สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ

นางสาวปัญจพร พยัคฆศิลป์
นางสาววิภาณี ไวยนาค
นางสาววิภาดา กาลอุปถัมภ์

2W
ม15231
2550
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83986
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551
b.....11983255
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tissue Culture and Identification of Jatropha

Miss Panjaporn Payakasin

Miss Vipanee Vaiyanak

Miss Wipada Kalupathump

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Biotechnology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการจัดจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ

นักศึกษา นางสาวปัญจพร พยัฆคศิลป์ รหัส 47050140
นางสาววิภาณี ไวยนาค รหัส 47050160
นางสาววิภาดา กาลอุปถัมภ์ รหัส 47050161

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
กรรมการ	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ	
นักศึกษา	ปัญจพร พยัคฆศิลป์	รหัส 47050140
	วิภาณี ไวยนาค	รหัส 47050160
	วิภาดา กาลอุปถัมภ์	รหัส 47050161
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ปีการศึกษา	2550	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	

บทคัดย่อ

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนใบและก้านใบของสบู่ดำ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ยโสธร อินเดีย โคราช A5 A28 A34 A72 B14 B15 และ B19 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 dichlophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส พบว่าจากทั้งส่วนใบและก้านใบของสายพันธุ์ยโสธรและ B14จะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 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 ส่วนของก้านใบและใบจะเจริญได้ดีที่สุดที่ 2,4-D เข้มข้น 3 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นทำการชักนำแคลลัสของสบู่ดำ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ โคราช A28 A72 B15 และ B19 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ Thidiazuron (TDZ) 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรกับโพรลีน 0 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในทุกความเข้มข้นของ TDZ และโพรลีนสามารถชักนำให้แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นยอดหรือต้นใหม่ได้

การจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบสบู่ดำ 8 ตัวอย่าง ได้แก่ สำโรง (เขมร) น่าน ยโสธร โคราช อินเดีย ห้วยห้องไคร้ ลำปางและสมก เมื่อนำมาตรวจสอบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์สบู่ดำแต่ละตัวอย่างโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม NTSYS pc เวอร์ชั่น 2.0e สามารถจำแนกตัวอย่างสบู่ดำทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เขมรและสมก กลุ่มที่ 2 น่าน ยโสธร อินเดีย ห้วยห้องไคร้และลำปาง กลุ่มที่ 3 โคราช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Tissue culture and Identification of Jatropha
Name	Miss Panjaporn Payakasin
	Miss Vipanee Vaiyanak
	Miss Wipada Kalupathump
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

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

From the study of plant regeneration by using solid medium MS supplemented with TDZ 0.1 and 0.5 mg/L with proline at different concentrate 0, 300 and 500 mg/L. We have found every varieties (A28, A72, B15, B19 and Korat) could formed bigger callus, but callus could not developed to be shoot after cultivating them 30 days at every concentrate.

Moreever, this study used RAPD (Random Analysis Polymorphic DNA) technique to study the genetics variation in *Jatropha curcas* that used 10 types of primers for 8 samples of *Jatropha curcas* varieties : Somrong(Cambodian), Nan, Yasothon, Korat, India, Huayhongkrai, Lampang and original KU. Analysis by used a program NTSYS pc version 2.0e. Result could separated all example were 3 groups : 1st group were Somrong (Cambodian) and Sormorkor, 2nd group were Nan, Yasothon, India, Huayhongkrai and Lampang and 3rd group was Korat

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยงข้อง	3
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบู่ดำ	3
2.1.1 ประวัติและความสำคัญ	3
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.3 ประโยชน์ของสบู่ดำ	7
2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของสบู่ดำ	8
2.1.5 พิษวิทยาของสบู่ดำ	9
2.2 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	10
2.2.1 ประวัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	10
2.2.2 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
2.2.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
2.2.4 ข้อดีและข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	12
2.2.5 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	13
2.2.6 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	14
2.2.7 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	14
2.2.8 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อพืช	16
2.2.9 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	17
2.2.10 ขั้นตอนการปลูกและดูแลพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3 การสกัดดีเอ็นเอ	18
2.3.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ	19
2.4 เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)	20
2.4.1 ประวัติความเป็นมา	20
2.4.2 ความหมายของอาร์เอพีดี	21
2.4.3 หลักการอาร์เอพีดี	22
2.4.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี	23
2.4.5 สภาพการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดี	24
2.4.6 การตรวจผล	25
2.4.7 ขั้นตอนการทำอาร์เอพีดี	26
2.5 อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (Agarose gel Electrophoresis)	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	29
3.1 ตัวอย่างสบู่ดำที่นำมาศึกษา	29
3.2 สารเคมี	29
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	30
3.4 วิธีดำเนินการทดลอง	31
3.4.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส	31
3.4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่	32
3.4.3 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลผลการทดลอง	36
4.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่	73
4.3 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี	79
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	86
5.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส	86
5.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่	86
5.3 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี	86
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก ก	90
ภาคผนวก ข	91
ภาคผนวก ค	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สรรรพคุณทางเภสัชของสบู่ดำ	9
2.2	ความต่างของปฏิกิริยาแบบอาร์เอพีดีกับปฏิกิริยาพีซีอาร์	22
2.3	ขั้นตอนปฏิกิริยาที่เหมาะสมของอาร์เอพีดี	25
2.4	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี	25
2.5	สภาพการเกิดปฏิกิริยาอาร์เอพีดี	26
3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ	30
3.2	ส่วนประกอบของ Master mix ในการทำอาร์เอพีดี	33
3.3	ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละขั้นตอน	34
3.4	ส่วนประกอบของ Master mix ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	34
4.1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส(ตารางมิลลิเมตร)ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำยโสธรบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	37
4.2	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	38
4.3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง41ส่วนก้านใบของสบู่ดำยโสธรบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	39
4.4	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำยโสธรบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	39
4.5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	40
4.6	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส(ตารางมิลลิเมตร)ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	42
4.8	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	42
4.9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำโคราช บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร	43
4.10	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
4.11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	45
4.12	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	45
4.13	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำA5 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	46
4.14	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำA5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	47
4.15	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำA5 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.16	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	48
4.17	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ A28 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	49
4.18	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	50
4.19	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ A28 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	51
4.20	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	51
4.21	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ A34 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	52
4.22	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	53
4.23	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ A34 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	54
4.24	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.25	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ A72 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	55
4.26	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	56
4.27	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ A72 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	57
4.28	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	57
4.29	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ B14 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	58
4.30	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	59
4.31	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ B14 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	60
4.32	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	60
4.33	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ B15 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.34	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	62
4.35	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ B15 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	63
4.36	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	63
4.37	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ B19 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	64
4.38	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของสบู่ดำ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	65
4.39	การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ B19 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	66
4.40	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของสบู่ดำ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	66
4.41	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำโดราชให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	73
4.42	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำ A28 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.43	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำ A34 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	76
4.44	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำ B15 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	77
4.45	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำ B19 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	78
4.46	การวิเคราะห์ผลอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.0e	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ต้นสบู่ดำ	4
2.2	ใบสบู่ดำ	5
2.3	ช่อดอกสบู่ดำ	5
2.4	ผลสบู่ดำ	6
2.5	เมล็ดสบู่ดำ	6
2.6	ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ	19
2.7	ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (ต่อ)	20
2.8	ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (ต่อ)	20
2.9	เทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเออะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส	27
4.1	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	38
4.2	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	40
4.3	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	41
4.4	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	43
4.5	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
4.6	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.7	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	47
4.8	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	49
4.9	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	50
4.10	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	52
4.11	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	53
4.12	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	55
4.13	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	56
4.14	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	58
4.15	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.16	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	61
4.17	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	62
4.18	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	64
4.19	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนใบของสบู่ดำ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	65
4.20	กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	67
4.21	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ยโสธร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรMSที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	68
4.22	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์อินเดีย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	68
4.23	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์โคราช ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	69
4.24	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	69
4.25	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	70
4.26	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	70
4.27	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.28	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	71
4.29	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	72
4.30	แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	72
4.31	การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำโคราช ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	74
4.32	การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	75
4.33	การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	76
4.34	การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	77
4.35	การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	78
4.36	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07	79
4.37	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20	80
4.38	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-01	80
4.39	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPAX-17	81
4.40	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14	81
4.41	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPD-02	82
4.42	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-13	82
4.43	ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPK-12	83
4.44	Phylogenetic tree ของสบู่ดำ 8 ตัวอย่าง	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

สบู่ดำ หรือ Physic nut อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ และเป็นที่ต้องการเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากในปัจจุบันในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทยประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิงส่งผลให้เชื้อเพลิงต่างๆ มีราคาสูงขึ้น โดยเฉพาะน้ำมัน ซึ่งสบู่ดำนี้สามารถนำมาผลิตพลังงานทดแทน ซึ่งก็คือน้ำมันไบโอดีเซลที่มีราคาถูกกว่า

โดยน้ำมันที่สกัดได้นอกจากจะใช้เป็นเชื้อเพลิงแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกหลายประการ เช่น ทำเครื่องสำอาง และถนอมผิว ซึ่งน้ำมันจากเมล็ดสามารถนำมาใช้ทาแก้โรคผิวหนัง หรือผิวหนังอักเสบ รวมทั้งสามารถบรรเทาอาการปวดข้อ อันเนื่องมาจากรูมาตอยด์ได้ด้วย กรดไลโนอิคในน้ำมันเมล็ดในของสบู่ดำซึ่งมีอยู่ประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ มีความน่าสนใจในการนำไปทำเป็นครีมถนอมผิวได้ ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช น้ำมันและสารสกัดจากน้ำมันของสบู่ดำ สามารถนำมาใช้กำจัดศัตรูพืชได้ โดยมีการนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูฝ้าย โดยเฉพาะหนอนเจาะสมอฝ้าย ศัตรูผัก มันฝรั่ง และข้าวโพด สารสกัดเมทานอล (methanol extracts) จากสบู่ดำ ซึ่งประกอบด้วยสารพิษบางชนิด ใช้ในการควบคุมพยาธิในหอยที่นำมาบริโภค ใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับจุดไฟ เชื้อเพลิงในการปรุงอาหาร และน้ำมันดีเซล การใช้ประโยชน์ในการนำมาทำเชื้อเพลิงนี้ เป็นการใช้ประโยชน์สูงสุดของสบู่ดำ น้ำมันสบู่ดำล้วนๆ สามารถนำมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลได้ รวมทั้งใช้ในการผลิตสบู่กลีเซอรีน ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากไบโอดีเซล สามารถนำมาทำสบู่ได้ ขณะเดียวกันน้ำมันจากสบู่ดำล้วนๆ ก็นำมาทำสบู่ได้เช่นกัน โดยมีการผลิตเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็ก หรืออุตสาหกรรมในครัวเรือน นอกจากนี้ยังใช้ทำยา ทุกส่วนของต้นสบู่ดำ รวมทั้งเมล็ด ใบและเปลือกไม้ ทั้งสดหรือต้ม สามารถนำมาทำยาพื้นบ้านและยารักษาสัตว์ได้ โดยน้ำมันของสบู่ดำมีฤทธิ์เป็นยาระบาย ใบนำมาต้มน้ำดื่มแก้ไอและใช้ฆ่าเชื้อโรคภายหลังการคลอด น้ำในเนื้อเยื่อของต้นสบู่ดำนำมาใช้ห้ามเลือด

ด้วยคุณประโยชน์ที่หลากหลายของพืชชนิดนี้ ทำให้สบู่ดำเป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้ จึงนำมาทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำในส่วนของใบและก้านใบให้เกิดเป็นแคลลัส จากนั้นทำการนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ เพื่อทำการขยายพันธุ์ให้ได้ต้นพันธุ์ปริมาณมากโดยใช้ระยะเวลาสั้นๆ เพื่อเพิ่มปริมาณสบู่ดำให้ได้ในปริมาณมาก เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการย้ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม และการยิงอนุภาคดีเอ็นเอ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อทำการจำแนกว่ามีความเหมือนหรือต่างกัน เพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถชักนำใบ หรือก้านใบให้เจริญเป็นแคลลัส

1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

1.2.3 ศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD; Random Amplification of Polymorphic DNA)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำในอนาคต ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในด้านอุตสาหกรรมเกษตรและด้านพลังงานทดแทน

1.3.2 ผลจากการวิจัยจะช่วยสนับสนุนการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืช สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการเรียนการสอน หรือเป็นแหล่งความรู้ในการพัฒนาทางด้านการเกษตรและพลังงานทดแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบู่ดำ

สบู่ดำ มีชื่อเรียกในประเทศต่าง ๆ หลายชื่อ เช่น Barbados nut, Purging nut, Kuikui pake, Pignon d'inde เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae วงศ์เดียวกับยางพารา ละหุ่ง มันสำปะหลัง โป๊ยเซียน และมะยม มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาเขตร้อน เป็นไม้พุ่มขนาดกลางสูงประมาณ 6 เมตร จัดเป็นไม้ยืนต้นได้ เพราะมีอายุไม่น้อยกว่า 20 ปี เนื้อไม้ไม่มีแก่น หักง่าย ในเนื้อไม้เมื่อหัก จะมียางสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนๆ ไหลซึมออกมา เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ใบกว้าง มีฐานเป็นรูปหัวใจ ขอบใบหยักคล้ายใบละหุ่ง ดอกออกเป็นช่อสีเหลืองอ่อน ลักษณะดอกเป็นรูประฆัง มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน ดอกตัวเมียมียอดเกสรเป็นรูปสามง่าม รังไข่มีผนังกั้น แบ่งออกเป็น 3 เซลล์ ผลมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองนวล ผลในช่อเดียวกันจะสุกแก่ไม่พร้อมกัน เมื่อผลแห้งแกะดูจะมีเมล็ดอยู่ภายใน 3 เมล็ด ลักษณะคล้ายเมล็ดละหุ่ง เมล็ดมีสีดำกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร และยาวประมาณ 2 เซนติเมตร เนื้อในของเมล็ดสีขาว มีน้ำมันที่นำมาใช้ประโยชน์หลายลักษณะ ในทุกส่วนของลำต้นมีน้ำยางสีขาวใสลื่นๆ เป็นฟอง มีคุณสมบัติคล้ายสบู่ ซึ่งการใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ เช่น ใบและเปลือกไม้ ใบอ่อนสามารถนำมานึ่ง หรือต้มรับประทานได้อย่างปลอดภัย ส่วนเปลือกไม้สามารถนำมาสกัดเอาแทนนิน (tannin) ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังได้ เมล็ด ใช้เป็นยาถ่าย ยาระบาย กากเมล็ด ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการหีบเอาน้ำมันไปใช้แล้ว จะนำมาอัดเป็นก้อน ส่วนนี้จะมีเคอร์ซิน (curcin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นพิษเหมือนกับไรซิน (ricin) ในละหุ่ง ไม่เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงสัตว์ แต่เหมาะที่จะนำไปทำปุ๋ย หรือนำไปทำเป็นเชื้อเพลิงให้กับเครื่องสตีมเทอร์ไบน์ (steam turbine) สำหรับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า น้ำมันเมล็ดของสบู่ดำ ประกอบไปด้วยน้ำมันประมาณ 35 – 40 เปอร์เซ็นต์ เนื้อใน (kernels) ประมาณ 55 – 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นน้ำมันจึงเป็นผลผลิตที่สำคัญของสบู่ดำ

2.1.1 ประวัติและความสำคัญ (นันทวรรณ, 2549)

"สบู่" เป็นภาษาโปรตุเกส หมายถึง ต้นไม้ชนิดหนึ่งที่ใช้น้ำมันจากเมล็ดมาเป็นส่วนผสมในการทำสบู่ สำหรับชำระล้างร่างกายและซักล้างเสื้อผ้า ของใช้ มีบันทึกไว้ว่าค้นพบโดยพ่อค้าชาวโปรตุเกสที่เดินเรือไปทวีปอเมริกากลางนำเข้ามาในทวีปเอเชียและแพร่มายังประเทศไทยสมัยกรุงศรีอยุธยาตอนปลายราวๆ 300 ปีก่อน โดยมีการแนะนำให้ผู้คนสมัยนั้นปลูก และพ่อค้ารับซื้อเมล็ดไปทำสบู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

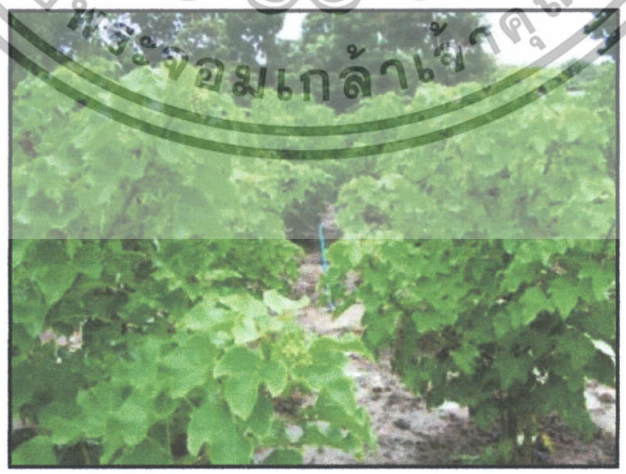
ในทวีปแอฟริกาสมัยก่อนปลูกกันมากที่แหลม Verde ในที่ดินที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์และเป็นแนวเขตรั้วบ้าน คอกสัตว์ หรือบริเวณหลุมฝังศพ เพื่อกันสัตว์ไม่ให้เข้าไปคุ้ยเขี่ย สำหรับในประเทศไทยมีรายงานว่า เคยมีการปลูกเป็นรั้วบ้าน ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ โดยผู้เฒ่าผู้แก่ใช้ยางใสๆ ที่หักออกจากก้านใบ หรือส่วนยอดใช้ทาแผลสด โดยเฉพาะแผลที่ปากให้ เด็กๆ ที่เป็นโรคปากนกกระจอก หรือใช้กวาดลิ้นเด็กที่เป็นฝ้าขาวและใช้เนื้อในเมล็ดสีขาวเลียบไม้ จุดแทนเทียนไข ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 เนื่องจากขาดแคลนน้ำมันก๊าดที่ใช้จุดตะเกียง

สบู่ดำ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น ภาคเหนือ เรียก มะหุ่งฮั้ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียก หมากเย่า มะเยา หรือสีหลอด ภาคใต้เรียก หงส์เทศ (เพราะต้นโต) และภาคกลางเรียก สบู่ดำ ชาวเขาเรียก ไท้ยู หรือเกงยู (เพราะน้ำมันมีสีดำ) พม่าเรียก แจ้ทซู เขมรเรียก ทะวอง จีนกลางเรียก หมาฟ่งสู้ แต้จิ๋วเรียก มั่วฮองซิว ญี่ปุ่นเรียก บูราคีรี และภาษาอังกฤษเรียก physic nut หรือ purging nut (*Jatropha* spp.) พืชสกุลนี้จัดเป็นไม้สกุลใหญ่ กระจายอยู่ในเขตร้อนและกึ่งร้อน ในประเทศไทยพบ 5 ชนิด คือ *J. gossypifolia* (สบู่แดง) *J. podagrica* (หนุมานนั่งแท่น) *J. integgerima* (ปัตตาเวีย) *J. multifida* (มะละกอฝรั่ง, ฝิ่นต้น) และ *J. curcas* (สบู่ดำ)

ในประเทศไทยนั้น สบู่ดำอาจจะเรียกชื่อพันธุ์ตามแหล่งที่ปลูก เช่น พันธุ์สตูล มุกดาหาร น่าน บุรีรัมย์ โคราช กาฬสินธุ์ ชัยนาท เป็นต้น

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (อนุวัฒน์, 2549)

ต้นสบู่ดำ (รูปที่ 2.1) เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง ความสูง 2-7 เมตร อายุยืนไม่น้อยกว่า 20 ปี ลำต้นมีเปลือกลำต้นเรียบ มีสีเทา-น้ำตาล ลำต้นเกลี้ยง อวบน้ำ เป็นไม้เนื้ออ่อน ไม่มีแก่นหักง่าย มีน้ำยาง สีขาวใส



รูปที่ 2.1 ต้นสบู่ดำ

ที่มา : http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/index.HTM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ (รูปที่ 2.2) มีลักษณะเป็นใบเดี่ยวรูปไข่ กว้าง หรือค่อนข้างกลม จัดเรียงแบบสลับ โคนใบเว้ารูปหัวใจ ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบหรือหยักเว้า 3-5 หยัก

รูปที่ 2.2 ใบสบู่ดำ

ที่มา : http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/index.HTM

มีช่อดอก (รูปที่ 2.3) แบบ panicle หรือ panicle cyme ประกอบด้วยดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน ดอกทั้ง 2 ชนิด มีกลีบรอง และกลีบดอก อย่างละ 5 กลีบ ดอกตัวผู้มีเกสรเรียงเป็นวง 2 วง วงละ 5 อัน ดอกตัวเมียมีรังไข่ ก้านเกสรตัวเมียมี 6 แฉก ดอกมีขนาดเล็กสีเขียวแกมเหลือง มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ออกเป็นช่อที่ซอกใบหรือปลายยอด ในช่อดอกเดียวกันมีดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมีย (อัตราดอกตัวผู้ : ดอกตัวเมีย เท่ากับ 6-7 : 1) ดอกแต่ละช่อบานไม่พร้อมกัน มีช่อดอกประมาณ 15-30 ช่อต่อต้น แต่ละช่อดอกมีดอกย่อย 70-120 ดอก ซึ่งติดผลเพียง 8-14 ผล

รูปที่ 2.3 ช่อดอกสบู่ดำ

ที่มา : http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/index.HTM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผล (รูปที่ 2.4) เกิดจากช่อดอกเดียวกันจะสุกแก่ไม่พร้อมกัน ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่มีสี เหลืองคล้ายลูกจันทน์ ผลมีลักษณะกลมรีเล็กน้อย ผลมีขนาดปานกลาง กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลมี 3 พูๆ ละ 1 เมล็ด เมื่อแก่ผลจะปริแตก ผลสด 1 กิโลกรัม มีจำนวน 85-90 ผล

รูปที่ 2.4 ผลสบู่ดำ

ที่มา : http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/index.HTM

เมล็ด (รูปที่ 2.5) รูปกลมรี เปลือกนอกสีดำ เนื้อในสีขาว มีสารพิษเคอร์ซิน (curcin) หากนำมาบริโภคจะเกิดอาการอาเจียนและท้องเสีย เมล็ดกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.6 กรัม เมล็ด 1 กิโลกรัม มีประมาณ 1,300-1,500 เมล็ด

รูปที่ 2.5 เมล็ดสบู่ดำ

ที่มา : http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/index.HTM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์ของสบู่ดำ (กรมวิชาการเกษตร, 2549)

ใบอ่อนสามารถนำมานึ่ง หรือต้มรับประทานได้อย่างปลอดภัย ส่วนเปลือกไม้สามารถนำมาสกัดเอาแทนนิน (tannin) ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังได้ เมล็ด ใช้เป็นยาถ่าย ยาระบาย กากเมล็ดเป็นส่วนที่เหลือจากการหีบเอาน้ำมันไปใช้แล้ว นำมาอัดเป็นก้อน ส่วนนี้จะมี เคอร์ซิน (curcin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นพิษ เหมือนกับไรซิน (ricin) ในละหุ่ง ไม่เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงสัตว์ แต่เหมาะที่จะนำไปทำปุ๋ย หรือนำไปทำเป็นเชื้อเพลิงให้กับเครื่องสตีมเทอร์ไบน์ (steam turbine) สำหรับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า เมล็ดของสบู่ดำประกอบไปด้วยน้ำมันประมาณ 35-40 เปอร์เซ็นต์ เนื้อใน (kernels) ประมาณ 55-60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น น้ำมันจึงเป็นผลผลิตที่สำคัญของสบู่ดำ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ ดังนี้

1. น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับจุดไฟ เชื้อเพลิงในการปรุงอาหารและน้ำมันดีเซล การใช้ประโยชน์ในการนำมาทำเชื้อเพลิงนี้ เป็นการใช้ประโยชน์สูงสุดของสบู่ดำ

2. สารเคมีกำจัดศัตรูพืช น้ำมันและสารสกัดจากน้ำมันของสบู่ดำ สามารถนำมาใช้กำจัดศัตรูพืชได้หลายชนิด ทั้งในฝ้าย มันฝรั่ง พืชผัก ถั่วเขียว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง

3. ทำสบู่ ในสมัยก่อนใช้น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำในการผลิตสบู่เนื่องจากมีการปลูกและสกัดน้ำมันจากเมล็ดเป็นจำนวนมากในแหลม Verde ปัจจุบันในประเทศมาลี ก็มีการผลิตสบู่จากน้ำมันสบู่ดำใช้กันอย่างแพร่หลายในท้องถิ่น โดยการนำน้ำมันมาต้ม กับโซดา มีการทดลองในห้องปฏิบัติการของบริษัท ตาตา ออยล์ มิลล์ จำกัด (Tata oil Mills Co.Ltd.,) ในเมืองบอมเบย์ ประเทศอินเดีย โดยการนำส่วนผสมที่ประกอบด้วยน้ำมันสบู่ดำที่มีส่วนผสมของไฮโดรเจน (hydrogenated physic nut) 75 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์ 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ผลิตเป็นสบู่ที่มีฟองมีค่าความเป็นกลางใช้สำหรับทำความสะอาดร่างกาย

4. ใช้ทำยาและทำเครื่องสำอางถนอมผิว น้ำมันจากเมล็ดสามารถนำมาใช้ทาแก้โรคผิวหนัง หรือผิวหนังอักเสบ รวมทั้งสามารถบรรเทาอาการปวดข้ออันเนื่องมาจากรูมาตอยด์ได้ด้วย กรดไลโนอิคในน้ำมันเมล็ดในของสบู่ดำ ซึ่งมีอยู่ประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ มีความน่าสนใจในการนำไปทำเป็นครีมถนอมผิว ทุกส่วนของต้นสบู่ดำ รวมทั้งเมล็ด ใบ และเปลือกไม้ ทั้งสดและนำมาสกัดหรือต้ม สามารถนำมาทำยาพื้นบ้าน และยารักษาสัตว์ได้ โดยน้ำมันของสบู่ดำมีฤทธิ์เป็นยาระบาย ใบนำมาต้มน้ำดื่มแก้ไอ และใช้ฆ่าเชื้อโรคภายหลังการคลอด น้ำในเนื้อเยื่อของต้นสบู่ดำนำมาใช้ห้ามเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สรรพคุณทางเภสัชของสบู่ดำ (กรมวิชาการเกษตร, 2549)

ส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ	สรรพคุณทางเภสัช
ต้น	ยาถ่าย
เปลือก	ยาถ่าย ขับพยาธิ แก้ปวดท้อง
ใบและเนื้อไม้	แก้ซางตาลขโมย ถอนพิษที่ทำให้ตัวร้อน แก้ปากและลิ้นเปื่อยพุพอง แก้ลิ้นเป็นฝ้าละออง
เมล็ด	เป็นยาระบาย ยาถ่ายอย่างแรง
น้ำมันจากเมล็ด	แก้ปวดตามข้อ แก้โรคผิวหนัง ใช้บำรุงรากผม
ยางจากก้านใบ	ใช้ป้ายรักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน แก้ลิ้นเป็นฝ้าขาว

โดยทั่วไปจะมีการใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำ แบ่งออกได้ 13 ประการคือ

1. ใช้เป็นอาหารและเครื่องดื่มสำหรับมนุษย์
2. ใช้เป็นอาหารสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า
3. ใช้เลี้ยงผึ้งเพื่อผลิตน้ำผึ้ง
4. เป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้เป็นฟืนและถ่าน
5. ใช้เป็นวัสดุก่อสร้างและทำรั้ว
6. ใช้เส้นใยทำเสื้อผ้า เชือกและหัตถกรรม
7. เป็นเครื่องมือทำการเกษตรและอุตสาหกรรมในครัวเรือน
8. ใช้ในวัตถุประสงค์เพื่องานศิลปะ งานหัตถกรรมทางด้านศาสนา
9. ใช้ทำสีย้อมและฟอกหนัง
10. ใช้ทำยาสำหรับคนและรักษาสัตว์
11. ใช้เป็นร่มเงาสำหรับคนและสัตว์
12. ใช้ป้องกันการชะล้างพังทลายของดินและรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน
13. ใช้เก็บกักน้ำ

2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของสบู่ดำ

ระหว่างปี ค.ศ. 1981 – 1984 มีการนำเมล็ดของสบู่ดำจากเมืองต่างๆ ในแถบแหลม Verde ในอเมริกาใต้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบ พบว่าเมล็ดในของสบู่ดำมี ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมันและเส้นใยในปริมาณที่แตกต่างกันตามแหล่งที่เก็บตัวอย่างดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความชื้น 3.8 – 7.8 เปอร์เซ็นต์
เถ้า 3.8 – 6.4 เปอร์เซ็นต์
โปรตีน 20.2 – 28.4 เปอร์เซ็นต์
ไขมัน 46.7 – 59.8 เปอร์เซ็นต์
เส้นใย 0.9 – 4.2 เปอร์เซ็นต์

ในส่วนของไขมัน มีกรดไขมันที่สำคัญ 4 ชนิด คือ ปาล์มมิติค สเตียริค โอเลอิค และไลโนเลอิค เช่นเดียวกับปาล์มน้ำมัน โดยกรดปาล์มมิติค และสเตียริคมีน้อยเพียง 15.38 เปอร์เซ็นต์ และ 6.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนโอเลอิค และไลโนเลอิค มีค่อนข้างสูงคือ 40.23 เปอร์เซ็นต์ และ 36.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณกรดไขมันดังกล่าวอาจแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูก

2.1.5 พิษวิทยาของสบู่ดำ (นันทวรรณ, 2550)

จากการสืบค้นและรวบรวมข้อมูลของสถาบันการแพทย์แผนไทย พบว่าทุกส่วนของสบู่ดำมีความเป็นพิษ ซึ่งส่วนใหญ่พบกับสัตว์ทดลอง ดังนี้

1. ใบ มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อและฆ่าพยาธิ โดยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus, Bacilius* และ *Micrococous*

2. ยาง (sap) ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าไข่พยาธิไส้เดือนและพยาธิปากขอยับยั้งการเจริญของลูกน้ำยุงและยางจะมีความเป็นพิษสูงมากต่อหนูถีบจักรเมื่อเข้าทางปากหรือฉีดเข้าร่องท้อง ทำให้เลือดแข็งตัวเร็วขึ้น (พบในคน) แต่ถ้าเจือจางมากๆ จะทำให้เลือดไม่แข็งตัว

3. กิ่งก้าน หรือส่วนต้น (จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง cytopathic effect ของเชื้อ HV โดยมีพิษต่ำ

4. ผลทดสอบกับปลาคาร์พ พบว่าพิษของฟอร์บอล เอสเตอร์ ทำให้ปลาเจริญเติบโตช้าลง มีมูกในอุจจาระและไม่กินอาหาร แต่ถ้าหยุดให้ฟอร์บอล เอสเตอร์ ปลาจะกลับมาเจริญเป็นปกติ ได้ทดสอบกับตัวอ่อนในครรภ์ของหนู พบว่าผลสบู่ดำทำให้หนูแท้งได้

5. เมล็ดมีสารพิษ คือ เคอร์ซิน (curcin) จะมีฤทธิ์ต่อมนุษย์ และสัตว์หลายชนิด ดังนี้

ฤทธิ์กับหนู พบว่าสารพิษเคอร์ซิน (curcin) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน แต่ในทางกลับกันพบว่าในเมล็ดสบู่ดำ มีสารบางชนิด ซึ่งมีฤทธิ์เป็น tumor promoter กล่าวคือไม่เป็นสารก่อมะเร็ง แต่สามารถกระตุ้นเซลล์ที่มียีนผิดปกติเนื่องจากสารก่อมะเร็งให้แบ่งตัวอย่างรวดเร็วและอาจพัฒนาเจริญเป็นก้อนมะเร็งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิษเฉียบพลันของเมล็ดสบู่ดำ

5.1 พิษกับหนู เมื่อให้ทางปากในหนูถีบจักร พบว่าทำให้หนูตาย เนื่องจากการคั่งในหลอดเลือด และ/หรือ เลือดออกในลำไส้ใหญ่ ปอด

5.2 พิษกับลูกไก่ พบว่าเมื่อนำเมล็ดมาผสมอาหารให้ลูกไก่กิน ทำให้ลูกไก่โตช้า ตับและไตโต

5.3 พิษในสัตว์ เช่น แกะ แพะ ทำให้ท้องเสีย ขาดน้ำ ไม่กินอาหารและมีเลือดออกในอวัยวะภายใน เช่น กระเพาะอาหาร ปอด ไต หัวใจผิดปกติ มีเลือกออกหลายแห่งในร่างกาย

5.4 พิษที่พบในเด็ก ที่รับประทานเมล็ดสบู่ดำได้แก่ อาการกระสับกระส่าย คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน และขาดน้ำ

5.5 พิษที่พบในผู้ใหญ่ กรณีที่เป็นสายพันธุ์ที่มีสารเป็นพิษสูง หากรับประทานเพียงแค่ 3 เมล็ด ก็เป็นอันตรายแก่ระบบทางเดินอาหาร แต่บางพันธุ์รับประทานถึง 50 เมล็ดก็ไม่เป็นอันตราย

6. ราก ฤทธิ์ต้านอักเสบ ผงรากเมื่อทาบนใบหูของหนูถีบจักรจะช่วยต้านอักเสบจากการถูกสาร TPA ได้ และสารสกัดด้วยเมทานอลของผงราก เมื่อให้ทางปากจะต้านอักเสบของอุ้งเท้าหนูที่ได้รับสารคาราจีแนน (carrageenan)

7. ไม่ระบุส่วน ฤทธิ์ต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่าสบู่ดำมีฤทธิ์ในการลด in vitro invasion ในการเคลื่อนที่และการหลั่งสารเอ็นไซม์ matrix metallo proteinase ของเซลล์

2.2 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.1 ประวัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มต้นในปี ค.ศ.1902 โดย Haberlandt นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันซึ่งเป็นคนแรกที่นำเซลล์จากส่วนใบของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร โดยหวังว่าเซลล์เดียวของพืชจะสามารถแบ่งตัว และเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้ คือมีคุณสมบัติที่เรียกว่า โทติโพเทนซี (totipotency) ซึ่งมีความหมายว่าเซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์จากส่วนใดๆของพืชมีความสามารถที่จะเจริญเป็นต้นใหม่ได้ แต่การทดลองในขณะนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ ต่อมา ในปี ค.ศ.1930 ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจากรากของพืชหลายชนิดโดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และในปี ค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ) และแคลลัส (callus) ของพืชได้หลายชนิดและนับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาไปได้อย่างกว้างขวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆอีกมากมาย ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงพืชเซลล์เดี่ยวๆ และโปรโต-พลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อยีน การถ่ายยีน ฯลฯ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น

2.2.2 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) คือ การนำชิ้นส่วนของพืช เช่น อวัยวะต่างๆ ข้อ ตา ราก ปลายยอด เนื้อเยื่อพาเรงไคมา (parenchyma) หรือเซลล์จำพวกโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งประกอบด้วย เกลือแร่ ธาตุอาหารต่างๆ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ซึ่งชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปในรูปแบบต่างๆ เช่น เกิดเป็นยอด เกิดเป็นราก เกิดเป็นเอมบริโอ หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า “แคลลัส” ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จำนวนมากได้ เนื่องจากเซลล์ของพืชมีคุณสมบัติที่จะมีการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ใหม่ได้ ถ้าได้รับสภาพแวดล้อมภายนอกที่เหมาะสม คุณสมบัตินี้เรียกว่า โทติโพเทนซี (totipotency)

หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือต้องทำในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์กล่าวคือทุกขั้นตอนต้องปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยขั้นตอนในการทำงานจะเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ชิ้นส่วนพืช แล้วตัดเอาเฉพาะส่วนที่ต้องการนำมาวางเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง หรือขวดแก้วที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วเช่นกัน ขวดเพาะเลี้ยงนี้จะถูกนำมาวางเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้น ให้เป็นไปตามที่ต้นพืชต้องการ ชิ้นส่วนของพืชจะได้รับแร่ธาตุและสารอาหารจากอาหารสังเคราะห์และเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชนี้สามารถควบคุมได้โดยการเลือกใช้สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เช่น ฮอร์โมนพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงว่าต้องการให้ชิ้นส่วนนั้นเจริญไปเป็นส่วนใด เช่น ถ้าต้องการให้เจริญไปเป็นส่วนลำต้นก็สามารถทำการชักนำโดยใช้ฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) หากต้องการให้เกิดรากอาจใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxin) หรืออาจจะใช้ฮอร์โมนหลายๆ ชนิดรวมกัน (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, 2550)

2.2.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. การขยายพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นได้ยาก หรือขยายพันธุ์ได้ช้า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้จำนวนมากอย่างรวดเร็ว สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดปี ซึ่งต้นพันธุ์ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และให้ผลผลิตคุณภาพดี พืชหลายชนิดที่มีปัญหาในการขยายพันธุ์แบบปกติแต่ปัจจุบันประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น กล้วยไม้ หน้าวัว หน่อไม้ฝรั่ง

2. การผลิตต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรค พืชหลายชนิดจะมีเชื้อไวรัสแฝงตัวอยู่ในท่อลำเลียง จึงเป็นการยากต่อการผลิตพันธุ์พืชที่ปราศจากโรค ดังนั้นการเพาะเลี้ยงส่วนของปลายยอดที่ยังไม่มีท่อลำเลียงจะสามารถขจัดการปนเปื้อนของไวรัสเหล่านั้นได้ มีพืชหลายชนิดที่ใช้เทคนิคนี้ได้สำเร็จ เช่น มันฝรั่ง สตรอเบอรี่ ขิง ฯลฯ

3. การผลิตสารสำคัญ พืชหลายชนิดสามารถผลิตสารสำคัญได้ ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้ เช่น สารตัวยารักษาโรค สีที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งการนำพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมได้จะสามารถชักนำให้เซลล์ของพืชผลิตสารในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

4. การอนุรักษ์พันธุกรรม และการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงไว้ในขวดและบังคับให้เติบโตอย่างช้าๆ ซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่และแรงงาน นอกจากนี้ยังสะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศ เพราะอยู่ในขวดและปราศจากเชื้อโรค

5. การปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ เช่น การสร้างพืชโครโมโซมชุดเดียว การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การรวมเซลล์พืช (Protoplast Fusion) และพันธุ์วิศวกรรมของพืช

2.2.4 ข้อดีและข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. สามารถนำเนื้อเยื่อเจริญจากชิ้นส่วนต่างๆของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นแคลลัส และสามารถผลิตต้นพันธุ์พืชได้ปริมาณมากและรวดเร็ว ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พื้นที่ไม่มากนัก

2. สามารถเก็บรวบรวมพันธุ์พืชต่างๆไว้ในหลอดทดลอง ขวด หรือในขวดแก้วได้เป็นจำนวนมาก โดยใช้พื้นที่น้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3. ต้นพืชใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆได้ เช่น ความเข้มแสง ระยะเวลาที่ให้แสง อุณหภูมิ ความชื้น สารอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และปัจจัยอื่นๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลา และไม่ขึ้นกับฤดูกาลต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การเปลี่ยนอาหารของเนื้อเยื่อพืชเมื่อเพาะเลี้ยงไประยะเวลาหนึ่งจากอาหารเก่าไปยังอาหารใหม่ใช้เวลาและใช้แรงงานน้อย

7. เนื้อเยื่อพืชบางชนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำไปผลิตสารทุติยภูมิโดยการสกัดสารจากส่วนของเนื้อเยื่อพืช แคลลัส และเซลล์แขวนลอย แล้วสามารถนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในงานต่างๆได้

8. ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไม่สามารถงอกได้ตามปกติในสภาพธรรมชาติ

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องใช้งบประมาณค่อนข้างสูง และสิ้นเปลือง เนื่องจากมีความจำเป็นต้องใช้สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือต่างๆหลายชนิด

2. ห้องที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องเป็นห้องที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆได้ เช่น แสงสว่าง ความชื้น และอุณหภูมิ โดยต้องเปิดเครื่องปรับอากาศตลอดเวลาเพื่อที่จะรักษาอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญเป็นพิเศษในการปฏิบัติงาน

4. ต้องเลือกชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชให้มีความเหมาะสมกับสูตรอาหาร เพื่อให้สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส และพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ พืชหลายชนิดยังมีปัญหาไม่สามารถที่จะพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

5. ต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจจะมีขนาดเล็กกว่าพืชปกติ

6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีโอกาสที่จะได้ต้นใหม่ที่มีความแตกต่างจากต้นเดิม คือเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม (somaclonal variation) สูงกว่าวิธีการขยายพันธุ์ตามปกติ ถ้าใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลานาน

2.2.5 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ อาหารเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยอาหารเพาะเลี้ยงนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงมีมากมายหลายสูตรให้เลือกใช้งาน เช่น สูตร MS (ภาคผนวก ข) เป็นสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้กับพืชทั่วๆไป สูตร Vacin and Went เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลต่างๆ สูตร Woody Plant Medium (WPM) เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชพวกไม้เนื้อแข็ง โดยทั่วไปสูตรอาหารเหล่านี้จะประกอบไปด้วย ธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ธาตุอาหารรองที่พืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเช่น โบรอน (B) โมลิบดินัม (Mo) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ไอโอดีน (I) และธาตุอาหารอื่นๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และน้ำตาล นอกจากนี้อาจจะมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรือที่เรียกว่า ฮอร์โมนพืช หรือสารจากธรรมชาติอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กล้วยหอม สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งจะมีสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืชรวมอยู่ด้วย (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, 2550)

2.2.6 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มี 2 รูปแบบภายใต้สูตรเดียวกัน แล้วแต่ผู้ปฏิบัติเห็นว่าในระยะไหนควรใช้อาหารรูปแบบใดแล้วส่งผลดีต่อการพัฒนาของชิ้นพืชได้ดีกว่า ได้แก่

1. อาหารแข็ง (Solid medium) เป็นเพียงการผสมวุ้นลงในอาหาร ประมาณ 0.7-1 เปอร์เซ็นต์ หรือ 7-10 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร เพื่อช่วยพยุงชิ้นพืชให้สามารถเจริญเติบโตอยู่บนอาหารได้

2. อาหารเหลว (Liquid medium) เป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของวุ้น ชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลวมักจะมีการเจริญเติบโตที่ดี และค่อนข้างรวดเร็ว แต่ต้องระวังเรื่องการถ่ายเทอากาศของชิ้นพืช ถ้าเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว จำเป็นต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Shaker) ควบคู่กันไปเสมอ ทั้งนี้เครื่องเขย่าจะเคลื่อนไหวด้วยการหมุนในแนวขนานกับพื้นโลก อัตรา 100-120 รอบต่อนาที การเขย่าตลอดเวลาจะช่วยให้ออกซิเจนละลายลงในอาหารส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชบนอาหารเหลวเป็นเวลานานพืชอาจมีการฉ่ำน้ำ หากพบอาการดังกล่าว ควรหยุดการใช้อาหารเหลว และเปลี่ยนไปใช้อาหารแข็งจะสามารถลดอาการฉ่ำน้ำของพืชลดลงได้

2.2.7 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 7 กลุ่มด้วยกันคือ

1. อ อกซิน (auxins) เป็นกลุ่มของสารที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement) การแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม การขยายขนาดของใบ การเกิดราก การขยายขนาดของผล ป้องกันการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล ยับยั้งการแตกตาข้าง ฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นก็คือ IAA โดยสร้างมากที่บริเวณปลายยอด ปลายราก ผลอ่อน และบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) อยู่มาก ปริมาณ IAA ภายในเนื้อเยื่อพืชแต่ละส่วนมีมากน้อยแตกต่างกันไป โดยจะมีอยู่มากในส่วนที่กำลังเจริญเติบโต การรักษาระดับปริมาณภายในเนื้อเยื่อพืชถูกควบคุมโดยระบบการสร้างและการทำลายพร้อม ๆ กันไป ถ้าเป็นเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตจะมีการสร้างมากกว่าการทำลาย และในทางตรงกันข้าม ในเนื้อเยื่อที่มีอายุมากขึ้น จะมีการทำลายมากกว่าการสร้าง คุณสมบัติที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำคัญของออกซินคือ ความสามารถในการกระตุ้นการเกิดรากและการเจริญของราก พืชบางชนิดที่ออกรากได้ยาก แต่ถ้ามีการใช้ออกซินเข้าช่วยก็จะทำให้ออกรากได้ง่ายขึ้น สารที่นิยมใช้ในการเร่งรากคือ NAA และ IBA ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้จัดว่าเป็นออกซินอย่างอ่อน มีพิษต่อพืชน้อย รากที่เกิดขึ้นจากการใช้สาร 2 ชนิดนี้จึงมักไม่มีอาการผิดปกติ แต่ถ้าใช้สารพวก 2,4-D หรือ 4-CPA ซึ่งมีฤทธิ์ของออกซินสูง จะทำให้รากผิดปกติ คือกุดสั้น รากหนาเป็นกระจุก สารสังเคราะห์ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน ที่ใช้กันมากได้แก่ NAA, IBA, 4-CPA และ 2,4-D

2. จิบเบอเรลลิน (gibberellins) เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation) ทำลายการพักตัวของพืช กระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิด และยับยั้งการออกดอกของพืชบางชนิด สารกลุ่มนี้มีทั้งที่พืชสร้างขึ้นเอง และเชื้อราบางชนิดสร้างขึ้น ในปัจจุบันพบจิบเบอเรลลินทั้งหมด 71 ชนิด โดยที่ทุกชนิดเรียกชื่อเหมือนกันคือ จิบเบอเรลลิน เอ (gibberellin A) หรือ จีเอ (GA) แต่มีหมายเลขตามหลังตั้งแต่ 1 ถึง 71 เช่น จีเอ3, จีเอ4 และ จีเอ7 (GA3 GA4 และ GA7) สารจีเอ3 เป็นจิบเบอเรลลินที่นำมาใช้มากทางการเกษตร โดยมีชื่อเรียกเฉพาะของสารจีเอ3 ว่ากรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) พืชสามารถสร้างจีเอ3ได้โดยมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งจีเอ3 ที่นำมาใช้ทางการเกษตรนั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราบางชนิดแล้วสกัดจีเอ3ออกมา เนื่องจากปัจจุบันยังไม่สามารถสังเคราะห์จีเอได้ด้วยวิธีทางเคมี

3. ไซโตไคนิน (cytokinins) เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ของพืช ชะลอการแก่ชรา และกระตุ้นการแตกตาข้าง พบมากในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ และในคัพภะ (embryo) ส่วนใหญ่แล้วไซโตไคนินมีการเคลื่อนย้ายน้อย แต่มีคุณสมบัติสำคัญในการดึงสารอาหารต่างๆ มายังแหล่งที่มีไซโตไคนินสะสมอยู่ (cytokinin-induced translocation) ฮอร์โมนที่พบในพืชได้แก่ ซีเอทิน ส่วนสารสังเคราะห์ที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP (6-BA) และไคเนติน (kinetin) คุณสมบัติในการช่วยแบ่งเซลล์ของไซโตไคนิน มีประโยชน์ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมากโดยใช้ผสมเข้าไปในสูตรอาหารเพื่อช่วยการเติบโตของแคลลัส และกระตุ้นให้ก้อนแคลลัสพัฒนากลายเป็นต้นได้

4. เอทิลีน และสารปลดปล่อยเอทิลีน (ethylene and ethylene releasing compounds) เอทิลีนเป็นก๊าซชนิดหนึ่ง และจัดเป็นฮอร์โมนพืช เนื่องจากพืชสร้างขึ้นมาได้ โดยมีผลควบคุมการแก่ชรา การสุก รวมทั้งการออกดอกของพืชบางชนิด และเกี่ยวข้องกับการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล การเหลืองของใบ การงอกของหัวพืช และเมล็ดพืชบางชนิด เอทิลีนจะสร้างมากในส่วนของพืชที่กำลังเข้าสู่ระยะชราภาพ (senescence) เช่น ในผลแก่ หรือใบแก่ใกล้หลุดร่วง เนื่องจากเอทิลีนเป็นก๊าซดังนั้นจึงฟุ้งกระจายไปได้ทั่ว จึงไม่มีการเคลื่อนย้ายเหมือนกับฮอร์โมนในกลุ่มอื่น ๆ สารอินทรีย์บางชนิดมีคุณสมบัติคล้ายเอทิลีน เช่น อะเซทิลีน (acetylene) โปรปิลีน (propylene)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงอาจนำสารเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้เช่นกัน ยกตัวอย่างได้แก่การใช้อะเซทิลีนในการบ่มผลไม้ และเร่งการออกดอกของสับปะรด เป็นต้น แต่เนื่องจากว่าสารที่กล่าวมานี้เป็นก๊าซ จึงมีความยุ่งยากในการใช้ และไม่สามารถควบคุมความเข้มข้นได้แน่นอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ในแปลงปลูกพืช ดังนั้นจึงได้มีการสังเคราะห์สารบางชนิด ซึ่งเป็นของเหลวแต่สามารถปลดปล่อยหรือสลายตัวได้ก๊าซเอทิลีน ซึ่งได้แก่ ethephon และ etacelasil

5. สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช (plant growth retardants) สารกลุ่มนี้ไม่จัดเป็นฮอร์โมนพืช แต่เป็นสารสังเคราะห์ทั้งหมด มีคุณสมบัติสำคัญคือ ยับยั้งการสร้างหรือยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในพืช จึงมีผลลดการยืดตัวของเซลล์ ทำให้ปล้องสั้น ใบหนาเขียวเข้ม กระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิด และมีคุณสมบัติอื่น ๆ ได้แก่ ทำให้พืชทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ร้อนจัด เย็นจัด ดินแห้ง ดินเกลือ เพิ่มผลผลิตพืชบางชนิด เพิ่มการติดผลของพืชบางชนิด สารชะลอการเจริญเติบโตที่สำคัญ ได้แก่ ดามิโนไซด์ (daminozide) และพาคลอบิวทราซอล (paclobutrazol) เป็นต้น

6. สารยับยั้งการเจริญเติบโต (plant growth inhibitors) สารกลุ่มนี้มีหน้าที่ในการถ่วงดุลกับสารเร่งการเติบโตพวกออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน เพื่อให้การเติบโตเป็นไปอย่างพอเหมาะพอดี ส่วนใหญ่มีหน้าที่ยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการเติบโตของเซลล์ ทำให้เกิดการพักตัว (dormancy) และเกี่ยวข้องกับการหลุดร่วงของอวัยวะพืช ฮอร์โมนในกลุ่มนี้มีพบในพืชมีกว่า 200 ชนิดแต่ที่สำคัญที่สุดและรู้จักกันดีคือ ABA (กรดแอบไซซิก abscisic acid) ในทางการเกษตรมีการใช้ประโยชน์จากสารกลุ่มนี้น้อยมาก อย่างไรก็ตาม มีการใช้สารสังเคราะห์เพื่อประโยชน์บางอย่างเช่นยับยั้งการงอกของหัวมันฝรั่งและหอมหัวใหญ่ ระหว่างการเก็บรักษา ใช้แทนการเด็ดยอด (pinching) เพื่อกระตุ้นให้แตกตาข้าง ร วมทั้งยับยั้งการเติบโตทางกิ่งใบซึ่งมีผลในการกระตุ้นดอกได้ในพืชบางชนิด สารสังเคราะห์ที่สำคัญได้แก่ ค ลอฟูเรนอล (chlorflurenol) ไดเคกูแลก โซเดียม (dikegulac sodium) มาเลอิก ไฮดราไซด์ (maleic hydrazide) และทีบา (TIBA) เป็นต้น

7. สารอื่น ๆ (miscellaneous) เป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากทั้ง 6 กลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนใหญ่ใช้เพื่อประโยชน์เฉพาะอย่าง เช่น เพิ่มผลผลิต ขยายขนาดผล ป้องกันผลร่วง ช่วยในการแบ่งเซลล์ อย่างไรก็ตามยังจัดว่ามีประโยชน์ค่อนข้างน้อยและการใช้ยังไม่กว้างขวาง ยกตัวอย่างสารเหล่านี้ได้แก่ เออร์โกสติม และอโทนิก เป็นต้น

2.2.8 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อพืช

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่สำคัญสำหรับจุดเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีวิธีปฏิบัติดังนี้คือ

1. เลือกตัดเนื้อเยื่อจากต้นพืชที่มีความสมบูรณ์ แข็งแรงและไม่แสดงอาการของโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ล้างชิ้นส่วนพืชให้สะอาด

3. จากนั้นตัดเป็นชิ้นให้มีส่วนที่ต้องการตัดอยู่

4. นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นประมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมน้ำยาจับใบ เช่น ทวีน 20 (Tween 20) ประมาณ 2-3 หยด เป็นเวลานาน 15-20 นาที

5. จากนั้นจึงย้ายมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 นาที

6. ล้าง 2-3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

7. ตัดเนื้อเยื่อที่ต้องการ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสม

8. นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

หมายเหตุ ขั้นตอนตั้งแต่ข้อ 5-8 ทำในตู้ปลอดเชื้อ

2.2.9 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ภาคผนวก ก)

1. เลือกสูตรอาหารที่ต้องการ เช่น สูตร MS (Murashige and Skoog) 1962

2. เตรียม Stock Solution ของอาหารแต่ละสูตร

3. การเตรียมอาหารทำโดยตวงเอา Stock Solution ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้มาผสมกัน และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตโคนินเพื่อเร่งการเจริญของชิ้นส่วนพืช จากนั้นเติมน้ำตาล เติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรองเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ

4. วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 1 นอร์มอล หรือกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1 นอร์มอล ให้มีค่าประมาณ 5.6-5.8 (ในสูตร MS)

5. ถ้าต้องการเตรียมอาหารเหลว กรอกใส่ภาชนะแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

6. ถ้าต้องการเป็นอาหารแข็ง เติมวุ้นประมาณ 7-10 กรัม ในอาหารและต้มให้วุ้นละลาย จากนั้นกรอกใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นกัน การชักนำให้ออกรากและย้ายปลูก

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ปริมาณมากในอาหารสูตรที่เหมาะสมแล้ว โดยทั่วไปต้นพืชเหล่านั้นจะออกรากและย้ายปลูกในโรงเรือนเพื่อให้พืชตั้งตัวได้ รอปลูกในกระถางหรือในแปลงต่อไป

2.2.10 ขั้นตอนการปลูกและดูแลพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. นำต้นพืชที่ออกรากไว้ในโรงเรือนก่อนย้ายปลูกประมาณ 3-5 วัน

2. คลายฝาขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนจะย้ายปลูกพืชประมาณ 1-2 วัน เพื่อให้ความชื้นสัมพัทธ์ในขวดลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83986

3. ใช้ปากคีบหรือลวดปลายงอดึงต้นพืชที่แข็งแรงและมีรากที่สมบูรณ์ออกจากขวด แต่ต้องระวังอย่าให้ต้นช้ำ

4. ล้างวุ้นออกจากรากพืชให้สะอาดและแช่ยาเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อรา

5. ปลูกพืชในภาชนะปลูกที่บรรจุวัสดุปลูกไว้แล้ว วัสดุปลูกที่ใช้คือ ทราย : ถ่านแกลบ หรือทราย : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1

6. รดน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ต้นพืชหลังปลูกเสร็จใหม่ๆ

7. นำต้นพืชที่เพิ่งย้ายปลูกเก็บในถุงพลาสติกห่อหุ้มหรือกระโจมเพื่อรักษาความชื้นไว้ในระบบปิด (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, 2550)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ โดยมีผู้ศึกษาวิจัยในการนำส่วนของตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ มีการเพาะเลี้ยงส่วนตายอด และตาข้างในอาหาร MS ที่เติม benzylaminopurine (BA) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และจิบเบอเรลลิกแอซิด (GA) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดของสบู่ดำสูงสุดเฉลี่ย 7.1 ยอดต่อต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (ยุพา, 2550) และการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA 8.9 ไมโครโมลาร์ ควบคู่กับ thidiazuron (TDZ) 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 12.3 ยอด (Sujatha, 2005) นอกจากนี้อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นชนิด embryogenic และมีบางส่วนสามารถเจริญเป็นยอดเล็กๆ ซึ่งสามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2550)

2.3 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA isolation) (อภิชาต, 2550ก)

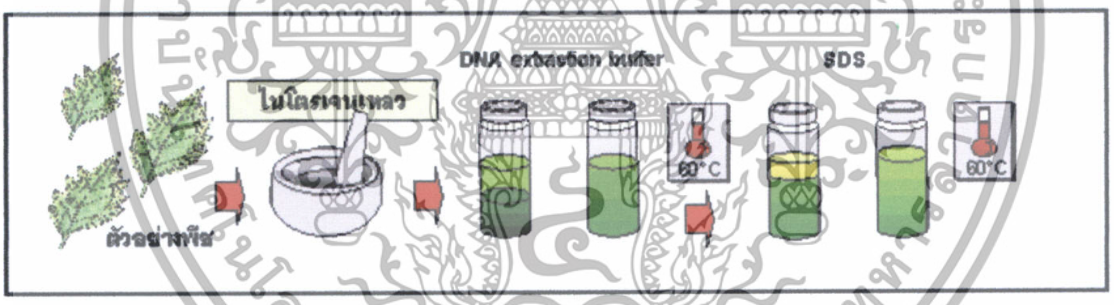
การนำเอาเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetic) มาใช้ในการวิเคราะห์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่จะนำมาใช้จะมีความสำคัญเพราะมีผลต่อการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการแยกโดยการใช้เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส การสกัดดีเอ็นเอในพืชมักเกิดปัญหาการปนของสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต และไกลโคโปรตีนต่างๆ การเลือกเนื้อเยื่อพืชจึงมีความสำคัญ ปกติจะเลือกใช้ในส่วนของใบอ่อน นำมาย่อยด้วยไนโตรเจนเหลว ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์ และทำให้เซลล์แตก ทำการแยกดีเอ็นเอออกจากองค์ประกอบอื่นๆในเซลล์ โดยใช้ DNA extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย tris-buffer มีหน้าที่ในการปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในสารละลายให้มีค่าประมาณ 8 ซึ่งมีผลทำให้ดีเอ็นเอแยกออกเป็นเส้นเดียว เกลือในสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น โซเดียม หรือโพแทสเซียมอะซิเตด มีผลทำให้เกิดการคลายตัวระหว่างโปรตีนกับดีเอ็นเอ สารดีเทอร์เจนต์ (detergent) เช่น โซเดียมดีโดซิลซัลเฟต (sodium dedosyl sulphate, SDS) หรือซาร์โคซิล (sarkosyl) มีผลต่อการสลายตัวของเยื่อหุ้มนิวเคลียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(nuclear membrane) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Dnase ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายดีเอ็นเอในเซลล์ โดยใช้ EDTA (ethylene dinitrilo tetraacetic acid) ซึ่งเป็นสารชีเลต (chelating agent) มีผลในการดึงไอออนแมกนีเซียมที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ Dnase ทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงาน ส่วนโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์จะถูกทำให้เสียสภาพและตกตะกอนโดยใช้ฟีนอลคลอโรฟอร์ม หรือยูเรียเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจะถูกนำมาใช้ในการกำจัดอาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยการปั่นเหวี่ยงแบบสมดุลในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ

2.3.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

เริ่มจากการเลือกชิ้นส่วนของพืชตัวอย่าง นำมาบดละเอียดในไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างที่ละเอียดใส่หลอดทดลองที่เติม DNA extraction buffer ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมสารโซเดียมดีโดซิลซัลเฟต ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2.6)

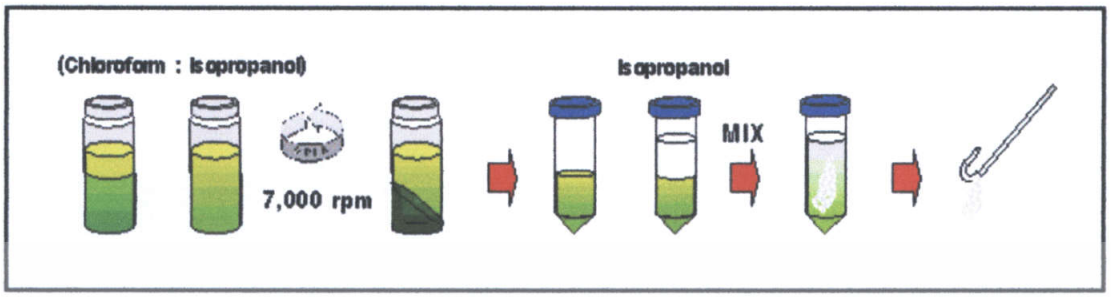


รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

ที่มา : http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique1_DNA_extraction.html

เติมคลอโรฟอร์มและไอโซโพรพานอลอัตราส่วน 24:1 ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกเศษชิ้นส่วนพืชออกจากดีเอ็นเอ แยกสารละลายเติมด้วยไอโซโพรพานอลผสมให้สารละลายเข้ากันอย่างเบาๆ ดีเอ็นเอจะเริ่มจับตัวให้เห็น ใช้แท่งแก้วปลายงอขนาดเล็กเกี่ยวดีเอ็นเอขึ้นมาล้างในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ซับให้แห้ง (รูปที่ 2.7)

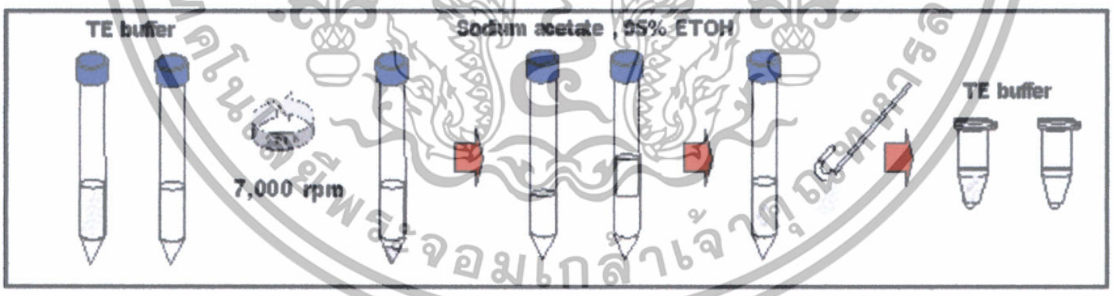
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (ต่อ)

ที่มา : http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique1_DNA_extraction.html

ย้ายดีเอ็นเอลงละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE (สารละลาย Tris-EDTA) ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนอยู่ออกจากดีเอ็นเอ แยกสารละลาย เติมด้วยโซเดียมอะซิเตด และเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้สารละลายเข้ากันอย่างเบาๆ ดีเอ็นเอจะเริ่มปรากฏ ใช้แท่งแก้วปลายงอขนาดเล็กเกี่ยวดีเอ็นเอขึ้นมาล้างในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ซับให้แห้ง แล้วย้ายดีเอ็นเอลงละลายในสารละลาย TE buffer นำมาเช็คความเข้มข้นก่อนนำมาใช้ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (ต่อ)

ที่มา : http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique1_DNA_extraction.html

2.4 เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (อภิชาต, 2550ข)

2.4.1 ประวัติความเป็นมา

ช่วงทศวรรษที่ 1990 ได้เริ่มมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) อย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะใช้ในการตรวจวินิจฉัย หรือในโครงการปรับปรุงพันธุ์เดิม เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ และได้ความนิยมคือ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) แต่ด้วยข้อจำกัดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้คือ มีขั้นตอนการปฏิบัติหลายขั้นตอน ต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก การสร้างตรวจทำได้ยาก จึงนำไปสู่การพยายามสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดใหม่ขึ้นมาเพิ่ม เพื่อใช้สำหรับงานที่ต้องทำเป็นจำนวนมากๆ อย่างเช่น ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ หรือการตรวจวินิจฉัย

เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) ได้พัฒนาขึ้นโดยกลุ่มของนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่มพร้อม ๆ กัน คือ กลุ่มของบริษัท Dupont ที่รายงานโดย William และคณะในปี ค.ศ. 1990 ที่ใช้ประโยชน์อาร์เอพีดีในการวางแผนที่โครโมโซม โดยเรียกชื่อเป็น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยตรง อีกกลุ่มหนึ่งพัฒนาโดย The California Institute of Biological Research ที่รายงานโดย Welsh และ McClelland ในปี ค.ศ. 1990 เช่นเดียวกัน แต่เรียกเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ว่า Arbitrarily – Primed PCR (AP – PCR) และนำไปใช้ประโยชน์ในการทำลายพิมพ์จีโนม (genome fingerprinting) ทั้งสองกลุ่มก็มีหลักการเหมือนกันซึ่งต่อไปจะเรียกอาร์เอพีดี (RAPD)

2.4.2 ความหมายของอาร์เอพีดี (ที่มา : http://moomsabuy.exteen.com/20070115/polymerase-chain-reaction-pcr)

อาร์เอพีดี (RAPD) หมายถึง การตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่ม ชนิด และเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase Chain Reaction; PCR) ที่มีการเลือกใช้ไพรเมอร์ของการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นชนิดสุ่ม (Random primer) ทำให้สารพันธุกรรมจำลองตัวเองได้ในหลอดทดลอง (in vitro) แบบแผนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกนำมาวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ความสามารถในการบ่งบอกความแตกต่างหรือความผันแปรในกลุ่มชนิดของสิ่งมีชีวิตได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของไพรเมอร์ที่ใช้ ซึ่งถ้าการสุ่มมีความจำเพาะในส่วนของดีเอ็นเอที่ผันแปรมาก จะได้แบบแผนที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้มาก โดยองค์ประกอบสำคัญของปฏิกิริยาอาร์เอพีดีคือ เอ็นไซม์จำลองตัวชนิดทนความร้อน (Taq DNA polymerase) ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer) และองค์ประกอบย่อยของดีเอ็นเอ (deoxynucleotide; dNTPs) เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้นมีขนาดที่สั้น (ประมาณ 10 เบส) จึงสามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบได้หลายตำแหน่งโดยสุ่ม หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 หลักการอาร์เอพีดี

หลักการของอาร์เอพีดีโดยทั่วไปก็เป็นการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ การทำให้เส้นดีเอ็นเอเป้าหมายแยกเป็นเส้นเดี่ยว แล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอเริ่มต้นจำลอง ไปเกาะตรงบริเวณที่เป็นคู่สมกัน (complementary) และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA Polymerase) ก็จะนำเอานิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่เป็นคู่สมกับเส้นแม่พิมพ์ (template) มาต่อจากไพรเมอร์จนเป็นเส้นยาวเกิดเป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา ต่อจากนั้นก็จะเกิดปฏิกิริยาเหมือนขั้นตอนแรกเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่หลายๆ รอบจนเกิดการจำลองเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมาปริมาณมากจนสามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมสี

ตารางที่ 2.2 ความต่างของปฏิกิริยาแบบอาร์เอพีดีกับปฏิกิริยาพีซีอาร์

ลักษณะ	อาร์เอพีดี	พีซีอาร์
1. ชนิดไพรเมอร์	ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นๆ ประมาณ 8-10 เบส เพียงชนิดเดียว	ไพรเมอร์สองชนิดที่มีความเฉพาะเจาะจงกับบริเวณที่ต้องการ ความยาวประมาณ 18-25 เบส
2. อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing	ต่ำประมาณ 35-38 องศาเซลเซียส	สูงกว่า ขึ้นกับ %GC content ของไพรเมอร์ประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส
3. บริเวณเป้าหมายเกาะ แบบสุ่ม ที่ไพรเมอร์ เกาะบนเส้นแม่พิมพ์	โดยสุ่มไปทั่วทั้งจีโนม	เกาะแบบเฉพาะเจาะจงกับบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์มา
4. ผลผลิตการเพิ่มปริมาณเส้นดีเอ็นเอ	ผลผลิตมากขึ้น โดยทั่วไปประมาณ 8-10 ชิ้นที่สามารถเห็นได้ชัดเจน ขึ้นกับขนาดของจีโนม	ปกติจะมีน้อยชิ้น ขึ้นกับชนิดของไพรเมอร์

ปฏิกิริยาอาร์เอพีดีเป็นปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั่วไป (ตารางที่ 2.2) แต่ต่างกันที่ปฏิกิริยาอาร์เอพีดีใช้ไพรเมอร์เพียงข้างเดียวที่มีขนาดสั้นๆ เพียงประมาณ 8-10 เบส และเป้าหมายการเกาะของไพรเมอร์ก็คือบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น โดยไม่ต้องคำนึงถึงทิศทางของไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เกาะกับเส้นแม่พิมพ์ ที่เกิดการแยกเส้นแม่พิมพ์เป็นเส้นเดียวในขั้นตอน denature เพราะฉะนั้นในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาอาร์เอพีดีจึงต้องใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ เพื่อให้เส้นไพรเมอร์สามารถเกาะได้โดยสุ่มมากที่สุดและเกิดการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในขั้นตอน extension แต่เนื่องจากทิศทางการเกาะของไพรเมอร์จะไม่แน่นอน แต่การที่เอนไซม์จะนำเบสมาต่อกับไพรเมอร์ให้ได้ ดีเอ็นเอเส้นใหม่จะเฉพาะในทิศทางบริเวณปลาย 3′ ของไพรเมอร์เท่านั้น เพราะฉะนั้นลักษณะ ทิศทางที่ไพรเมอร์เกาะกับเส้นแม่พิมพ์แต่ละเส้นต้องอยู่ในลักษณะตรงกันข้ามแบบทิศชี้ปลาย 3′ เข้าหากันจึงจะสามารถเกิดเป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่สามารถมองเห็นได้เมื่อเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่หลายๆ รอบ อย่างไรก็ตามเนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดสั้นๆ จึงสามารถเกาะได้หลายตำแหน่งและทิศทางอาจทำให้เกิดเส้นดีเอ็นเอใหม่ได้เหมือนกัน จึงเป็นเหตุผลที่อาร์เอพีดีสามารถสร้างดีเอ็นเอผลผลิตได้หลายชิ้น แต่พบว่าโอกาสที่อาร์เอพีดีเส้นสั้นๆ จะมีโอกาสเป็นไปได้มากกว่าเส้นยาว โดยปกติขนาดของชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตจะอยู่ในช่วง 300-1,500 เบส ซึ่งสามารถตรวจผลบนเจลอะกาโรส (agarose gel) มาตรฐานโดยการย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ได้

2.4.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

1. เส้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์

ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) เป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา RAPD ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องเป็นดีเอ็นเอที่สะอาดพอสมควร ต้องไม่มีสิ่งเจือปนมากนักและไม่แตกหัก (sheered DNA) หรือ degrade เพราะจะมีผลต่อการทำซ้ำปฏิกิริยา สามารถใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี small-scale ได้ โดยปรกติจะเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นประมาณ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อความสะดวกในการทำปฏิกิริยา และให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาประมาณ 10-20 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

2. ไพรเมอร์ของอาร์เอพีดี

ไพรเมอร์ของอาร์เอพีดีเป็นไพรเมอร์แบบสุ่มที่ได้จากออกแบบขึ้นมาเองโดยให้มีเปอร์เซ็นต์ของเบสจีซี (%GC content) เหมาะสม โดยทั่วไปสามารถออกแบบเองหรือสั่งซื้อเป็นชุดสำเร็จรูปจากบริษัท เช่น Operon Kit เป็นต้น ความยาวของเส้นไพรเมอร์จะใช้ประมาณ 8-10 เบส ซึ่งถ้าไพรเมอร์ยิ่งมีขนาดสั้นมาก โอกาสที่สามารถเกาะกับเส้นแม่พิมพ์ก็เป็นไปได้มาก ทำให้ได้จำนวนเส้นดีเอ็นเอผลผลิตจำนวนมาก ฉะนั้น จำนวนเบสที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 10 เบสเพราะจะได้จำนวนเส้นดีเอ็นเอผลผลิตประมาณ 8-10 ชิ้นต่อไพรเมอร์ อย่างไรก็ตามขนาดของจีโนมก็มีผลต่อจำนวนผลผลิตของปฏิกิริยา ความเข้มข้นของไพรเมอร์เริ่มต้นที่ใช้จะเจือจางให้เป็น 2 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นของไพรเมอร์สุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 200 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. บัฟเฟอร์พีซีอาร์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ เป็นตัวปรับสภาพสารละลายในปฏิกิริยาให้เหมาะสมที่เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ ทั่วไปจะได้รับมาพร้อมกับเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA Polymerase) ซึ่งจะแตกต่างกันบ้างแล้วแต่บริษัท บัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-Cl พีเอช 8.3 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียม 500 มิลลิโมลาร์ และเจลาติน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบัฟเฟอร์จะมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของปฏิกิริยาปกติ และส่วนประกอบสุดท้ายคือ แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งบางชนิดจะผสมรวมกับบัฟเฟอร์หรืออาจแยกหลอดต่างหากเพื่อผสมที่หลัง โดยปกติปฏิกิริยาอาร์เอพีดีแมกนีเซียมคลอไรด์ต้องมีความเข้มข้นประมาณ 2-2.5 มิลลิโมลาร์ต่อปฏิกิริยา ซึ่งความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อการเกาะของไพรเมอร์บนเส้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์

4. เบสนิวคลีโอไทด์

เบสเป็นส่วนที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส จะนำไปต่อกับไพรเมอร์เพื่อสร้างเป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ เบสจะอยู่ในรูปดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate; dNTP) ซึ่งประกอบด้วยเบส 4 ชนิด คือ dATP dCTP dGTP และ dTTP ส่วนประกอบทั้ง 4 จะผสมรวมกันในหลอดเดียวกันในปริมาณเท่ากันความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ของแต่ละชนิด ซึ่งในปฏิกิริยาอาร์เอพีดีปริมาณที่เหมาะสมของ dNTP เท่ากับ 100-200 ไมโครโมลาร์

5. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เป็นส่วนที่สำคัญของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทั่วไปประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์เป็นสำคัญ โดยส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ชนิด Tag DNA Polymerase อย่างไรก็ตามคุณภาพของเอนไซม์ ก็ขึ้นกับบริษัทที่จำหน่ายด้วย ปฏิกิริยาอาร์เอพีดีที่ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 ไมโครลิตร จะใช้ประมาณ 0.2-1 ยูนิตขึ้นกับชนิด และขนาดของจีโนม

2.4.5 สภาพการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน denature annealing และ extension ซึ่งอาร์เอพีดีก็ในทำนองเดียวกัน จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนเหมือนกัน (ตารางที่ 2.3) เพียงแต่ในขั้นตอน annealing ของอาร์เอพีดีจะใช้อุณหภูมิต่ำกว่าพีซีอาร์ทั่วไป เนื่องจากไพรเมอร์ที่มีความยาวเพียง 8-10 เบส ซึ่งมี melting temperature ต่ำ (อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวครึ่งหนึ่ง) ประกอบกับปฏิกิริยาอาร์เอพีดีต้องการให้ไพรเมอร์สามารถไปเกาะได้มากและดีที่สุด จึงต้องใช้อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 35-36 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อสิ่งมีชีวิตใดต้องทำการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ นอกจากนี้ ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนก็มีผลต่อผลของปฏิกิริยา ซึ่งต้องมีการทดสอบเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ขั้นตอนปฏิกิริยาที่เหมาะสมของอาร์เอพีดี

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(วินาที)
Denature	94 - 95	15 – 60
Annealing	35 – 36	15 – 60
Extension	72	30 – 120

นอกจากนี้ จำนวนรอบของการเกิดปฏิกิริยาก็มีผลต่อความเข้มของชิ้นดีเอ็นเอผลผลิต โดยทั่วไปปฏิกิริยาอาร์เอพีดีจะเพิ่มขั้นตอนก่อน และหลังการเกิดปฏิกิริยาอาร์เอพีดีจริงอีก 1 รอบ โดยเพิ่มขั้นตอน denature ก่อนจะเริ่มปฏิกิริยาจริงให้มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-5 นาที เพื่อให้เกิดการแยกตัวของเส้นดีเอ็นเอมากที่สุด และในขั้นสุดท้าย เริ่มขึ้น last extension เพื่อให้สามารถเห็นผลผลิตที่จะได้มากที่สุด ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียสประมาณ 5-7 นาที

2.4.6 ขั้นตอนการทำอาร์เอพีดี

1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (ตารางที่ 2.4) ที่เหมือนกันรวมกันเป็น master mix แล้วแบ่งลงในแต่ละหลอดปฏิกิริยา เช่น ใส่เฉพาะดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างในหลอด แล้วเตรียมส่วนของ master mix ที่เป็นไพรเมอร์ชนิดเดียวกัน ผสมแล้วแบ่งลงในแต่ละหลอดปฏิกิริยา โดยปกติจะต้องเตรียมส่วน master mix ให้มากกว่าปกติ 10 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

ส่วนผสม	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	10 นาโนกรัม	2.0
บัฟเฟอร์พีซีอาร์	10 เท่า	1 เท่า	1.0
dNTPs mix	1 มิลลิโมลาร์	100 ไมโครโมลาร์	1.0
Tag DNA polymerase	1 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.2 ยูนิต	0.2
ไพรเมอร์อาร์เอพีดี	2 ไมโครโมลาร์	200 นาโนโมลาร์	1.0
น้ำปราศจากไอออน			4.8
ปริมาตรรวม			10.0

2. นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เพื่อให้สารละลายที่ติดอยู่ที่ข้างหลอดตกลงสู่ก้นหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. หยด mineral oil 1 หยดบนสารละลายที่ผสมแล้ว เพื่อป้องกันการระเหยถ้าเป็นเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Thermal Cycler) ที่ไม่สามารถป้องกันการระเหยได้ หรือเมื่อทำในปริมาตรน้อยๆ (5 ไมโครลิตร) แต่ถ้าเป็นเครื่องรุ่นใหม่ๆ ที่ป้องกันการระเหยหรือมีระบบ heat lid ก็ไม่จำเป็นต้องใส่ mineral oil (ที่มา : www.dna.kps.ku.ac.th/m-crop/ Technique11_ RAPD.html)

4. นำหลอดปฏิกิริยาใส่ในเครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา Programmable DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 สภาพการเกิดปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละขั้น	อุณหภูมิและเวลา	จำนวนซ้ำ
Initiation Denature Step	94 องศาเซลเซียส 2 นาที	1
Denaturing Step	94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	35
Annealing Step	35 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
Extension Step	72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Final Extension Step	72 องศาเซลเซียส 5 นาที	1
Cool down 4 องศาเซลเซียส		

5. เมื่อครบรอบสุดท้ายแล้ว นำหลอดปฏิกิริยาออกจากเครื่องพีซีอาร์แล้วเติมสารละลายสีที่มีสมบัติในการหยุดการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA Polymerase ได้ PCR loading Dye 2 เท่า ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเพื่อให้ส่วนผสมตกลงมาที่ก้นหลอด แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ผลบนเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสที่มีอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟที่ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ และบันทึกภาพเพื่อการวิเคราะห์ผล

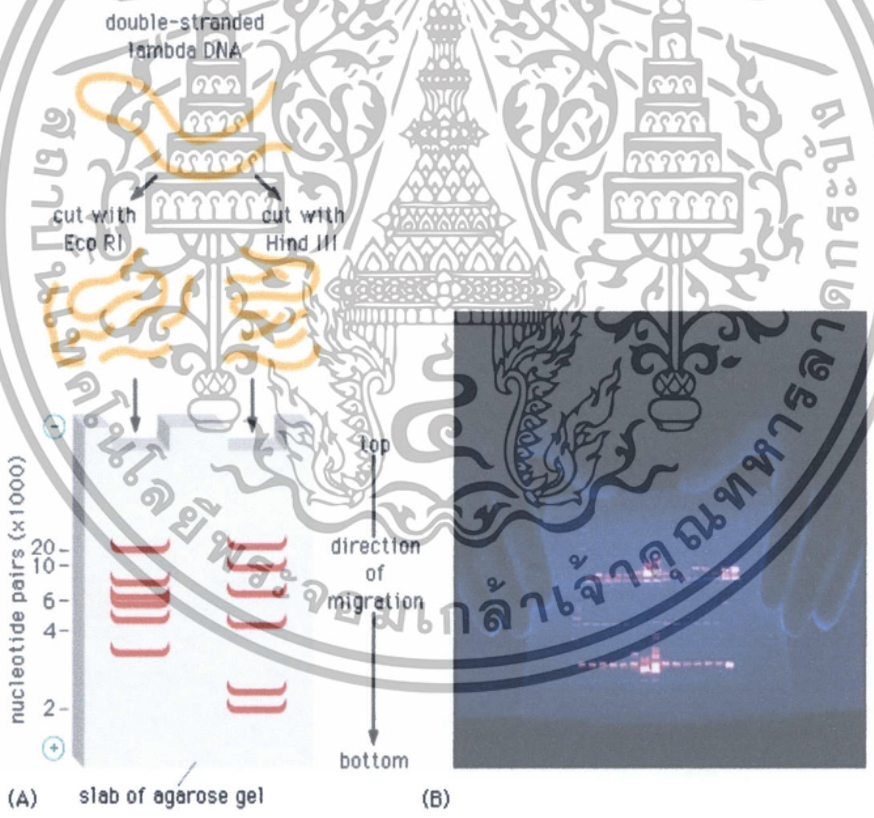
2.4.7 การตรวจผล

เนื่องจากผลผลิตของปฏิกิริยาอาร์เอพีดีมีขนาดไม่เล็กมากนัก และไม่ใหญ่มากเกินไปจึงสามารถตรวจบนเจลอะกาโรส มาตรฐานที่มีความเข้มข้นประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ได้โดยการย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ โดยปกติผลผลิตของปฏิกิริยาอาร์เอพีดีจะมีขนาดประมาณ 300-1,500 เบส อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจชิ้นดีเอ็นเอที่เข้มน้อย อาจใช้วิธีการตรวจผลบนโพลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide gel) ที่ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์หรือซิลเวอร์สเตนนิ่ง (silver-staining) ก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (Agarose gel Electrophoresis) (ธีรวรรธน์, 2547)

อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) เป็นเทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวลดีเอ็นเอแล้ว จะเป็นค่าคงที่ นอกจากนี้อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสยังแยกดีเอ็นเอออกจากกัน โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอัดแน่นอย่าง supercoiled DNA จะมีแรงเสียดทานน้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า circular DNA และดีเอ็นเอรูปร่างเป็นแท่ง ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเหมือนกัน ดีเอ็นเอขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่



รูปที่ 2.9 เทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเออะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)
ที่มา : http://www.thirawat.com/bc/rdna.html#agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟ-รีซิส (รูปที่ 2.9) กระทำโดยเตรียมเจลอะกาโรส ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม หยดสารละลายดีเอ็นเอลงในช่องบนเจลอะกาโรส แล้วเปิดสนามไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะวิ่งจากขั้วลบเข้าหาขั้วบวก เมื่อได้เวลาที่เหมาะสม ปิดสนามไฟฟ้า แล้วย้อมดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสด้วยเอทธิเดียมโบร์ไมด์ แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เอทธิเดียมโบร์ไมด์จะเรืองแสงสีส้มเป็นแถบดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้น สามารถอาศัยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่าง หรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม (Polymerase Chain Reaction; PCR) สามารถทำให้สารพันธุกรรมจำลองตัวเองได้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยอาศัยหลักการที่ไพรเมอร์ ที่มีขนาดสั้นประมาณ 10 คู่เบสเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบได้หลายตำแหน่งโดยสุ่ม หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสม ทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัว และขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืช (vartietal identification) ซึ่งนำ molecular markers มาใช้เป็นตัวกำหนดสายพันธุ์ หรือจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพถูกต้องแม่นยำ นอกจากจะใช้เทคนิคอาร์เอพีดี สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืชแล้ว ยังมีการใช้เทคนิคอื่นๆอีก เช่น Amplification Fragment Length Polymorphic (AFLP) ในการจำแนกสบู่ดำ 134 ตัวอย่าง สามารถจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยในกลุ่มสบู่ดำแบ่งเป็นตัวอย่างจากสหรัฐอเมริกากลุ่มหนึ่ง และตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศอีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งในกลุ่มหลังสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยเพิ่มได้อีก 8 กลุ่มย่อย (ศิริศักดิ์, 2550) ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการจำแนกสายพันธุ์ของสบู่ดำทั้งที่มีอยู่ในประเทศไทย และต่างประเทศ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ

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

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องชั่ง

3.3.2 อุปกรณ์เครื่องแก้ว (เช่น บีกเกอร์ ปิเปตต์ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแท่งแก้ว)

3.3.3 อ่างน้ำ

3.3.4 ถังน้ำกลั่น

3.3.5 เครื่องวัดความเป็นกรด- ด่าง (pH meter)

3.3.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.3.7 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.3.8 ช้อนตักสารเคมี

3.3.9 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน

3.3.10 เตาอบไมโครเวฟ

3.3.11 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

3.3.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.13 กระดาษกรอง

3.3.14 มีดผ่าตัด

3.3.15 ปากคีบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.16 เครื่องเขย่า

3.3.17 ที่ดูดปล่อยสาร (automatic pipette)

3.3.18 ทิปขนาดต่างๆ (tip)

3.3.19 หลอดทดลองขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)

3.3.20 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ

3.3.21 เครื่องช่วยผสม (vortex)

3.3.22 Ice box

3.3.23 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermocycler)

3.3.24 โกร่ง

3.3.25 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 1 ชุด (Mini Agarose Gel Electrophoresis system)

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

3.4.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ล้างทำความสะอาดใบและก้านใบของสบู่ดำด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกภายนอกออก และล้างให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างจานผึ่งให้แห้ง

2. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบและก้านของสบู่ดำในสารละลายคลอรอกซ์ร้อยละ 15 และ tween-20 แล้วนำไปไว้บนเครื่องเขย่านาน 15 นาที

3. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที

4. นำชิ้นใบและก้านสบู่ดำที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาวางบนจานแก้วที่มีทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งให้แห้งเล็กน้อย

5. ตัดใบและก้านของสบู่ดำให้ได้ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร

6. นำชิ้นเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโตในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร
1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร
3.0 มิลลิกรัม/ ลิตร
5.0 มิลลิกรัม/ ลิตร
และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร

7. นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

8. ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์

9. เก็บบันทึกผล โดยวัดขนาดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารแต่ละสูตร และนำแคลลัสที่ได้ย้ายไปยังอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอด ราก หรือลำต้น

3.4.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

1. นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน มาทำการชักนำให้เป็นต้นใหม่ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับโพรลีนเข้มข้น 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์

2. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ วันละ 16 ชั่วโมง

3. สังเกตการเปลี่ยนแปลง โดยดูได้จากการเจริญของยอดและการเกิดราก เก็บบันทึกผล และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารแต่ละสูตร

3.4.3 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากสบู่ดำโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็เอสำเร็จรูป (DNA E-Z KIT)

1. นำใบของสบู่ดำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยใช้ตัวอย่างประมาณ 10-30 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็นจากนั้นบดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วตักตัวอย่างพืชใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด

2. เติมบัฟเฟอร์ DA และ DB ที่อุ่น 65 องศาเซลเซียส จำนวน 500 และ 40 ไมโครลิตรตามลำดับ แล้วผสมให้เข้ากันโดย vortex นาน 10 วินาที

3. ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายหลอดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เติมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดย vortex นาน 10 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

5. ดูดส่วนใส่ 500 ไมโครลิตรมาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอล (แช่เย็น) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมานาน 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

6. ดูดสารละลายทิ้ง นำตะกอนมาล้างด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ (แช่เย็น) 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเซนตริฟิวส์ที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7. ดูดสารละลายทิ้ง นำตะกอนของดีเอ็นเอไปทำให้แห้ง แล้วทำการละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร

8. นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) (ภาคผนวก ข)

ขั้นตอนการทำอาร์เอพีดี

(ปริมาตรสารรวมทั้งหมด 15-25 ไมโครลิตร)

1. คำนวณปริมาณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยใช้ประมาณ 100 นาโนกรัม

2. ใส่น้ำปราศจากไอออนลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรตามที่คำนวณได้ให้ครบ 15-25 ไมโครลิตร (หักลบออกจากดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม และ Master mix 7.6 ไมโครลิตร)

3. เตรียม Master mix (ตารางที่ 3.1) นำไป vortex และ spindown และแบ่ง Master mix ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำปราศจากไอออนเรียบร้อยแล้ว โดยปริมาตร Master mix 7.6 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของ Master mix ในการทำอาร์เอพีดี

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
10 เท่า PCR buffer	2.0	
Mix dNTPs (1.25 มิลลิโมลาร์)	3.2	(ภาคผนวก ข)
ไพรเมอร์ (20 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.0	(ภาคผนวก ข)
แมกนีเซียมคลอไรด์ (50 มิลลิโมลาร์)	1.2	
Tag DNA polymerase	0.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบตามปริมาตรที่คำนวณได้ลงในหลอดพีซีอาร์ทิวป์ แล้ว vortex และ spindown จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.3 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละขั้นตอน

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละขั้น	อุณหภูมิและเวลา	จำนวนซ้ำ
Initiation Denature Step	94 องศาเซลเซียส 1 นาที	1
Denaturing Step	94 องศาเซลเซียส 1 นาที	45
Annealing Step	35 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extension Step	72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Final Extension Step	72 องศาเซลเซียส 5 นาที	1
	Cool down 4 องศาเซลเซียส	

5. ตรวจสอบผลการทำอาร์เอพีดีโดยทำเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

ขั้นตอนการทำเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

1. เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1 เท่าบัฟเฟอร์ TBE โดยที่เตรียมเจลขนาดเล็ก 8 ช่อง จะใช้อะกาโรสเจล 0.2 กรัมและ 1 เท่าบัฟเฟอร์ TBE 20 มิลลิลิตร หากใช้เจลขนาดใหญ่ 15 ช่อง กาโรสเจล 0.4 กรัมและ 1 เท่าบัฟเฟอร์ TBE 40 มิลลิลิตร

2. ทำการละลายเจล และเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจลเสียบหวี ทิ้งให้เจลแข็งนำหวีออก นำไปใช้รันเจล

3. ทำ Master mix โดยปริมาตรรวมไม่เกิน 12 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของ Master mix ในการทำเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

สารเคมี	Marker	Master mix	หลังทำพีซีอาร์
	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
ดีเอ็นเอ	1.5	5	1-5
สีย้อม	1	1	1
น้ำ DI	5	5	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ทำการโหลดตัวอย่างที่ผสม Master mix แล้วลงในเจล จนครบทุกตัวอย่าง จากนั้นเปิดเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 30 นาที

5. นำเจลออกจากเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า และนำไปย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์นาน 3-5 นาที จากนั้นล้างเจลโดยแช่น้ำทิ้งไว้นาน 10-30 นาที

6. นำเจลที่ผ่านการล้างน้ำแล้วไปส่องกล้อง UV และบันทึกภาพเพื่อทำการวิเคราะห์ผลของเจลที่ได้

7. นำภาพที่ได้จากการส่องกล้องไปตรวจผลของการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาคผนวก ค)

8. ทำการวิเคราะห์ผลอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสด้วยโปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.0e และบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำให้เจริญเป็นแคลลัส

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ และก้านในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งระยะการวัดขนาดของแคลลัสเป็น 0, 10, 20, 30 และ 40 วัน ตามลำดับ โดยทำการวัดขนาดของแคลลัสจากความกว้างและความยาว เพื่อนำมาหาค่าพื้นที่เฉลี่ย ศึกษาจากสบู่ดำทั้งหมด 10 สายพันธุ์ พบว่าสบู่ดำทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ทั้งหมด ซึ่งสีของแคลลัสที่เกิดขึ้น มีตั้งแต่สีเหลืองอ่อน เขียวอ่อน เขียวแก่ จนกระทั่งสีน้ำตาลอ่อน และลักษณะของแคลลัสส่วนใหญ่จะเป็นแบบ friable หรือ มีลักษณะชุ่มน้ำ

สบู่ดำสายพันธุ์ยโสธร พบว่าในส่วนของใบ (ตารางที่ 4.1และ4.2) เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1) ส่วนก้านใบ (ตารางที่ 4.3และ4.4) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2) เช่นกัน สบู่ดำสายพันธุ์อินเดีย พบว่าในส่วนของใบ (ตารางที่ 4.5และ4.6) สามารถเจริญบนอาหารที่มี 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.3) ส่วนก้านใบ (ตารางที่ 4.7และ4.8) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4) ส่วนสบู่ดำสายพันธุ์โคราช (ตารางที่ 4.9 และ 4.10) พบว่าในอาหารที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.5) แต่ในส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.11และ4.12) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.6)

สบู่ดำสายพันธุ์ A5 (ตารางที่ 4.13 ถึง 4.16 , รูปที่ 4.7 และ 4.8) และ A28 (ตารางที่ 4.17 ถึง 4.20, รูปที่ 4.9 และ 4.10) พบว่ามีการเจริญของชิ้นส่วนของใบและก้านใบไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสายพันธุ์ A34 ส่วนของใบ (ตารางที่ 4.21 และ 4.22) พบว่าสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการเจริญไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11) ส่วนของก้านใบ (ตารางที่ 4.23และ4.24) เจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้น 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12) สายพันธุ์ A72 พบว่าในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนของใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.25 และ4.26, รูปที่ 4.13) และเจริญได้ไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนของก้านใบ (ตารางที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.27 และ 4.28) เจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.14)

สบู่ดำสวยพันธุ์ B14 ทั้งส่วนของใบและก้านใบ (ตารางที่ 4.29 ถึง4.32) มีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่ มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.15 และ 4.16) ส่วนในสายพันธุ์ B15 และ B19 ทั้งส่วนของใบและก้านใบ (ตารางที่ 4.29 ถึง4.40) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.17 ถึง 4.20)

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส(ตารางมิลลิเมตร)ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำยโสธรบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	947.24	315.75	334.73	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	6054.84	1513.71	1604.74	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	485.51	40.46	42.89	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	264.12	0.94		
รวม	299	7751.71			

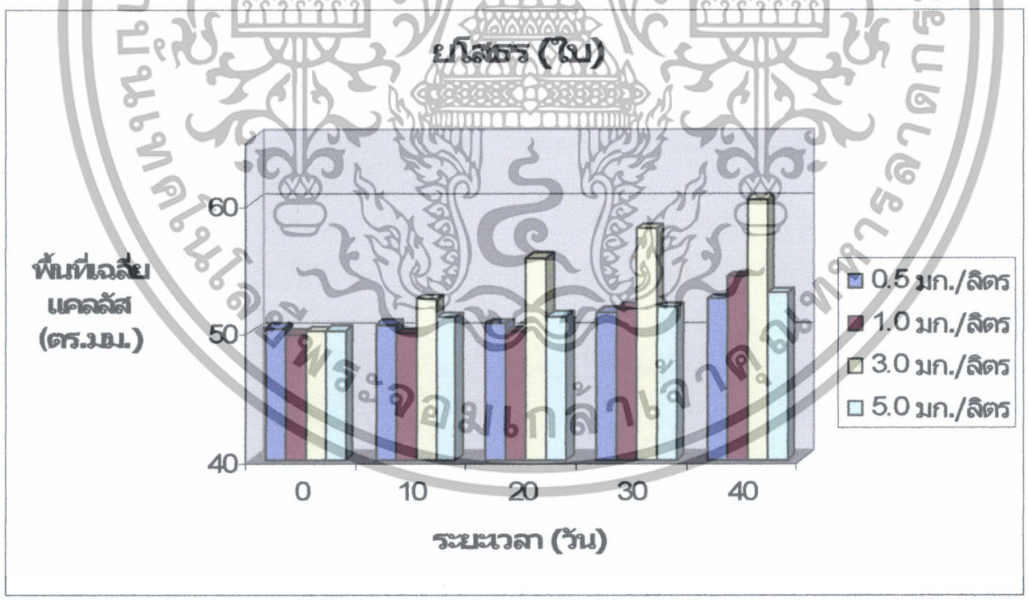
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำยโสธรบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1691.78	563.93	228.35	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	1762.05	440.51	178.37	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	618.77	51.56	20.88	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	691.49	2.47		
รวม	299	4764.10			

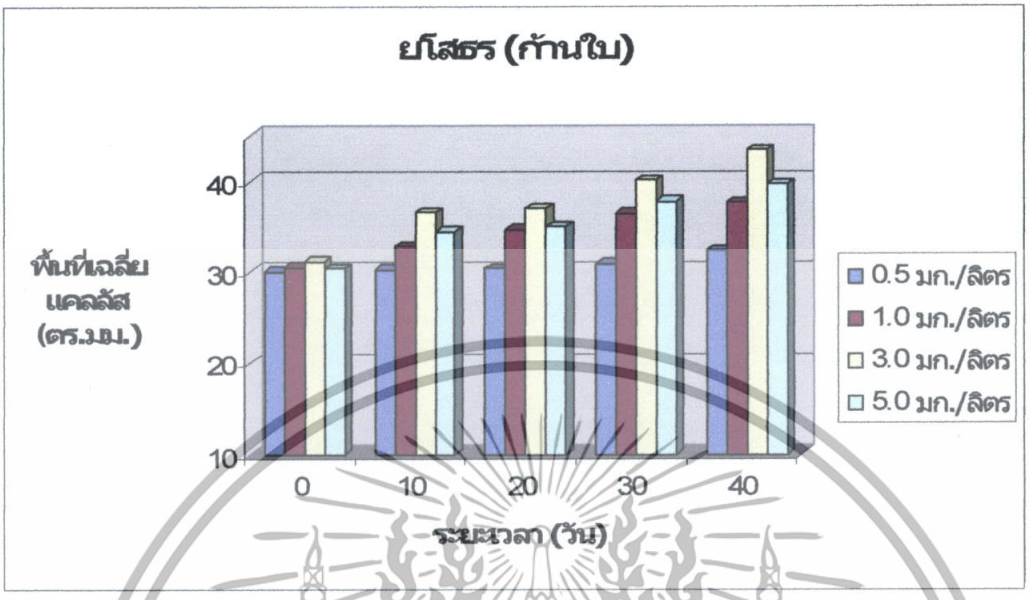
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่4.4)

ตารางที่ 4.4 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	30.100^{e}	30.310^{f}	30.370^{f}	30.970^{f}	32.400^{e}
1	30.451^{f}	32.780^{e}	34.630^{d}	36.400^{c}	37.640^{c}
3	31.094^{ef}	36.590^{cd}	37.030^{c}	40.110^{b}	43.360^{a}
5	30.340^{c}	34.500^{de}	34.970^{d}	37.720^{c}	39.630^{b}

<u>หมายเหตุ</u> ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำยโสธร บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	938.74	312.91	424.25	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	933.50	233.38	316.41	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	448.83	37.40	50.71	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	206.52	0.74		
รวม	299	2527.60			

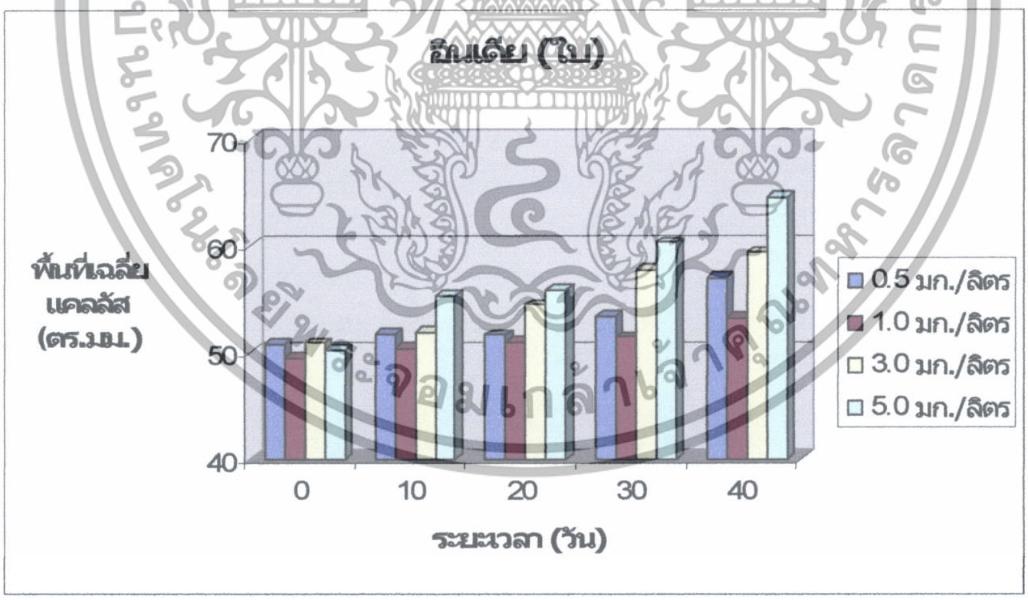
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่(Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส(ตารางมิลลิเมตร)ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1814.21	604.74	1371.61	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	4434.18	1108.55	2514.31	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	695.06	57.92	131.37	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	123.45	0.44		
รวม	299	7066.90			

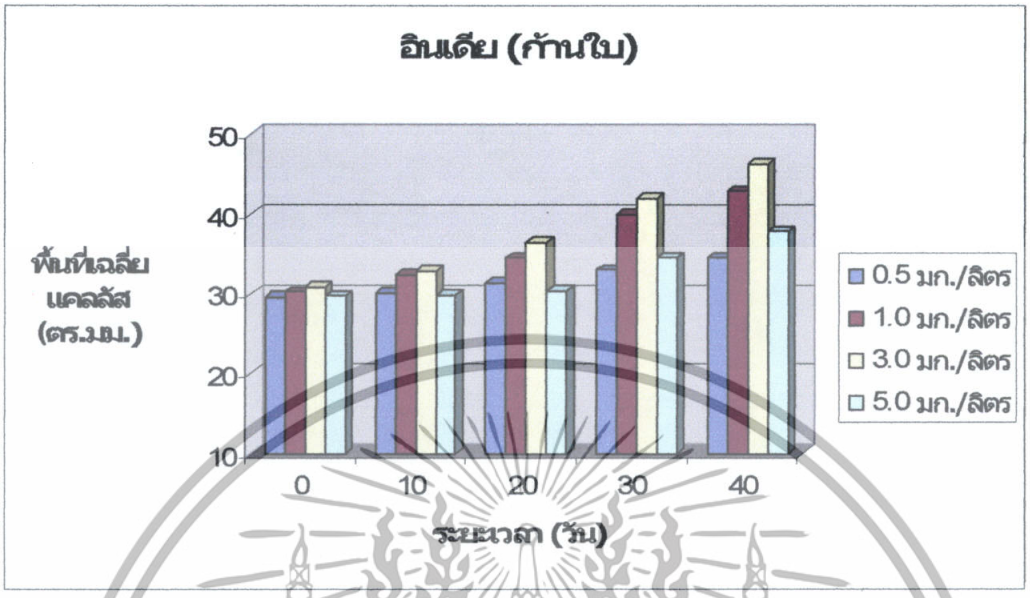
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 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	29.670^{i}	30.170^{i}	31.440^{h}	33.060^{g}	34.490^{f}
1	30.200^{i}	32.400^{g}	34.530^{f}	39.980^{c}	42.820^{b}
3	30.900^{hi}	32.970^{g}	36.408^{e}	42.040^{b}	46.210^{a}
5	29.700^{i}	29.910^{i}	30.440^{i}	34.570^{f}	37.790^{d}

<u>หมายเหตุ</u> ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำอินเดีย บนอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำโคราช บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	947.24	315.75	334.73	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	6054.84	1513.71	1604.74	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	485.51	40.46	42.89	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	264.12	0.94		
รวม	299	7751.71			

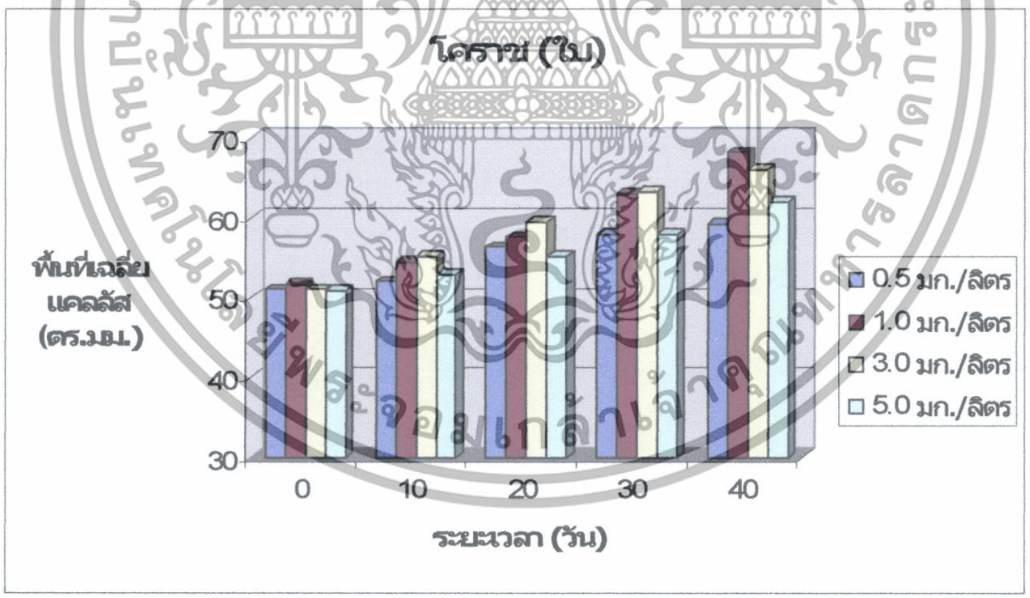
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1429.95	476.65	445.90	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	14748.89	3687.22	3449.37	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	822.96	68.58	64.16	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	299.31	1.07		
รวม	299	17301.10			

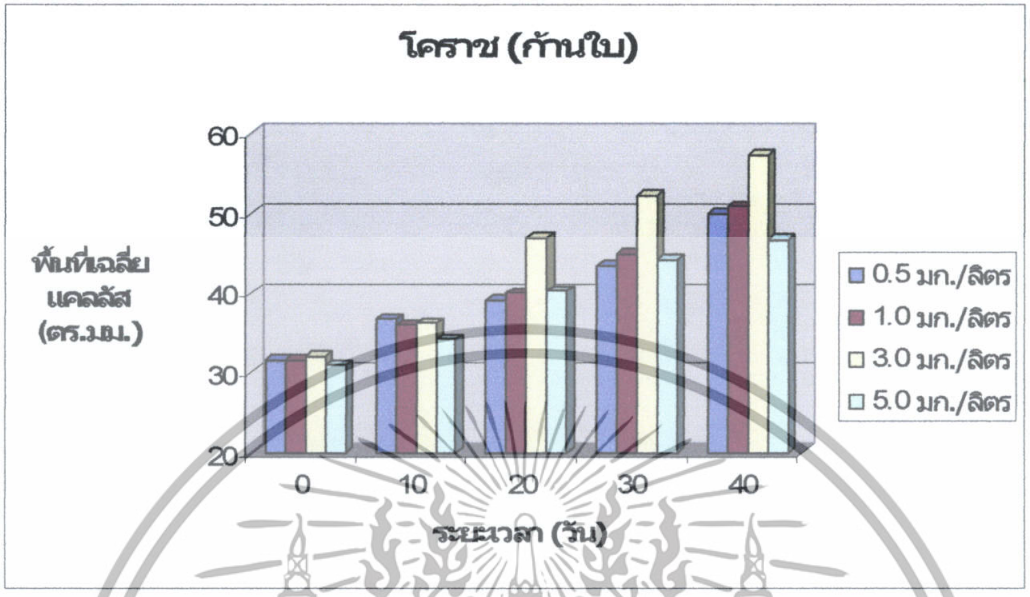
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัส โดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 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	31.600^{l}	36.767^{h}	39.050^{g}	43.370^{f}	49.928^{c}
1	31.562^{k}	35.947^{h}	40.022^{g}	44.932^{e}	50.796^{c}
3	32.061^{j}	36.196^{h}	46.895^{d}	52.159^{b}	57.252^{a}
5	30.947^{l}	34.203^{i}	40.301^{g}	44.166^{ef}	46.696^{d}

<u>หมายเหตุ</u> ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำA5 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1078.13	359.38	416.71	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	2115.53	528.88	613.26	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	299.38	24.95	28.93	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	241.47	0.86		
รวม	299	3734.51			

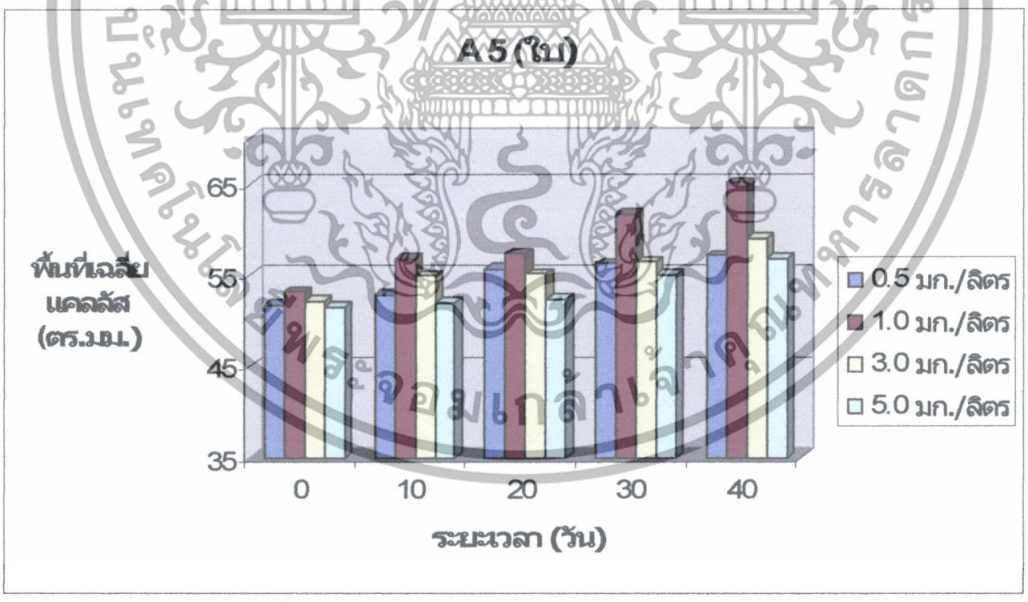
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 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) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ A5 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	2599.02	866.34	841.67	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	4156.13	1039.03	1009.45	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	621.62	51.80	50.33	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	288.21	1.03		
รวม	299	7664.98			

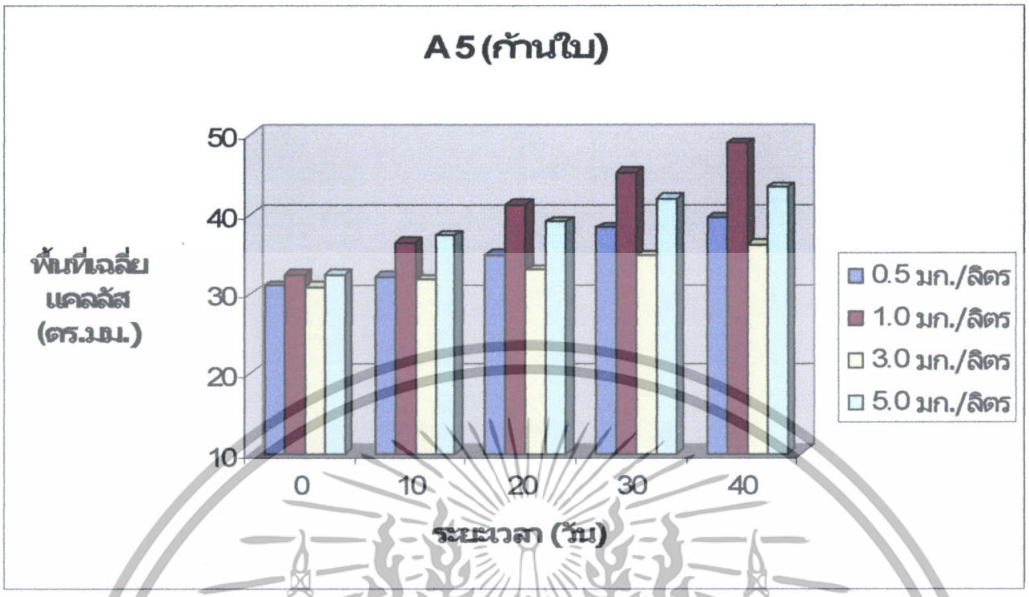
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.16)

ตารางที่ 4.16 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ A28 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	172.05	57.35	47.31	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	2276.92	569.23	469.57	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	136.86	11.41	9.41	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	339.43	1.21		
รวม	299	2925.26			

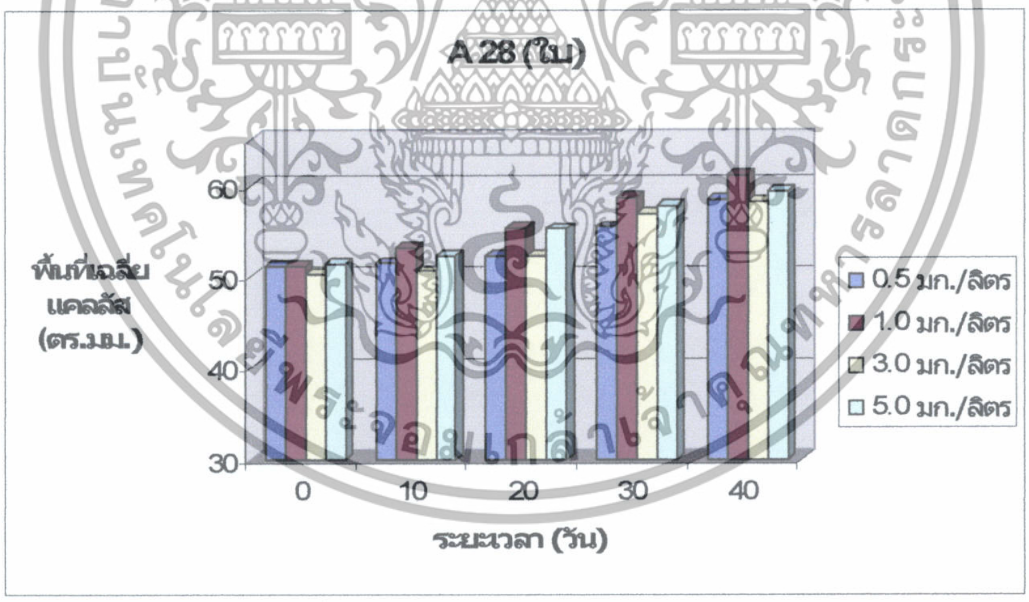
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ A28 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	308.41	102.80	128.75	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	4701.22	1175.30	1471.90	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	336.85	28.07	35.15	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	223.58	0.80		
รวม	299	5570.05			

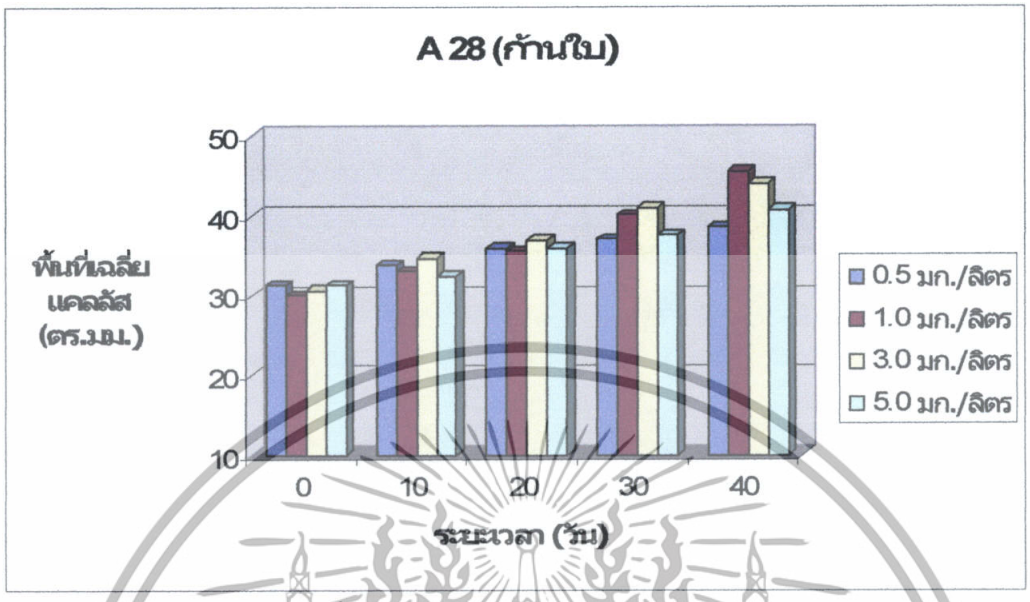
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.20)

ตารางที่ 4.20 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 บนอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ A34 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	943.83	314.61	412.63	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	2283.37	570.84	748.69	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	306.56	25.55	33.51	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	213.49	0.76		
รวม	299	3747.25			

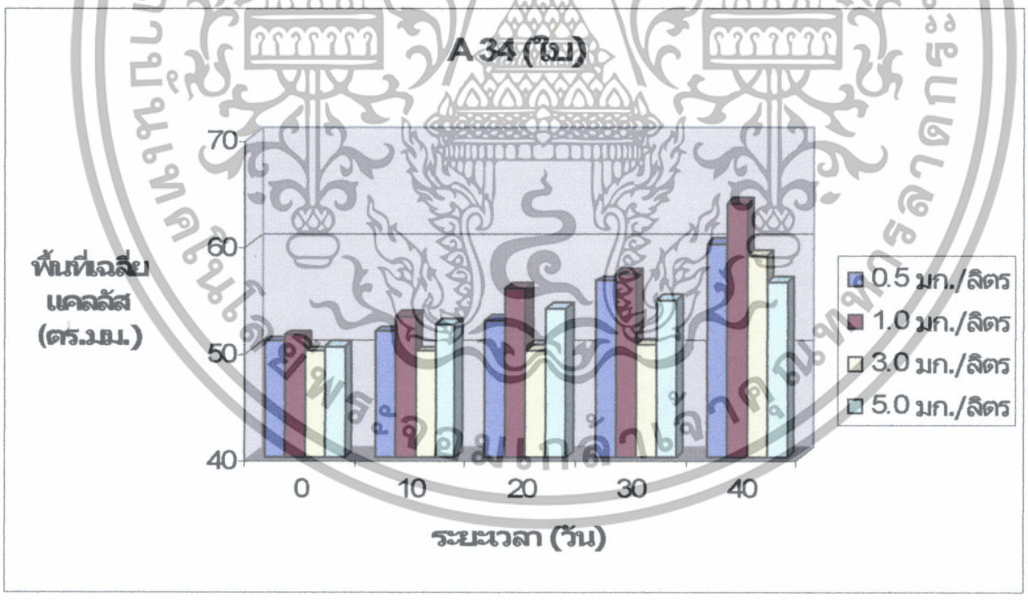
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำA34 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	329.539	109.846	186.59	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	752.773	188.193	319.67	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	65.829	5.486	9.32	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	164.841	0.589		
รวม	299	1312.982			

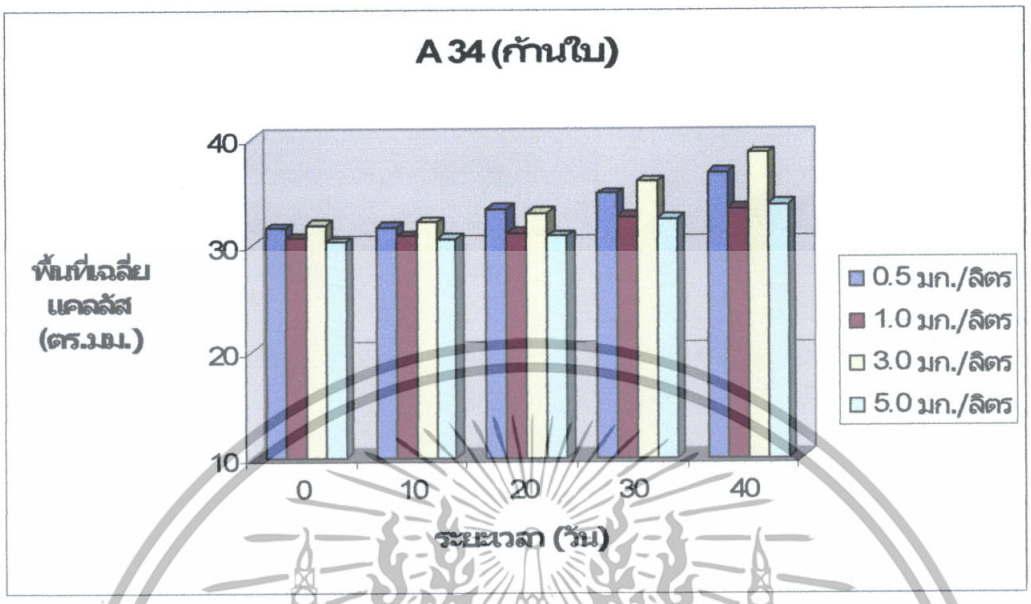
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.24)

ตารางที่ 4.24 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^{e}	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}

<u>หมายเหตุ</u> ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำA72 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1199.90	399.97	93.32	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	1939.05	484.76	113.11	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	454.61	37.88	8.84	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	1200.05	4.29		
รวม	299	4793.60			

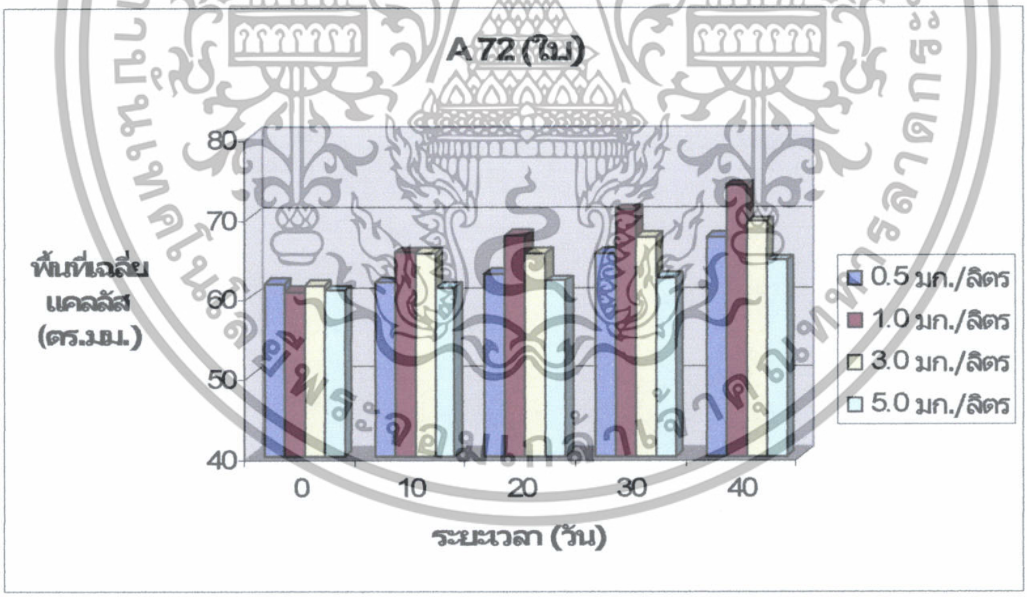
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.26)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.26 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำA72 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

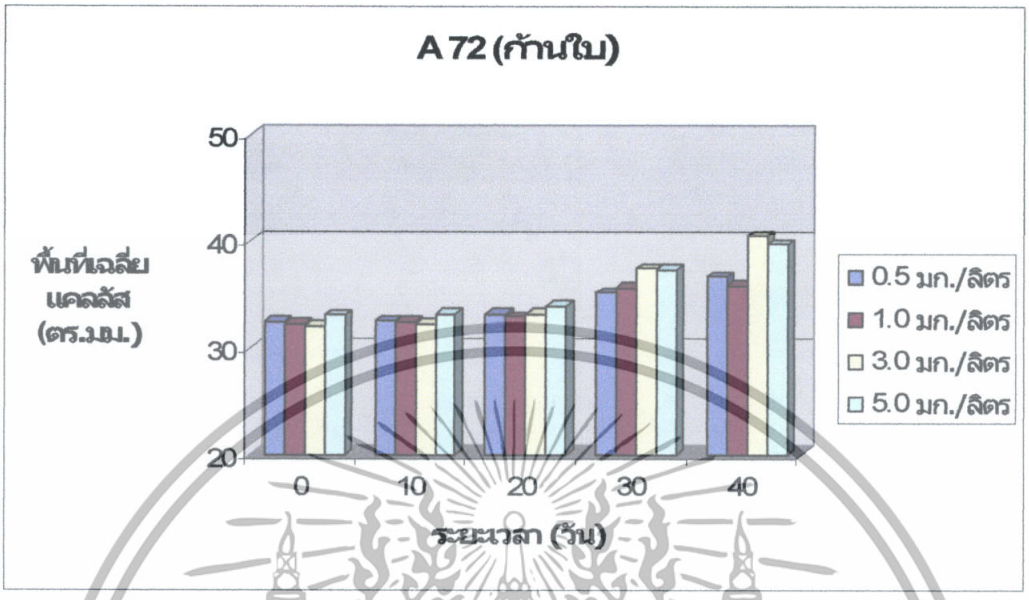
แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	146.182	48.727	16.48	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	1559.235	389.809	131.80	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	173.370	14.448	4.88	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	828.125	2.958		
รวม	299	2706.912			

จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.28)

ตารางที่ 4.28 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}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำB14 บนอาหาร MS ที่เติม BA 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1510.9	503.60	41.10	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	21769.2	5442.3	444.08	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	1273.5	106.1	8.66	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	3431.4	12.3		
รวม	299				

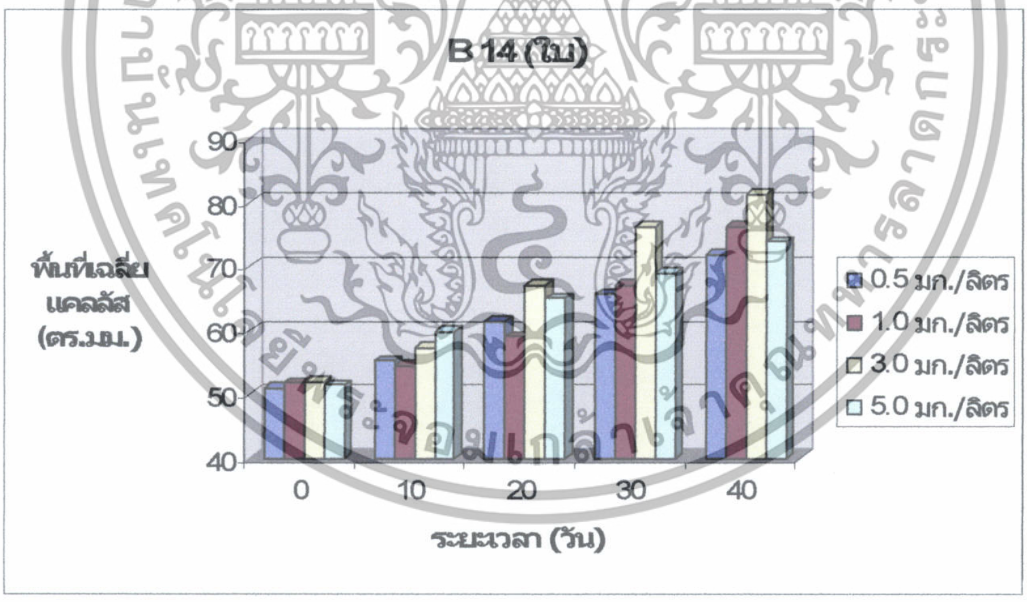
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.30)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.30 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^{de}	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ B14 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	313.854	104.618	25.77	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	1342.173	335.543	82.64	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	130.412	10.868	2.68	0.002
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	1136.883	4.060		
รวม	299	2923.322			

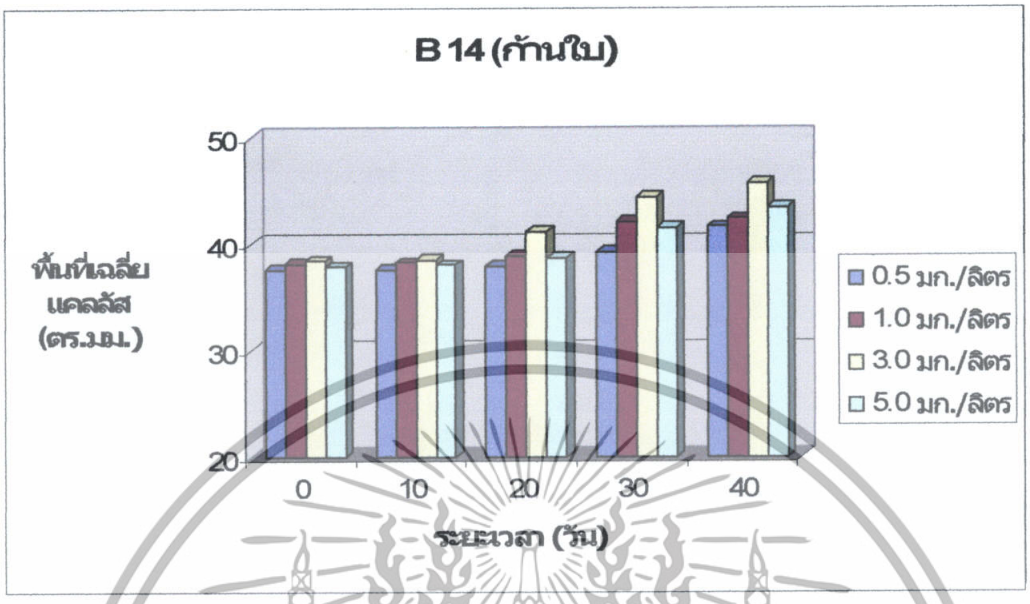
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่)

ตารางที่ 4.32 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ B15 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	183.12	61.04	110.43	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	16744.57	4186.14	7573.56	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	667.93	55.66	100.70	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	154.76	0.55		
รวม	299	17750.38			

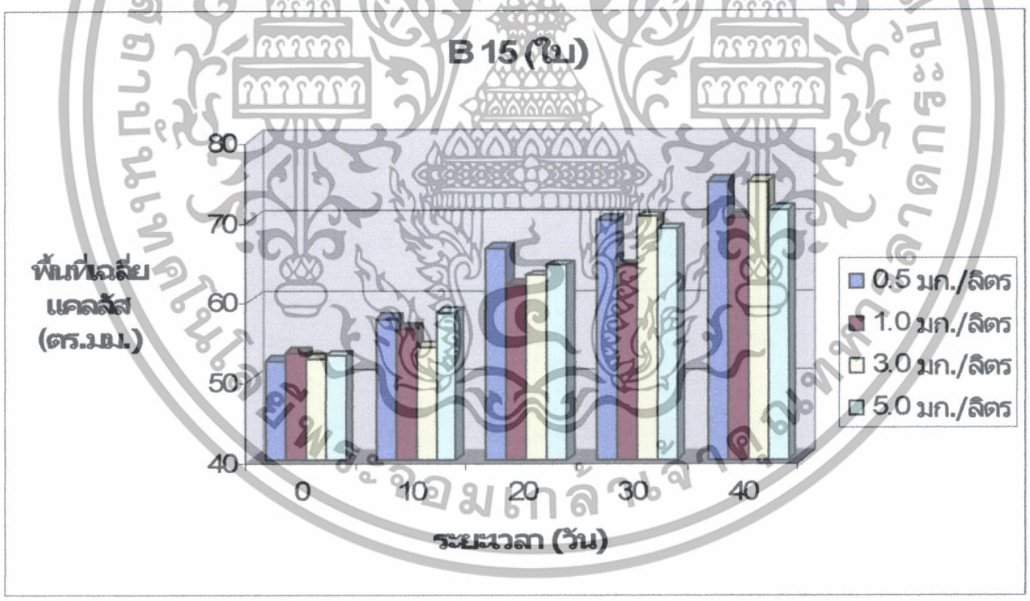
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.34)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.34 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำ B15 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	3026.39	1008.80	2725.96	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	13012.00	3253.00	8790.23	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	1639.68	136.64	369.23	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	103.62	0.37		
รวม	299	17781.68			

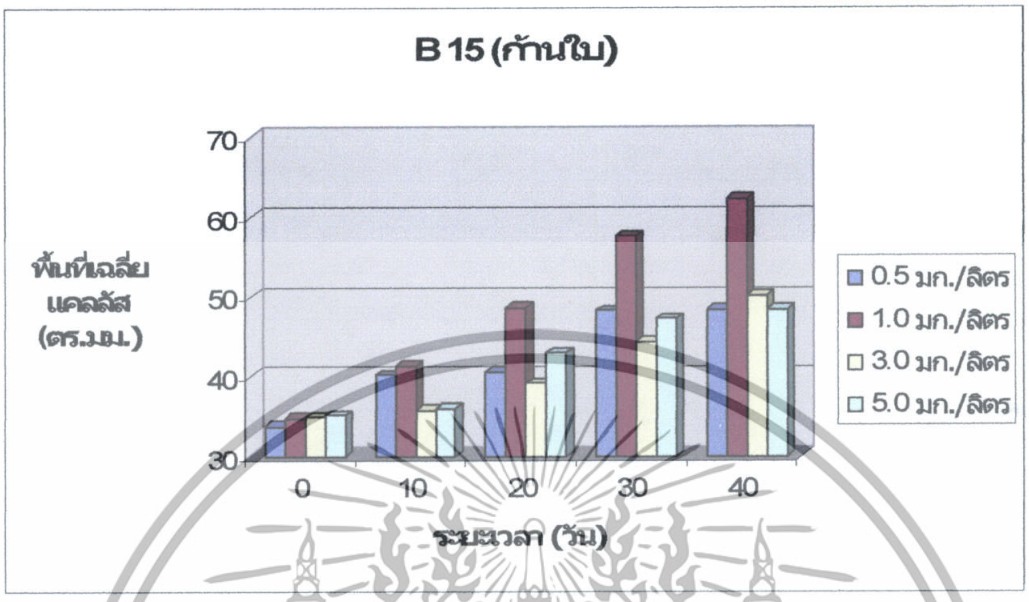
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัส โดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.36)

ตารางที่ 4.36 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}

<u>หมายเหตุ</u> ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนใบของสบู่ดำ B19 บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1158.89	386.30	747.65	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	14878.13	3719.53	7198.82	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	606.04	50.50	97.74	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	144.67	0.52		
รวม	299	16787.73			

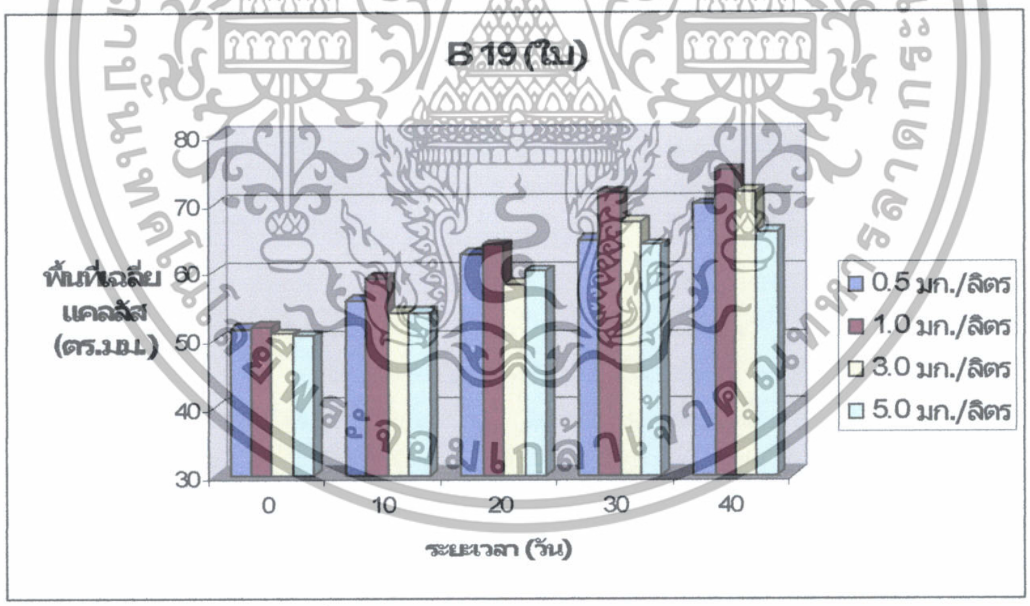
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัสโดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.36)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.38 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นที่เฉลี่ยแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบของสบู่ดำโคราช บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (A)	3	1108.91	369.64	1055.99	0.000
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (B)	4	9820.99	2455.25	7014.19	0.000
อิทธิพลร่วมระหว่าง A*B	12	931.22	77.60	221.69	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	280	98.01	0.35		
รวม	299	11959.14			

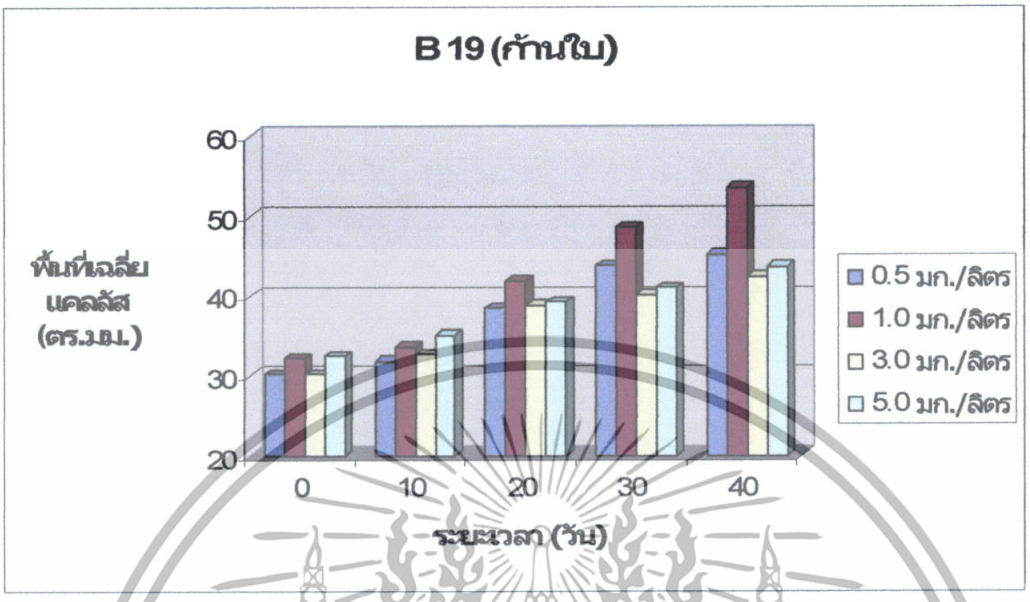
จากตารางที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของ2,4-D และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของแคลลัส โดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test (ดังตารางที่ 4.40)

ตารางที่ 4.40 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}

<u>หมายเหตุ</u> ขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส (เฉลี่ย) จากส่วนก้านใบของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

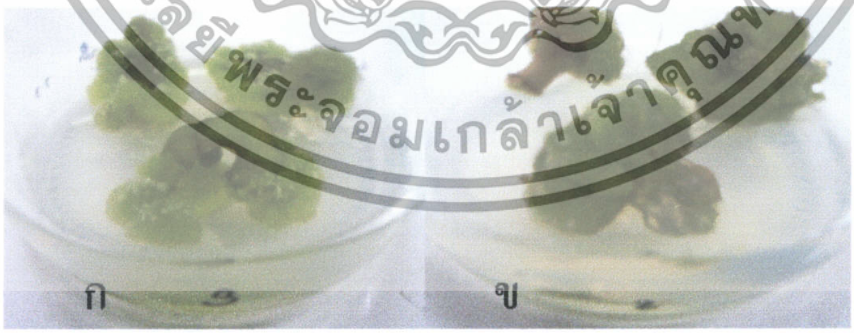
แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบและส่วนก้านใบ

แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ และก้านใบของสบู่ดำทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ ยโสธร (รูปที่ 4.21) อินเดีย (รูปที่ 4.22) โคราช (รูปที่ 4.23) A5 (รูปที่ 4.24) A28 (รูปที่ 4.25) A34 (รูปที่ 4.26) A72 (รูปที่ 4.27) B14 (รูปที่ 4.28) B15 (รูปที่ 4.29) และB19 (รูปที่ 4.30) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA และ 2,4-D พบว่ามีการพัฒนามีขนาดเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น

รูปที่ 4.21 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ยโสธร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรMSที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

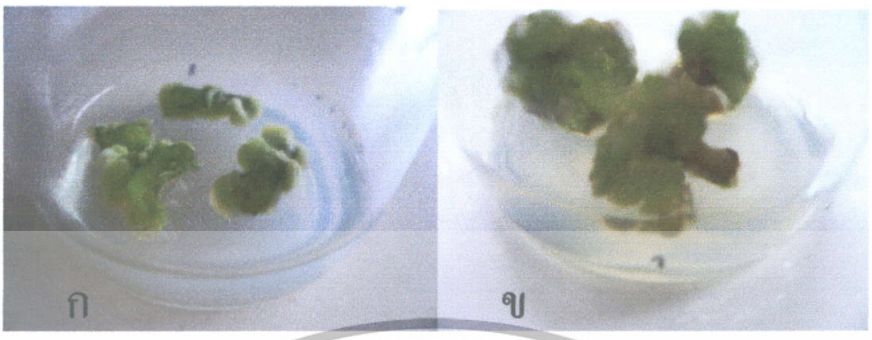


รูปที่ 4.22 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์อินเดีย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ โคราช ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

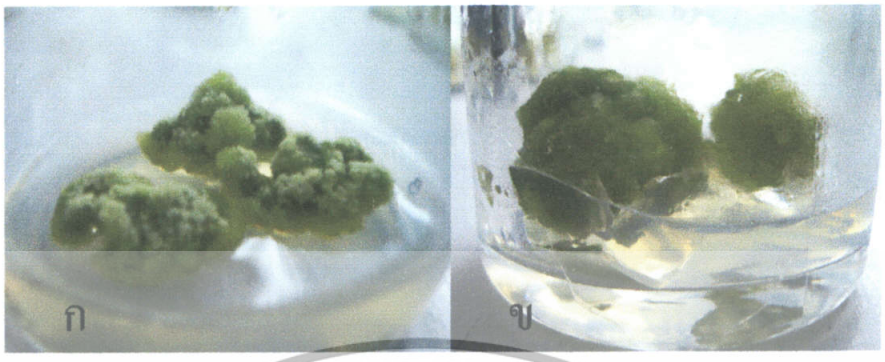
(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

รูปที่ 4.24 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

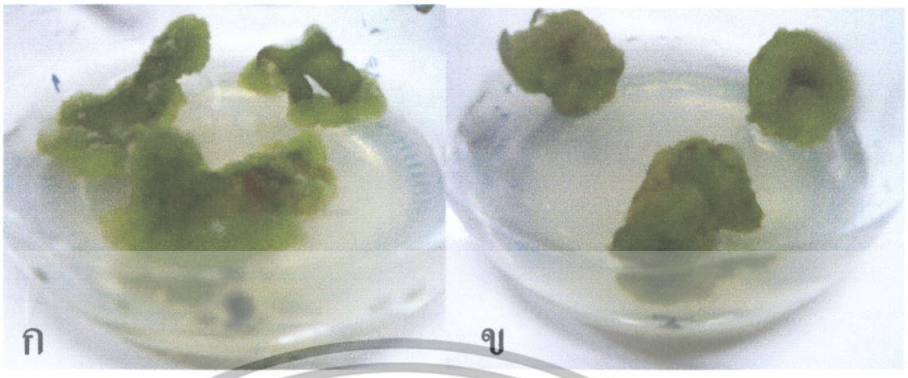
(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

รูปที่ 4.26 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A34 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

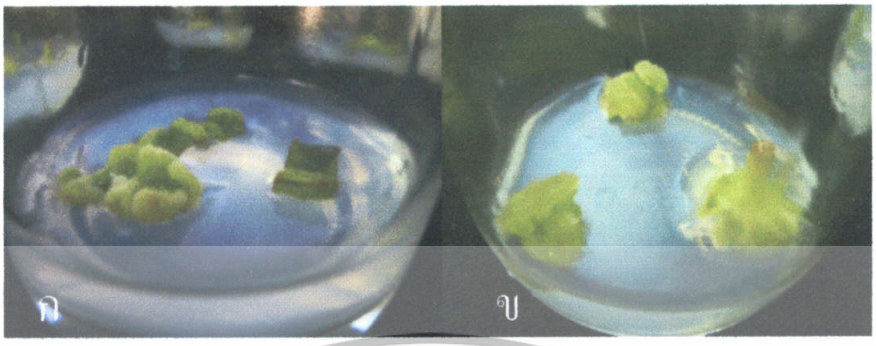
(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

รูปที่ 4.28 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

รูปที่ 4.30 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

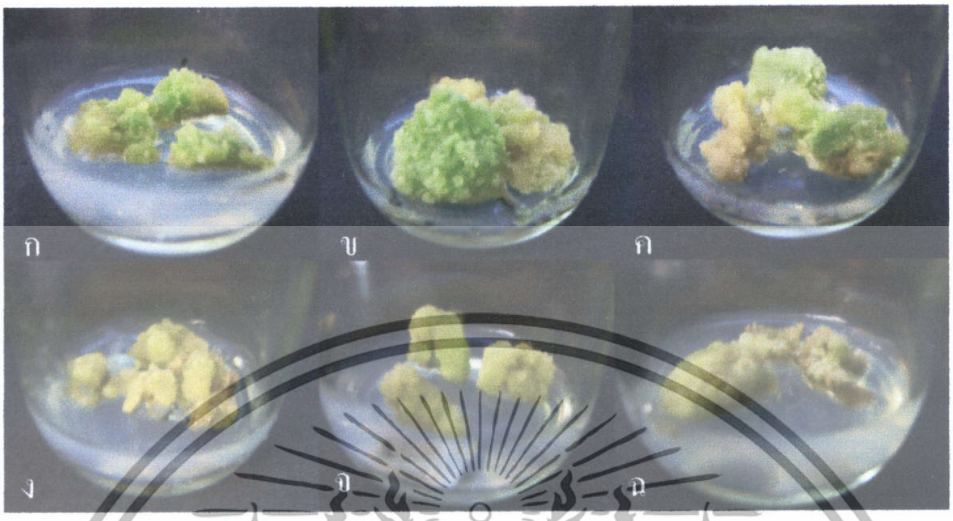
4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่พบว่า ทั้งสายพันธุ์โคราช, A28, A72, B15 และ B19 ที่นำชิ้นส่วนของแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรกับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 30 วัน พบว่าแคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ยังไม่พัฒนาเป็นยอดหรือราก

ตารางที่ 4.41 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำโคราชให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ TDZ/ โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 12 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)	
	0 วัน	30 วัน
0.1/ 0	106.28	250.63
0.1/ 300	122.12	308.63
0.1/ 500	125.57	298.21
0.5/ 0	138.95	295.62
0.5/ 300	124.42	315.46
0.5/ 500	136.67	326.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.31 การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำโคราช ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

(ก) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ข) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ค) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ง) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

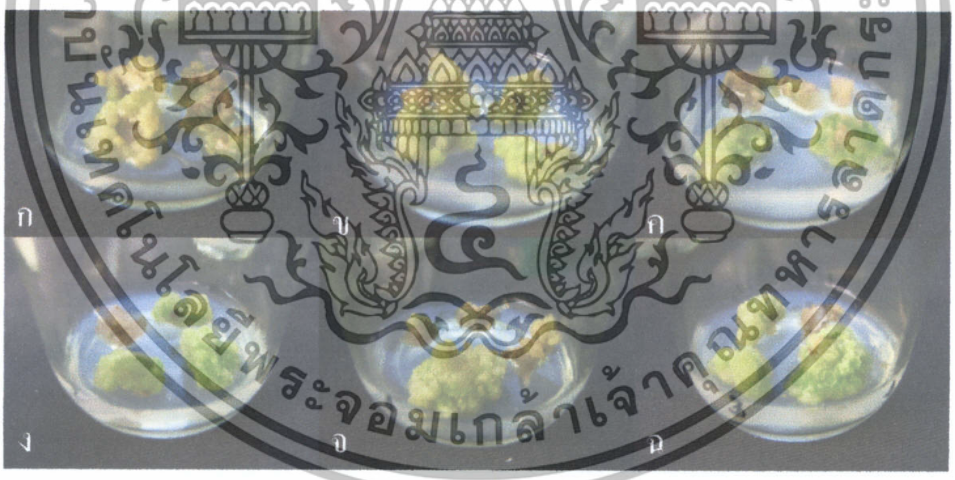
(จ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ฉ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.42 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำสายพันธุ์ A28 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ TDZ/โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 12 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)	
	0 วัน	30 วัน
0.1/ 0	123.48	258.62
0.1/ 300	112.98	303.60
0.1/ 500	106.63	278.57
0.5/ 0	141.32	261.74
0.5/ 300	124.94	318.99
0.5/ 500	127.23	329.34



รูปที่ 4.32 การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ A28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

(ก) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ข) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ค) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ง) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(จ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ฉ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.43 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำสายพันธุ์ A72 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ TDZ/โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 12 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)	
	0 วัน	30 วัน
0.1/ 0	138.46	237.86
0.1/ 300	104.52	241.29
0.1/ 500	110.45	228.84
0.5/ 0	103.33	222.87
0.5/ 300	115.94	217.07
0.5/ 500	109.48	221.74

รูปที่ 4.33 การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ A72 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

(ก) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ข) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ค) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ง) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

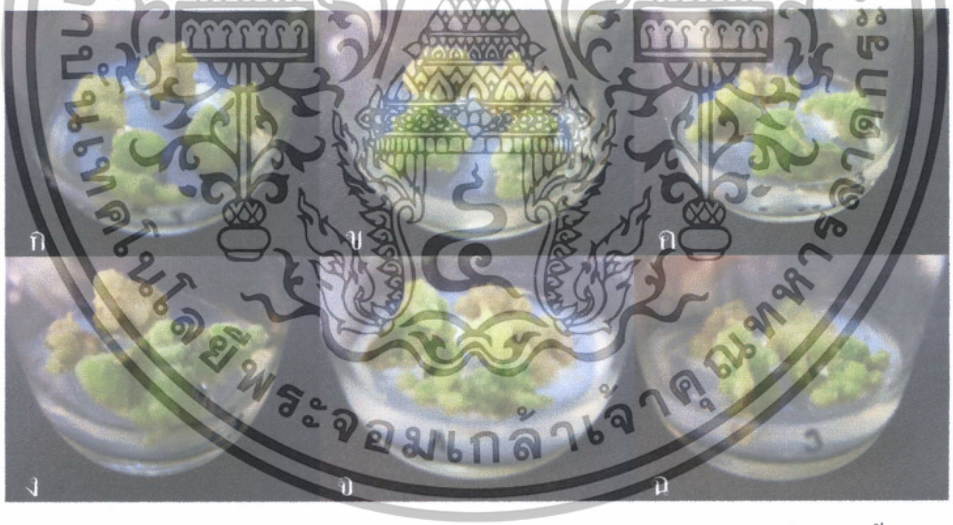
(จ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ฉ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.44 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำสายพันธุ์ B15 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ โพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ TDZ/โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 12 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)	
	0 วัน	30 วัน
0.1/ 0	99.81	194.58
0.1/ 300	106.15	218.73
0.1/ 500	110.06	235.49
0.5/ 0	119.93	228.36
0.5/ 300	122.06	247.19
0.5/ 500	103.38	220.12



รูปที่ 4.34 การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ B15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

(ก) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ข) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ค) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ง) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(จ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ฉ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.45 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จากการชักนำแคลลัสสบู่ดำสายพันธุ์ B19 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับโพรลีน 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ TDZ/โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 12 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)	
	0 วัน	30 วัน
0.1/ 0	114.16	221.49
0.1/ 300	101.75	248.78
0.1/ 500	103.97	236.22
0.5/ 0	129.58	225.76
0.5/ 300	133.47	303.17
0.5/ 500	130.07	285.76

รูปที่ 4.35 การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ของสบู่ดำสายพันธุ์ B19 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

(ก) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ข) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ค) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ง) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 0 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(จ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 300 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ฉ) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ โพรลีน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

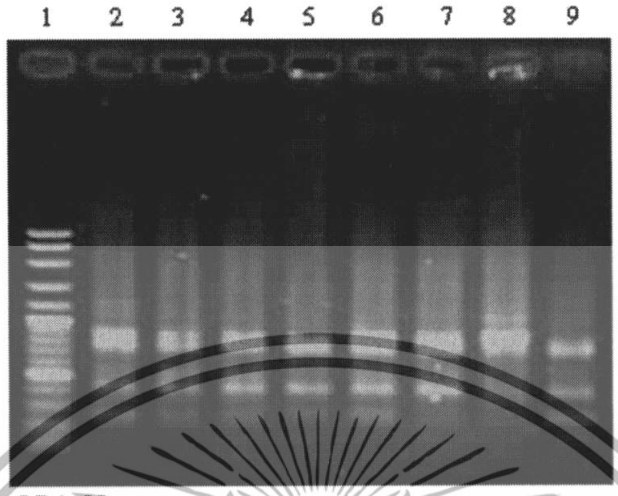
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

ทำการจำแนกสบู่ดำทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ เขมร น่าน ยโสธร โคราช อินเดีย ห้วยห้องไคร้ ลำปาง และสมก โดยเทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ ดังนี้ OPA-07 (รูปที่ 4.36) OPA-20 (รูปที่ 4.37) OPAM-01 (รูปที่ 4.38) OPAM-03 OPAX-17 (รูปที่ 4.39) OPB-14 (รูปที่ 4.40) OPD-02 (รูปที่ 4.41) OPE-17 OPG-13 (รูปที่ 4.42) และ OPK-12 (รูปที่ 4.43) ได้ผลดังนี้

รูปที่ 4.36 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

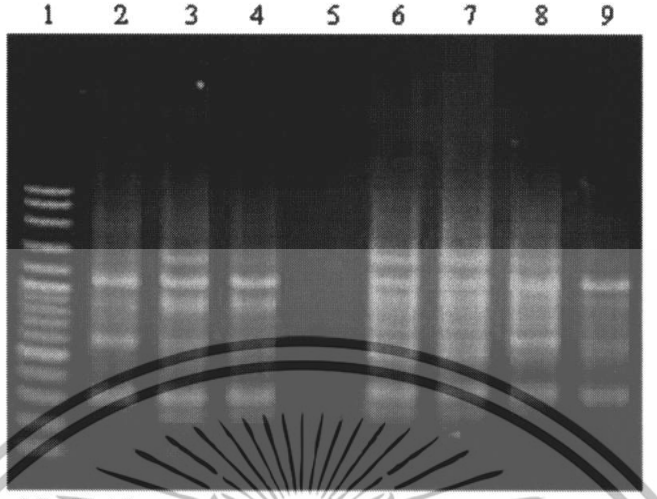
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.37 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

รูปที่ 4.38 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-01 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

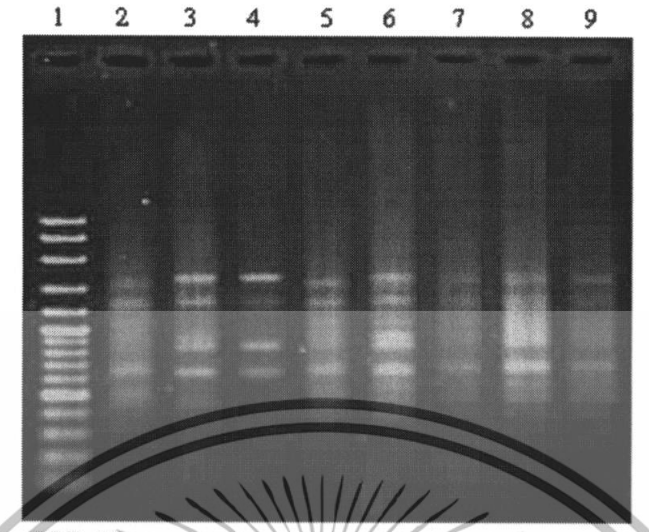
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.39 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAX-17 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

รูปที่ 4.40 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

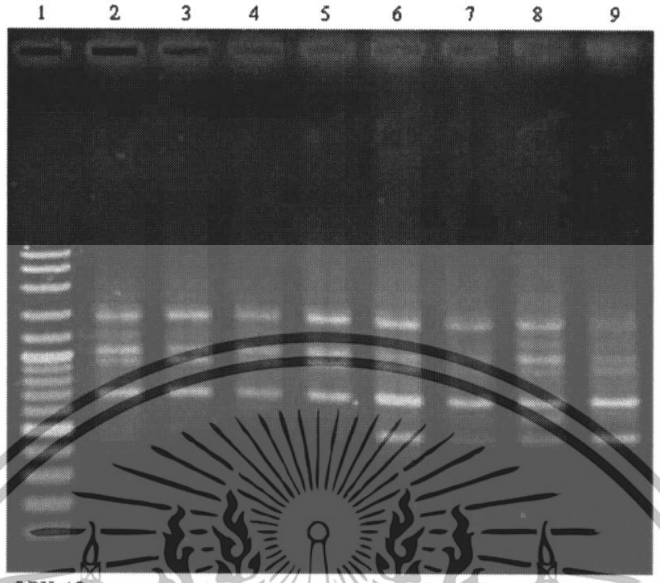
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.41 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPD-02 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

รูปที่ 4.42 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-13 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



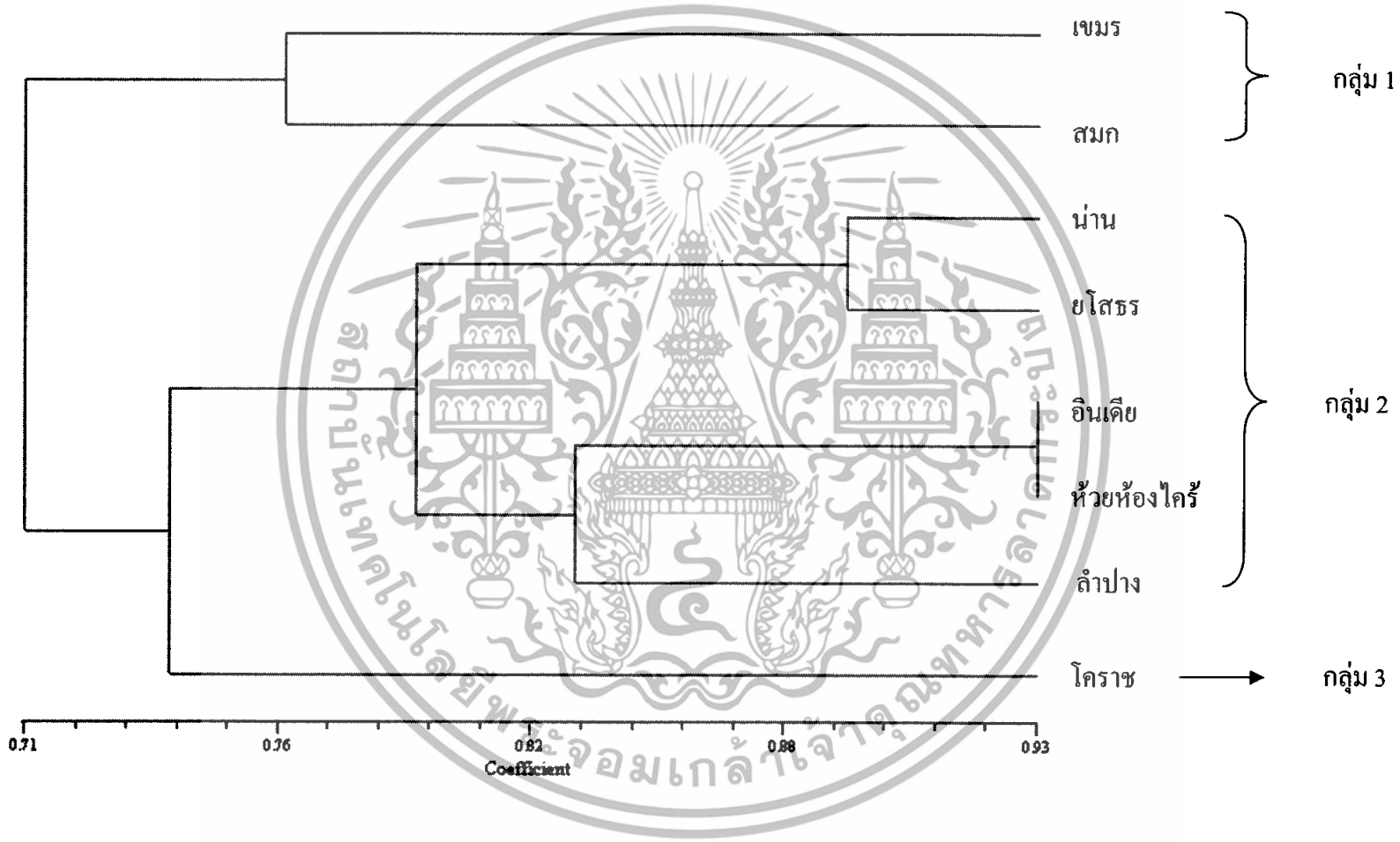
รูปที่ 4.43 ผลการวิเคราะห์อาร์เอพีดี เพื่อจำแนกสายพันธุ์สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ OPK-12 ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง (9) สมก

จากนั้นวิเคราะห์ผล โดยนำดีเอ็นเอมาหาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.0e (ตารางที่) และสร้าง Phylogenetic tree (รูปที่ 4.44) พบว่าสบู่ดำทั้ง 8 ตัวอย่างสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ สบู่ดำสำโรง (เขมร) กับสบู่ดำสมก. กลุ่ม 2 ได้แก่ สบู่ดำน่าน สบู่ดำยโสธร สบู่ดำอินเดีย สบู่ดำห้วยห้องไคร้ และสบู่ดำลำปาง กลุ่ม 3 คือ สบู่ดำโคราช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.41 การวิเคราะห์ผลอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.0e

	เขมร	น่าน	ยโสธร	โคราช	อินเดีย	ห้วยห้องไคร้	ลำปาง	สมก
เขมร	1.0000000							
น่าน	0.6987952	1.0000000						
ยโสธร	0.7727273	0.8888889	1.0000000					
โคราช	0.6835443	0.8055556	0.7532468	1.0000000				
อินเดีย	0.7551020	0.8351648	0.7916667	0.7816092	1.0000000			
ห้วยห้องไคร้	0.7311828	0.8139535	0.8131868	0.7317073	0.9306931	1.0000000		
ลำปาง	0.7835052	0.7111111	0.8000000	0.6279070	0.8380952	0.8200000	1.0000000	
สมก	0.7654321	0.6756757	0.7341772	0.5714286	0.6966292	0.7142857	0.6818182	1.0000000



รูปที่ 4.44 Phylogenetic tree ของสบู่ดำ จำนวน 8 ตัวอย่าง

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ ให้เจริญเป็นแคลลัส

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบและก้านใบ พบว่า สายพันธุ์ยโสธร และ B14 ทั้งส่วนของใบ และก้านใบเจริญไปเป็นแคลลัสดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์อินเดียส่วนของใบ และก้านใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ โคราช, A34 และ A72 ในส่วนของใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่เติม 2,4 -D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในส่วนของก้านใบจะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสายพันธุ์ A5, A28 และ B19 จะเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งส่วนของใบและก้าน และในสายพันธุ์ B15 พบว่าส่วนของใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และส่วนของก้านใบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

จากการชักนำแคลลัสของสบู่ดำ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ สายพันธุ์โคราช, A28, A72, B15 และ B19 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ บนอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรกับโพรลีนเข้มข้น 0, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 30 วัน พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ โพรลีนทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เป็นยอดหรือต้นใหม่ได้

5.3 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสบู่ดำทั้ง 8 ตัวอย่าง ได้แก่ สำโรง (เขมร), น่าน, ยโสธร, โคราช, อินเดีย, ห้วยห้องไคร้, ลำปาง และสมก โดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ชนิด คือ OPA-07, OPA-20, OPAM-01, OPAM-03, OPAX-17, OPB-14, OPD-02, OPE-07, OPG-13 และ OPK-12 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.0e พบว่าตัวอย่างสบู่ดำสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ สำโรง (เขมร) และสมก กลุ่ม 2 ได้แก่ น่าน, ยโสธร, อินเดีย, ห้วยห้องไคร้และลำปาง กลุ่ม 3 คือ โคราช และพบว่าตัวอย่างสบู่ดำที่นำมาศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งจากในและต่างประเทศ มีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงมาก อย่างไรก็ตาม การจำแนกพันธุกรรมของสบู่ดำยังต้องใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นๆ มาวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อให้สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

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)

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Sujatha, M. and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue culture of Jatropha curcas. Plant cell. Tiss. Org. Cult. 44(2): 135-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร MS

ตารางภาคผนวก ก องค์ประกอบในสูตรอาหาร MS (Murashige และ Skoog, 1962)

สูตรอาหาร MS	ชื่อสารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	จำนวนที่ใช้ (กรัม)	ปริมาณที่เตรียม (มิลลิลิตร)
Stock 1	NH_4NO_3	100 X	165	1,000
	KNO_3		190	
	$MgSO_4.7H_2O$		37	
	KH_2PO_4		17	
Stock 2	$CaCl_2.2H_2O$	100 X	44	1,000
Stock 3	H_3BO_3	1,000 X	3.1	500
	KI		0.415	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$		0.125	
	$CoCl_2.6H_2O$		0.0125	
Stock 4	$MnSO_4.4H_2O$	100 X	2.23	1,000
	$ZnSO_4.7H_2O$		0.86	
	$CuSO_4.5H_2O$		0.0025	
Stock 5	Na_2 EDTA.$2H_2O$	100 X	3.73	1,000
	$FeSO_4.7H_2O$		2.78	
Stock 6	Inositol	100 X	5	500
	Nicotinic acid		0.025	
	Pyridoxine HCl		0.025	
	Thiamine HCl		0.005	
	Glycine		0.1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวัดค่าการดูดกลืนแสงจากดีเอ็นเอที่สกัดได้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยการวัดที่ 260 นาโนเมตรจะเป็นการวัดเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอและที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณโปรตีน โดยที่โครงสร้างในส่วนของเบสพิวรีนและไพริมิดีนเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสง

การวัดค่าการดูดกลืนแสงจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและนำมาหาค่า Ratio O.D. 260/280 เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

O.D. 260/280 = 1.8-2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอบริสุทธิ์

O.D. 260/280 > 2.0 แสดงว่าโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อน

O.D. 260/280 < 1.8 แสดงว่าอาร์เอ็นเอปนเปื้อน

<u>ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสง</u>

1. ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 495 ไมโครลิตรและใส่ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร
2. นำไป vortex และ spindown
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน

<u>การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ</u>

1. หาปริมาณดีเอ็นเอจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากค่ามาตรฐานถ้าวัด O.D. ที่ 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1 แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวัดค่า O.D. ที่ 260 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.080

ดังนั้น มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 0.080×50/ 1 = 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำค่าไปคูณค่าการเจือจางจึงได้ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

<u>สูตร</u> ปริมาณดีเอ็นเอ = O.D. ที่ 260 นาโนเมตร × 50 × dilution factor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

ตัวอย่าง ต้องการใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม จากการสกัดที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) (คำนวณได้จากการวัด O.D.)

ปริมาณดีเอ็นเอ 150 µg/ml = 150×1,000 นาโนกรัม/ 1,000 ไมโครลิตร

= 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ดังนั้น 150 นาโนกรัม มีอยู่ในดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร

ต้องการ 200 นาโนกรัม ต้องปีเปตดีเอ็นเอ 200×1/ 150 เท่ากับ 1.33 ไมโครลิตร

การเตรียม Mix dNTP

ต้องการเตรียม Mix dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จาก stock ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

$(1.25\ mM)(100\ \mu l) = (100\ mM)\ V_2$

$V_2 = 1.25\ \mu l$

ดังนั้น ต้องปีเปต stock dNTPs แต่ละเบสมา 1.25 ไมโครลิตร

จะได้ Mix dNTPs จำนวน 5 ไมโครลิตร ซึ่งมาจาก dATP dCTP dGTP และ dTTP อย่างละ 1.25 ไมโครลิตร ดั้งนั้นต้องเติมน้ำ 95 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ Mix dNTPs เข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

<u>การคำนวณปริมาณ Mix dNTPs ในปฏิกิริยาพีซีอาร์</u>

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา ที่มีปริมาตรสารรวม 25 ไมโครลิตรและ Mix dNTP ต้องมีความเข้มข้นของ 200 ไมโครโมลาร์ จึงจะสามารถทำงานได้ (working reaction) โดยเตรียมจาก Mix dNTP เข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

$(200\ \mu M)(25\ \mu l) = (1.25\ mM)\ V_2$

$V_2 = 4\ \mu l$

ดังนั้นต้องปีเปต Mix dNTP เข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ มาจำนวน 4 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ working reaction เท่ากับ 200 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ต้องมีความเข้มข้น 20 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร เตรียม 50 ไมโครลิตรจาก Stock ที่มีความเข้มข้น 100 พิกโคโมล

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

$(100)\ V_1 = (20)(50)$

$V_1 = 10$ ไมโครลิตร

ดังนั้น ต้องปีเปต Stock ไพรเมอร์มา 10 ไมโครลิตร และเติมน้ำพีซีอาร์ 40 ไมโครลิตรจะทำให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 20 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE (Tris Boric EDTA)

สารเคมี 1. Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) น้ำหนักโมเลกุล 121.14 กรัมต่อโมล

2. Boric acid (H_3BO_3) น้ำหนักโมเลกุล 61.83 กรัมต่อโมล

3. 0.5 โมลาร์ EDTA พีเอช 8.0

4. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม 10 เท่าบัฟเฟอร์ TBE 1,000 มิลลิลิตร

1. ชั่งสาร Tris base และ Boric acid อย่างละ 108 และ 55 กรัม

2. ตวง 0.5 โมลาร์ EDTA พีเอช 8.0 จำนวน 20 มิลลิลิตร

3. นำสารข้อ 1 และ 2 เทรวมกันคนให้ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ขั้นตอนการเตรียม 1 เท่าบัฟเฟอร์ TBE 500 มิลลิลิตรจาก 10 เท่าบัฟเฟอร์ TBE

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

$(1X)(500\ ml) = (10X)\ V_2$

$V_2 = 50$ ml

ดังนั้น ต้องตวง 10 เท่าบัฟเฟอร์ TBE มา 50 มิลลิลิตรและเติมน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียม EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1. ชั่ง EDTA 93.06 กรัม (1 โมลาร์ EDTA เท่ากับ 372.24 กรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)ใส่ลงบีกเกอร์ ละลาย EDTA ในน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic bar สารละลายสีขาวขุ่นจะใสขึ้น

2. ปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 8 จากนั้นนำไปปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร

3. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

การเตรียมเอทธิเดียมโบรไมด์ (EtBr, Ethidium bromide)

1. ดูดสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ จาก Stock 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในถาดย้อมเจล

2. ตวง 1 เท่าบัฟเฟอร์ TBE 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในถาดย้อมเจลและผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การตรวจผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันด้วยสนามไฟฟ้าแล้วย้อมด้วยเอทธิเดียมโบร์ไมด์ส่องกล้อง UV และบันทึกผลจะเห็นว่าดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจะมีลักษณะของแถบแตกต่างกัน (รูปภาคผนวก ค) จากนั้นทำการนับแถบของดีเอ็นเอทั้งหมดที่สนใจ โดยกำหนดให้นับค่าเท่ากับ 1 หากปรากฏว่าพบแถบของดีเอ็นเอและนับค่าเท่ากับ 0 หากไม่พบแถบดีเอ็นเอ

รูปภาคผนวก ค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากเทคนิคอาร์เอพีดี จากการใช้ไพรเมอร์ OPAM-01 ของสบู่ดำ 8 ตัวอย่าง ช่อง (1) DNA Ladder 100 คู่เบส (2) สำโรงหรือเขมร (3) น่าน (4) ยโสธร (5) โคราช (6) อินเดีย (7) ห้วยห้องไคร้ (8) ลำปาง และ (9) สมก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการตรวจผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากเทคนิคอาร์เอพีดีของไพรเมอร์ OPAM-01 จะได้ผลดังนี้

(1) Marker 100 bp	
(2) เขมร	0001111
(3) น่าน	1011011
(4) ยโสธร	1011011
(5) โคราช	1011011
(6) อินเดีย	1111011
(7) ห้วยห้องไคร้	1111011
(8) ลำปาง	1111111
(9) สมก.	0001011

จากนั้นทำการนับค่าเช่นเดียวกันนี้กับไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย โดยนำข้อมูลที่ได้มาเรียงต่อกันและนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.0e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้