.2.7 การใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์

ส่วนต่างๆ ของสบู่ดำจากต้นสดๆ สามารถนำมาทำเป็นปุ๋ยพืชสดได้ ส่วนกากของสบู่ดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันสามารถนำมาทำปุ๋ยอินทรีย์สำหรับบำรุงดินได้เป็นอย่างดีและราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับปุ๋ยเคมี เนื่องจากกากสบู่ดำมีอินทรียวัตถุคือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และเมื่อเปรียบเทียบกากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันกับปุ๋ยคอกมูลกระบือ มูลไก่ มูลเป็ด ปุ๋ยหมักจากฟางข้าว ผักตบชวา พบว่ากากสบู่ดำมีปริมาณไนโตรเจนมากกว่า แม้จะมีฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมน้อยกว่าปุ๋ยมูลไก่แต่ยังคงมากกว่าปุ๋ยอื่นๆ

1.2.8 ประโยชน์ด้านอื่นๆ ดังนี้

- ใช้น้ำมันสบู่ดำทำเป็นหมึกพิมพ์โรเนียว แต่น้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติแห้งช้า จึงต้องปรับปรุงของผงถ่านดำละเอียดที่ใช้เป็นสีในหมึกพิมพ์ให้พอเหมาะ

- ใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้น้ำมันสบู่ดำข้น เหนียว และไม่แห้ง เพื่อทำกาวบนเทปกระดาษ หรือกาวบนแผ่นเซลโลเฟน หรือกาวบนเทปผ้าได้

- ใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้น้ำมันสบู่ดำแห้งเร็ว เพื่อใช้เป็นสีทาบ้าน (ไม้ เหล็ก) โดยใช้สีเป็นส่วนผสม

- ใช้น้ำมันเป็นส่วนผสมในการทำสบู่

- ใช้ส่วนเปลือกและรากของสบู่ดำเป็นวัตถุดิบในการผลิตสีธรรมชาติ โดยส่วนเปลือกให้สีน้ำเงิน และส่วนรากให้สีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การรวบรวมพันธุ์ของสบู่ดำ

พืชสกุลเดียวกับสบู่ดำที่พบในประเทศไทย พบ 5 ชนิด คือ (http://it.doa.go.th/vichakan/new.php/newsid=15)

1.3.1 *J. curcas* L. (สบู่ดำ)

1.3.2 *J. gossypifolia* L. (สบู่แดง)

1.3.3 *J. podagrica* Hook.f. (หนุมารนั่งแท่น)

1.3.4 *J. integerrim* Jacq. (ปัตตาเวีย)

1.3.5 *J. multifida* L. (มะละกอฝรั่ง, ฝิ่นต้น)

ในประเทศไทยมีการรวบรวมสายพันธุ์สบู่ดำ เพื่อเป็นแหล่งพันธุกรรมโดยรวบรวมท่อนพันธุ์จาก 4 ภาคของประเทศ ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ นำมาปลูกและทำการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ รวมทั้งผลผลิต จากการศึกษาลักษณะของผลสบู่ดำจากแหล่งต่างๆ (ทวีศักดิ์, 2548) พันธุ์ของสบู่ดำที่พบในประเทศไทย มี 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สบู่ดำที่มีผลทรงกลม ซึ่งจะมีขนาดของผลป่านกลาง มีเปลือกหนาป่านกลาง ปลูกกันทั่วไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ พันธุ์สบู่ดำที่มีผลทรงกลม หรือรูปทรงของผลยาวกว่าพวกแรกเล็กน้อย ส่วนผลนั้นมีขนาดเท่ากัน แต่มีเปลือกหนากว่า ปลูกมากในภาคเหนือ และพันธุ์สบู่ดำที่มีผลกลม แต่มีขนาดเล็กกว่า 2 พวกแรก ปลูก ในภาคเหนือ และภาคใต้ โดยพันธุ์ของสบู่ดำนั้นเป็นพันธุ์พื้นบ้านจะเรียกชื่อตามแหล่งปลูก เช่น พันธุ์สตูล มุกดาหาร น่าน โคราช เป็นต้น ซึ่งสายพันธุ์ของสบู่ดำจากต่างประเทศ กรมวิชาการเกษตรได้รับสายพันธุ์จากต่างประเทศ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากประเทศฟิลิปปินส์ สายพันธุ์จากประเทศศรีลังกา และสายพันธุ์จากประเทศมาเลเซีย

1.4 การขยายพันธุ์สบู่ดำ

จากประโยชน์ของสบู่ดำทำให้ทั้งภาครัฐ และภาคเอกชน ต้องการส่งเสริมให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูกสบู่ดำเป็นจำนวนมาก เพื่อใช้ในการวิจัยพัฒนาในการผลิตต้นพันธุ์ เมล็ด และน้ำมันเป็นพลังงานทดแทน เพื่อการค้า โดยการขยายพันธุ์สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี (พรชัย, 2549) ดังนี้

1.4.1 การเพาะเมล็ด เมล็ดสบู่ดำไม่มีระยะพักตัว ควรเก็บผลขณะที่มีสีเหลืองแก่แกมน้ำตาลแล้วนำเมล็ดที่ได้มาเพาะทันที เพราะจะมีความงอกดีกว่าเมล็ดที่ทิ้งไว้นาน โดยนำเมล็ดมาเพาะในถุงเพาะหรือกระบะทราย อย่างน้อย 45-60 วัน จึงย้ายปลูก สำหรับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดจะให้ผลผลิตหลังการย้ายปลูกประมาณ 8-10 เดือน

1.4.2 การปักชำ โดยคัดเลือกท่อนพันธุ์ที่มีสีน้ำตาลปนเขียว ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป ตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร เพาะในถุงดำ หรือ 45-50 เซนติเมตร สำหรับเพาะในแปลง ใช้เวลาปักชำประมาณ 2 เดือน จึงนำไปปลูก โดยจะให้ผลผลิตหลังการย้ายปลูกประมาณ 6-8 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยนำส่วนต่างๆ ของสบู่ดำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ใบก้าน ข้อ และยอด เป็นต้น

ในความรู้พื้นฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อนุรักษ์ (2550) อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารต่างๆ แต่ละสูตรจะมีชื่อเรียกต่างๆ กัน ตามชื่อผู้คิดค้น เช่น

White (1943) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ

Vacin และ Went (1949) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

Murashige และ Skoog (1962) ค้นพบสูตร MS เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ

Linsmaier และ Skoog (1965) ค้นพบอาหารสูตร LS

Nitch และ Nitch (1969) ค้นพบสูตรอาหาร NN

Gamborg และคณะ (1968) ค้นพบสูตรอาหาร B_5

Chu (1975) ค้นพบสูตร N_6 เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด

Lloyd และ McCown (1980) ค้นพบสูตร WPM เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็ง

Driver และ Kuniyuki (1984) ค้นพบสูตร DKW เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวอลนัส

อย่างไรก็ตามสูตรอาหารต่างๆที่มีอยู่มากมายในปัจจุบันเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

1.ธาตุอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก (macronutrients หรือ major elements) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมาก และขาดไม่ได้ โดยทั่วไปพืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณ 25-60 มิลลิโมล หรืออาจจะมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 แร่ธาตุอาหารรอง (micronutrients หรือ trace elements) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมล โคบอลต์ (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล ทองแดง (Cu) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล โดยทั่วไปพืชต้องการแร่ธาตุอาหารรองไปใช้ในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. สารอินทรีย์ (organic substances หรือ organic salts) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 คาร์โบไฮเดรต ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน ที่มีส่วนสำคัญในการให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีทั้งชนิดที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยปกติจะใช้น้ำตาลปริมาณ 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเตรียมอาหาร 1 ลิตร หรือพบในบางรายงานอาจใช้ปริมาณมากกว่านี้ ตัวอย่างน้ำตาลที่ใช้ได้แก่

- **กลูโคส** (glucose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16
- **ฟรักโทส** (fructose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16
- **กาแลกโทส** (galactose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16
- **ซอบิทอล** (sobitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17
- **แมนนิทอล** (mannitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17
- **ซูโครส** (sucrose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30
- **มอลโทส** (maltose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30
- **ซูคราโลส** (sucralose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 397.64

2.2 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีสำคัญมาก มีผลทำให้พืชมีการพัฒนา และเจริญเติบโต มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

- **ไทอามีน** (thiamine) หรือวิตามิน B_1 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{17}N_4OS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 265.35 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร
- **อินโนสิทอล** (inositol) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.15 ปกติจะใช้ในรูปของไมโอ-อินโนสิทอล (myo-inositol)ใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
- **ไนอะซิน** (niacin) หรือกรดนิโคทินิก (nicotinic acid) หรือเรียกว่าวิตามิน B_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_5NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 123.11 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- **ไพริดอกซิน** (pyridoxine) หรือวิตามิน B_6 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_{11}NO_3$ น้ำหนักโมเลกุล 169.18 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร
- **ไบโอติน** (biotin) หรือวิตามิน H หรือวิตามิน B_7 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ น้ำหนักโมเลกุล 244.31 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- **อะดีนีน** (adenine) หรือวิตามิน B_4 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $\underline{C_5H_5N_5}$ น้ำหนักโมเลกุล 135.13
- **กรดแอสคอบิก** (ascorbic acid) หรือวิตามิน C สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_8O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 176.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **กรดโฟลิก** (folic acid) หรือวิตามิน M หรือวิตามิน B_9 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{19}H_{19}N_7O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 441.14

- **กรดแพนโททีนิก** (pantothenic acid) หรือแคลเซียมแพนโททีเนต (calcium pantothenate) หรือเรียกว่าวิตามิน B_5 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_9H_{17}NO_5$ น้ำหนักโมเลกุล 219.24

- **ไซยาโนโคบาลามิน** (cyanocobalamine) หรือวิตามิน B_{12} สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{63}H_{90}CoN_{14}O_{14}P$ น้ำหนักโมเลกุล 1355.4

- **โคลีน คลอไรด์** (choline chloride) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_5H_{14}ONCl$ น้ำหนักโมเลกุล 139.63

- **ไรโบฟลาวิน** (riboflavin) หรือวิตามิน B_2 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{17}H_{20}N_4O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 376.37

2.3 กรดอะมิโน (amino acid) กรดอะมิโนมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก กรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ไกลซีน (glycine) ใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อะลานีน (alanine) และ อาร์จีนีน (arginine) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปาราจีน (asparagine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสปาติก (aspartic acid) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีสทีน (cystein) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน (glutamine) และ กรดกลูตามิก (glutamic acid) ใช้ประมาณ 8 มิลลิโมล ลิวซีน (leucine) เมทไทโอนีน (methionine) และ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน (proline) ใช้ประมาณ 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซอรีน (serine) ทริปโตเฟน (tryptophan) และไทโรซีน (tyrosine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น โดยทั่วไปประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปของ L มากกว่าในรูปของ D ในบทนี้จะขอกล่าวถึงกรดอะมิโนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับมวลโมเลกุล การเก็บรักษา และตัวทำละลาย

2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ขึ้นได้เอง และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช เร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

2.4.1 ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส ออกซินปกติจะพบในรูปของกรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acitic acid : IAA) ส่วน IAA ที่ผลิตจากทริปโตเฟนหรืออินโดล โดยส่วนมากพบได้ในใบอ่อนที่กำลังงอก และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาในขณะที่มีการงอก สาร IAA จะมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ควบคุมการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และมีผลในการกระตุ้นการเกิดรากออกซินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.1 พวกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

-กรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acetic acid) หรือ 3-indolacetic acid เรียกย่อๆ ว่า IAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_9NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 175.19 สามารถละลาย ในอะซิโตน และอีเทอร์

2.4.1.2 พวกที่สังเคราะห์ขึ้น

- กรดแอลฟาแนพทาลีนอะซิติก (α-napthalene acetic acid) หรือ 1-napthalene acetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า NAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{10}O_2$ ($C_{10}H_7CH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 186.21 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

- กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อๆ ว่า 2,4-D สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_6Cl_2O_3$($Cl_2C_6H_3OCH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

-กรด 2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4,5Trichlorophenoxyacetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2,4,5-T สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_5Cl_3O_3$($Cl_3C_6H_2OCH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 255.48 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

- กรดอินโดล-3-บิวทีริก (3-idole butyric acid) หรือ indol-3-butyric acid หรือ 4-[3-indoly] butyric acid หรือ เรียกย่อๆ ว่า IBA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{13}NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 203.24 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และอะซิโตน

- กรดพารา-คลอโรฟีนอกซีอะซิติก (p-chlorophenoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อๆ ว่า 4-CPA หรือ PCPA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_7ClO_3$($ClC_6H_4OCH_2COCl$) น้ำหนักโมเลกุล 186.59

- กรด 2-แนพทอกซีอะซิติก (2-naphthoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อๆ ว่า NOA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{10}O_3$($C_{10}H_7OCH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 202.21 เป็นผลึกสีเทา สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และกรดอะซิติก

- กรด 3,6-ไดคลอโร-ออโท-อะนิสิก (3,6-dichloro-o-anisic acid) หรือ 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid หรือ 3,6-dichloroanisic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า dicamba สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_6Cl_2O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ และอะซิโตน

-กรด 4-อะมิโน-3,5,6-ไตรคลอโรพิโคลินิก (4-amino-3,5,6-trichloro picolinic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า picloram สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_3Cl_3N_2O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 241.46 สามารถละลายในน้ำ และอะซิโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **กรดฟีนีลอะซิติก** (phenylacetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า PAA สูตรทางเคมี $C_8H_8O_2$ $C_6H_5CH_2CO_2H$ น้ำหนักโมเลกุล 136.15 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ และอีเทอร์

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์โดยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลส และการเจริญของลำต้น

2. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิก

3. กระตุ้นการเกิดรากบริเวณลำต้นที่ถูกตัด และพัฒนาการเกิดรากแขนงให้สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับของออกซินในต้นพืชกับสภาพแวดล้อม

4. ส่งเสริมให้มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ใช้ลำเลียงน้ำและอาหาร

2.4.2 ไซโตคินิน (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีนซึ่งพบได้หลายชนิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไซโตไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดีนิน โดยจะเกิดในบริเวณปลายราก และเอ็มบริโอที่กำลังเจริญ มีผลต่อการแสดงออกของพืช คือสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม นอกจากนี้ยังกระตุ้นการเจริญทางด้านข้างของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง ชะลอการแก่ของพืช โดยสารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่

- **6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน** (6-furfurylaminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า ไคนีทีน (kinetin) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_9N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล215.2 สามารถละลายในเมทานอล และเอทานอล

- **6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน** (6-benzylaminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า BA หรือ BAP สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{11}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 225.26 สามารถละลายในเมทานอลและเอทานอล

- **2-ไอโซเพนทินิลอะมิโนเพียวรีน** (2-isopentenylaminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2iP สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{13}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 203.3 ละลายใน 1N. NaOH

- **ซีเอทิน** (zeatin) หรือ 6-(4-ไฮดรอกซี-3-เมทิล-ทราน-2-บิวทีนิวอะมิโน) เพียวรีน (6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino) purine) หรือเรียกย่อๆ ว่า zea เป็นสารที่เกิดในธรรมชาติ สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{13}N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 219.25 ลักษณะสีขาวปนเหลืองๆ ละลายใน 1N. NaOH

ผลของไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์
2. กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์
3. สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดหลายๆ ยอดได้ (multiple shoots)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 จิบเบอร์เรลลิน (gibberellin) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid) สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญขึ้น กรดจิบเบอร์เรลลิก สามารถที่จะเคลื่อนย้ายผ่านท่อน้ำและท่ออาหารได้

กรดจิบเบอร์เรลลิก หรือเรียกย่อๆ ว่า GA_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{19}H_{22}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346.38 สามารถละลายใน เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน

ผลของจิบเบอร์เรลลินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. กระตุ้นทั้งการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์
2. ชักนำให้เมล็ดเกิดการงอกโดยการกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์จำนวนมาก โดยเฉพาะแอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ในพืชที่กำลังงอก

2.5 สารอื่น ๆ เช่น สารอินทรีย์อื่นๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน (coconut milk) น้ำมะเขือเทศ (tomato juice) น้ำองุ่น (grape juice) น้ำมันฝรั่ง (potato juice) กล้วย (banana) น้ำข้าวโพด (corn milk) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) และอื่นๆ บทบาทของสารอินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ผงถ่าน (activated charcoal) เมื่อเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกมาจากเซลล์ เช่น พวกฟีนอลิกต่างๆ จะทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่ได้รับอันตรายต่อสารดังกล่าว และสามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ข้อเสียของผงถ่าน คือผงถ่านสามารถยึดเกาะกับโมเลกุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปในอาหารได้ และมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่สามารถดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตมาใช้ได้อย่างเต็มที่ และทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ มักใช้ผงถ่านที่ความเข้มข้นประมาณ 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์

2.6 วุ้น (agar) ทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะของเนื้อเยื่อพืช ใช้สำหรับการเตรียมอาหารแบบเป็นอาหารแข็งและอาหารกึ่งแข็งได้ สำหรับวุ้นทั่วๆไป ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.8-1 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาบริษัท FMC ได้พัฒนาวุ้นที่มีคุณภาพสูง ชื่อว่า Sea Plaque ที่ใช้งานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.35-0.7 เปอร์เซ็นต์ และบริษัท Sigma Chemical ผลิตวุ้นมีชื่อว่า Phytagel หรือบริษัท Kelco Crop ผลิตวุ้นมีชื่อว่า Gelrite เป็นวุ้นที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูงและมีราคาแพง โดยปกติใช้ความเข้มข้นประมาณ 1.25-2.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเตรียมอาหารเสร็จเรียบร้อยแล้วลักษณะของวุ้นจะใส ซึ่งมีประโยชน์มากในการตรวจสอบการเจริญเติบโตของราก และตรวจสอบการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆ ส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

ส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

1. เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาประมาณไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2. เนื้อเยื่อบริเวณปลายราก (root apex) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณถัดจากส่วนของหมวกราก (root cap) ซึ่งจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับบริเวณส่วนของปลายยอด

3. เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในบริเวณส่วนของราก และลำต้น โดยจะอยู่บริเวณระหว่างกลุ่มของท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem)

4. เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

5. เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

- **ส่วนของเปลือกชั้นใน** (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อท่ออาหาร และ cortex
- **ส่วนไส้** (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา
- **ใบ** (leaf) ในส่วนของใบมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่เป็นจำนวนมาก เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์
- **ดอก** (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา
- **ผล** (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา
- **เมล็ด** (seed) ในบริเวณส่วนของเมล็ดจะประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ เอ็มบริโอ เอ็นโดสเปิร์ม และใบเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็มบริโอภายในเมล็ดจะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จค่อนข้างสูง

การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรงไคมา (parenchyma) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสมีขนาดต่างๆ กันหลายรูปแบบ มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคคิวโอลสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ ฉ่ำน้ำ คล้ายกับฟองน้ำ เรียกว่า friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน เนื้อเยื่อพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สามารถที่จะชักนำให้พัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ ยกตัวอย่างเช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ลำต้น ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เมล็ด เรณู อับเรณู แคมเบียม คอร์เทกซ์ และท่อลำเลียงอาหาร เป็นต้น

ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

1. สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึงสารในกลุ่มของออกซิน และไซโทไคนิน ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช โดยขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินและไซโทไคนิน เช่น ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินมีค่าอัตราส่วนสูง เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นราก แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินมีอัตราส่วนต่ำ เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นส่วนยอด และถ้าในอัตราส่วนที่สมดุล เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นรากและยอด แต่ในบางกรณีก็ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินเสมอไป อาจขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ

2. ธาตุอาหารชนิดต่างๆ เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท กลูตามีน แอลฟา-คีโตกลูตาลิก โพรลีน แอสปาราจีน อาร์จินีน และซิลเวอร์ไนเทรต นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าว ยังมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน

3. แหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลซอบิทอล น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลกาแลกโทส เป็นต้น ซึ่งโดยปกติจะใช้น้ำตาลประมาณ 20-40 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์

4. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะต้องใช้แสงที่มีความเข้มต่ำ หรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

5. สถานะของอาหารที่ใช้เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งจะทำให้แคลลัสมีพื้นที่ผิวสัมผัสอาหารน้อยกว่า

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ จากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆ สามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้ว หรือช้อนตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

137313

ควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย มีหลายวิธี ได้แก่

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใน microchamber เป็นวิธีที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยซึ่งประกอบด้วยเซลล์เดี่ยวๆ กระทำได้โดยหยดเซลล์แขวนลอยบนกระจกปิดสไลด์ แล้วคว่ำกระจกปิดสไลด์บนสไลด์หลุม เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวๆ ด้วยวิธี handing drop technique บางกรณีอาจใช้กระจกปิดสไลด์สองแผ่นมาวางบนแผ่นสไลด์หลุมให้ห่างกันพอสมควร แล้วจึงวางกระจกปิดสไลด์อีกอันหนึ่งที่มีเซลล์เดี่ยวๆ หยดอยู่คว่ำลงไประหว่างกระจกปิดสไลด์ทั้งสอง การเพาะเลี้ยงโดยวิธีนี้ให้ผลสำเร็จไม่สูงมากนัก เนื่องจากวิธีนี้นิยมใช้เฉพาะกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว หรือในกรณีที่มีเซลล์แขวนลอยจำนวนน้อยๆ เท่านั้น ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในการติดตามผลการเจริญของเซลล์แขวนลอยอย่างใกล้ชิด

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยวิธีนี้นิยมใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในปริมาณไม่มาก โดยนำเซลล์แขวนลอยใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50-2,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีทั้งชนิดที่สามารถปรับอุณหภูมิได้ และปรับไม่ได้ ด้วยอัตราเร็ว 30-150 รอบต่อนาที โดยปริมาณอาหารที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของขวดรูปชมพู่ โดยทั่วไปขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จะใช้อาหารเหลวประมาณ 20-25 มิลลิลิตร และขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะใส่อาหารเหลวประมาณ 50-70มิลลิลิตร ถ้าปริมาณอาหารเหลวน้อยเกินไป อาจมีผลทำให้เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้รับอันตรายจากแรงเหวี่ยงของเครื่องได้ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยวิธีนี้จะต้องเปลี่ยนอาหารให้เซลล์แขวนลอยอยู่สม่ำเสมอทุกๆ 5-20 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยง การเปลี่ยนอาหารบ่อยๆ อาจทำให้เซลล์แขวนลอยขาดการเติบโตอย่างต่อเนื่อง การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยวิธีนี้เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในห้องปฏิบัติการสำหรับการวิจัยต่างๆ เช่นการศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของพืชชนิดต่างๆ เป็นต้น

3. การเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง การเพาะเลี้ยงโดยวิธีนี้คล้ายกับวิธีการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่า แต่อัตราเร็วในการหมุนของเครื่องจะแตกต่างกัน วิธีนี้นิยมใช้เซลล์แขวนลอยในปริมาณไม่มาก โดยนำเซลล์แขวนลอยใส่หลอดทดลอง แล้วนำหลอดทดลองนั้นไปวางบนเครื่องเขย่า ซึ่งจะหมุนเป็นวงกลมในแนวตั้งฉากกับพื้นด้วยอัตราเร็ว 30-150รอบต่อนาที ซึ่งขึ้นอยู่กับความต้องการและปริมาณอาหารในหลอดทดลอง โดยทั่วไปใช้หลอดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวประมาณ 40-50 มิลลิลิตร การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยวิธีนี้สามารถใส่หลอดทดลองได้ในปริมาณมาก และควรเปลี่ยนอาหารให้เซลล์แขวนลอยอยู่สม่ำเสมอทุกๆ 5-20 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยวิธีนี้เหมาะสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในห้องปฏิบัติการสำหรับการวิจัยต่างๆ เช่นการศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเพิ่มปริมาณเซลล์ในหลอดทดลอง เป็นต้น

4. การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยวิธีนี้ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมากขนาดตั้งแต่ 1-20 ลิตร โดยการนำเซลล์แขวนลอยไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งมีระบบการกวนโดยใช้แกนมอเตอร์ลักษณะคล้ายใบพัดช่วยให้เซลล์แขวนลอยภายในมีการเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลา เซลล์แขวนลอยจะถูกตรวจสอบตลอดเวลาเพื่อให้มีการเติมอาหารเหลว อากาศ และสามารถปรับอุณหภูมิภายในให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต และมีระบบการควบคุมโดยใช้คอมพิวเตอร์ เนื่องจากการผลิตเซลล์แขวนลอยโดยวิธีนี้จะต้องใช้เครื่องมือที่มีความทันสมัย และราคาแพง สิ้นเปลืองแรงงานน้อย ซึ่งเราสามารถที่จะควบคุมขั้นตอนการผลิตเซลล์แขวนลอยได้อย่างสมบูรณ์ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยวิธีนี้ใช้ประโยชน์ในการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อการผลิตสารเคมีในทางอุตสาหกรรมและทางการแพทย์

รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจะมีการเติบโตแบ่งได้เป็น 4 ระยะ

1. Lag phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยจะมีการเจริญเติบโตน้อยมาก เนื่องจากเซลล์แขวนลอยต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพอาหารใหม่หลังจากการเปลี่ยนอาหาร ระยะนี้จะใช้เวลาที่ยาวนานขึ้น เมื่อปริมาณของเซลล์แขวนลอยที่เริ่มต้นมีปริมาณน้อย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทั่วไปจึงควรเริ่มต้นด้วยเซลล์แขวนลอยปริมาณ 9,000-15,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. Expotential phase หรือ log phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยมีอัตราการเจริญเติบโตสูง ทำให้ปริมาณของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เหมาะสำหรับนำเซลล์แขวนลอยไปใช้ในการศึกษากิจกรรมต่างๆ เช่น การเปลี่ยนอาหารใหม่ การนำเซลล์ไปแยกเป็นโพรโทพลาสต์ การนำเซลล์แขวนลอยไปทดสอบกับสารเคมี หรือเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และอัตราการตายของเซลล์แขวนลอยในระยะนี้จะน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะอื่นๆ โดยเซลล์แขวนลอยจะมีประมาณ 1-4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะ stationary

3. Stationary phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยจะมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับอัตราการตาย โดยปกติเซลล์แขวนลอยจะเข้าสู่ระยะนี้หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 10-25 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณของอาหาร และชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้) ถ้ามีการย้ายเซลล์แขวนลอยในอาหารใหม่ในระยะนี้เซลล์แขวนลอยจะเข้าสู่ระยะ lag phase ค่อนข้างนาน ดังนั้นระยะ stationary จึงเป็นระยะสุดท้ายที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย โดยทั่วไปผู้วิจัยจะต้องทราบว่าระยะเวลาช่วงใดจะต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ และจะไม่ยอมให้เซลล์แขวนลอยถูกปล่อยไว้นานมากจนกระทั่งอัตราการเกิดใหม่ของเซลล์แขวนลอยต่ำกว่าอัตราการตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Death phase เป็นระยะที่เซลล์แขวนลอยมีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเจริญ โดยปกติแล้วมักจะไม่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจนกระทั่งมาถึงระยะนี้ เนื่องจากเซลล์แขวนลอยจะตายหมด ดังนั้นจึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารก่อนที่ถึงระยะนี้ นอกจากจะทำการทดลองเกี่ยวกับการทดสอบสารบางชนิดว่าเซลล์แขวนลอยสามารถทนต่อการตายได้ในความเข้มข้นระดับเท่าใด

การหาลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่า ผู้วิจัยจะต้องหากราฟการเจริญเติบโต (growth curve) ระหว่างระยะเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยโดยวิธีหาน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ซึ่งทำให้ทราบได้ว่าจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ประมาณช่วงเวลาใด

การตรวจสอบการเจริญเติบโต

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาหารเหลวที่ถูกใช้ไปในช่วงระยะเวลาหนึ่งจะมีปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตและซากเซลล์แขวนลอยปะปนกันอยู่ ดังนั้นการตรวจนับจำนวนเซลล์แขวนลอยเป็นเรื่องที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นอย่างมาก เพราะถ้าปริมาณของเซลล์แขวนลอยต่อหน่วยปริมาตรของอาหารที่ต่ำเกินไป จะมีผลทำให้เซลล์แขวนลอยขาดสารอาหารและตายได้ในที่สุด ซึ่งจะมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารแข็งด้วย การตรวจวัดปริมาณเซลล์แขวนลอย สามารถทำได้โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การหาปริมาณเซลล์แขวนลอยที่อัดแน่น (packed cell volume) วิธีนี้เป็นวิธีวัดปริมาณเซลล์แขวนลอย แบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่

1.1 วิธีวัดปริมาณเซลล์แขวนลอย โดยดูดเซลล์แขวนลอยจำนวน 10 มิลลิลิตร มาใส่หลอดวัดปริมาตรที่มีขีดบอกปริมาตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 700-1,000 g ประมาณ 5 นาที สามารถทราบปริมาตรเซลล์แขวนลอยที่ตกตะกอนอัดแน่นอยู่ก้นหลอดว่ามีปริมาตรเท่าไร จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร

1.2 วิธีวัดปริมาณเซลล์แขวนลอยโดยใช้ปิเปตต์ปลายตัด โดยการใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์แขวนลอยในขวดรูปชมพู่ แล้วใช้ปลายปิเปตต์สัมผัสกับก้นขวดชมพู่ เพื่อปล่อยให้อาหารไหลออก จากปิเปตต์ และเหลือเฉพาะส่วนเซลล์แขวนลอยปลายปิเปตต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ถ้าต้องการตรวจสอบการเจริญโตของเซลล์แขวนลอยที่อายุ 20 วัน โดยใช้ปิเปตต์ปลายตัดดูดเซลล์แขวนลอยในขวดรูปชมพู่ทั้งหมด แล้วใช้ปลายปิเปตต์สัมผัสกับก้นขวดชมพู่ เพื่อปล่อยให้อาหารไหลออกจากปิเปตต์ แล้วเปรียบเทียบกับเซลล์เริ่มต้นที่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจะทราบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเท่าไร

2. การหาน้ำหนักสด (fresh weight) วิธีนี้จะต้องทำการชั่งน้ำหนักเซลล์ โดยต้องชั่งน้ำหนักของกระดาษกรองก่อน จากนั้นทำการกรองเซลล์แขวนลอยบนกระดาษกรองที่อยู่ในกรวยกรอง และล้างเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นบนกรวยกรองโดยใช้เครื่องดูดอากาศช่วย แล้วจึงนำกระดาษกรองพร้อมเซลล์แขวนลอยมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นคำนวณหาน้ำหนักสดของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แขวนลอย การหาน้ำหนักสดนี้จำเป็นต้องใช้เซลล์แขวนลอยจำนวนมากพอสมควรจึงจะได้ค่าที่ถูกต้องและแม่นยำ การแสดงน้ำหนักสดจะต้องแสดงต่อปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร

3. การหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) วิธีนี้ทำโดยนำเซลล์แขวนลอยที่หาน้ำหนักสดเรียบร้อยแล้ว มาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือในตู้อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาชั่งและอบต่อจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงจึงนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง วิธีนี้ต้องใช้เซลล์แขวนลอยจำนวนมากเพื่อจะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อยที่สุด และเซลล์แขวนลอยที่ใช้จะไม่สามารถนำกับมาใช้ได้อีก ถ้ามีเซลล์แขวนลอยจำนวนน้อยไม่ขอแนะนำให้ทำโดยวิธีนี้เพราะจะเกิดความคลาดเคลื่อนได้

4. การนับจำนวนเซลล์ (cell counter) วิธีนี้สามารถกระทำโดยนำเซลล์แขวนลอยที่เกาะกลุ่มกันมาทำให้กระจาย และนำเซลล์แขวนลอยมาปริมาตร 1 ส่วน มาเติมสารโครมิคไตรออกไซด์ ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ส่วน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-15 นาที เขย่าให้เซลล์แขวนลอยมีการกระจายตัวมากที่สุด จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมานับจำนวนบน hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ข้อเสียของวิธีนี้จะต้องกระจายเซลล์ให้เป็นเซลล์เดียวมากที่สุด ถ้าเซลล์มีการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนจะไม่สามารถนับเซลล์ได้

5. หาการแบ่งเซลล์ไมโทติก (mitotic index) วิธีนี้เป็นการตรวจสอบเพื่อดูการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยโดยดูจากการแบ่งเซลล์ ทดสอบโดยการนำเอาเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วยสีย้อมโครโมโซม เช่น aceto-orcein หรือ aceto-carmine ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ การแสดงค่า mitotic index จะเป็นการแสดงว่าในจำนวนเซลล์แขวนลอย 100 เซลล์ จะมีเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวอยู่กี่เซลล์ ต้องตรวจสอบเซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจจากเซลล์แขวนลอยจำนวนไม่น้อยกว่า 1,000 เซลล์ วิธีนี้ทำให้ทราบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตมากน้อยเพียงใด

6. การย้อมด้วยสี

6.1 ฟลูออเรสซีนไดอะซิเทต (fluorescence diacetate) มีชื่อเรียกย่อๆ ว่า FDA สีนี้เป็นสีย้อมชนิดพิเศษที่ใช้สำหรับการย้อมเซลล์ที่มีชีวิต ปกติเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเตอร์เรส (esterase) อยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเทต สีนี้จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เอสเตอร์เรสที่อยู่ภายในเซลล์แขวนลอย จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ เซลล์แขวนลอยที่มีการเรืองแสงจะมีสีเหลือง-เขียว แสดงว่าเซลล์แขวนลอยยังมีชีวิตอยู่ ถ้าเซลล์แขวนลอยมีการเรืองแสงมากแสดงว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตที่ดี และมีชีวิตจำนวนมาก แต่ถ้าเซลล์แขวนลอยมีการเรืองแสงน้อยหรือไม่ติดสี แสดงว่าเซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตได้ไม่ดี และส่วนใหญ่เป็นเซลล์แขวนลอยที่ไม่มีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 อีแวนส์ บลู (Evan's blue) เป็นสีที่นิยมใช้สำหรับย้อมเซลล์แขวนลอย ปกติใช้ในความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำ หรือนิยมละลายสีในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ระยะเวลาในการย้อมเซลล์แขวนลอยประมาณ 5-10 นาที แล้วนำเซลล์แขวนลอยมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยคุณสมบัติของสีจะติดสีฟ้าเฉพาะเซลล์ที่ตายหรือเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์อันเนื่องมาจากผนังเซลล์ถูกทำลาย

การใช้ประโยชน์จากเซลล์แขวนลอย ในด้านต่างๆ เช่น

1. การศึกษาด้านสรีรวิทยาของเซลล์แขวนลอย การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยมีผลทำให้ได้เซลล์ที่มีความสม่ำเสมอกันทั้งด้านรูปร่าง และคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นจำนวนครั้งละมากๆ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาถึงพฤติกรรมทางสรีรวิทยาของเซลล์ได้ง่ายยิ่งขึ้น

2. ใช้ผลิตสารเคมี เซลล์แขวนลอยของพืชหลายชนิดเมื่อได้รับการปฏิบัติดูแลเป็นอย่างจำเพาะเจาะจง เช่น การเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง อุณหภูมิที่เหมาะสม ในสภาพของสารอาหารที่มีเกลือแร่ และสารควบคุมการเจริญเติบโตอย่างเฉพาะเจาะจง มีผลทำให้เซลล์แขวนลอยเหล่านั้นอาจจะสร้างสารเคมีบางชนิดมากขึ้นกว่าปกติ ซึ่งสารทุติยภูมิเหล่านี้ ได้แก่ alkaloids, phenolic, anthraquinones, purpurin, terpnoid, resepine, shikonin และ steroid เป็นต้น ในบริษัทอุตสาหกรรมต่างๆ ได้นำเซลล์แขวนลอยของพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ขนาดใหญ่เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์แขวนลอยจำนวนมาก แล้วนำเซลล์แขวนลอยเหล่านั้นมาสกัดเป็นสารที่ต้องการ เช่น สาร rotenone จากต้นโล่ติ้น จากพืชในวงศ์ leguminosae สาร capsaicin จากเซลล์เนื้อเยื่อพริก สาร vanillin จากเซลล์ของ vanilla และสารสี betalain จากเซลล์ของ portulaca เป็นต้น

3. ใช้คัดเลือกพันธุ์ เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเป็นเวลานาน เซลล์แขวนลอยจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดมากขึ้น อาจมีผลทำให้สามารถที่จะคัดเลือกเซลล์แขวนลอยที่มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปได้ เซลล์แขวนลอยที่คัดเลือกได้นั้นอาจจะมีลักษณะพิเศษตามที่เราต้องการ แต่ต้นพืชที่เกิดจากเซลล์แขวนลอยเหล่านั้นๆ อาจจะไม่มีลักษณะพิเศษตามที่เราต้องการก็ได้ เพราะการแสดงออกของยีนขณะที่เป็นเซลล์แขวนลอยนั้นยังไม่สามารถแสดงผลออกมาได้

4. ศึกษาการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยที่ทนต่อสภาพต่างๆ

4.1 การทนต่อสภาพเครียดจากสารเคมี การคัดเลือกทำโดยนำเซลล์แขวนลอยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นซึ่งมีการเพิ่มหรือลดสารเคมีที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่ทนได้ก็สามารถรอดชีวิต และเจริญเติบโตต่อไปได้ สารที่นิยมเติมลงในอาหาร ได้แก่ สารกำจัดวัชพืช เพื่อหาพืชที่ทนต่อสารกำจัดวัชพืช เช่น สารกลูโฟซิเนต (glufosinate) สารฟอสฟิโนทริซิน (phosphinothricin) สารออกซีฟลูออร์เฟน (oxyfluorfen) สารไกลโฟเสท (glyphosate) เพื่อหาพืชที่ทนต่อสารไกลโฟเสท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอล-โพรลีน เพื่อหาพืชที่ทนความแห้งแล้ง และเกลือโซเดียมคลอไรด์ เพื่อหาพืชที่ทนดินเค็ม เป็นต้น

4.2 การทนต่อสภาพเครียดของน้ำ การคัดเลือกทำโดยนำเซลล์แขวนลอยมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มปริมาณของวุ้นให้มากขึ้น หรือเพิ่มสารพวกออสโมติคัม (osmoticum) บางชนิด เช่น สารโพลีเอทธีลีน ไกลคอล (polythylene glycol) หรือพีอีจี (PEG) น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ซูโครส (sucrose) และกลูโคส (glucose) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ลดแรงดันออสโมซิส (osmotic potential) ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ จากนั้นจึงคัดเลือกเซลล์ที่ทนทานต่อสารที่ใช้ในการคัดเลือก แล้วชักนำให้เซลล์แขวนลอยเหล่านี้พัฒนาเป็นต้น และทดสอบความทนแล้งของต้นพืชที่ได้ในรุ่นต่อๆ ไป

4.3. การทนต่อสารพิษจากเชื้อโรค เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเข้าทำลายเซลล์พืชได้โดยมีการปลดปล่อยสารที่เป็นพิษออกมาทำลาย ดังนั้นจึงได้มีการสกัดเอาสารพิษนั้นมาใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อคัดเลือกเซลล์แขวนลอยที่ไม่ถูกทำลาย และนำเซลล์แขวนลอยที่สามารถเจริญเติบโตได้มาเพื่อชักนำให้เกิดต้นพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารชนิดนั้นๆ ต่อไป เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการศึกษา ได้แก่ *Acremonium fusidioides, Alternaria alternate, Bacillus thuringiensis, Cladosporium cladosporioides, Epicoccum nigrum, Glomerella cingulata, Phytophthora infestans, Pseudomonas syringae* และ *Phoma lingan* เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Jatropha*

สำหรับการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผลิตต้นสบู่ดำและพืชในสกุล *Jatropha* ได้มีการวิจัย และพัฒนาจากห้องปฏิบัติการในหลายประเทศ เช่น อินเดีย บราซิล และออสเตรีย เป็นต้น เพื่อให้เกิดศักยภาพในการผลิตต้นสบู่ดำในปริมาณมาก ตามต้องการและสามารถนำออกปลูกได้ในสภาพธรรมชาติ โดยการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากชิ้นส่วนต่างๆ คือ ส่วนของใบ (leaf segment) ก้านใบ (petiole) ลำต้น (stem) ส่วนใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ส่วนเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ก้านช่อ-ดอก (peduncle) เอ็มบริโอ (embryo) ราก (root) และ ส่วนข้อ (nodal segment) ซึ่งมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสบู่ดำและพืชในวงศ์ Euphorbiaceae พอสรุปได้ดังนี้

Sujatha และ Dhingra (1993) ศึกษาการเพิ่มจำนวนของ *J. integerrima* โดยใช้ชิ้นส่วน ใบและก้านช่อดอก เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ให้เกิดตายอดได้ดีที่สุด คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากออกซินสามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 8-10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spera และคณะ (1996) ศึกษาประสิทธิภาพและความเข้มข้นของผงถ่าน (activated charcoal) และสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากชิ้นส่วนของเอ็มบริโอที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature embryos) ของ *J. podagrica* บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม GA_3 ที่เติม และไม่เติมผงถ่านความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดตายอดได้ดีที่สุด คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.29 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับผงถ่าน ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดและเกิดราก คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.90 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับผงถ่าน ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร

Sujatha และ Mukta (1996) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนต่างๆ ของ *J. curcas* พบว่า อาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดตายอดจากไฮโปคอทิล และก้านใบ คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์โดยสามารถชักนำให้เกิดตายอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่การใช้ zeatinความเข้มข้น 9.12 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดตายอดได้ 100 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดตายอดได้ 0 และ 55 เปอร์เซ็นต์ จากไฮโปคอทิลและก้านใบตามลำดับ สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสจากไฮโปคอทิลเกิดยอดคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์โดยชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้ 43 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจำนวนยอด 7.0 ยอด สำหรับอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้แคลลัสจากก้านใบพัฒนาเป็นยอดได้ 67 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจำนวนยอด 2.7 ยอด และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบพัฒนาเป็นยอดได้ 67 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจำนวนยอด 10.7 ยอด ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากออกซินสามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้ 88 เปอร์เซ็นต์

Spera และคณะ (1997) ศึกษาผลของ Kn และ 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *J. podagrica* โดยใช้ส่วนราก เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (4.6 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (9.1 ไมโครโมลาร์)Sujatha และ Reddy (2000) ศึกษาการตอบสนองของชิ้นเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของ *J. integerrima* ต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน โดยใช้ชิ้นส่วนลำต้น ก้านช่อดอก และใบ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA Kn และ zeatin ความเข้มข้น 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน ประเภท BA ให้ผลดีที่สุดในการชักนำชิ้นส่วนลำต้น ก้านช่อดอก และใบ ให้เกิดยอดได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 19.0-100.0 เปอร์เซ็นต์ โดยชิ้นส่วนที่เกิดยอดได้มากที่สุด คือ ลำต้น และใบ แต่ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kn และ zeatin ไม่สามารถชักนำให้ใบเกิดยอดได้

Sardana และ Batra (2000) ศึกษาการชักนำการเกิด somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของ *J. curcas* โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบให้เกิดเป็น embryogenic callus และ globular embryos คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นชักนำให้เกิดต้นโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ชักนำต้นให้เกิดรากบนอาหารแข็งครึ่งสูตรของ MS ที่เติมน้ำตาล ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และย้ายลงปลูกในแปลงพบว่ามีการเจริญเติบโตเป็นปกติ

Lin และคณะ (2002) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงในส่วนของตาข้างของเนื้อเยื่อสบู่ดำได้สำเร็จ และ Lu (2003) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ เช่น ยอดอ่อน ก้านใบ และ ใบ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดันแปลงที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของซีเอติน ไคนีติน และ BA

Rajore และคณะ (2002) ศึกษาการเพิ่มจำนวนของ *J. curcas* โดยใช้ชิ้นส่วนข้อ (node) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากข้อมากที่สุดคือ อาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการให้ ascorbic acid ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร citric acid ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร adenine sulphate ความเข้มข้น 25.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลูตามีน (glutamine) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลในการชักนำ และพัฒนาการเกิดยอดของ *J. curcas* ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดให้เกิดรากคือ อาหารแข็งครึ่งสูตรของMS ที่เติม α - Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำต้นที่ได้มาปลูกในแปลงโดยผสมดินต่อเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) อัตราส่วน 3 ต่อ 1 พบว่า พืชมีอัตราการรอด 70 เปอร์เซ็นต์

Qin และคณะ (2004) ศึกษาการเพิ่มจำนวนของ *J. curcas* โดยใช้ชิ้นส่วนอิพิคอทิล มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำอิพิคอทิลให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.22 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.49 ไมโครโมลาร์) และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.22 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (4.90 ไมโครโมลาร์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wei และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากส่วนของเมล็ดของสบู่ดำ โดยการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แกะเปลือกออก แล้วคีบเอมบริโอออกมา และฟอกฆ่าเชื้อด้วย 0.15 เปอร์เซ็นต์ $HgCl_2$ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2-0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตได้มากที่สุด การชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้น BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ที่มีทั้งยอดและราก ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จากนั้นสามารถชักนำออกปลูกในเรือนทดลองได้สำเร็จ

Rajore และ Batra (2005) ศึกษาการเพิ่มจำนวน *J. curcas* โดยใช้ส่วนปลายยอด (shoot tip) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่เติม 6-Benzylaminopurine (BAP), kinetin (Kn) และ indole-3-aceticacid (IAA) ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำปลายยอดให้เกิดยอดคือ อาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดให้เกิดราก คือ อาหารแข็งครึ่งสูตรของ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำต้นที่ได้มาปลูกในแปลงทดลองพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Thepsamran และคณะ (2006) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในหลอดทดลองของสบู่ดำ (*J. curcas*) จากยอดขนาด 0.7 เซนติเมตร ที่ได้จากตาข้าง โดยพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม N^6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 0.049 ไมโครโมลาร์ ให้ผลในการเกิดยอดทวีคูณดีที่สุด 5.9 ยอด ในเวลา 6 สัปดาห์ และทำการชักนำยอดให้เกิดราก โดยการย้ายยอดลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แล้วย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

Sarika และ Meenakshi (2008) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีผลในการชักนำให้เกิดราก และยอดของต้นสบู่ดำ ซึ่งสารที่เติมลงไปได้แก่ BA, IBA, NAA, อะดีนีนซัลเฟต, กลูตามีน, แอลอาร์จีนีน และกรดซิตตริก โดยทำการเพาะเลี้ยงตาข้างของสบู่ดำบนอาหารแข็งสูตร MS และ 1/2 MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ IBA 1 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และเมื่ออาหารสูตรดังกล่าวมาเติมอะดีนีนซัลเฟต กลูตามีน แอลอาร์จีนีน และกรดซิตตริก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ IBA 1 ไมโครกรัมต่อลิตร และเติมอะดีนีนซัลเฟต 25 ไมโครกรัมต่อลิตร กลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อลิตร แอลอาร์จีนีน 15 ไมโครกรัมต่อลิตร และกรดซิตตริก 25 ไมโครกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และอาหารแข็ง 1/2 MS ที่เติม IBA 3 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

นันท์นภัส และคณะ (2549) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ (*J. curcas*) โดยใช้ชิ้นส่วนก้านใบ เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดแคลลัสในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 1 และการชักนำให้เกิดยอดในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 โดยมีรอบการเพาะเลี้ยง 30 วันเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.44-17.76 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.049-9.80 ไมโครโมลาร์ พบว่า สารเร่งการเติบโตที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดจากก้านใบ คือ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ โดยแคลลัสจากก้านใบจะมีการพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุด

อนุรักษ์ และคณะ (2550) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโอของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) สายพันธุ์ สมก. 1 บนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร α- ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้นไฟตาเจล 2.6 กรัม ต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ที่ทุกระดับความเข้มข้นของ 2,4-D จากนั้นย้ายแคลลัสไปในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เจริญเป็นไมโครแคลลัส แล้วนำไมโครแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบน อาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร α- ketoglutaric acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่าไมโครแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นจุดสีเขียวได้ที่ทุกระดับความเข้มข้นของ BA

ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์ (2550) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ (*J. curcas*) โดยใช้ชิ้นส่วนตา ยอด ตาข้าง ใบอ่อน และก้านใบ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เนื้อเยื่อของชิ้นส่วนต่าง ๆ สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี โดยแคลลัสที่ได้เป็นแบบเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (embryogenic callus) ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นจำนวนมากต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อของใบอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโพรลีน (proline) ความเข้มข้น 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ เคซีนไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากโดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความหลากหลายของสบู่ดำโดยเทคนิคต่างๆ มีดังนี้

ปัจจุบันนิยมหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของพืชดอก Taberlet และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ชนิดใหม่ขึ้นมาเพื่อใช้ในการจำแนกพืช โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ tobacco ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

marchantia และ rice บริเวณยีน *trn*T (UGU) และ *trn*F (GAA) ซึ่งเป็น single-copy region ขนาดใหญ่ที่มีความจำเพาะ และพบว่ายีน *trn* เป็นยีนอนุรักษ์ เมื่อออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA 6 ชนิด คือ a, b, c, d, e, และ f แสดงดังตารางที่ 2. โดยไพรเมอร์ a และ b ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*T(UGU) และ *trn*L(UAA) 5'exon ไพรเมอร์ c และ d ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L(UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon และไพรเมอร์ e และ f ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L (UAA) 3'exon และ *trn*F (GAA) ขนาดของ PCR product ที่คาดว่าจะพบมีขนาด 773, 833 และ 251 bp. ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ a และ b ขนาด 577, 614 และ 389 bp. ตามลำดับ เมื่อใช้ ไพรเมอร์ c และ d และ ขนาด 438, 324 และ 158 bp. ตามลำดับเมื่อใช้ไพรเมอร์ e และ f ในพืชชนิด tobacco , marchantia และ rice เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน algae, bryophytes, pteridophytes, gymnosperms และ angiosperm จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ c และ d สามารถจำแนกพืชดังกล่าวได้มากชนิดที่สุด คือจำแนกได้ถึง 15 ชนิดใน 19 ชนิด จึงนิยมนำไพรเมอร์ c และ d มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของพืช

ตารางที่ 2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

Name	**sequence 5' – 3'**
a	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
f	ATTTGAACTGGTGACACGAG

อาร์เอพีดี (RAPD) หมายถึง การตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่ม ชนิด และเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ที่มีการเลือกใช้ไพรเมอร์ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นชนิดสุ่ม (Random primer) ทำให้สารพันธุกรรมจำลองตัวเองได้ในหลอดทดลอง (in vitro) แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอจะนำมาวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ซึ่งความสามารถในการบ่งบอกความแตกต่างหรือความผันแปรในกลุ่มชนิดของสิ่งมีชีวิตได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของไพรเมอร์ที่ใช้ ซึ่งถ้าการสุ่มมีความจำเพาะในส่วนของดีเอ็นเอที่

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผันแปรมาก จะได้แบบแผนที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้มาก โดยองค์ประกอบสำคัญของปฏิกิริยาอาร์เอพีดีคือ เอ็นไซม์จำลองตัวชนิดทนความร้อน (Taq DNA polymerase) ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer) และองค์ประกอบย่อยของดีเอ็นเอ (deoxynucleotide; dNTPs) เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้น มีขนาดที่สั้น (ประมาณ 10 เบส) จึงสามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบได้หลายตำแหน่งโดยสุ่ม หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่จำลองขึ้น

Ranade และคณะ (2008) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของ *J. curcas* ที่รวบรวมตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศอินเดีย ทั้งที่ขึ้นเองอยู่ตามธรรมชาติและจากแหล่งเก็บรวบรวมพันธุ์แหล่งพื้นที่การเกษตร รวมถึงตัวอย่างสายพันธุ์อื่นที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน คือ *J. gossypifolia* L. และ *P. emblica* L. โดยใช้วิธี Two single-primer amplification reaction (SPAR) ที่ประกอบด้วยเทคนิค RAPD (ใช้ไพรเมอร์ OPH18, OPM12, OPM13, OPM14, OPM15, OPU13 และ OPAP19) และเทคนิค DAMD หรือ directed amplification of minisatellite DNA (ใช้ไพรเมอร์ HBV, HVR, 33.6 และ M13) โดยพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากแหล่งธรรมชาติมีความหลากหลายมากที่สุด อันอาจเนื่องมาจากวิวัฒนาการเพื่อความอยู่รอดตามธรรมชาติ และจากการผสมข้ามต้นโดยแมลงและกระแสลม ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากแหล่งรวบรวมสายพันธุ์นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ซึ่งอาจเกิดจากการขยายพันธุ์โดยเมล็ดและการตอนกิ่งทำให้ต้นที่เก็บรวบรวมไว้ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก

Sudheer และคณะ (2008) ศึกษาความสัมพันธ์และความแปรผันทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Jatropha* ได้แก่ *Jatropha curcas, J. glandulifera, J. gossypifolia, J. integerrima, J. multifida, J. podagrica* และ *J. tanjorensis* โดยใช้วิธี RAPD และ AFLP โดยพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากระหว่าง *J. curcas* และ *J. integerrima* ซึ่งอาจเกิดจากการผสมกันของสองสายพันธุ์ และสามารถสรุปได้ว่าทั้งวิธี RAPD และ AFLP สามารถใช้จัดกลุ่มความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดทางสายพันธุ์ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

การวิจัยนี้สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์ จะเป็นส่วนหนึ่งที่มีแหล่งข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืช ในด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งภายใน

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องทดลองและแปลงปลูก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งภาครัฐ เอกชน และเกษตรกรในการเพิ่มผลผลิตและพัฒนาคุณภาพสินค้าการเกษตร ดังนี้

1. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ด ใบ ก้านใบ และตาข้าง เพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส และในการชักนำแคลลัสให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสในอาหารเหลวที่เหมาะสม และชักนำเซลล์แขวนลอยให้กลายเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์
3. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ
4. มีข้อมูลด้านพันธุกรรมและเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประโยชน์ต่อการจำแนกและคัดเลือกเพื่อการผสมพันธุ์
5. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการคัดเลือกพันธุ์ที่แม่นยำและใช้เวลาสั้นที่เหมาะสม
6. ได้สายพันธุ์ใหม่ที่เพิ่มผลผลิตทางการเกษตร
7. สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการเรียน การสอน ทั้งสำหรับนักศึกษาระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และปริญญาเอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

สายพันธุ์ของสบู่ดำที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมข้าม ที่รวบรวมโดย ศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ฉัตรแก้ว หัวหน้าโครงการเพาะปลูกสบู่ดำเพื่อทดแทนพลังงาน โดยได้ทำการปลูกสบู่ดำในหลายๆ พื้นที่ และได้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพ ได้แก่สายพันธุ์ ยโสธร, บ้านใหม่ (โคราช), แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่), ขอนแก่น, น่าน, A5, A28, A34, A69, A72, A73, B12, B14, B15 B20, B22, KJ1 สายพันธุ์จากประเทศลาว อินเดีย, สำโรง (กัมพูชา) และอเมริกา

ทำการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นสบู่ดำจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย นำตัวอย่างที่เก็บได้มาเพาะปลูกที่กรุงเทพมหานคร โดยสายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 22 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์อาร์เอพีดี 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ได้แก่ สำโรง (เขมร), น่าน, ยโสธร, โคราช, อินเดีย, ห้วยห้องไคร้, ลำปาง และ สมก (สมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์)

2.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1.2.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet)

2.1.2. 2. เครื่องชั่งแบบละเอียด (blance)

2.1.2. 3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)

2.1.2. 4. เตาอบไมโครเวฟ (microwave)

2.1.2.5. ตู้อบความร้อน (hot air oven)

2.1.2.6. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

2.1.2.7. เครื่องปั๊มสูญญากาศ (vaccum suction)

2.1.2. 8. เครื่องเขย่า (sheaker)

2.1.2.9. โถดูดความชื้น (desicator)

2.1.2.10. กระดาษกรอง (filter papers)

2.1.2.11. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดต่างๆ (tissue culture flask)

2.1.2.12. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (plate)

2.1.2.13. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

2.1.2.14. มีดผ่าตัด (blades)

2.1.2.15. ปากคีบ (forcept)

2.1.2.16 บีกเกอร์ (beaker)

2.1.2.17 กระบอกตวง (cylinder)

2.1.2.18 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 0.2, 0.5, 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร

2.1.2.19 ช้อนตักสารเคมี (spatular)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.20 โกร่ง และที่บด (mortar and pestle)

2.1.2.21 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และ

2.1.2.22 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ

2.1.2.23 ตะเกียง (burner)

2.1.2.24 คิวเวท (cuvette)

2.1.2.25 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)

2.1.2.26 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.1.2.27 กล้องจุลทรรศน์ชนิด bright field

2.1.2.28 เครื่องช่วยผสม (vortex)

2.1.2.29 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.1.2.30 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (*spectrophotometer*)

2.1.2.31 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)

2.1.2.32 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

2.1.2.33 เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transilluminator)

2.1.2.34 ชุดถ่ายภาพเจล (gel document)

2.1.3 วัสดุ และสารเคมี

2.1.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (Marashige and Skoog, 1962)

2.1.3.2 สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ เช่น โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ คลอร็อกซ์ และสารเปียกใบ (tween-20)

2.1.3.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น 2,4-D , BA และ BAP เป็นต้น

2.1.3.4 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

2.1.3.5 วุ้น phytagel

2.1.3.6 น้ำกลั่น (distilled water)

2.1.3.7 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.1.3.8 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis, Malaysia)

2.1.3.9 บัฟเฟอร์ (buffer) เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ tris borate EDTA (TBE) เป็นต้น

2.1.3.10 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide, dNTPs) ของบริษัท Roche

2.1.3.11 ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs

2.1.3.12 เจลอะกาโรส (agarose gel)

2.1.3.13 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromind)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.14 ไพร์เมอร์ (primer) 1 คู่ คือ ไพร์เมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพร์เมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet *et al.* (1991) (Invitrogen)

2.1.3.15 ไพร์เมอร์สำหรับ RAPD จำนวน 10 primer ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำในเทคนิค RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5′-3′
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-20	GTTGCGATCC
OPAM-01	TCACGTACGG
OPAM-03	CTTCCCTGTG
OPAX-17	TGGGCTCTGG
OPB-14	TCCGCTCTGG
OPD-02	GGACCCAACC
OPE-07	AGATGCAGCC
OPG-13	CCACACTACC
OPK-12	TGGCCCTCAC

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ ยโสธร, อินเดีย, โคราช, A5, A28, A34, A72, B14, B15 และ B19

1. ตัดส่วนใบ ล้างด้วยน้ำสะอาด
2. นำชิ้นส่วนใบ มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween 20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที
3. นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที
4. ตัดเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายออก 2 ข้าง ตัดให้มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร
5. นำชิ้นส่วนใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร
6. โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตโดยวัดขนาดของแคลลัส หลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Dancan's New Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

2. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนชิ้นก้านใบ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนชิ้นก้านใบ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ ยโสธร, อินเดีย, โคราช, A5, A28, A34, A72, B14, B15 และ B19

1. ตัดส่วนก้านใบ ล้างด้วยน้ำสะอาด
2. นำชิ้นส่วนก้านใบ มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween 20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที
3. นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที
4. นำชิ้นส่วนที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดส่วนที่เป็นเซลล์ที่ถูกทำลายจากการฟอกฆ่าเชื้อ ทั้ง 2 ข้างของชิ้นส่วนตัวอย่าง
5. นำชิ้นส่วนก้านใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร
6. โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตโดยวัดขนาดของแคลลัส หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Dancan's New Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

3. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้าง

การเพาะเลี้ยงตาข้างของสบู่ดำ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากประเทศลาว ขอนแก่น แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) สำโรง (กัมพูชา) และอเมริกา

1. ตัดส่วนของตาข้าง ล้างด้วยน้ำสะอาด
2. นำตาข้าง มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween 20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที
3. นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที
4. นำชิ้นส่วนที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดส่วนที่เป็นเซลล์ที่ถูกทำลายจากการฟอกฆ่าเชื้อ ทั้ง 2 ข้างของชิ้นส่วนตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำชิ้นส่วนตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตรอะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร

6. ทำการทดลอง 5 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์พัฒนา และการเปลี่ยนแปลง โดยทำการบันทึกขนาดของแคลลัส จำนวนใบ และความยาวของก้านใบ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Dancan's New Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

4. การเพาะเลี้ยงเมล็ดหรือ เอ็มบริโอ

การเพาะเลี้ยงเมล็ดหรือ เอ็มบริโอของสบู่ดำ 6 สายพันธุ์ คือ A69, A73, B12, B20, B22 และน่าน

1. คัดเลือกเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ที่เติมด้วยสารเปียกใบ จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลาเป็น เวลา 20 นาที

2. นำมาทำการแกะเปลือกออก แล้วใช้ปากคีบ คีบเอมบริโอวางในจานแก้ว

3. นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสาควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร

4.. โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตโดยวัดขนาดของแคลลัส หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Dancan's New Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17

5. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

5.1. ย้ายแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ KJ1 มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกผลเพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของสบู่ดำในแต่ละช่วงเวลา คือ 0 7 14 21 และ 28 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละช่วงระยะเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาตามกำหนด ทำการกรองเซลล์แขวนลอย เพื่อหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

5.2. หาน้ำหนักกระดาษกรองก่อนเข้าอบ บันทึกน้ำหนักกระดาษกรอง (A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 หาน้ำหนักกระดาษกรองให้คงที่ โดยนำกระดาษกรองมาใส่ในจานแก้วแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ บันทึกน้ำหนักของกระดาษกรอง (B)

5.4 นำแผ่นกระดาษกรองวางลงบนกรวยกรอง (bucher funnel) แล้วนำไปต่อกับขวดรูปชมพู่ เพื่อที่จะทำการกรองในระบบสูญญากาศด้วยปั๊ม

5.5 เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรอง ทำการกรองในระบบสูญญากาศรอจนกระทั่งน้ำหยุดไหล จากนั้นนำไปชั่ง บันทึกน้ำหนักสด (C)

5.6 นำกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่ ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งบันทึกน้ำหนักแห้ง (D)

5.7 นำค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ขวดที่ได้มาเขียนกราฟ

5.8 ค่าน้ำหนักสด (fresh weight) = (C)-(A) ค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) = (D)-(B)

6. การชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

1. ชักนำแคลลัสของสบู่ดำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ให้เป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์

2. ชักนำการเกิดรากจากต้นให้สมบูรณ์ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส

7. วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิธีการทดลอง

7.1 การเก็บตัวอย่างต้นสบู่ดำ

ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นสบู่ดำจากสถานที่ต่างๆ ในประเทศไทย เก็บใบอ่อนจำนวน 1-2 ใบ เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ พร้อมนำกิ่งมาเพาะปลูกที่กรุงเทพมหานคร เพื่อศึกษาลักษณะของการเจริญ

7.2 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบของต้นสบู่ดำ จำนวน 1-2 ใบ ที่เก็บมาได้มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis, Malaysia) โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ คือ ตัดตัวอย่างส่วนใบของสบู่ดำประมาณ 10-30 มิลลิกรัม ใส่ลงในโกร่ง จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียด เติม Buffer PL ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ผสมโดยการ vortex (ประมาณ 30 วินาที) เติม Proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อ

เอกสารนี้มีไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง ใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดก็นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด supernatant ลงในหลอดใหม่ (หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม RNase A (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม Buffer PB ปริมาตร 640 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 1 นาที เติม absolute ethanol (มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันย้ายตัวอย่างลงคอลัมน์นำไปปั่นเหวี่ยง 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที อีก 2 นาที เพื่อระเหย absolute ethanol ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที อีก 2 นาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถึง -20 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจหาทั้งปริมาณและคุณภาพ

7.2.2 การวิเคราะห์ด้านคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทางด้านคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของวุ้นอะกาโรส ร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า กระแสไฟฟ้า 100 โวตต์ พร้อมทั้งเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ขนาด 10,000 คู่เบส หรือ λ Hind III หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และดูแผ่นเจลภายใต้แสงยูวีจากเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านปริมาณทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

7.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพร์เมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet *et al.* (1991) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพร์เมอร์ c และ d (Invitrogen) ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล (*p*M) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product จากทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เก็บรักษา PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.2.4. การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

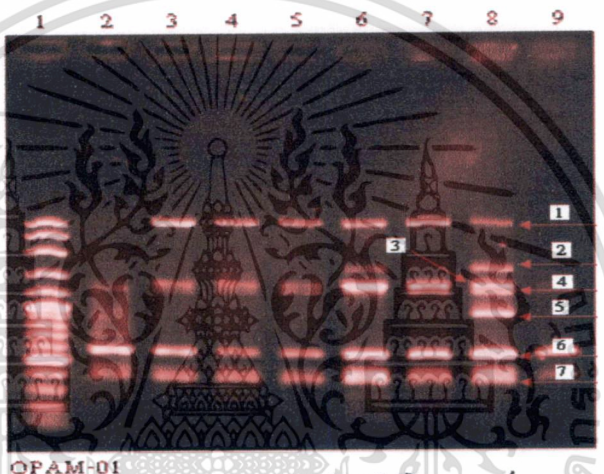
นำ PCR product ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท Tech Dragon Limited เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI (National Center for Biotechnology Information) ใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip package version 3.6 ที่รวมการใช้งานหลายโปรแกรม คือ Seqboot, Dnadist, Neighbor และ Consense ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 ด้วยวิธี Neighbor-joining และใช้โปรแกรม Consense คัดเลือกรูปแบบ Phylogenetic tree ที่น่าจะมีความเป็นไปได้และถูกต้องมากที่สุด เมื่อได้ phylogenetic tree จึงกำหนดรูปแบบแผนภูมิด้วยโปรแกรม Tree view version 1.6.6

7.2.5 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี

คำนวณปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้ประมาณ 100-500 นาโนกรัม คำนวณปริมาตรสารต่างๆ ที่ต้องใช้ ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ชนิด 10 นิวคลีโอไทด์สำหรับเทคนิค RAPD ความเข้มข้น 20 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร, Mix dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3.2 ไมโครลิตร, 10 เท่า PCR buffer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร และ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ดีเอ็นเอตามปริมาณที่คำนวณและเติมน้ำให้ได้ปริมาณทั้งหมดครบ 15-25 ไมโครลิตร (หักลบออกจากดีเอ็นเอต้นแบบ 100-500 นาโนกรัม) ผสมให้เข้ากัน และนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่สภาวะดังนี้ เริ่มจาก Initiation denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 30-36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบปฏิกิริยานำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส นำเจลไปวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ หรือวิเคราะห์จำนวนแถบที่เกิดขึ้น ซึ่งในแต่ละตัวอย่างถ้าปรากฏแถบนับ 1 ไม่ปรากฏแถบนับ 0 เปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่าง หาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Distance) จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอ สร้างผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วย unweighted-pair-group method (UPGMA) ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy System (NTsys) ดังตัวอย่างในรูปที่ 4. ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อการจำแนกสบู่ดำทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ OPAM-01 สามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 แถบ ซึ่งในแต่ละตัวอย่างถ้าปรากฏแถบนับ 1 ไม่ปรากฏแถบนับ 0 ดังนี้



รูปที่ 4. ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยา RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-01 โดยช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2

ดังนั้นเมื่อต้องการวิเคราะห์จะให้คะแนนการเกิด หรือไม่เกิดแถบ เช่น

(2) เขมร	0001111
(3) น่าน	1011011
(4) ยโสธร	1011011
(5) โคราช	1011011
(6) อินเดีย	1111011
(7) ห้วยห้องไคร้	1111011
(8) ลำปาง	1111111
(9) กรุงเทพ 2	0001011

เมื่อได้ผลของแต่ละไพรเมอร์แล้ว ให้นำข้อมูลมาเรียงต่อกัน และนำไปประมวลผลโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc ซึ่งจะได้เป็น Phylogenetic tree พร้อมคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงส่วนของใบสบู่ดำ 10 สายพันธุ์ ให้เกิดเป็นแคลลัส ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งระยะการวัดขนาดของแคลลัสเป็น 0, 10, 20, 30 และ 40 วัน ตามลำดับ โดยทำการวัดขนาดของแคลลัสจากความกว้างและความยาว เพื่อนำมาหาค่าพื้นที่เฉลี่ย พบว่าสบู่ดำทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ทั้งหมด ซึ่งสีของแคลลัสที่เกิดขึ้น มีตั้งแต่สีเหลืองอ่อน เขียวอ่อน เขียวแก่ จนกระทั่งสีน้ำตาลอ่อน และลักษณะของแคลลัสส่วนใหญ่จะเป็นแบบ friable หรือ มีลักษณะชุ่มน้ำ

สบู่ดำสายพันธุ์ยโสธร พบว่าในส่วนของใบ (ตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1) เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2) สายพันธุ์อินเดีย พบว่าในส่วนของใบ (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3) สามารถเจริญบนอาหารที่มี 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.4) ส่วนสายพันธุ์โคราช (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.5) พบว่าในอาหารที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.6)

สบู่ดำสายพันธุ์ A5 (ตารางที่ 4.4 รูปที่ 4.7 รูปที่ 4.8) และ A28 (ตารางที่ 4.5, รูปที่ 4.9) พบว่ามีการเจริญของชิ้นส่วนของใบไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.10)

ในสายพันธุ์ A34 ส่วนของใบ (ตารางที่ 4.6 และ รูปที่ 4.11) พบว่าสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12) และมีการเจริญไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สายพันธุ์ A72 พบว่าในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนของใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.7 และ รูปที่ 4.13) และเจริญได้ไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.14)

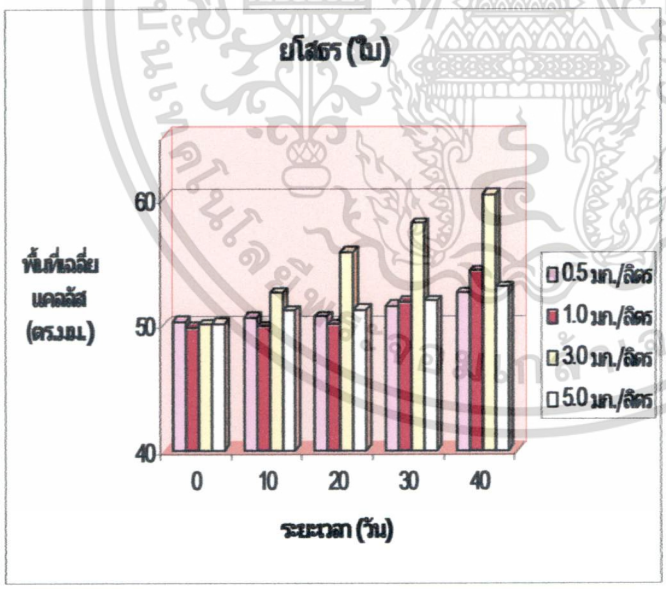
สบู่ดำสายพันธุ์ B14 ทั้งส่วนของใบ (ตารางที่ 4.8 , รูปที่ 4.15) มีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่ มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.16) ส่วนใน สายพันธุ์ B15 ทั้งส่วนของใบ (ตารางที่ 4.9, รูปที่ 4.7) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.18) และ B19 สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.10, รูปที่ 4.19, รูปที่ 4.20)

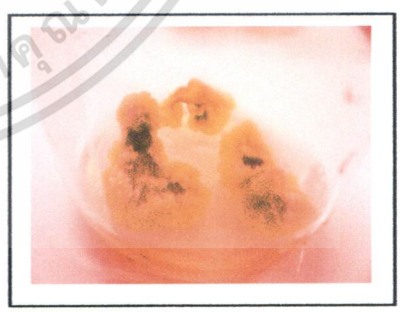
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	50.200^{m}	50.542^{m}	50.630^{f}	51.470^{i}	52.520^{e}
1	49.712^{o}	49.789^{p}	49.960^{n}	51.810^{h}	54.247^{c}
3	49.981^{m}	52.492^{f}	55.740^{q}	57.990^{b}	60.270^{a}
5	50.092^{m}	51.113^{k}	51.183^{j}	51.885^{g}	53.005^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05





รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

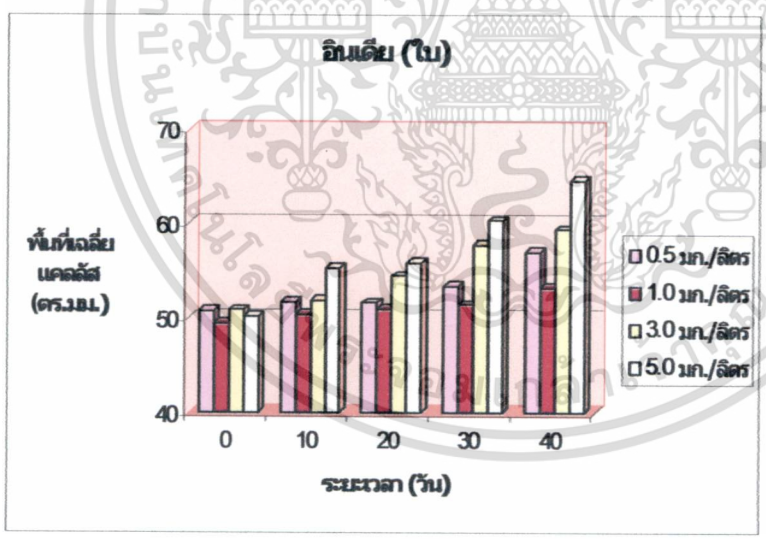
รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ยโสธร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรMSที่เติม 2,4-D

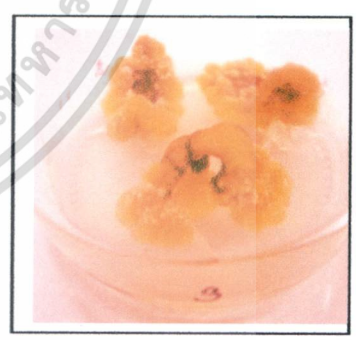
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	50.730^{m}	51.700^{k}	51.620^{i}	53.380^{g}	56.980^{d}
1	49.400^{m}	50.400^{m}	50.960^{m}	51.380^{l}	53.200^{h}
3	50.820^{m}	51.930^{j}	54.430^{f}	57.690^{c}	59.320^{b}
5	50.130^{m}	55.320^{e}	55.830^{e}	60.320^{a}	64.520^{a}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05





รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

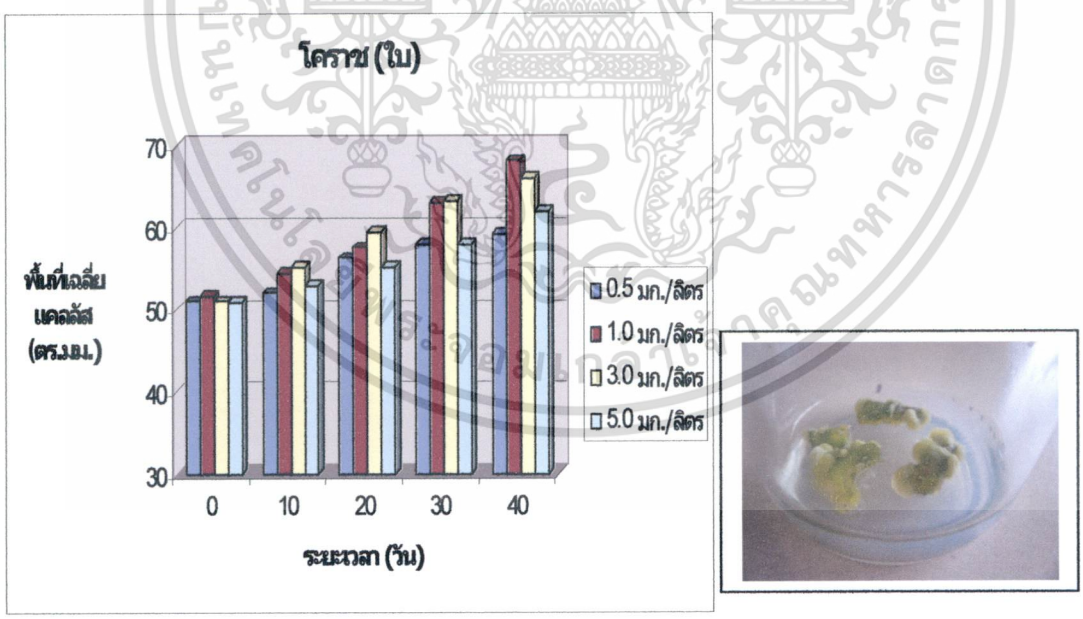
รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์อินเดีย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	50.981^{i}	52.011^{h}	56.344^{f}	57.997^{e}	59.160^{d}
1	51.598^{h}	54.380^{g}	57.520^{de}	63.013^{c}	68.115^{a}
3	51.061^{i}	55.210^{fg}	59.487^{d}	63.210^{c}	65.966^{b}
5	50.823^{i}	52.960^{h}	55.118^{g}	57.897^{ef}	61.967^{c}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

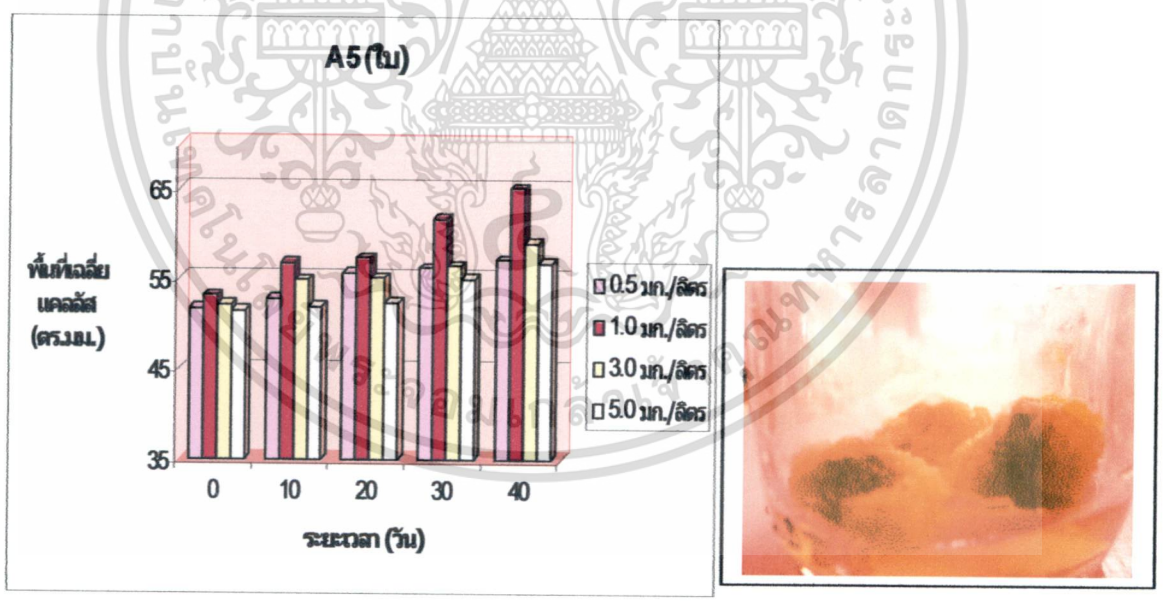
รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ โคราช ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	51.700^{h}	52.770^{g}	55.759^{e}	56.212^{e}	57.093^{d}
1	53.172^{g}	56.804^{de}	57.378^{d}	61.626^{b}	65.036^{a}
3	52.140^{g}	54.902^{f}	55.143^{ef}	56.492^{e}	59.062^{c}
5	51.450^{h}	52.005^{gh}	52.429^{g}	55.012^{e}	56.840^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

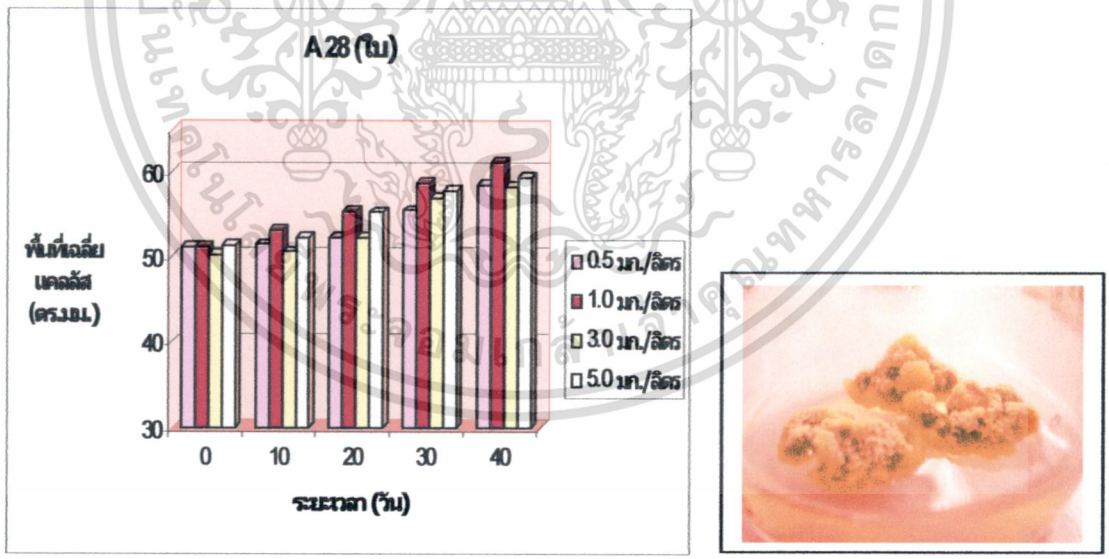
รูปที่ 4.8 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	51.130^{f}	51.490^{e}	52.213^{e}	55.475^{de}	58.478^{bc}
1	51.100^{f}	53.108^{e}	55.284^{d}	58.609^{b}	61.029^{a}
3	50.240^{f}	50.572^{f}	52.245^{e}	56.819^{d}	58.146^{c}
5	51.370^{f}	52.208^{ef}	55.258^{d}	57.712^{c}	59.333^{b}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

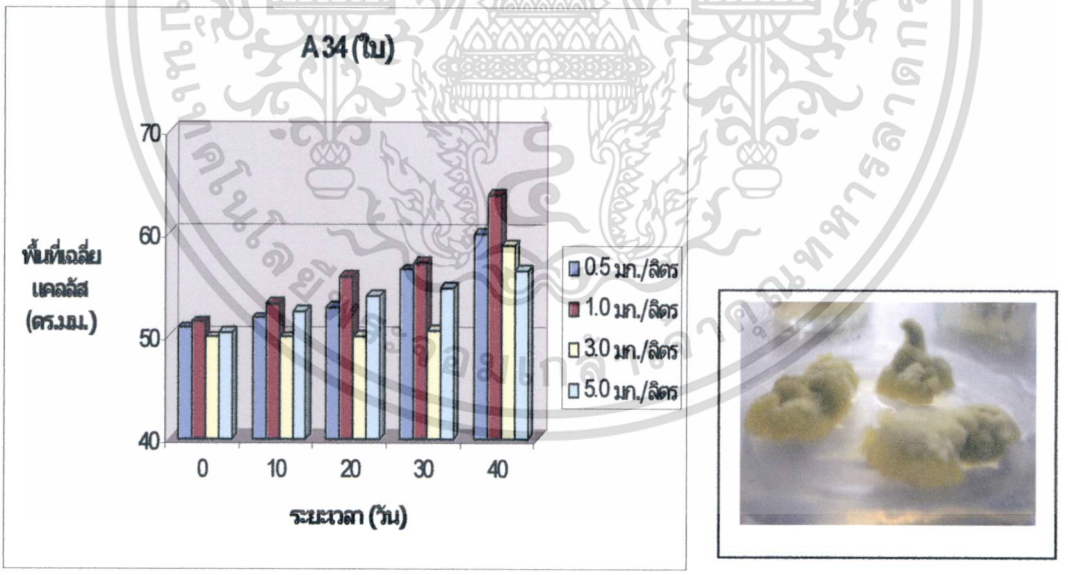
รูปที่ 4.10 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	50.800^{g}	51.804^{fg}	52.835^{e}	56.542^{bc}	60.004^{a}
1	51.380^{fg}	53.178^{ef}	55.896^{cd}	57.131^{b}	63.752^{a}
3	49.900^{g}	49.921^{g}	49.940^{g}	50.588^{g}	58.840^{d}
5	50.410^{g}	52.405^{f}	53.935^{e}	54.741^{d}	56.456^{c}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

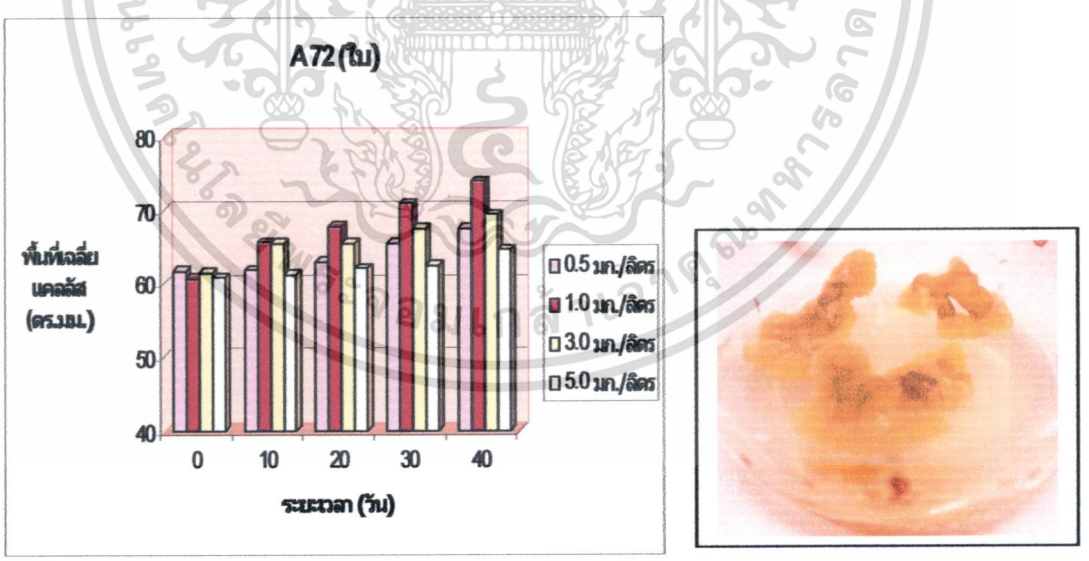
รูปที่ 4.12 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	61.700^{d}	61.745^{d}	62.937^{cd}	65.432^{c}	67.476^{bc}
1	60.560^{d}	65.515^{c}	67.730^{b}	70.863^{ab}	73.847^{a}
3	61.430^{d}	65.401^{c}	65.465^{c}	67.483^{b}	69.287^{b}
5	60.800^{d}	61.084^{d}	62.005^{d}	62.463^{d}	64.541^{c}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

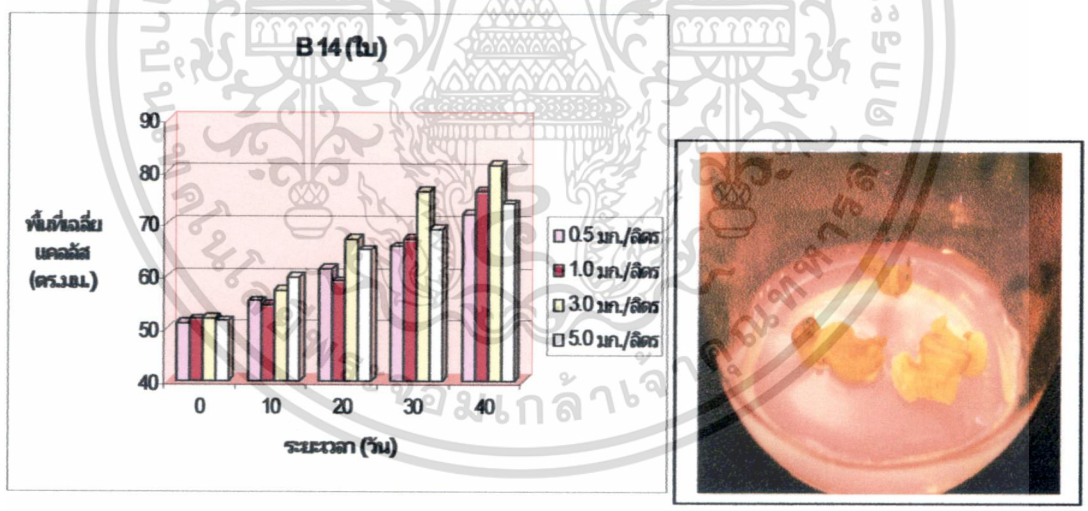
รูปที่ 4.14 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	50.940^{e}	55.240^{e}	61.340^{d}	65.568^{c}	71.779^{bc}
1	51.800^{e}	54.380^{e}	59.040^{dc}	66.970^{c}	76.19^{6b}
3	52.010^{e}	57.307^{d}	67.116^{c}	76.246^{b}	81.185^{a}
5	51.390^{e}	59.807^{d}	65.066^{cd}	68.937^{c}	73.813^{b}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

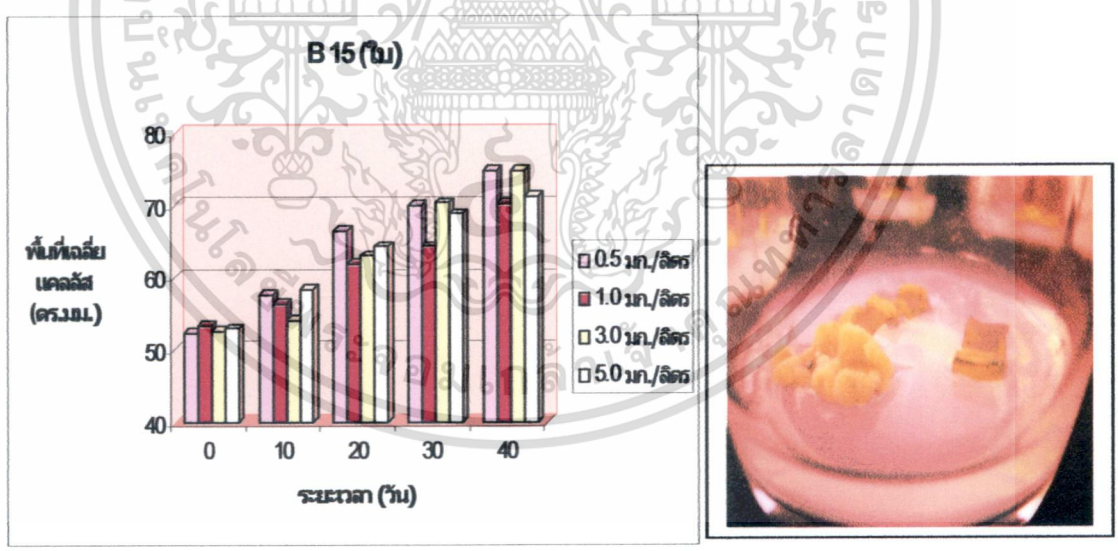
รูปที่ 4.16 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	52.300^{m}	57.648^{k}	66.435^{g}	69.951b^{c}	74.788^{a}
1	53.300^{kl}	56.397^{j}	61.949^{h}	64.301^{f}	70.170^{c}
3	52.600^{m}	54.129^{k}	62.999^{g}	70.375^{b}	74.702^{a}
5	52.900^{l}	58.318^{i}	64.332^{e}	68.875^{d}	71.264^{b}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

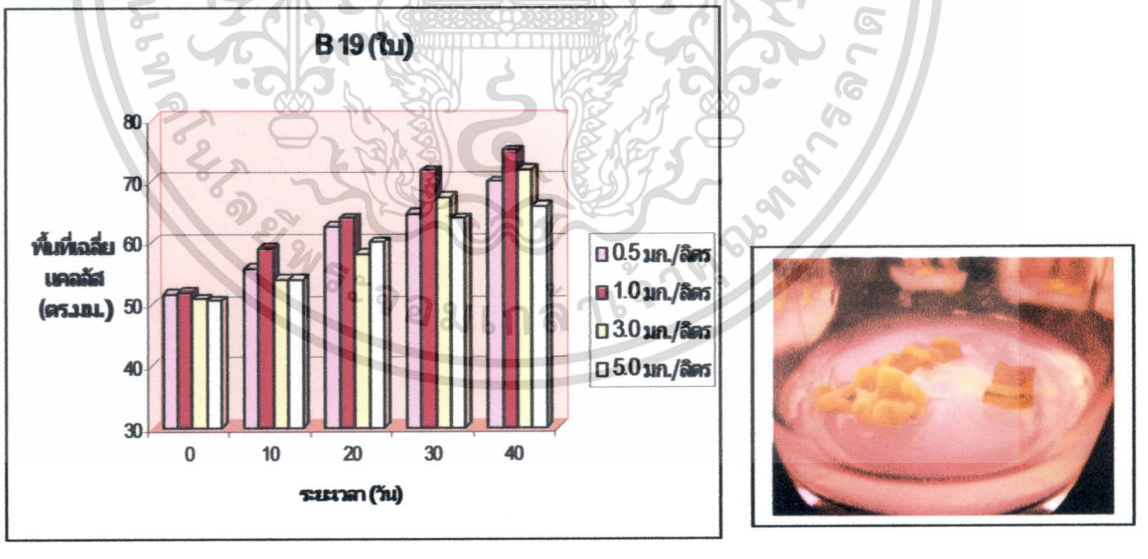
รูปที่ 4.18 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	51.700^{l}	55.716^{j}	62.490^{g}	64.588^{f}	69.776^{c}
1	51.900^{l}	58.930^{i}	63.879^{f}	71.556^{b}	74.788^{a}
3	50.900^{l}	53.931^{k}	58.028^{i}	67.196^{d}	71.785^{b}
5	50.598^{l}	53.882^{k}	60.007^{h}	63.887^{f}	65.735^{e}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.20 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านใบสบู่ดำ 10 สายพันธุ์ ให้เกิดเป็นแคลลัส ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งระยะการวัดขนาดของแคลลัสเป็น 0, 10, 20, 30 และ 40 วัน ตามลำดับ โดยทำการวัดขนาดของแคลลัสจากความกว้างและความยาว เพื่อนำมาหาค่าพื้นที่เฉลี่ย พบว่าสบู่ดำทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ทั้งหมด ซึ่งสีของแคลลัสที่เกิดขึ้น มีตั้งแต่สีเหลืองอ่อน เขียวอ่อน เขียวแก่ จนกระทั่งสีน้ำตาลอ่อน และลักษณะของแคลลัสส่วนใหญ่จะเป็นแบบ friable หรือ มีลักษณะชุ่มน้ำ

สบู่ดำสายพันธุ์ยโสธร พบว่าใน ส่วนก้านใบ (ตารางที่ 4.11 และรูปที่ 20) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.21) เช่นกัน

สบู่ดำสายพันธุ์อินเดีย พบว่าในส่วนก้านใบ (ตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.22) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 23)

ส่วนสบู่ดำสายพันธุ์โคราช พบว่าส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.24) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.25)

สบู่ดำสายพันธุ์ A5 (ตารางที่ 4.14 และ รูปที่ 4.26 และ รูปที่ 4.27) และ A28 (ตารางที่ 4.15 รูปที่ 4.28 และรูปที่ 4.29) พบว่ามีการเจริญของชิ้นส่วนของก้านใบไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในสายพันธุ์ A34 ส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.16 รูปที่ 30 และ) เจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้น 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 31)

สายพันธุ์ A72 พบว่า ส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.32) เจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.33)

สบู่ดำสายพันธุ์ B14 ส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.18 รูปที่ 4.34) มีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่ มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.35)

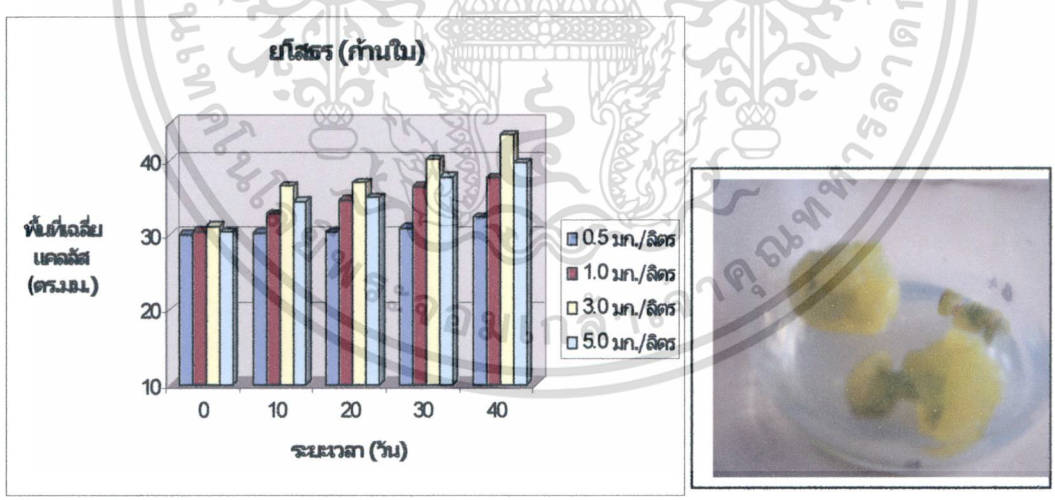
ส่วนในสายพันธุ์ B15 ส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.19 รูปที่ 4.36 รูปที่ 4.37) และ B19 ส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.20 รูปที่ 4.38 รูปที่ 4.39) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	30.10^{e}	30.31^{f}	30.37^{f}	30.97^{f}	32.40^{e}
1	30.45^{f}	32.78^{e}	34.63^{d}	36.40^{c}	37.64^{c}
3	31.09^{ef}	36.59^{cd}	37.03^{c}	40.11^{b}	43.36^{a}
5	30.34^{c}	34.50^{de}	34.97^{d}	37.72^{c}	39.63^{b}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร

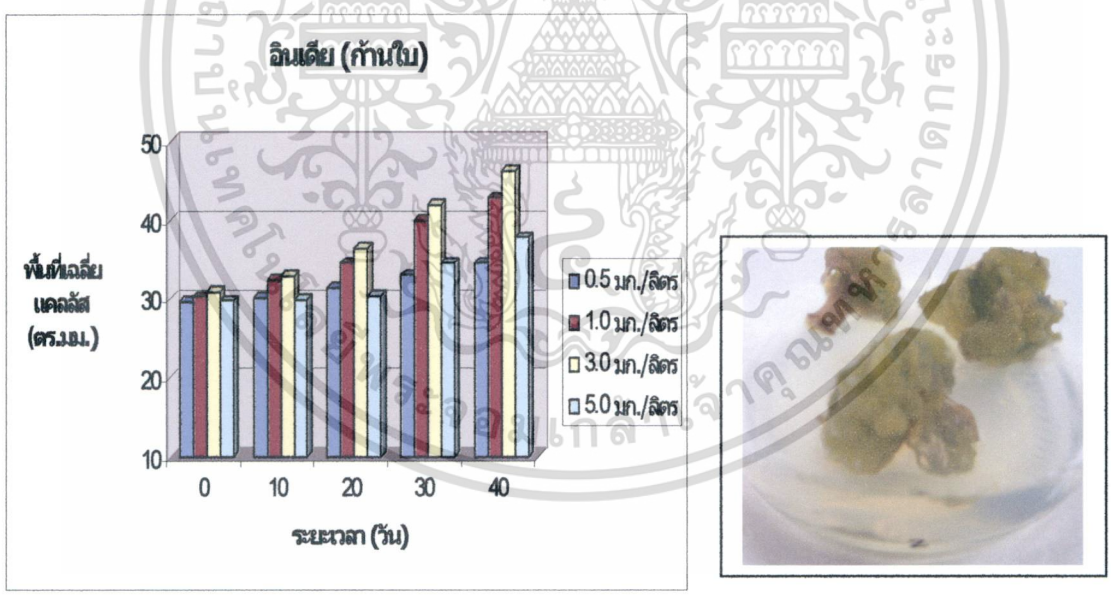
รูปที่ 4.21 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ยโสธร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	29.67^{i}	30.17^{i}	31.44^{h}	33.06^{g}	34.49^{f}
1	30.20^{i}	32.40^{g}	34.53^{f}	39.98^{c}	42.82^{b}
3	30.90^{hi}	32.97^{g}	36.41^{e}	42.04^{b}	46.21^{a}
5	29.70^{i}	29.91^{i}	30.44^{i}	34.57^{f}	37.79^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.22 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

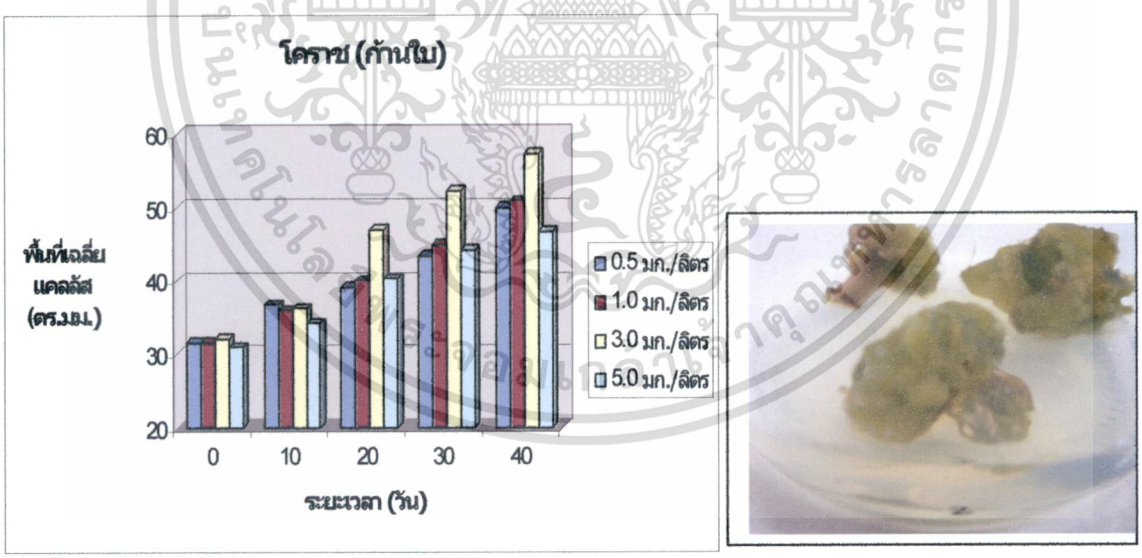
รูปที่ 4.23 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์อินเดีย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	31.60^{l}	36.77^{h}	39.05^{g}	43.37^{f}	49.93^{c}
1	31.56^{k}	35.95^{h}	40.02^{g}	44.93^{e}	50.80^{c}
3	32.06^{j}	36.20^{h}	46.90^{d}	52.16^{b}	57.25^{a}
5	30.95^{l}	34.20^{i}	40.30^{g}	44.17^{ef}	46.70^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.24 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

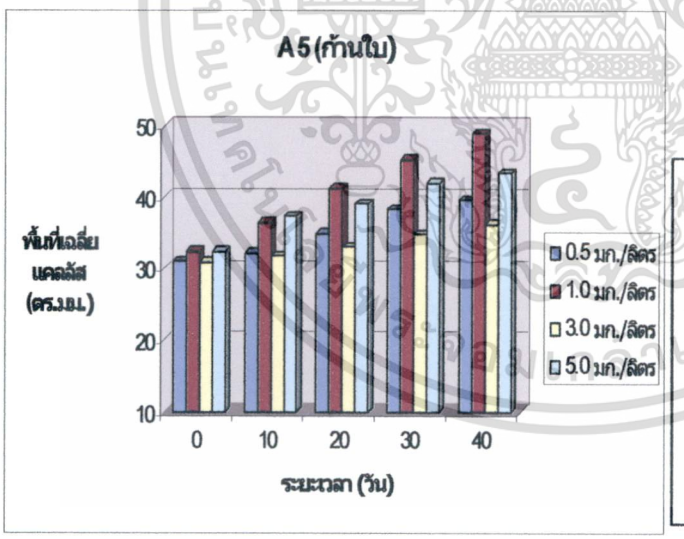
รูปที่ 4.25 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ โคราช ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

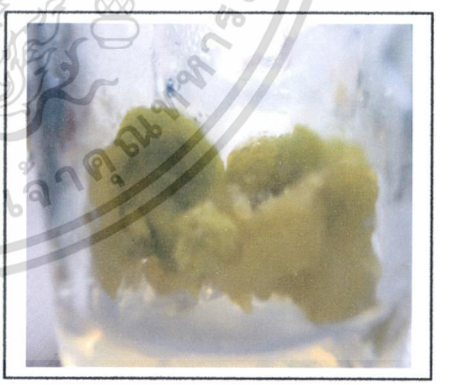
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	31.020^{h}	32.116^{g}	34.921^{f}	38.340^{de}	39.576^{d}
1	32.404^{g}	36.418^{e}	41.224^{c}	45.304^{b}	48.935^{a}
3	30.920^{h}	31.810^{gh}	32.981^{g}	34.759^{f}	36.133^{e}
5	32.330^{g}	37.335^{e}	39.083^{d}	41.978^{c}	43.379^{b}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05





รูปที่ 4.26 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

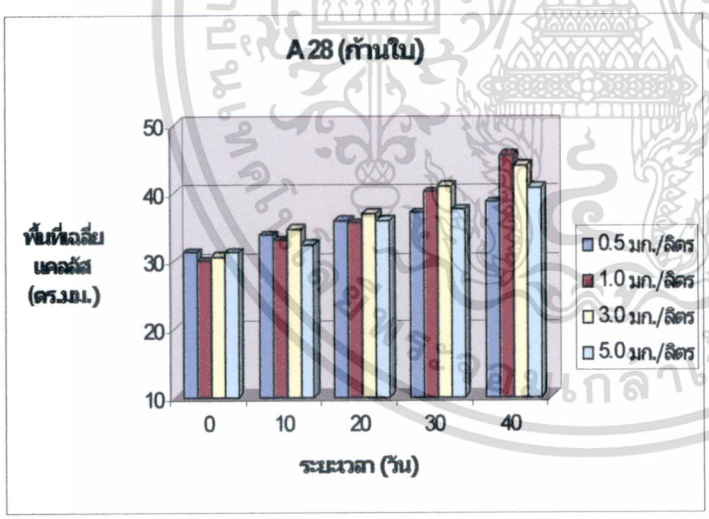
รูปที่ 4.27 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ โคราช ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

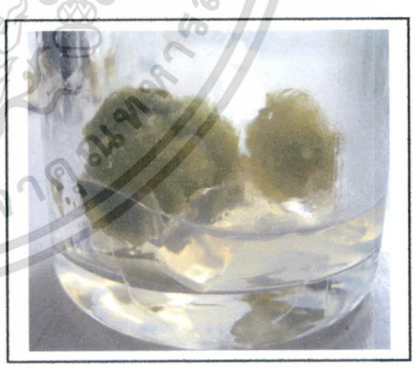
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	31.300^{g}	33.750^{f}	35.952^{e}	37.043^{cd}	38.530^{c}
1	30.025^{g}	33.043^{f}	35.593^{e}	40.086^{b}	45.476^{a}
3	30.590^{g}	34.618^{e}	36.891^{de}	40.932^{b}	44.041^{a}
5	31.290^{g}	32.402^{fg}	35.998^{e}	37.537^{d}	40.728^{b}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05





รูปที่ 4.28 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

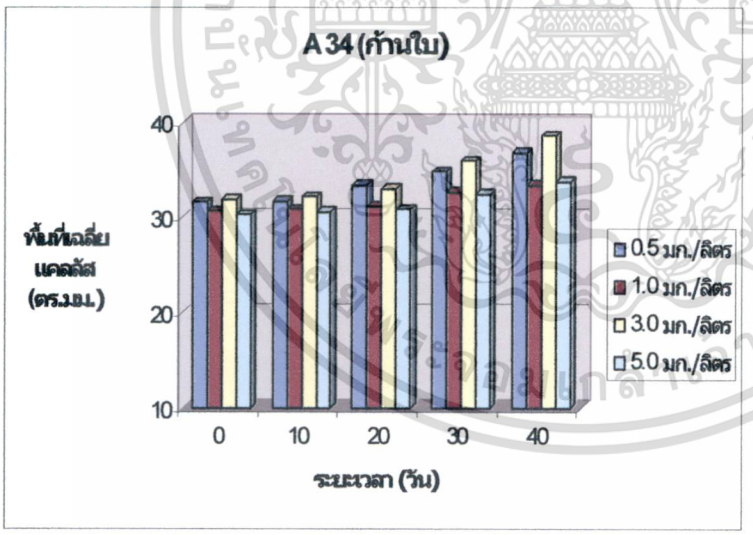
รูปที่ 4.29 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	31.600^{e}	31.705^{c}	33.402^{d}	34.856^{cd}	36.789^{b}
1	30.700^{fg}	30.856^{e}	31.116^{e}	32.619^{d}	33.368^{c}
3	31.900^{ef}	32.202^{e}	33.009^{d}	35.946^{bc}	38.615^{a}
5	30.300^{g}	30.600^{f}	30.880^{f}	32.504^{e}	33.842^{de}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.30 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

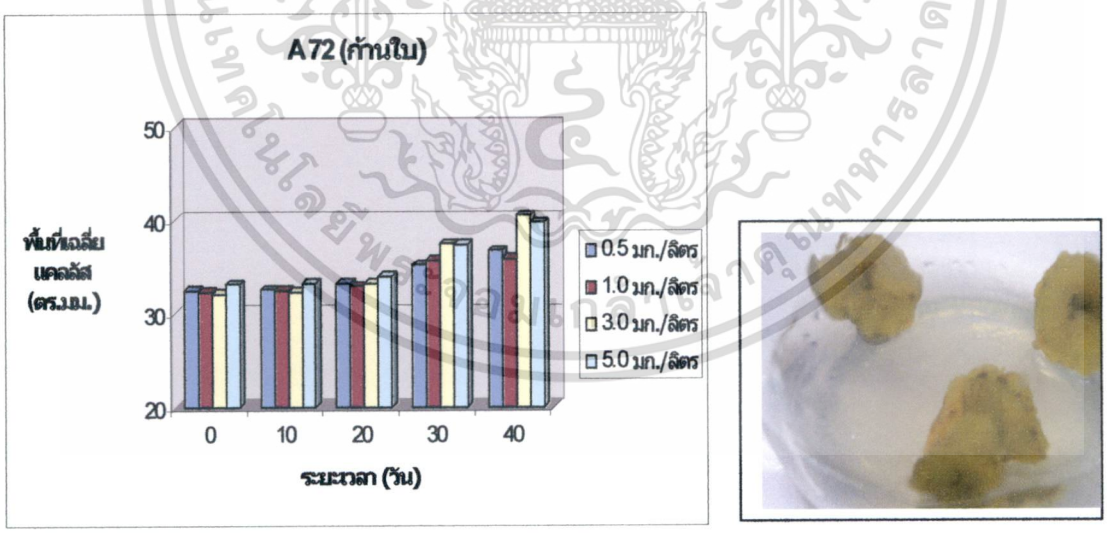
รูปที่ 4.31 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	32.500^{c}	32.553^{c}	33.174^{c}	35.159^{bc}	36.712^{b}
1	32.300^{c}	32.438^{c}	32.942^{c}	35.663^{b}	35.797^{b}
3	32.100^{c}	32.223^{c}	33.241^{c}	37.438^{b}	40.460^{a}
5	33.140^{c}	33.217^{c}	34.002^{c}	37.395^{b}	39.689^{ab}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.32 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

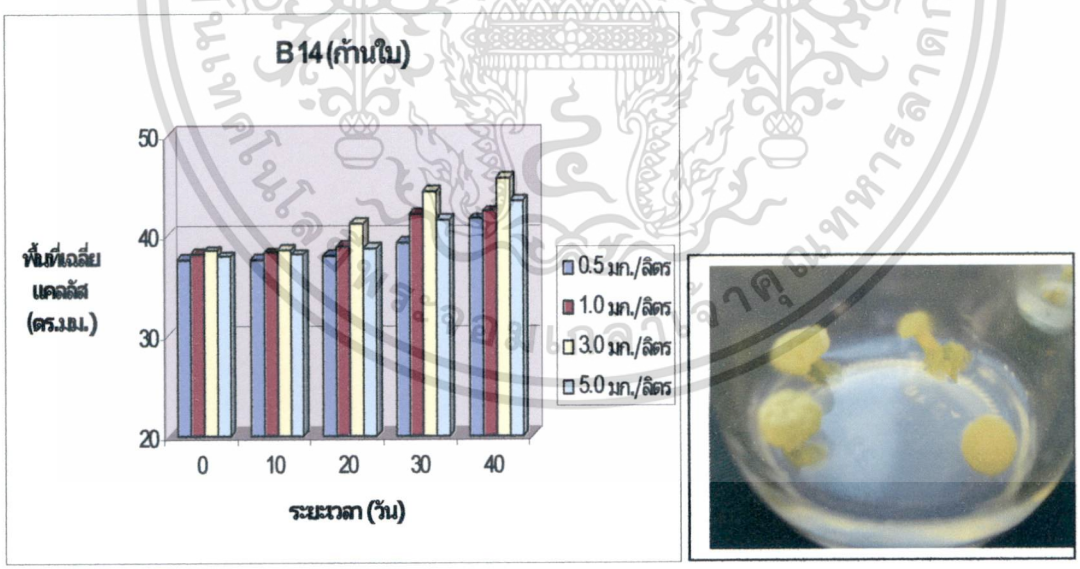
รูปที่ 4.33 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	37.500^{d}	37.559^{d}	37.920^{cd}	39.228^{c}	41.601^{b}
1	38.100^{c}	38.180^{c}	38.920^{c}	42.119^{b}	42.346^{b}
3	38.400^{c}	38.536^{c}	41.170^{bc}	44.402^{a}	45.635^{a}
5	37.800^{d}	38.043^{c}	38.680^{c}	41.491^{b}	43.403^{ab}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.34 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

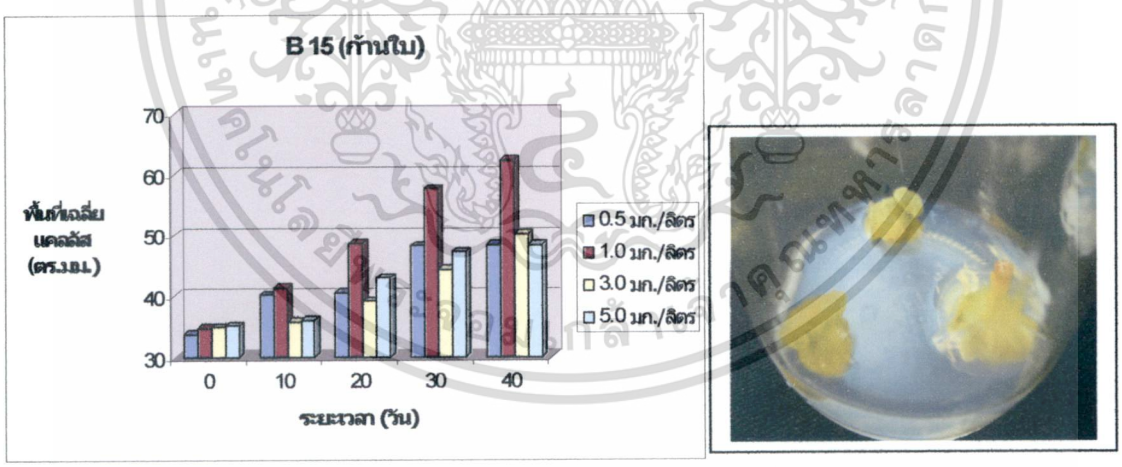
รูปที่ 4.35 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	33.800^{m}	40.215^{i}	40.513^{hi}	48.279^{d}	48.321^{d}
1	34.800^{l}	41.310^{h}	48.628^{d}	57.521^{b}	62.291^{a}
3	34.900^{l}	35.717^{kl}	39.193^{j}	44.295^{f}	50.133^{c}
5	35.100^{l}	36.021^{k}	42.907^{g}	47.238^{e}	48.338^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.36 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

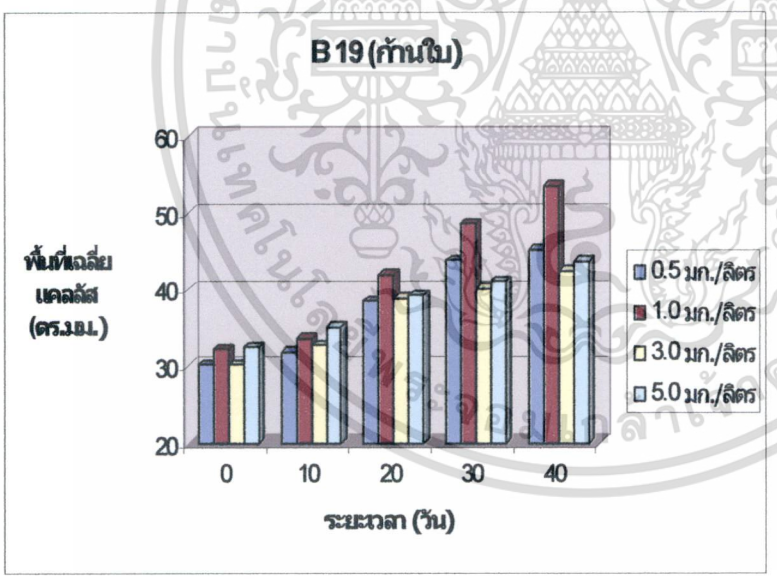
รูปที่ 4.37 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)				
	0 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
0.5	30.200^{m}	31.763^{l}	38.529^{h}	43.765^{d}	45.207^{c}
1	32.200^{kl}	33.536^{j}	41.911^{e}	48.566^{b}	53.487^{a}
3	30.200^{m}	32.676^{k}	38.864^{h}	40.130^{g}	42.329^{e}
5	32.400^{k}	35.020^{i}	39.266^{h}	41.056^{f}	43.627^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.38 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.39 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้าง

การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอด จากชิ้นส่วนของตาข้าง 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จากประเทศลาว ขอนแก่น แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) สำโรง (เขมร) และอเมริกา ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย อะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญ BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วทำการบันทึกผลหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

สบู่ดำสายพันธุ์ ขอนแก่น พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 5 ใบ ความยาวของก้านใบจะยาวที่สุด เท่ากับ 6.82 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสจะเจริญได้ดีที่สุด เท่ากับ 218.36 ตารางมิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.21 และ รูปที่ 4.40)

สบู่ดำสายพันธุ์จากประเทศลาว พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบได้ดีที่สุด เท่ากับ 5.8 ใบ ความยาวของก้านใบจะยาวที่สุด เท่ากับ 5.73 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสจะเจริญได้ดีที่สุด เท่ากับ 216.91 ตารางมิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.22 และ รูปที่ 4.41)

สบู่ดำสายพันธุ์ แม่ปิงน้อย(เชียงใหม่) พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบได้ดีที่สุด เท่ากับ 5.8 ใบ ความยาวของก้านใบจะยาวที่สุด เท่ากับ 7.04 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสจะเจริญได้ดีที่สุด เท่ากับ 256.83 ตารางมิลลิเมตรบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.23 และ รูปที่ 4.42)

สบู่ดำสายพันธุ์ สำโรง(เขมร) พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบได้ดีที่สุด เท่ากับ 7.4 ใบ ความยาวของก้านใบจะยาวที่สุด เท่ากับ 7.53 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสจะเจริญได้ดีที่สุด เท่ากับ 217.05 ตารางมิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.24 และ รูปที่ 4.43)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

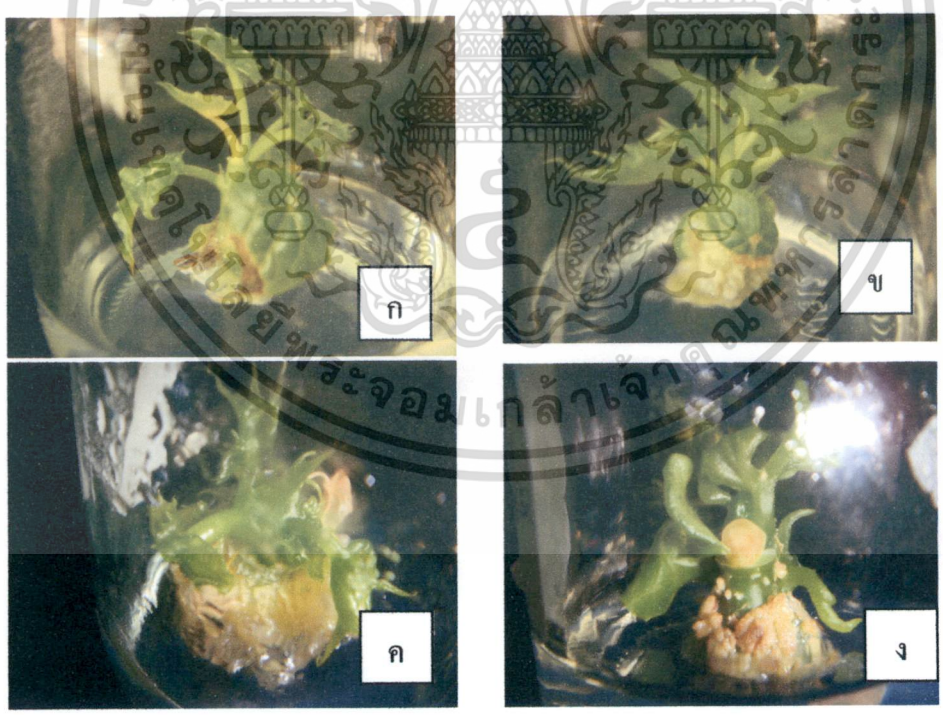
สบู่ดำสายพันธุ์ อเมริกา พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบได้ดีที่สุด เท่ากับ 4.8 ใบ ความยาวของก้านใบจะยาวที่สุด เท่ากับ 6.57 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสจะเจริญได้ดีที่สุด เท่ากับ 194.32 ตารางมิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.25 และ รูปที่ 4.44)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 แสดงการเปลี่ยนแปลงเฉลี่ยของการเจริญของสบู่ดำสายพันธุ์ขอนแก่น บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร MS ที่เติม BA (มก./ลิตร)	ขนาดของแคลลัส (ตร.มม.)	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวของก้านใบ (มม.)
1	184.21^{b}	3.8^{ab}	6.82^{a}
3	204.21^{b}	5.0^{a}	4.21^{b}
5	218.36^{a}	3.2^{b}	2.78^{bc}
7	198.91^{ab}	2.8^{b}	1.53^{c}

หมายเหตุ $^{a-c}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.40 การพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของสบู่ดำสายพันธุ์ขอนแก่น

ก. BA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. BA ที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

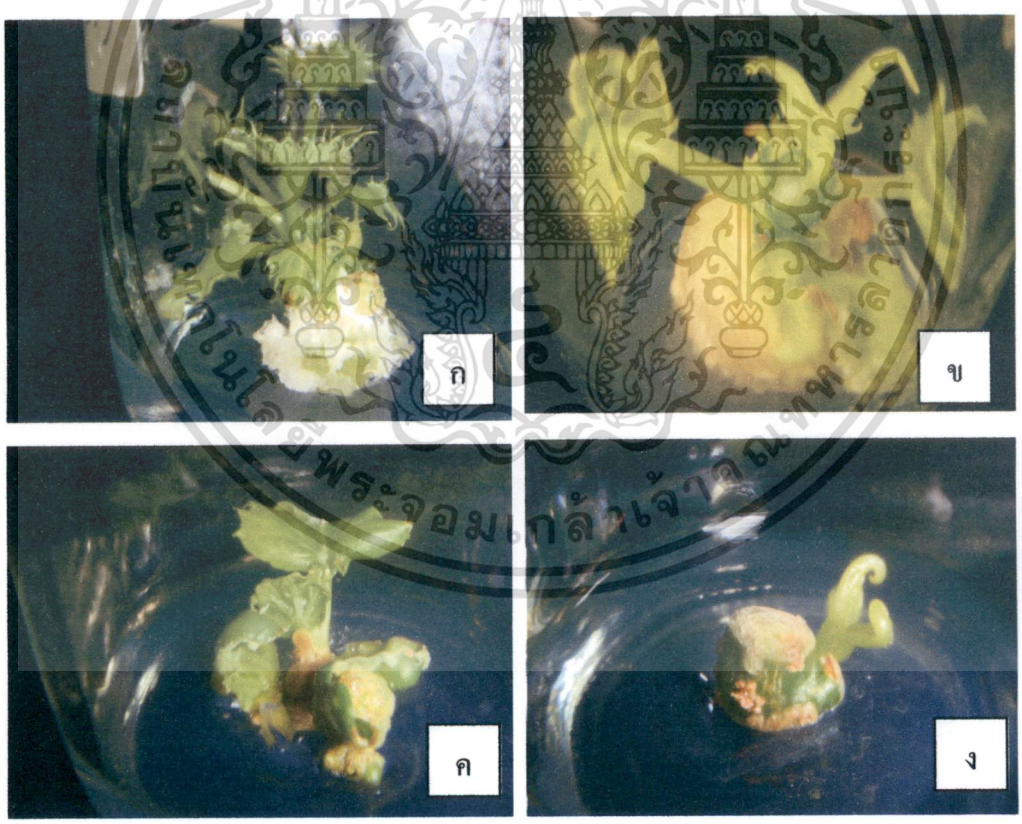
ค. BA ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. BA ที่มีความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 แสดงการเปลี่ยนแปลงเฉลี่ยของการเจริญของสบู่ดำสายพันธุ์จากประเทศลาว บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร MS ที่เติมBA(มก./ลิตร)	ขนาดของแคลลัส (ตร.มม.)	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวของก้านใบ (มม.)
1	187.79[b]	5.8[a]	4.412[b]
3	216.91[a]	3.4[c]	5.732[a]
5	184.17[b]	4.6[b]	3.778[b]
7	78.13[c]	0[d]	0[c]

หมายเหตุ [a-d] หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.41 การพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของสบู่ดำสายพันธุ์ลาว

ก. BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

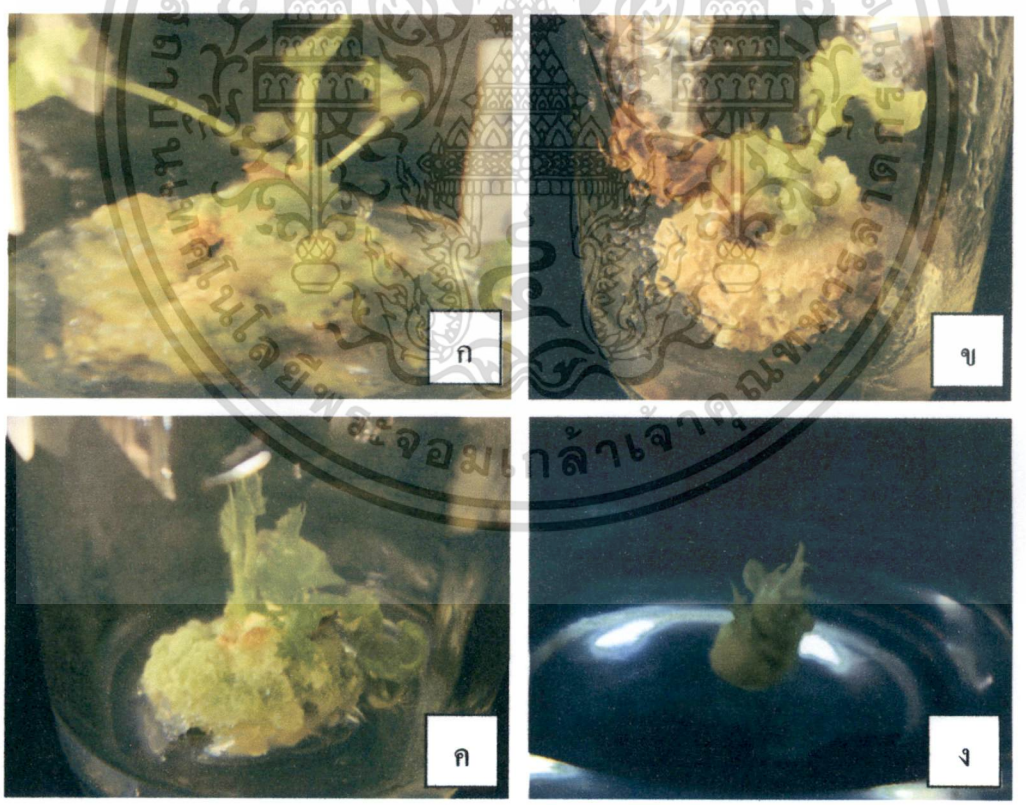
ค. BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. BA ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.23 แสดงการเปลี่ยนแปลงเฉลี่ยของการเจริญของสบู่ดำสายพันธุ์แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดีนีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร MSที่เติม BA(มก./ลิตร)	ขนาดของแคลลัส (ตร.มม.)	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวของก้านใบ (มม.)
1	256.83[a]	3.4[b]	7.04[a]
3	203.86[b]	4.2[b]	5.81[b]
5	239.51[a]	5.8[a]	4.28[c]
7	74.01[c]	0[c]	0[d]

หมายเหตุ [a-d] หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



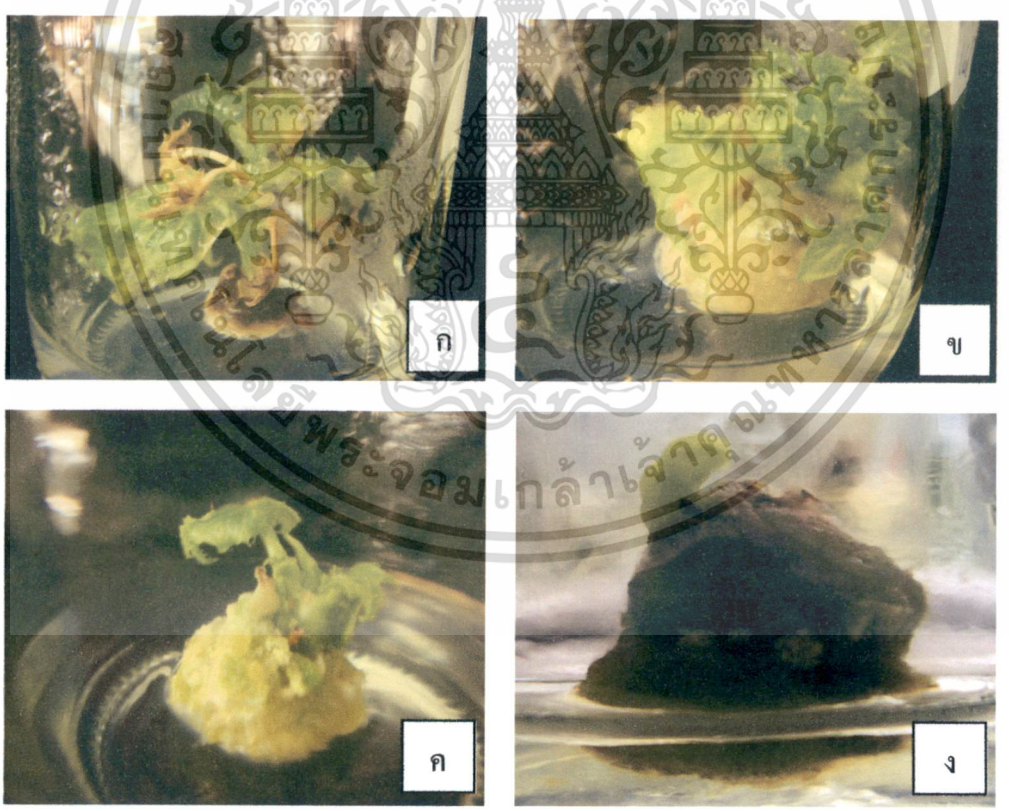
รูปที่ 4.42 การพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของสบู่ดำสายพันธุ์แม่ปิงน้อย
ก. BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
ค. BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. BA ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. 24 แสดงการเปลี่ยนแปลงเฉลี่ยของการเจริญของสบู่ดำสายพันธุ์สำโรง (เขมร) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร MSที่เติม BA(มก./ลิตร)	ขนาดของแคลลัส (ตร.มม.)	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวของก้านใบ (มม.)
1	185.96[b]	4.2[b]	7.53[a]
3	217.05[a]	7.4[a]	1.09[c]
5	199.00[b]	2.6[c]	2.93[b]
7	78.14[c]	0[d]	0[d]

หมายเหตุ [a-d] หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.43 การพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของสบู่ดำสายพันธุ์เขมร

ก. BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

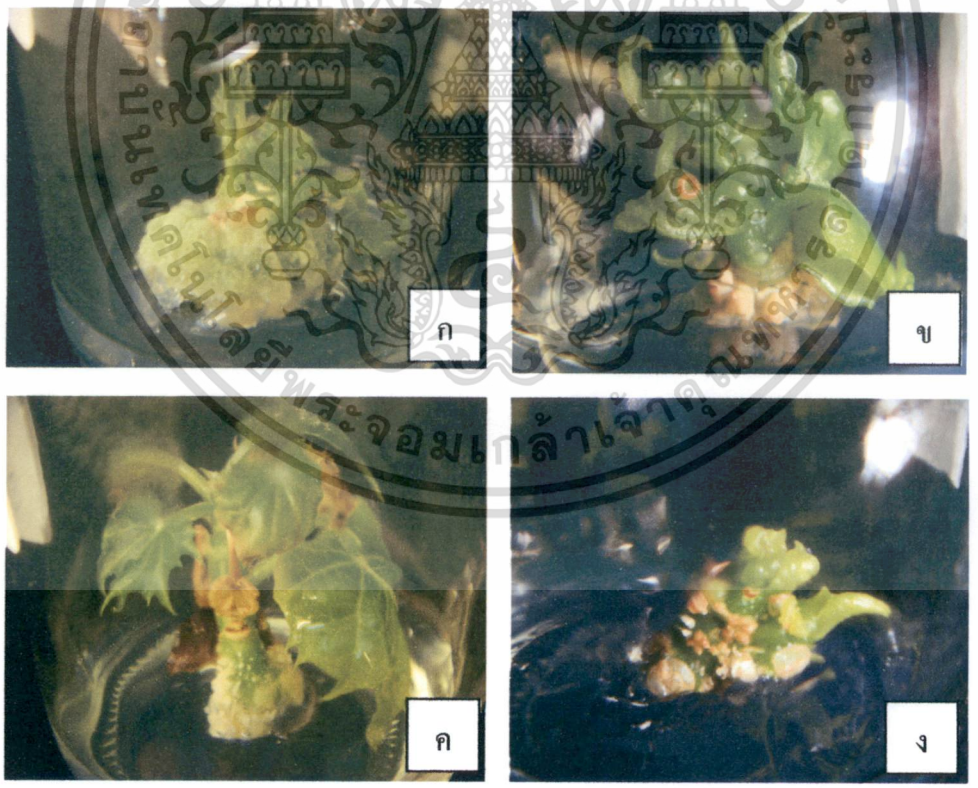
ค. BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. BA ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.25 แสดงการเปลี่ยนแปลงเฉลี่ยของการเจริญของสบู่ดำสายพันธุ์อเมริกา บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร MSที่เติม BA (มก./ลิตร)	ขนาดของแคลลัส (ตร.มม.)	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวของก้านใบ (มม.)
1	178.87[a]	3.4[b]	6.57[a]
3	194.32[a]	4.8[a]	2.65[c]
5	144.24[b]	2.6[b]	4.21[b]
7	54.04[c]	0[c]	0[d]

หมายเหตุ [a-d] หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.44 การพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของสบู่ดำสายพันธุ์อเมริกา

ก. BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. BA ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญไปเป็นแคลลัส

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เกิดเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอให้เจริญไปเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการศึกษาจากสบู่ดำทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ A69, A73, B12, B20, B22 และน่าน พบว่า สบู่ดำทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ทั้งหมด ซึ่งสีของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีตั้งแต่สีเหลืองอ่อน เขียวอ่อน เขียวแก่ และสีน้ำตาลอ่อน โดยลักษณะของแคลลัสส่วนใหญ่ จะเป็นแบบเกาะตัวกันหลวมๆ (friable callus) ซึ่งสามารถหลุดออกจากกันได้ง่าย มีลักษณะชุ่มน้ำ ซึ่งจะต้องทำการวัดขนาดของแคลลัสจากความกว้าง และความยาว เพื่อนำมาหาค่าพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ซึ่งจะแบ่งระยะเวลาในการวัดขนาดของแคลลัสเป็นเวลา 0, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ

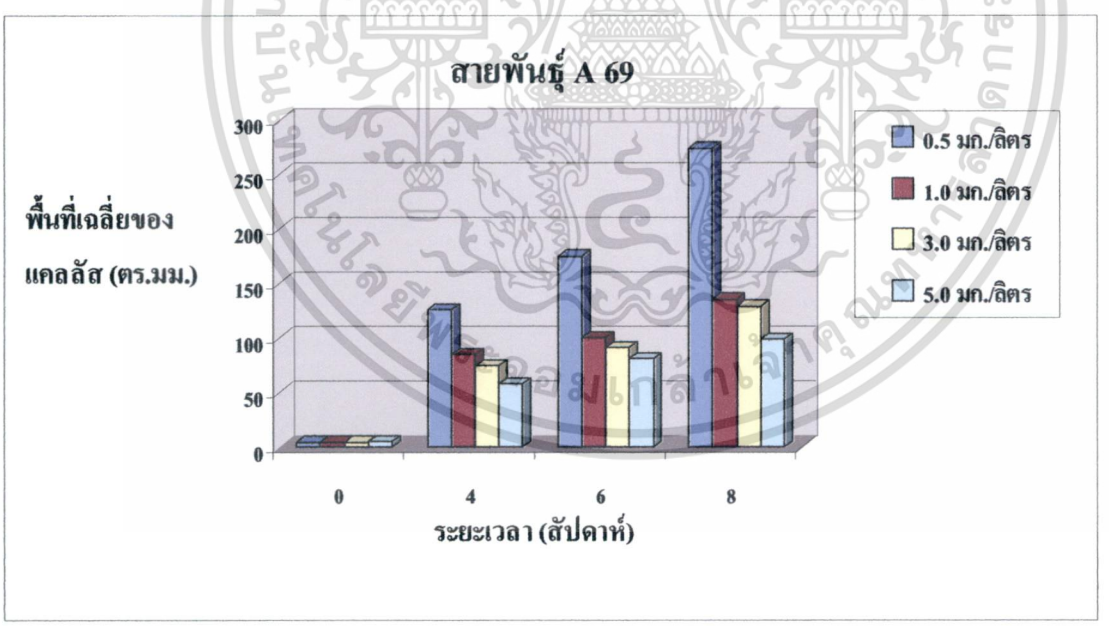
จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสบู่ดำบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น โดยสบู่ดำสายพันธุ์ A69 (ตารางที่ 4.26 และ รูปที่ 4.45) เอ็มบริโอเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.46) ซึ่งมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 273.99 ตารางมิลลิเมตร ส่วนเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ A73 (ตารางที่ 4.27 และรูปที่ 4.47) เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.48) โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 263.79 ตารางมิลลิเมตร สบู่ดำสายพันธุ์ B12 (ตารางที่ 4.28 และรูปที่ 4.49) พบว่าเอ็มบริโอสามารถเจริญบนอาหารที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีที่สุด(รูปที่ 4.50) และมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 315.15 ตารางมิลลิเมตร ส่วนสบู่ดำสายพันธุ์ B20 (ตารางที่ 4.29 และรูปที่ 4.51) พบว่าในอาหารที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เอ็มบริโอสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.52) ซึ่งมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 329.19 ตารางมิลลิเมตร สบู่ดำสายพันธุ์ B22 (ตารางที่ 4.30 และรูปที่ 4.53) พบว่า เอ็มบริโอเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.54)โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 344.25 ตารางมิลลิเมตร และในสายพันธุ์น่าน (ตารางที่ 4.31 และรูปที่ 4.55) สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.55) และมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 288.34 ตารางมิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.26 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแคลลัสจากเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ A69 ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

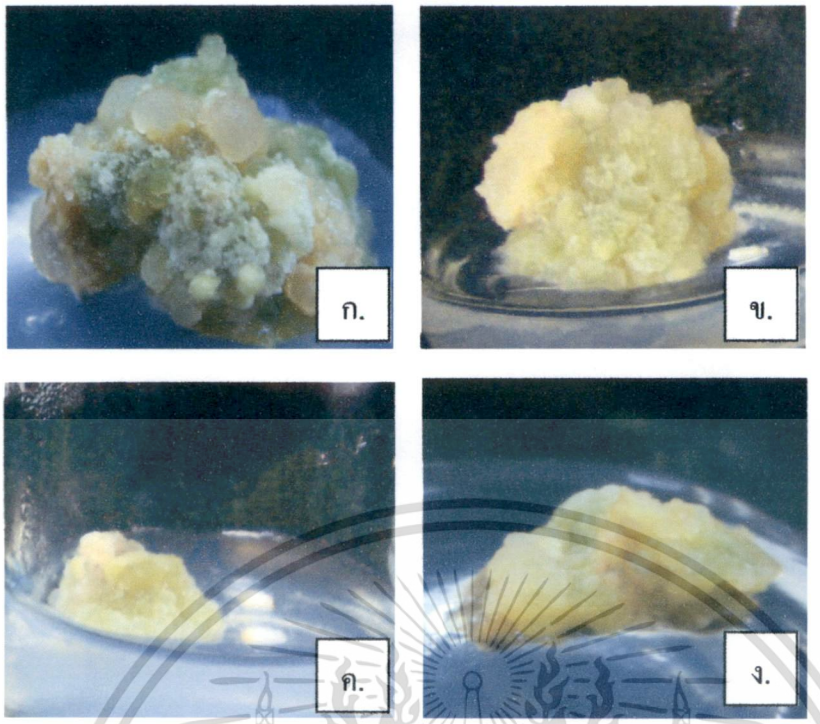
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	4.7^{a}	125.98^{de}	174.9^{f}	273.99^{g}
1	4.71^{a}	84.94^{bc}	99.66^{cde}	135.16^{e}
3	4.70^{a}	74.65^{bc}	90.84^{bcd}	128.94^{de}
5	5.01^{a}	57.98^{b}	80.58^{bc}	99.01^{cde}

ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกัน สังเกตุได้จากที่สัปดาห์ที่ 4 ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัม มีอักษร b เหมือนกันแสดงว่ามีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสไม่แตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในสัปดาห์เดียวกัน



รูปที่ 4.45 กราฟแสดงการเพิ่มขนาดของแคลลัสโดยเฉลี่ยจากเอ็มบริโอของสบู่ดำพันธุ์ A69 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เห็นได้ชัดเจนว่าที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสสูงที่สุดในทุกสัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



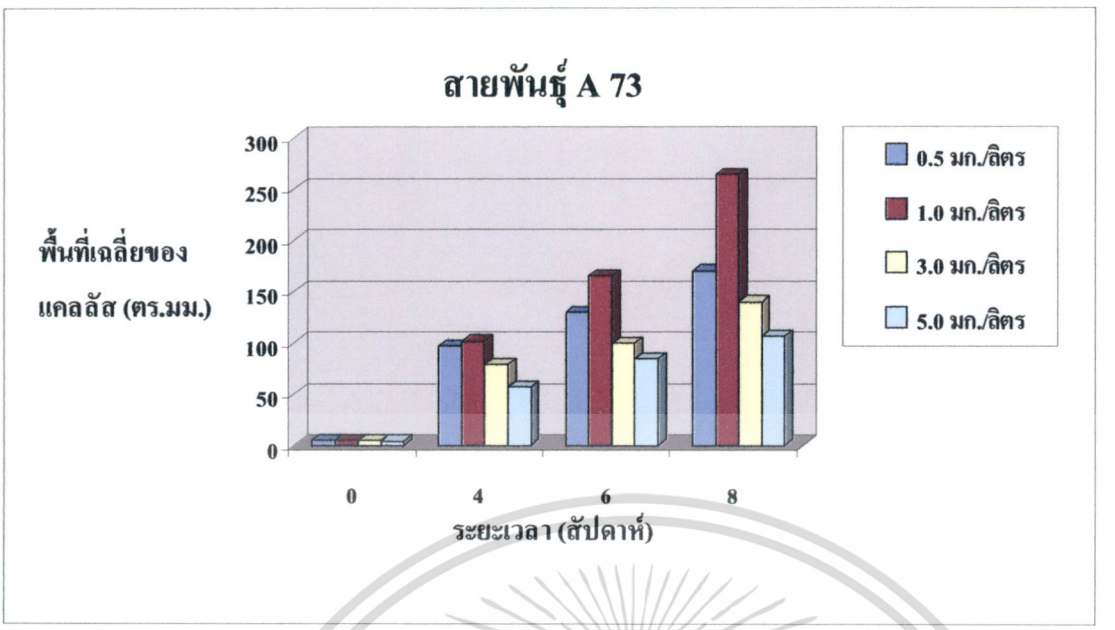
รูปที่ 4.46 แสดงลักษณะการเจริญของแคลลัสจากการชักนำเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ A69 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น ก. 0.5 ข. 1 ค. 3 และ ง. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.27 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแคลลัสจากเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ A73 ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

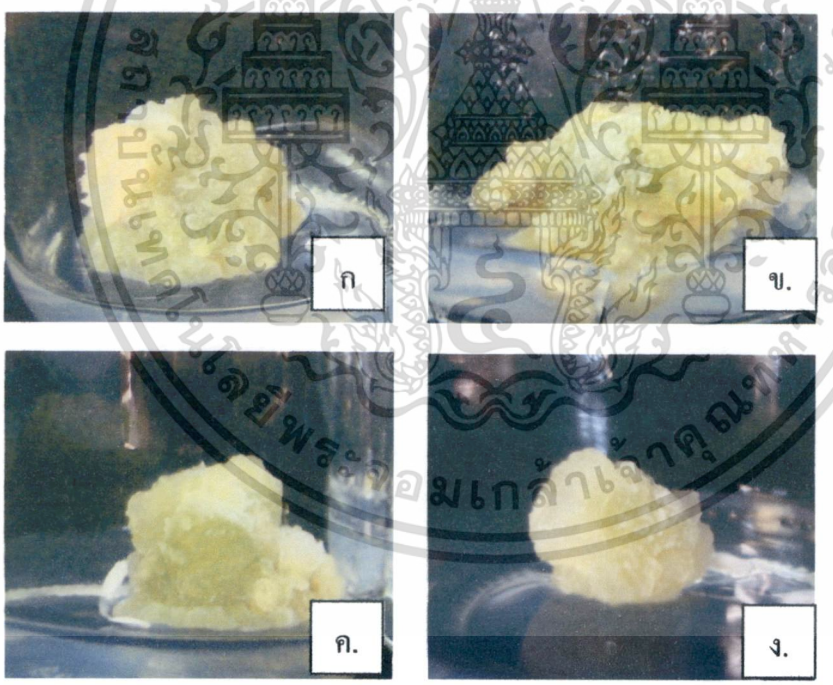
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	4.70^{a}	96.67^{bcd}	129.49^{cde}	169.90^{e}
1	4.73^{a}	101.39^{bcd}	164.85^{e}	263.79^{f}
3	4.63^{a}	78.96^{bc}	99.03^{bcd}	139.69^{de}
5	4.14^{a}	56.86^{ab}	84.25^{bcd}	105.75^{bcd}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.47 กราฟแสดงการเพิ่มขนาดของแคลลัสโดยเฉลี่ย จากเอ็มบริโอของสบู่ดำพันธุ์ A73 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



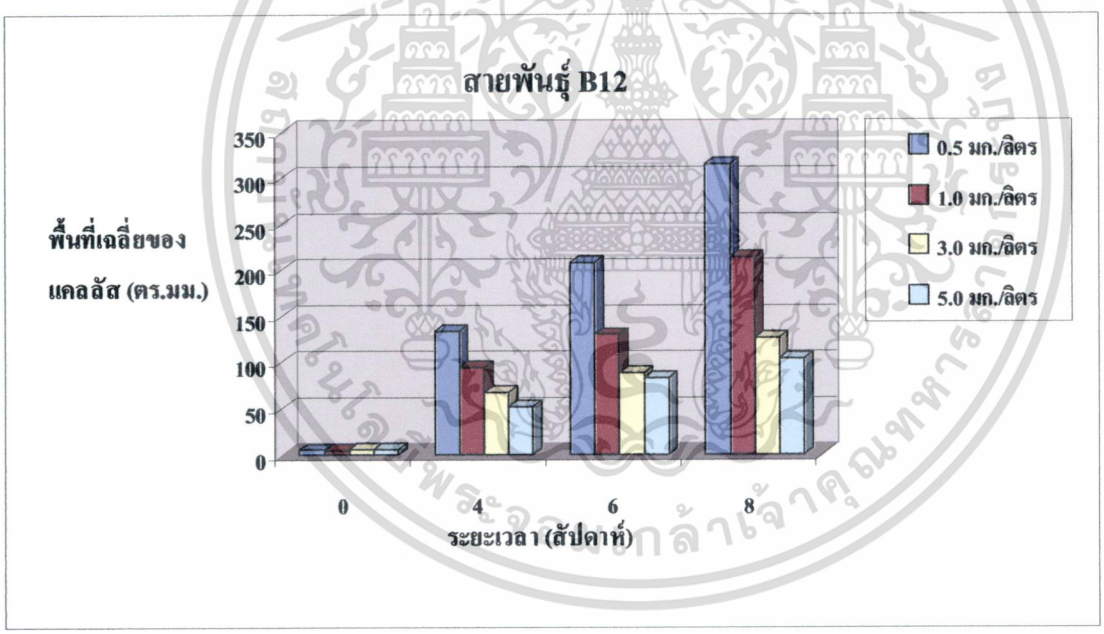
รูปที่ 4.48 แสดงลักษณะการเจริญของแคลลัสจากการชักนำเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ A 73 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น ก. 0.5 ข. 1 ค. 3 และ ง. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.28 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแคลลัสจากเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ B12 ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

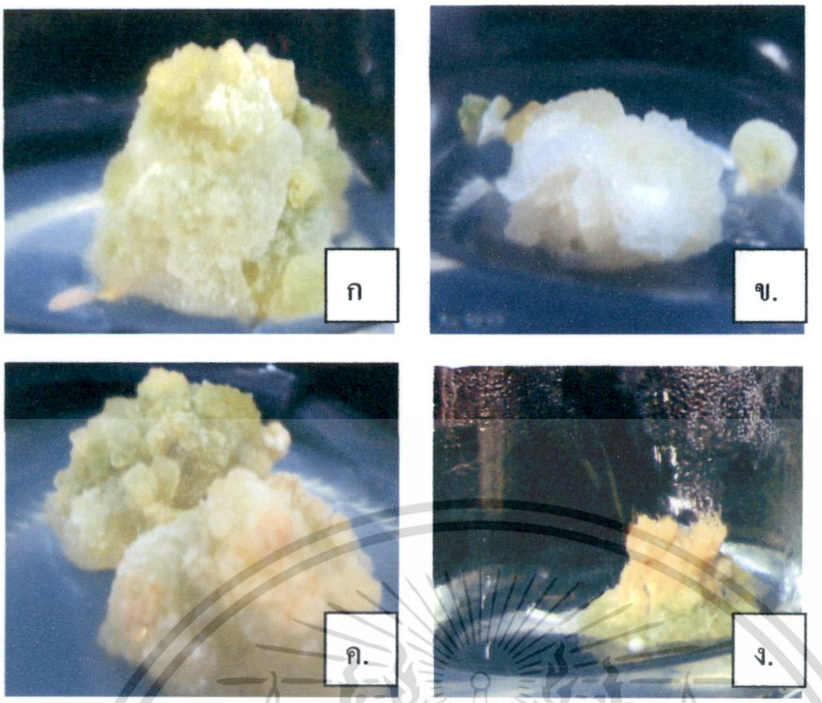
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	4.67[a]	133.73[c]	208.06[d]	315.15[e]
1	4.56[a]	93.76[bc]	129.94[c]	213.94[d]
3	4.76[a]	67.28[b]	88.65[bc]	126.10[c]
5	4.87[a]	52.00[ab]	83.23[bc]	103.60[bc]

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.49 กราฟแสดงการเพิ่มขนาดของแคลลัสโดยเฉลี่ย จากเอ็มบริโอของสบู่ดำพันธุ์ B12 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



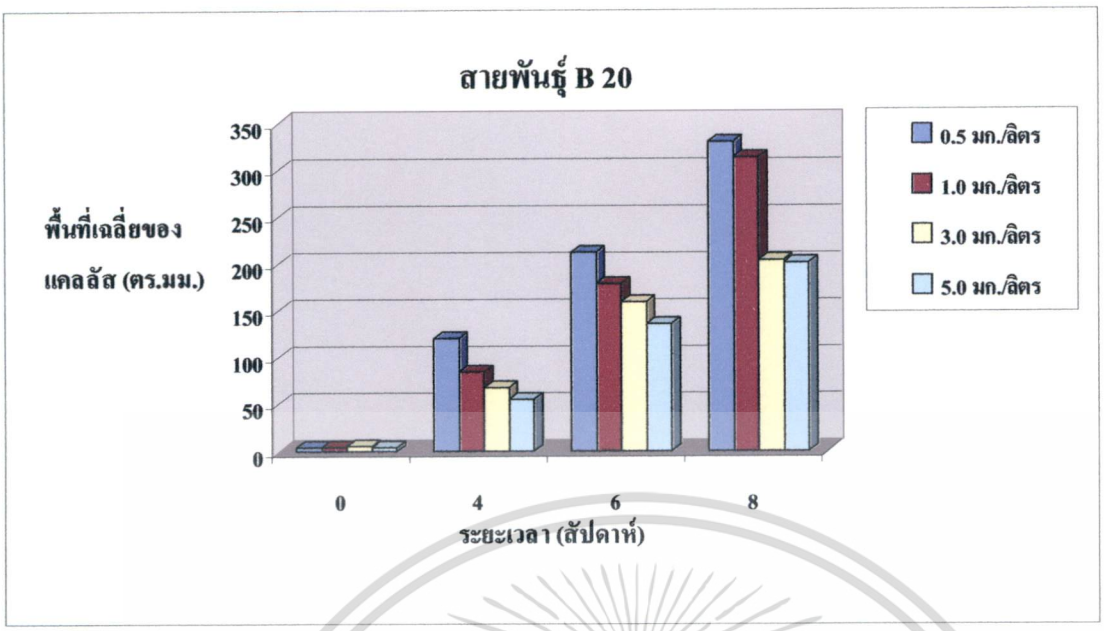
รูปที่ 4.50 แสดงลักษณะการเจริญของแคลลัสจากการชักนำเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ B 12 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น ก. 0.5 ข. 1 ค. 3 และ ง. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.29 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแคลลัสจากเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ B20 ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

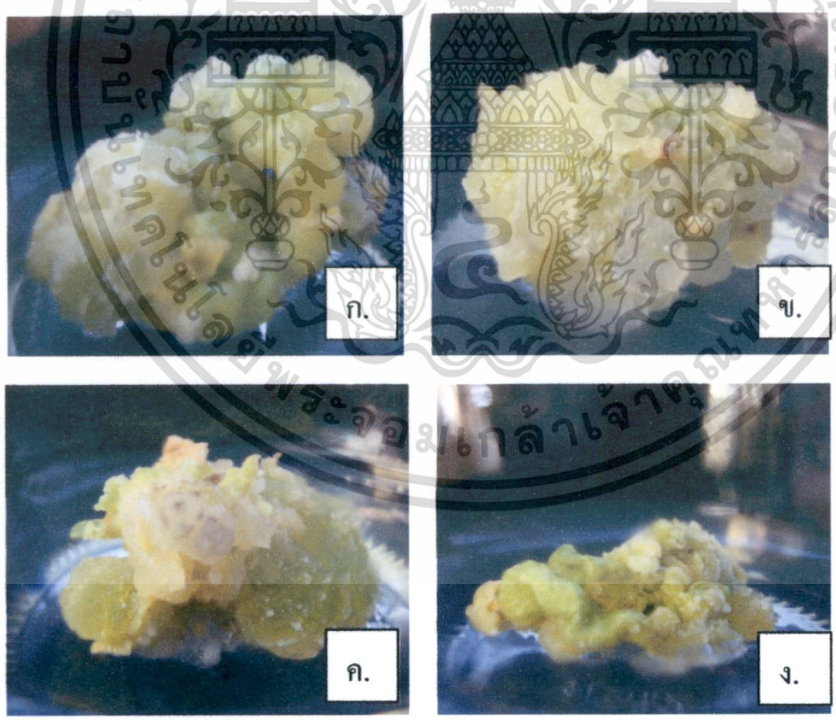
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	4.25^{a}	120.25^{d}	211.24^{g}	329.19^{h}
1	3.97^{a}	84.76^{c}	178.47^{ef}	312.98^{h}
3	4.68^{a}	67.18^{bc}	159.22^{e}	203.67^{g}
5	4.14^{a}	54.99^{b}	135.06^{d}	200.03^{fg}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.51 กราฟแสดงการเพิ่มขนาดของแคลลัสโดยเฉลี่ย จากเอ็มบริโอของสบู่ดำพันธุ์ B20 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



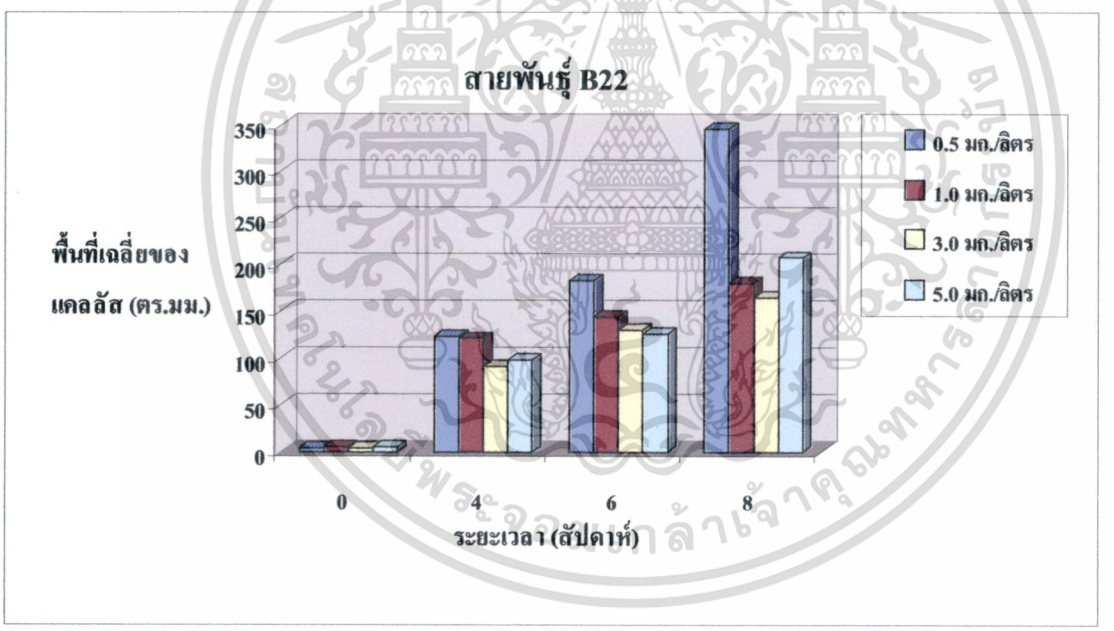
รูปที่ 4.52 แสดงลักษณะการเจริญของแคลลัสจากการชักนำเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ B20 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น ก. 0.5 ข. 1 ค. 3 และ ง. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.30 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแคลลัสจากเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ B22 ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

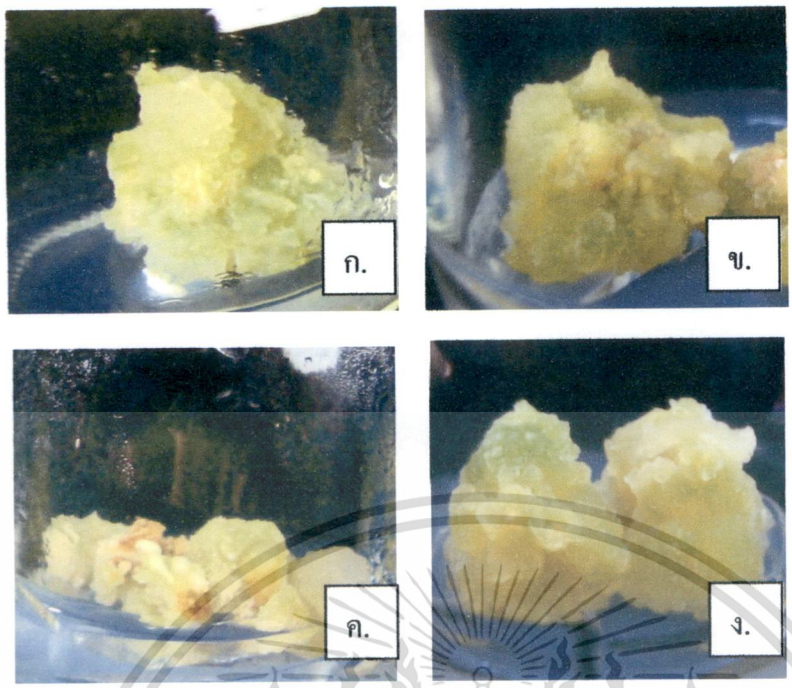
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	4.41^{a}	122.68^{bc}	181.98^{cd}	344.25^{e}
1	4.80^{a}	120.93^{bc}	143.87^{bcd}	180.25^{cd}
3	4.42^{a}	91.81^{b}	130.07^{bc}	164.47^{bcd}
5	4.63^{a}	98.33^{b}	126.08^{bc}	206.87^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.53 กราฟแสดงการเพิ่มขนาดของแคลลัสโดยเฉลี่ย จากเอ็มบริโอของสบู่ดำพันธุ์ B22 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



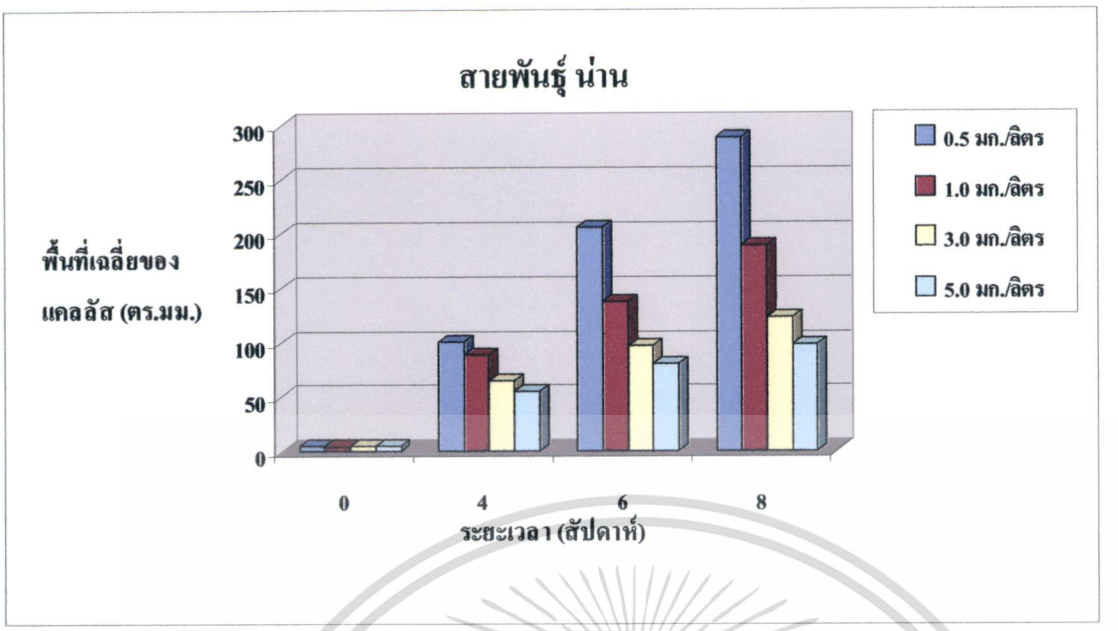
รูปที่ 4.54 แสดงลักษณะการเจริญของแคลลัสจากการชักนำเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์ B 22 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น ก. 0.5 ข. 1 ค. 3 และ ง. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.31 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแคลลัสจากเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์น่าน ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความ เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

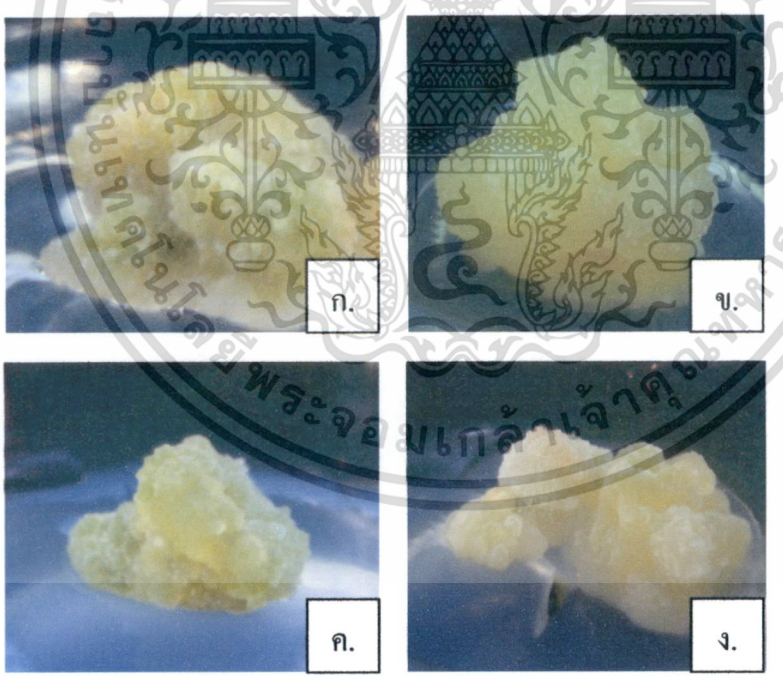
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	5.08^{a}	100.92^{de}	205.79^{g}	288.34^{h}
1	4.39^{a}	88.12^{cd}	137.75^{f}	189.26^{g}
3	4.47^{a}	64.62^{bc}	96.74^{de}	123.53^{ef}
5	4.64^{a}	54.73^{b}	79.71^{bcd}	97.70^{de}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.55 กราฟแสดงการเพิ่มขนาดของแคลลัสโดยเฉลี่ย จากเอ็มบริโอของสบู่ดำพันธุ์น่าน บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.56 แสดงลักษณะการเจริญของแคลลัสจากการชักนำเอ็มบริโอของสบู่ดำสายพันธุ์น่านในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น ก. 0.5 ข. 1 ค. 3 และ ง. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม BA ให้เจริญเป็นต้นใหม่ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของต้นสบู่ดำสายพันธุ์ A69, A73, B12, B20, B22 และน่าน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และพบว่าลักษณะของแคลลัสส่วนใหญ่จะเป็นแบบเกาะตัวกันแน่นๆ (compact callus) และมีสีเขียว ซึ่งเป็นแคลลัสที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ จากนั้นทำการย้ายแคลลัสทั้ง 6 สายพันธุ์ ลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ พบว่าแคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น มีการพัฒนาไปเป็นยอด และเจริญเป็นต้นใหม่ ยกเว้นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B12 ที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในทุกความเข้มข้นของ BA

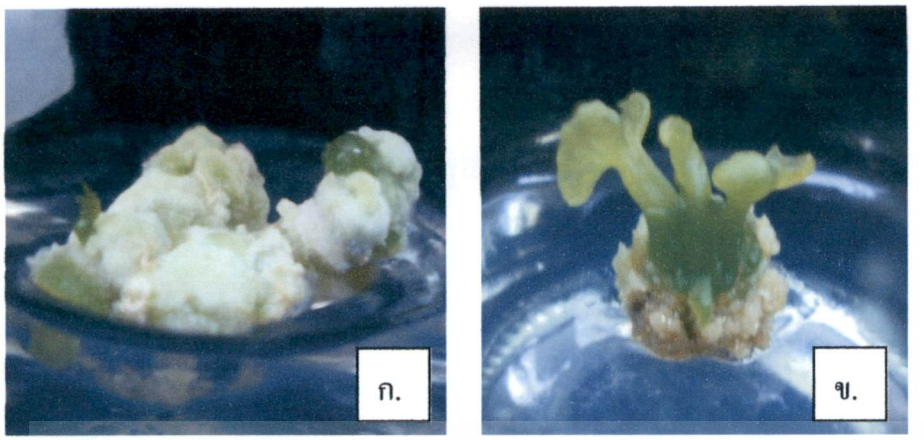
ตารางที่ 4.32 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นของสบู่ดำสายพันธุ์ A69 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้ม ข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดโดยเฉลี่ย (ยอด)		
	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	1.00	2.00*	3.00*
1	1.33*	1.67	2.33
3	0.67	1.00	2.00
5	1.00	1.33	2.00

* คือ จำนวนยอดโดยเฉลี่ยที่สูงที่สุดในแต่ละสัปดาห์

พบว่าใน 4 สัปดาห์แรกสบู่ดำสายพันธุ์ A69 มีการเจริญไปเป็นยอดได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.33 ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 พบว่ามีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 2.00 และ 3.00 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.57 แสดงลักษณะการเกิดยอดของสบู่ดำสายพันธุ์ A 69 ที่ชักนำให้เกิดยอดด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น ก. 0.5 ที่ 6 สัปดาห์ และ ข. 1 ที่ 8 สัปดาห์

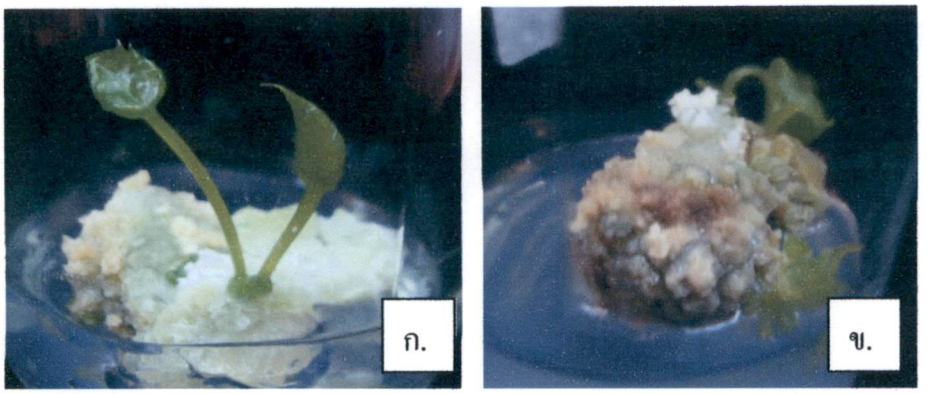
ตารางที่ 4.33 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นของสบู่ดำสายพันธุ์ A73 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดโดยเฉลี่ย (ยอด)		
	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	0.67	1.33	2.00
1	1.67*	3.00*	4.33*
3	0.67	2.00	2.33
5	0.67	1.67	1.67

* คือ จำนวนยอดโดยเฉลี่ยที่สูงที่สุดในแต่ละสัปดาห์

พบว่าแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A73 ที่ชักนำโดย BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญไปเป็นยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.67, 3.00 และ 4.33 ที่ 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.58 แสดงลักษณะการเกิดยอดของสบู่ดำสายพันธุ์ A 73 ที่ชักนำให้เกิดยอดด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น ก. 0.5 และ ข. 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะพบว่ามีใบเล็กๆ เกิดขึ้น

พบว่าแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B12 ไม่สามรถเจริญไปเป็นยอดได้จากการชักนำโดย BA ที่ความเข้มขน 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสมีขนาดใหญ่ และจับกันแน่นขึ้น มีสีเขียวเข้มขึ้น (รูปที่ 4.42)

รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B12 ที่ชักนำให้เกิดยอดด้วยสารควบคุมการ เจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น ก. 1 และ ข. 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีการเจริญไปเป็นยอดและใบ แต่มีการเจริญเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact สีเขียวเข้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.34 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นของสบู่ดำสายพันธุ์ B20 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดโดยเฉลี่ย (ยอด)		
	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	0.33	1.00	2.00
1	1.00	1.33	3.00
3	1.67*	3.33*	5.00*
5	0.67	1.33	1.67

* คือ จำนวนยอดโดยเฉลี่ยที่สูงที่สุดในแต่ละสัปดาห์

พบว่าแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B20 ที่ชักนำโดย BA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.67, 3.33 และ 5.00 ที่ 4, 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ

รูปที่ 4.59 แสดงลักษณะการเกิดยอดของสบู่ดำสายพันธุ์ B20 ที่ชักนำให้เกิดยอดด้วยสารเร่งการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น ก. 1 และ ข. 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเจริญไปเป็นยอดและใบจำนวนมาก และมีบางส่วนที่เจริญเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact สีเขียวเข้ม

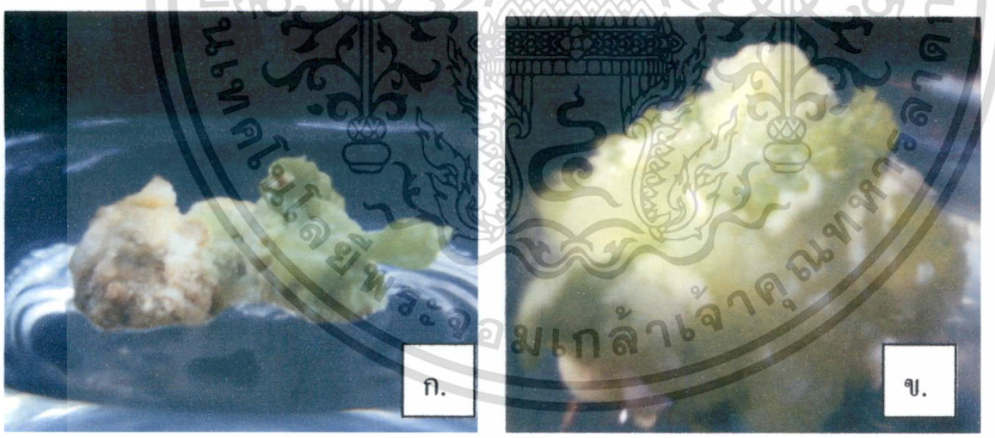
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.35 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นของสบู่ดำสายพันธุ์ B22 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดโดยเฉลี่ย (ยอด)		
	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	0.67	2.00	2.33
1	1.33*	2.33*	3.00*
3	1.33*	1.67	2.33
5	1.33*	2.00	2.66

* คือ จำนวนยอดโดยเฉลี่ยที่สูงที่สุดในแต่ละสัปดาห์

พบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรก แคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B22 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงเท่าที่ BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 คือ 1.33 ยอด และมีจำนวนยอดเฉลี่ยแตกต่างกันในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 โดยที่ชักนำโดย BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.33 และ 3.00 ที่ 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ



รูปที่ 4.60 แสดงลักษณะการเกิดยอดของสบู่ดำสายพันธุ์ B22 ที่ชักนำให้เกิดยอดด้วยสารเร่งการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น ก. 0.5 และ ข. 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเจริญไปเป็นยอดเล็กๆ และมีการเจริญของใบ โดยส่วนมากจะเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็นเกาะกันแน่น มีสีเขียวเข้ม

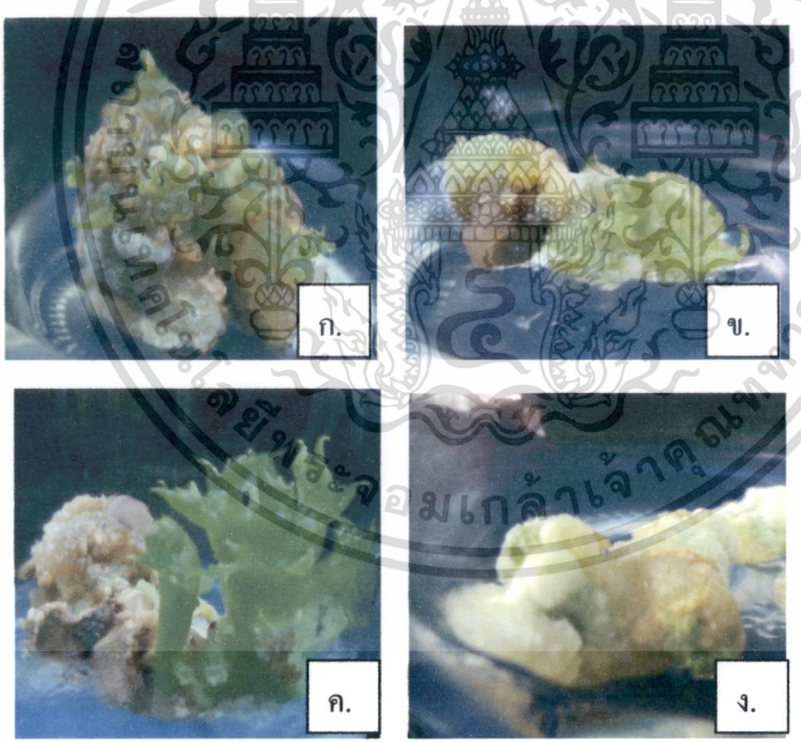
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.36 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นของสบู่ดำสายพันธุ์น่านในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดโดยเฉลี่ย (ยอด)		
	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0.5	1.67	2.00	4.00
1	1.67	2.33	3.33
3	2.33*	3.67*	7.33*
5	2.00	2.67	4.00

* คือ จำนวนยอดโดยเฉลี่ยที่สูงที่สุดในแต่ละสัปดาห์

พบว่าแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์น่านที่ชักนำโดย BA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.33, 3.67 และ 7.33 ที่ 4, 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ



รูปที่ 4.61 แสดงลักษณะการเกิดยอดของสบู่ดำสายพันธุ์น่าน ที่ชักนำให้เกิดยอดด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น ก. 0.5 ข. 1 ค. 3 และ ง. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีสีเขียวเข้ม และมีจุดกำเนิดเป็นยอดเล็กๆ ที่พร้อมเจริญต่อไปเป็นยอด ใบ และลำต้น

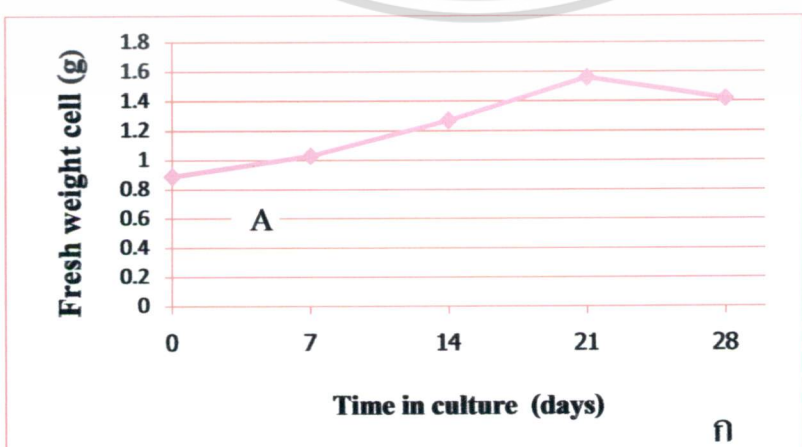
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

เมื่อนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร บันทึกผลในแต่ละช่วงเวลา คือ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน แล้วนำมา เขียนกราฟการเจริญ พบว่าในช่วงวันที่ 0-21 อัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่หลังจากวันที่ 21 อัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยจะลดลง และเกิดการตายของเซลล์ เนื่องจากสารอาหารถูกเซลล์ใช้จนไม่เพียงพอที่เซลล์จะใช้ในการเจริญเติบโตต่อไปได้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเปลี่ยนอาหาร คือ ช่วงวันที่ 14-21 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.37 และ รูปที่ 4.61 ก. และ ข.) จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 4.62 ก. และศึกษาการมีชีวิตของเซลล์โดยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตจะมีการเรืองแสงสีเขียวสำหรับเซลล์มีชีวิต (รูปที่ 4.62 ข.)

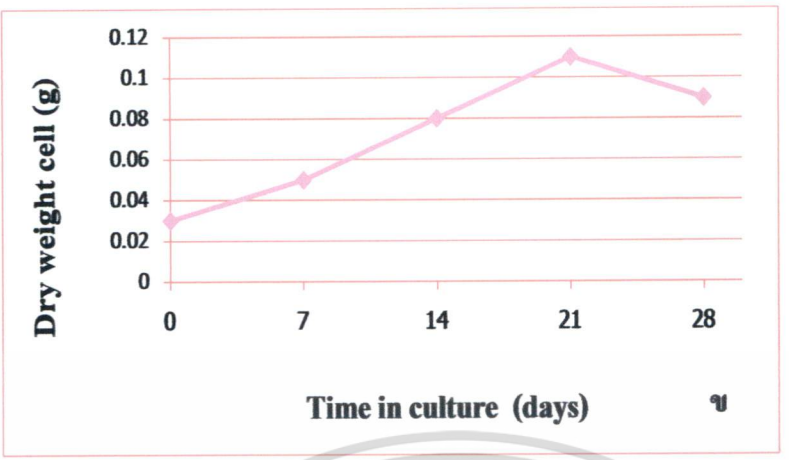
ตารางที่ 4.37 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยของสบู่ดำของสายพันธุ์ KJ1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน

เวลา (วัน)	น้ำหนักสด (mg/30 ml)	น้ำหนักแห้ง (mg/30 ml)
0	0.89^{e}	0.03^{d}
7	1.03^{d}	0.05^{c}
14	1.27^{bc}	0.08^{b}
21	1.56^{a}	0.11^{a}
28	1.42^{ab}	0.09^{ab}



ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.61 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของสบู่ดำของสายพันธุ์ KJ1,
(ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง

รูปที่ 4.62 ก. เซลล์แขวนลอยที่ปกติเมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
รูปที่ 4.62 ข. เป็นเซลล์แขวนลอยการที่มีชีวิตทราบโดยการย้อมสีฟลูออเรสซีน ไดอะซีเตตจะมีการเรืองแสงเป็นสี เขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6. การชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

1. 1. การชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นอ่อน แล้วนำต้นอ่อนมาชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์นสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้นต่างๆ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.4 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสง ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 30 วันพบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ทุกสูตรอาหาร (รูปที่ 4.63) และสามารถนำออกปลูกสู่ธรรมชาติได้สำเร็จ

รูปที่ 4.63 การเจริญเป็นต้นใหม่ของต้นสบู่ดำที่มียอดและรากสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

4.7.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างสบู่ดำที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้เก็บรวบรวมตัวอย่างต้นสบู่ดำจากจังหวัดต่างๆ และได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้าม ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ฉัตรแก้ว โดยสายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 22 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ เขมร , น่าน, ยโสธร, โคราช, อินเดีย, ห้วยฮ้องไคร้, ลำปาง และสมก ดังตารางที่ 4.38

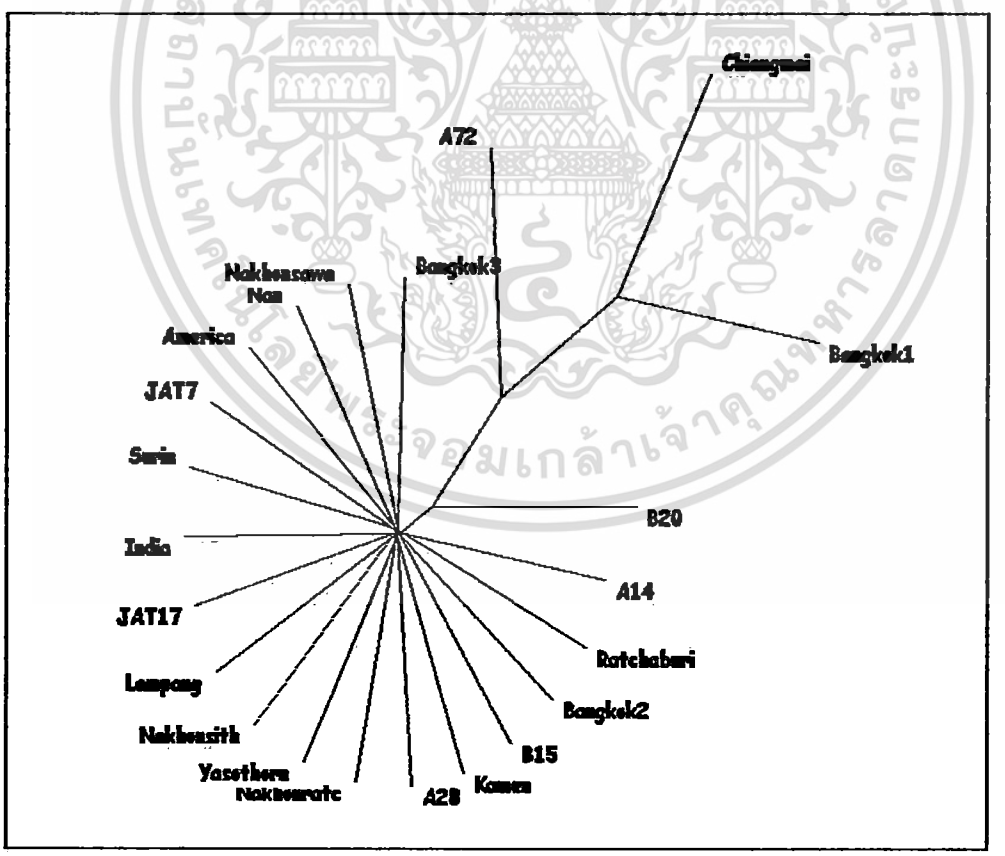
ตารางที่ 4.38 รหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างต้นสบู่ดำที่ใช้ในการศึกษา

รหัส	แหล่งที่มา	ไอโซเลต	แหล่งที่มา
A 14	จากการปรับปรุงพันธุ์	เชียงใหม่ (Chiangmai)	จากจังหวัดเชียงใหม่
A 28	จากการปรับปรุงพันธุ์	อินเดีย (India)	
A 72	จากการปรับปรุงพันธุ์	เขมร (Kamen)	
B 15	จากการปรับปรุงพันธุ์	ลำปาง (Lampang)	จากจังหวัดลำปาง
B 20	จากการปรับปรุงพันธุ์	นครสวรรค์ (Nakhonsawan)	จากจังหวัดนครสวรรค์
JAT 7	จากการปรับปรุงพันธุ์	นครศรีธรรมราช (Nakhonsithammarat)	จากจังหวัดนครศรีธรรมราช
JAT 17	จากการปรับปรุงพันธุ์	นครราชสีมา หรือโคราช (Nakhonratchasima)	จากจังหวัดนครราชสีมา
อเมริกา (America)		น่าน (Nan)	จากจังหวัดน่าน
กรุงเทพ 1 (Bangkok 1 หรือKJ)	จากเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร	ราชบุรี (Ratchaburi)	จากจังหวัดราชบุรี
กรุงเทพ 2 (Bangkok 2 หรือ SMK-1)	จากสมาคมนิสิตเก่า มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในพระบรมราชูปถัมภ์	สุรินทร์ (Surin)	จากจังหวัดสุรินทร์
กรุงเทพ 3 (Bangkok 3 หรือSMK-3)	จากสมาคมนิสิตเก่า มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในพระบรมราชูปถัมภ์	ยโสธร (Yasothorn)	จากจังหวัดยโสธร
ห้วยห้องไคร้ (Huaihongkhrai)	จากจังหวัดเชียงใหม่		

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์การสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

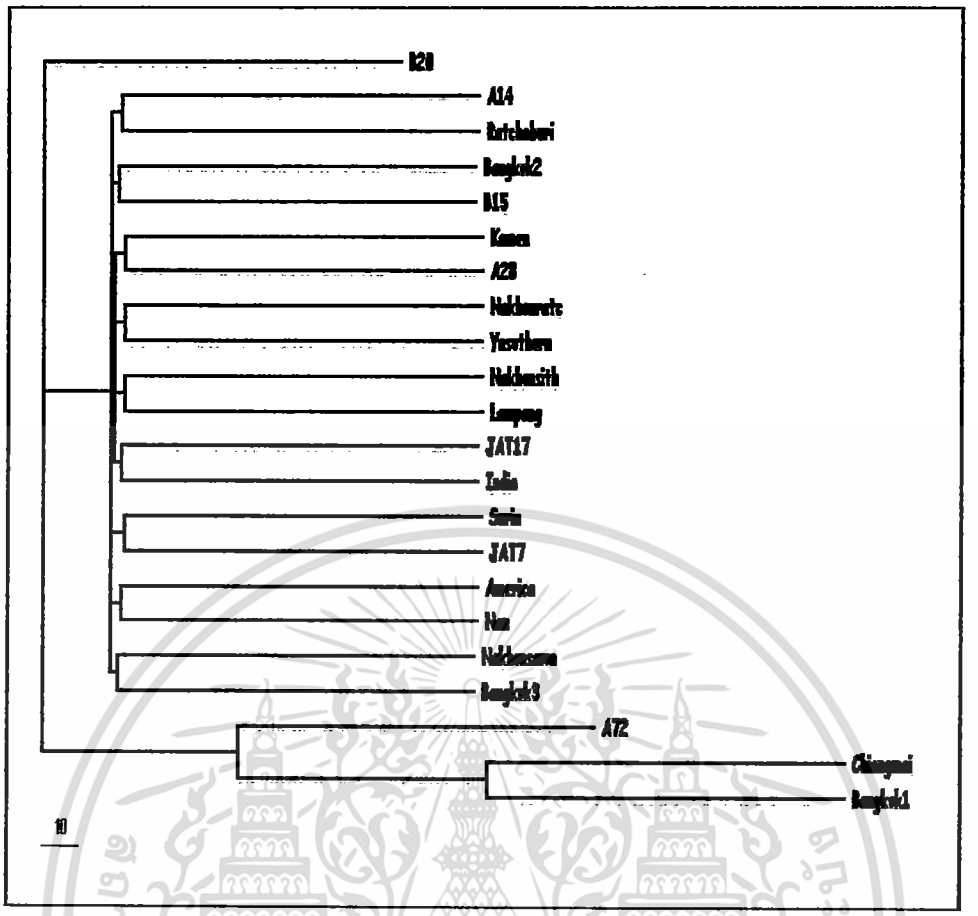
4.7.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

ในการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลโดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c และ d ในทุกตัวอย่าง พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวประมาณ 600 คู่เบส ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอใกล้เคียงกับยาสูบที่มีขนาดประมาณ 577 คู่เบส (Taberlet *et al.*, 1991) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมาวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 4.64 และ 4.65 ซึ่งพบว่าสบู่ดำไม่แตกต่างทั้งในระดับสปีชีส์ ยกเว้น A 72, B 20, Chiangmai และ Bangkok 1 โดยที่ A 72 และ B 20 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการผสมข้าม และจากการที่ไม่มีความหลากหลายในระดับสปีชีส์อาจเนื่องจากพืชสบู่ดำเป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายโดยการปักชำ จึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างพืชส่วนใหญ่ไม่แสดงความแตกต่างกันเนื่องจากมาจากแหล่งเดียวกัน จึงอาจกล่าวว่าในการศึกษาความหลากหลายของสบู่ดำในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ชนิด c และ d มีข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาตำแหน่งอื่นๆ ทั้งในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ เช่น ตำแหน่ง *trnT-L* intergenic spacer หรือ *trnK* intron และในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 รวมทั้งการใช้ marker อื่น เช่น RAPD เพื่อประกอบการศึกษาต่อไป



รูปที่ 4.64 Unroot ของสบู่ดำ จำนวน 22 ตัวอย่าง ในบริเวณ *trn*L (UAA) intron โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining method จากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000

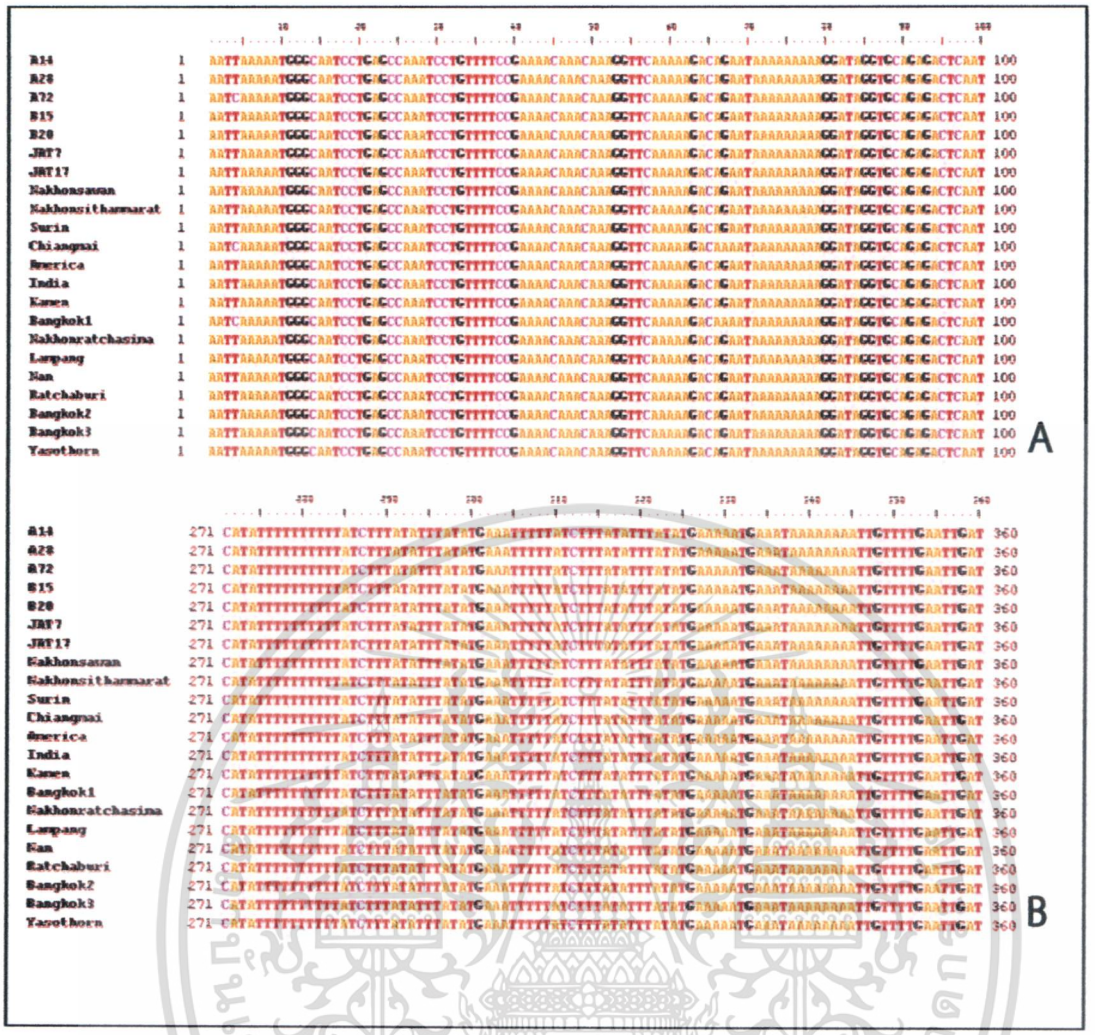
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.65 Phylogenetic tree ของสบู่ดำ จำนวน 22 ตัวอย่าง ในบริเวณ *trn*L (UAA) intron โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining method จากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000

ซึ่งในปัจจุบันนี้สบู่ดำมีส่วนสำคัญต่อการนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทน ซึ่งมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เรียบร้อยแล้วทั้งจีโนม โดยมีลำดับนิวคลีโอไทดทั้งหมด 285,858,490 คู่เบส โดยมีองค์ประกอบของเบสกัวนีนและไซโตซีนเพียง 34.3% ซึ่งเมื่อพิจารณาลำดับของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ชนิด c และ d แล้วพบองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่เป็นอะดีนีนและไทมีน ดังแสดงในรูปที่ 4.66 ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1-100 (รูปที่ 4.66 A) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 271-360 (รูปที่ 4.66 B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.66 ลำดับของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ชนิด c และ d ที่พบองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่เป็นอะดีนีนและไทมีนในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1-100 (A) และ 271-360 (B)

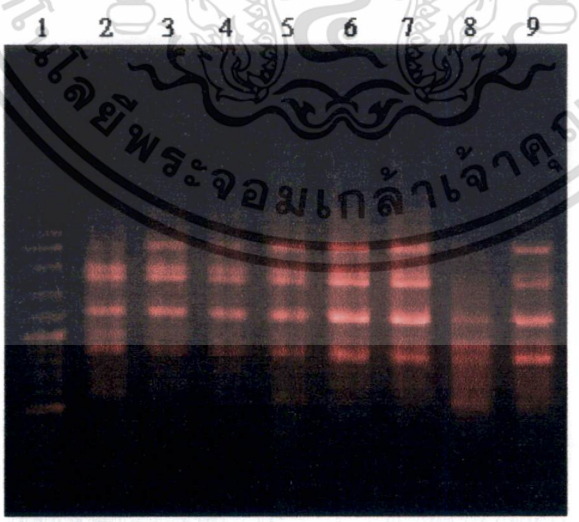
4.7.3 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสบู่ดำทั้ง 8 ตัวอย่าง ได้แก่ สำโรง (เขมร), น่าน, ยโสธร, โคราช, อินเดีย, ห้วยห้องไคร้, ลำปาง และกรุงเทพ โดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ชนิด โดยมีอุณหภูมิในขั้นตอน denature annealing และ extension เท่ากับ 94 35 และ72 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งแต่ละขั้นตอนนาน 1 นาที จำนวนซ้ำ 45 รอบ จากนั้นนำไปทำเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ตรวจผลเจล สามารถให้แถบเพียง 8 ไพรเมอร์ ดังแสดงในแต่ละไพรเมอร์ คือ OPA-07 (รูปที่ 4.67), OPA-20 (รูปที่ 4.68), PAM-01 (รูปที่ 4.69), OPAM-03, OPAX-17 (รูปที่ 4.70), OPB-14 (รูปที่ 4.71), OPD-02 (รูปที่ 4.72), OPE-17, OPG-13 (รูปที่ 4.73) และ OPK-12 (รูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

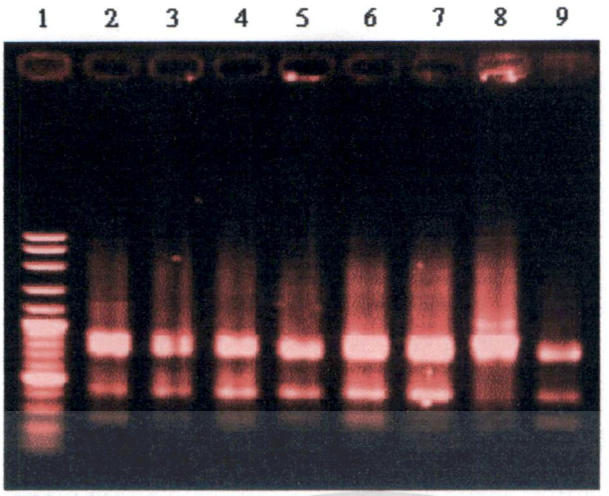
ที่ 4.74) ได้แถบของดีเอ็นเอทั้งหมด 37 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 4.6 แถบต่อไพรเมอร์ ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากหลายจำนวน 7 แถบ (18.9%) และแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายจำนวน 30 แถบ (81%) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.0e พบค่าความดัชนีเหมือนทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 0.522-0.902 ดังแสดงในตารางที่ 4.65 จากค่าที่ได้ในเกิดจากการเปรียบเทียบความเหมือนทางพันธุกรรมของตัวอย่างสบู่ดำ จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของตัวอย่างเองจะมีค่าเป็น 1 และเมื่อเทียบเป็นปอร์เซ็นต์จะมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีความเหมือนกันทางพันธุกรรม โดยสายพันธุ์อินเดียกับน่านมีความเหมือนกันมากที่สุด โดยสายพันธุ์อินเดียเมื่อเปรียบเทียบกับสบู่ดำจากจังหวัดน่านนั้นมีความเหมือนกันทางพันธุกรรม 90 เปอร์เซ็นต์ และในสายพันธุ์จากจังหวัดลำปางมีความแตกต่างจากสายพันธุ์จากจังหวัดโคราชมากที่สุด เนื่องจากมีความเหมือนกันเพียง 52 เปอร์เซ็นต์

เมื่อสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และหาค่า similarity coefficient ของ Jaccard ด้วยโปรแกรม NTSYS แสดงออกมาในรูปเดนโดแกรม (dendrogram) (รูปที่ 4.75) สามารถแยกสายพันธุ์สบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยในกลุ่ม 1 มีเฉพาะสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดลำปางเพียงตัวอย่างเดียว สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เขมร น่าน ยโสธร อินเดีย ห้วยห้องไคร้ โคราช และกรุงเทพ และพบว่าตัวอย่างสบู่ดำที่นำมาศึกษาทั้งจากในและต่างประเทศ มีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงมาก อย่างไรก็ตามการจำแนกพันธุกรรมของสบู่ดำยังต้องใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นๆ มาวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อให้สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้ดียิ่งขึ้น



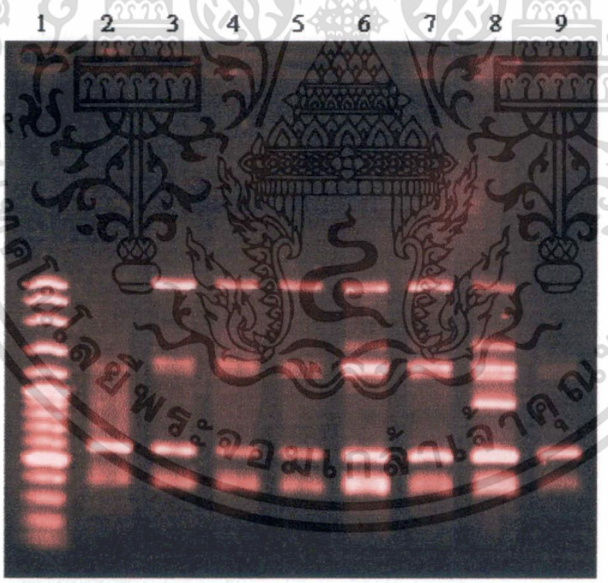
รูปที่ 4.67 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



OPA-20

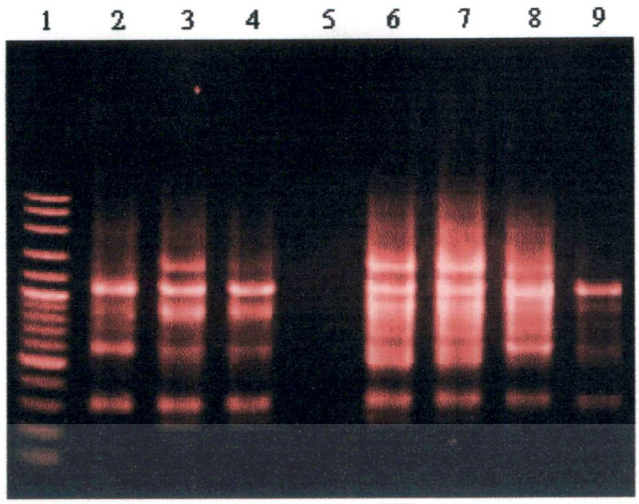
รูปที่ 4.68 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2



OPAM-01

รูปที่ 4.69 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์OPAM-01 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



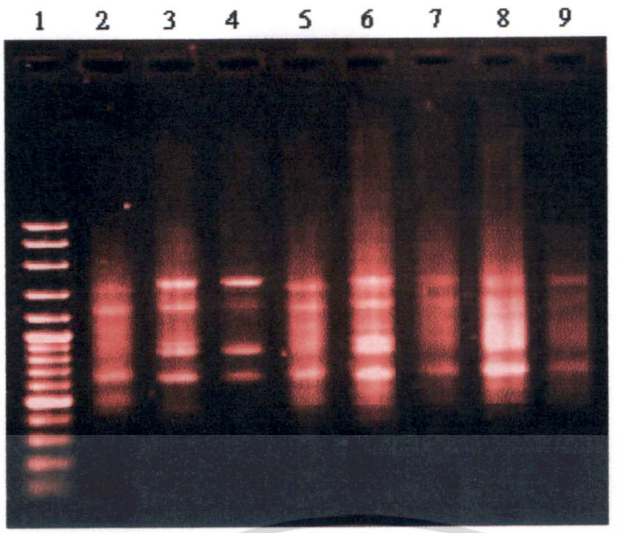
OPAX-17

รูปที่ 4.70 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPAX-17 **ช่อง** (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2

OPB-14

รูปที่ 4.71 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 **ช่อง** (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2

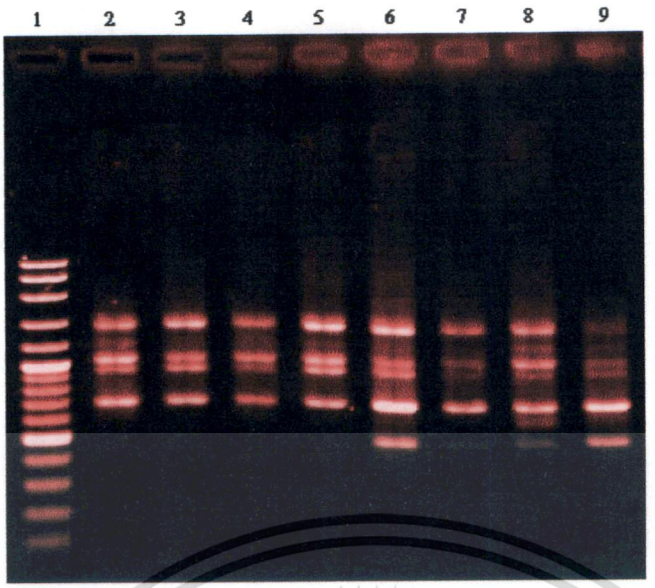
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



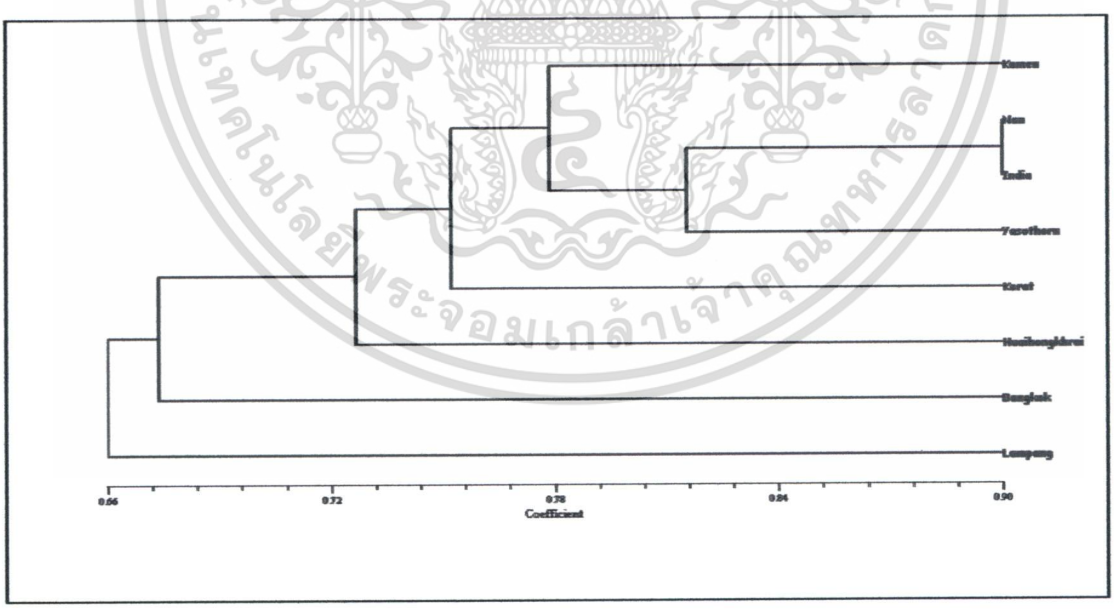
รูปที่ 4.72 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPD-02 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2

รูปที่ 4.73 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-13 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.74 ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPK-12 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) เชมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) กรุงเทพ 2



รูปที่ 4.75 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำ 8 ชนิด จากการใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด

ตารางที่ 4.39 ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Kamen	Nan	Yasothorn	Korat	India	Huaihong khrai	Lampang	Bangkok2
Kamen	1.000							
Nan	0.792	1.000						
Yasothorn	0.800	0.840	1.000					
Korat	0.762	0.809	0.682	1.000				
India	0.745	0.902	0.792	0.755	1.000			
Huaihongkhrai	0.698	0.791	0.711	0.649	0.783	1.000		
Lampang	0.731	0.654	0.741	0.522	0.727	0.638	1.000	
Bangkok2	0.698	0.651	0.711	0.594	0.696	0.684	0.596	1.000

สบู่ดำเป็นพืชที่นิยมปลูกทั่วไปในเขตร้อน และกึ่งเขตร้อนของอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย โดยมีความเชื่อว่ามีแหล่งกำเนิดจากอเมริกากลาง แม้ว่าบางพื้นที่ไม่มีการปรับปรุงสายพันธุ์แต่ยังสามารถปลูกได้เนื่องจากสบู่ดำมีความสามารถในการปรับตัว และในปัจจุบันสบู่ดำมีความสำคัญในเรื่องของพลังงานทางเลือก ดังนั้นจึงมีการพยายามในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต โดยเฉพาะด้านความคงทนต่อแหล่งเพาะปลูก ปริมาณและคุณภาพของน้ำมัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยและเข้าใจในด้านความหลากหลาย หรือความแปรปรวนของสายพันธุ์ของสบู่ดำก่อนการนำไปปรับปรุงพันธุ์ผ่านการผสมข้ามต่อไป หรืออาจกล่าวได้ว่าการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาเรื่องของการปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งการเพิ่มผลผลิตทางการค้าต่อไป ซึ่งในการศึกษาอาศัยทั้งเทคนิค RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats) และ ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) โดยมีการรายงานครั้งแรกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ 2 สายพันธุ์ ระหว่างสายพันธุ์ที่มีความเป็นพิษจากประเทศอินเดีย (toxic Indian variety) และไม่เป็นพิษจากเมซิโก (non-toxic Mexican variety) โดยเทคนิค RAPD พบว่ามีค่าความเหมือน 96.3% (Sujatha และคณะ, 2005) รวมทั้ง Subramanyam และคณะ (2009) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศอินเดียจำนวน 40 สายพันธุ์ ทั้งที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมและที่ใช้ในทางเกษตร โดยเทคนิค RAPD พบค่าความดัชนีเหมือนทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-1.00 ซึ่งแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม และเมื่อนำมาวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean (UPGMA) สามารถแบ่งสบู่ดำออกเป็นด้วยกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่ม รวมทั้งการศึกษาด้วยเทคนิคอื่นๆ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น Ricci และคณะ (2512) ทำการศึกษาด้วยเทคนิค Microsatellite marker และ Single nucleotide polymorphism (SNP) พบว่ามีความแตกต่างกันตามแหล่งที่มาโดยแบ่งออกเป็น 2 แหล่ง กลุ่มที่ 1 มาจาก หมู่เกาะของประเทศคิวบา และเคปเวิร์ด และกลุ่มที่ 2 มาจากบราซิล โมซัมบิก และเซเนกัล โดยผลของ SNP มีความแตกต่างกัน 1 นิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ Jcps9 ตำแหน่งที่ 96 ระหว่าง C และ T

นอกจากนั้นแล้วยังอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรม (Genetic stability) ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ดังที่ Sharma และคณะ (2011) ใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในการ sub-culture ครั้งที่ 2 ซึ่งมีความผันแปรเพียง 4 แถบจาก 177 แถบ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงในการ sub-culture ครั้งที่ 8 และ 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำจากส่วนของใบและก้านใบ ให้เจริญเป็นแคลลัส

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบและก้านใบ พบว่า สายพันธุ์ยโสธร และ B14 ทั้งส่วนของใบ และก้านใบเจริญไปเป็นแคลลัสดีที่สุดในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์อินเดีย ส่วนของใบ เกิดเป็น แคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และก้านใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม และ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ โคราช, A34 และ A72 ในส่วนของใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และในส่วนของก้านใบจะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในสายพันธุ์ A5, A28 และ B19 ทั้งส่วนของใบและก้าน จะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และในสายพันธุ์ B15 พบว่าส่วนของใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และส่วนของก้านใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้าง

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้าง โดยศึกษาดูจากจำนวนใบที่เกิดขึ้น พบว่า

สายพันธุ์ขอนแก่น สายพันธุ์สำโรง (กัมพูชา) และ สายพันธุ์อเมริกา ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างได้ดีที่สุด

สายพันธุ์จากประเทศลาว ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างได้ดีที่สุด

สายพันธุ์แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนตาข้างได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในชักนำให้เอมบริโอเจริญไปเป็นแคลลัส

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสบู่ดำ จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ A69, A73, B12, B20, B22 และ น่าน ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สบู่ดำสายพันธุ์ A69, B12, B20, B22 และน่าน สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ A73 สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของสบู่ดำสายพันธุ์ 5 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์จากประเทศลาว ขอนแก่น แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) สำโรง (เขมร) และอเมริกา บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมอะดินีนซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดการพัฒนายอดของสบู่ดำสายพันธุ์ขอนแก่น สำโรง (เขมร) และอเมริกา คืออาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสบู่ดำสายพันธุ์จากประเทศลาว และสายพันธุ์แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) จะสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเกิดเป็นยอดได้ดีที่สุดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสายพันธุ์แม่ปิงน้อย (เชียงใหม่) จะสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนายอดได้ดีที่สุดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.5 ศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของสบู่ดำสายพันธุ์ KJ1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าการศึกษาน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตดีที่สุด วันที่ 21 มีน้ำหนักสด 1.56 กรัม และน้ำหนักแห้ง 0.11 กรัม ต่ออาหาร 30 มิลลิลิตร เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 7-21 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase

5.6 วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

เมื่อสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และหาค่า similarity coefficient ของ Jaccard ด้วยโปรแกรม NTSYS แสดงออกมาในรูปเดนโดแกรม (dendrogram)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถแยกสายพันธุ์สบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยในกลุ่ม 1 มีเฉพาะสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดลำปาง เพียงตัวอย่างเดียว สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เขมร น่าน ยโสธร อินเดีย ห้วยห้องไคร้ โคราช และกรุงเทพ และพบว่าตัวอย่างสบู่ดำที่นำมาศึกษาทั้งจากในและต่างประเทศ มีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงมาก อย่างไรก็ตามการจำแนกพันธุกรรมของสบู่ดำยังต้องใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นๆ มาวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อให้สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียม stock solution แต่ละกลุ่มของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS

Stock	Stock สารเคมี	ชั่งสารเตรียม stock (มก./ต่อลิตร)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ปิเปตจาก stock (มล./อาหาร1ลิตร)
A	NH_4NO_3	82,500	50	20
	KNO_3	95,000	50	
B	H_3BO_3	1,240	200	
	KH_2PO_4	34,000	200	
	KI	166	200	5
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	50	200	
	$CoCl_2.6H_2O$	5	200	
C	$CaCl_2.2H_2O$	88,000	200	5
D	$MgSO_4.7H_2O$	74,000	200	
	$MnSO_4.7H_2O$	4,460	200	5
	$ZnSO_4.7H_2O$	1,720	200	
	$CuSO_4.5H_2O$	5	200	
E	Na_2EDTA	7,450	200	5
	$FeSO_4.7H_2O$	5,570	200	
F	Glycine	400	200	
	Nicotinic acid	100	200	
	Pyridoxine-HCL	100	200	5
	Thiamime-HCL	20	200	
	Myo-inositol	5	200	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2549. ประโยชน์ของสบู่ดำ. [online]. Available: http://agritech.doae.go.th/actech/techno/other/sabudum&disel.htm

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. สบู่ดำ พืชพลังงาน: การคัดเลือกพันธุ์สบู่ดำเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง. [Online].. Available from http://www.kualumni. org/news/JATROPHA/jatropha.html

ชำนาญ ฉัตรแก้ว. 2549. สบู่ดำ: พืชพลังงาน, ห้างหุ้นส่วนจำกัด, กรุงเทพฯ.

ทวีศักดิ์ อุ่นจิตติกุล. 2548. สบู่ดำพืชพลังงานสารพัดประโยชน์. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์วศิระ.

นันท์นภัส เทพสำราญ โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และอารีย์ ทองภักดี. 2549. การชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 6 ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว เชียงใหม่.

ธีรวรรธน์ ขันทอง. 2547. Agarose gel Electrophoresis. [online]. Available: http://www.thirawat.com/bc/rdna.html#agar

นันทวรรณ สโรบล. 2549. ประวัติและความสำคัญของสบู่ดำ. [online]. Available: http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/oth/his.HTM

นิรนาม. 2550. ความหมายของอาร์เอพีดี.[online]. Available: http://moomsabuy.exteen.com/20070115/polymer-ase-chain-reaction-pcr)

นิรนาม. 2550. วิธีทำอาร์เอพีดี.[online]. Available: www.dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique11_RAPD.html)

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. สบู่ดำ เพื่อไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.

ยุพา มงคลสุข และคณะ. 2550. การขยายพันธุ์สบู่ดำด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. โครงการสัมมนาเรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติครั้งที่ 1. หน้า 91-94

ระพีพันธุ์ ภาสบุตร และสุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์. 2544. พลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล ทางเลือกของเกษตรกร น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ น้ำมันจากมะพร้าว. ส่วนเครื่องจักรการเกษตร สถาบันพัฒนาและส่งเสริมปัจจัยการผลิต กรมส่งเสริมการเกษตร.

รังษี เจริญสถาพร และอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว. 2548. การใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ: นอกจากน้ำมัน. การประชุมเสนอกิจกรรมสบู่ดำ ณ ห้องประชุม 107 ตึกสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

ศิริวรรณ บุรีคำ และรุ่งทิพย์ กาวิตา. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 2550. นิทรรศการงานวิจัยบนเส้นทางงานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2550 ในงานเกษตรแฟร์ ประจำปี 2550 ณ. อาคารจักรพันธ์เพ็ญศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร และคณะ. 2550. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสบู่ดำโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. โครงการสัมมนาเรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติครั้งที่ 1. หน้า 141-148.

ศิริวรรณ บุรีคำ และรุ่งทิพย์ กาวิตา. 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ. โครงการสัมมนาเรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติครั้งที่ 1. หน้า 130-135

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. [online]. Available: http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/tissue%20Culture/ protoplast.html

อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2549. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์. [online]. Available: http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/oth/bot.HTM

อภิชาต. 2550 ก. การสกัดดีเอ็นเอ. [online]. Available: http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique1_DNA_extraction.html

อภิชาต. 2550 ข. RAPD. [online]. Available: http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique11_RAPD.html

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม นิตย์ศรี แสงเดือน ชาญวิทย์ ม่วงมิตร และ ชำนาญ ฉัตรแก้ว. 2550. การเจริญเป็นแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเนื้อเยื่อสบู่ดำสายพันธุ์ สมก. ในโครงการสัมมนาวิชาการเรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1 จัดโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 119-123.

Dehgan, B. and Webster, G. L. 1996. Morphology and infargeneric relationships of the genus *Jatropha*. (Euphorbiaceae). University of California Plublication in Botany 74 : 1-73.

da Camara Machado, A., Frick, N.S., Kremen, R., Katinger, H. and Laimer da Cmara Machado, M. 1997. Biotechnological approaches to the improvement of *Jatropha curcas*. In: *Proceeding Jatropha* : Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas* Gbitz GM, Mittelbach M, Trabi M (Eds), Managua, Nicaragua, 23-27 February.

Ganesh, R.S., Parthiban, K.T., Senthil, K.R., Thiruvengadam, V. and Paramathma, M. 2007. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol* 55, 803–809.

Heller, Joachim. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.1-66.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kaushik, N., Kumar K., Kumar, S., Kaushik, N. and Roy, S. 2007. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. Biomass and Bioenergy. 31, 497–502.

Lin J., Tang L. and Chen F. 2002. Tissue culture and plantlet regeneration of *Jatropha curcas*. Plant Physiol Commu. , 38(3) :252.

Lin J., Li YX., Zhou XW., Tang KX. and Chen F. 2003. Cloning and characterization of a curcin gene encoding a ribosome inactivating protein from Jatropha curcas. DNA Seq. 14(4):311-7.

Lu WD., Wei Q., Tang L., Yan F. and Chen F. 2003. Induction of callus from *Jatropha curcs* and rapid propagation, Chin J Appl Environ Biol. , 9(2): 127-130.

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

Pamidiamarri, S., DVN, Nirali, P., Reddy, M.P. and Radhakrishnan, T. 2008. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. Molecular Biology. 901-907.

Plestsch, M. and Charlwood, B. V. 1997. Accumulation of diterpenoids in cell and root-organ culture of Jatropha species. Journal of Plant Physiology 150 : 37-45.

Qin, W., Wei-Da, L., Yi, L., Shu-Lin, P., Ying, X., Ling, T. and Fang, C. 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology 30: 475-478.

Rajore, S. and Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 14: 73-75.

Rajore, S., Sardana, J. and Batra, A. 2002. *In vitro* cloning of *Jatropha curcas* L. Journal Plant Biology 29: 195-198.

Ranade, A.S., Anuj, P.S., Tikam, S.R., Jyoti, S. and Rakesh Tuli. 2008. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. Biomass and Bioenergy 32, 533–540

Reinhard, K.H. 2005. Fighting desertification by integrated utilization of the *Jatropha* Plant. Unpublished project report. Project *Jatropha*, GTZ.

Ricci, A., Chekhovskiy, K., Azhaguvel, P., Albertini, E., Falcinelli, M. and Saha, M. 2012. Molecular Characterization of Jatropha curcas Resources and Development of Population-Specific Markers. Bioenergy Research. Bioenerg. Res. 5: 215–224.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sardana, J and Batra, A. 2000. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. Phytomorphology 50: 239-242.

Sharma, S., Kumar, N. and Reddy, M.P. 2011. Regeneration in Jatropha curcas: Factors affecting the efficiency of in vitro regeneration. Ind Crop Prod. 34: 943-951.

Sujatha, M., Makkar, H.P.S. and Becker, K. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic Jatropha curcas L. Plant Growth Reg. 47: 83–90.

Spera, M.R.N., Pasqual, M., Macial, A.L.R. and Salvador, E.D. 1996. Effect of different concentrations of activated charcoal and GA3 on *in vitro* culture of *Jatropha podagrica* embryos. Clënciae Agrotechnologia 20: 446-451.

Spera, M.R.N., Pasqual, M., Macial, A.L.R. and Salvador, E.D. 1997. Effect of different concentrations of kinetin and 2, 4-D on the *in vitro* cultivation of *Jatropha podagrica* Hook. roots. Clënciae Agrotechnologia 21 : 386-389.

Subramanyam, K., Muralidhararao, D. and Devanna, N. 2009. Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of Jatropha curcas (L.) in India by RAPD analysis. African Journal of Biotechnology 8: 1900-1910.

Sujatha, M. and Dhingra, M. 1993. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerima.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 293-296.

Sujatha, M. and Mukta, N. 1996. Morphologenesis and plant regeneration from tissue culture of *Jatropha curcas.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 135-141.

Sujatha, M. and Reddy, T.P. 2000. Morphogenic responses of *Jatropha integerima* explants to cytokinins. Biologia, Bratislava 55: 99-104.

Thepsumran, N., Thepsithar, C. and Thongpukdee, A. 2006. In vitro multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Proceeding: 32nd Congress on Science and Technology of Thailand – Science and Technology for Sufficiency Economy to Celebrate the 60th Anniversary of the Majesty the King's Accession to the Throne. Sirikit Convention Hall, Bangkok, Thailand.

Trabi, M., Gbitz, G. M. , Steiner, W and Foidl, N. 1997. Toxicity of *Jatropha curcas* seeds. In:Proceeding *Jatropha*: Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas*. Gbitz GM, Mittelbach M, Trabi M (Eds), Managua, Nicaragua, 23-27 February .

Wei Q., Lu W., Liao Y., Pan S., Xu Y., Tang L. and Chen F. 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of Jatropha curcas. J Plant Physio and Mol Bio. 30(4):475-478.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wiesenhütler, J. 2003. Use of physic nut (*Jatropha curcas* L.) to combat desertrification and reduce poverty Deutsche Gesellschaff für Technische, Zusammenarbeit (GTZ) and Convention project to combat Dessertification ZCCD project), Bonn, Germany.

Winkler, E., Gbitz, G.M., Foidl, N., Staubmann, R. and Steiner, W. 1997. Use of enzymes for oil extraction from *Jatropha curcas* seeds. In: *Proceeding Jatropha curcas* Gbitz GM, Mittelbach M, Trabi M (eds), Managua, Nicaragua, 23-27 February.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้