การเกิดเป็นต้นใหม่ของชงโคโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

PLANT REGENERATION OF *Bauhinia purpurea* BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

วิภาดา ทรัพย์อร่าม

WIPHADA SAPARAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2567

KMITL-2024-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PLANT REGENERATION OF *Bauhinia purpurea* BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

WIPHADA SAPARAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT’S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2024
KMITL-2024-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2024

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT’S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเกิดเป็นต้นใหม่ของชงโคโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิภาดา ทรัพย์อร่าม
รหัสประจำตัว	63605049
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้าง ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ ศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อน และศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดชงโคบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Gibberellic Acid (GA_3) ความเข้มข้น 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการงอกของเมล็ดเท่ากับ ร้อยละ 100 และเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยของต้นอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 71.14±0.528 มิลลิเมตร จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างของต้นชงโค พบว่า การใช้สารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละการรอดชีวิตมากที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 92 และเมื่อนำชิ้นส่วนตาข้างมาศึกษาการชักนำให้เกิดยอดพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-Benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยที่สูงที่สุดเท่ากับ 24.27±0.984 มิลลิเมตร และมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.07±0.799 ยอดต่อตาข้าง

การศึกษาการชักนำยอดให้เกิดราก พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Indole-3- acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ ร้อยละ 100 ให้ค่าความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 33.45±0.401 มิลลิเมตร และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ3.60±0.737 รากต่อยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อน พบว่า ร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนเท่ากับ ร้อยละ 73.33 และการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 40 แถบ โดยขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 250 ถึง 2400 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic band) จำนวน 40 แถบ คิดเป็นร้อยละ 100 และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันเฉลี่ยเท่ากับ 4.44 แถบต่อไพรเมอร์

คำสำคัญ: การชักนำยอด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ชงโค

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Plant Regeneration of *Bauhinia purpurea* by Tissue Culture Technique
Student Name	Miss Wiphada Saparam
Student ID	63605049
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2024
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

The objective of this study is to estimate the number of *B. purpurea* rapidly without mutation and reduce the problems that were the cause of the extinction of trees in the future by using the plant tissue culture technique. The sterilized seeds were inoculated on half-strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3.0 mg/L Gibberellic acids (GA_3) that were 100% germinated and gave 71.14±0.528 mm for the highest seedling. The nodal segments from natural trees were sterilized with 20% Teepol detergent solution in the pre-sterilizing process, followed by sterilizing agents, including 0.1% fungicide, 20% Sodium hypochlorite (NaOCl) and 1.0% Mercuric chloride ($HgCl_2$). Both nodal segments (from natural trees and seeds) were placed on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) for shoot induction; the result showed that 24.27±0.984 mm was the highest proliferation of shoot and the maximum average number of shoot was 2.07±0.799 shoots.

The average number of roots was 3.60±0.737, and the highest root length was 33.45±0.401 mm, obtained at half-strength MS medium supplemented with 0.25 mg/L Indole-3-acetic acid (IAA). For the acclimatization method, the result showed that the percentage of survival plantlets was 73.33%. Regarding the study of genetic variation estimating by ISSR markers, the finding revealed that 40 ISSR bands were

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

achieved for 9 primers and the range. Their size was 250 to 2400 bp. Of the 40 bands, none was polymorphic band (0%); instead, they were all monomorphic bands (100%) with an average of 4.44 bands per primer.

Keywords: ISSR, Plant tissue culture, Propagation, Shoot induction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “การเกิดเป็นต้นใหม่ของชงโคโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ” ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่สละเวลาอันมีค่าในการให้คำแนะนำ ให้ความรู้ ให้ข้อมูล ตลอดจนสนับสนุนด้านต่างๆที่เอื้อต่อการทำวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก และรองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจสอบความถูกต้องเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี พ.ศ.2563

ขอกราบขอบพระคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อนุเคราะห์ชิ้นส่วนตาข้างของต้นชงโคสำหรับการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และห้องปฏิบัติการ อีกทั้งสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆสำหรับการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยสนับสนุนส่งเสริมในทุกๆด้าน และคอยให้คำปรึกษา ให้กำลังใจที่ดีเสมอมา รวมถึงบรรดาเพื่อน พี่ และน้อง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาววิภาดา ทรัพย์อร่าม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลทั่วไปของชงโค	4
2.2 ประโยชน์ของชงโค	6
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	6
2.3.1 ธาตุอาหารจำพวกสารอนินทรีย์ (inorganic salts)	7
2.3.2 ธาตุอาหารจำพวกสารอินทรีย์ (organic salts)	8
2.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	8
2.5 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช	9
2.6 การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่	11
2.7 การสกัดดีเอ็นเอ	14
2.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain	12
Reaction หรือ PCR)	15
2.9 เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์	17
2.10 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
3.1 ตัวอย่างพืช	22
3.2 ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการศึกษา	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ........ 22
3.4 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ........ 22
3.5 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ 23
3.6 อุปกรณ์........ 23
3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย........ 24
3.7.1 การเตรียมตัวอย่างพืช........ 24
3.7.2 การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช........ 25
3.7.3 การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด และชิ้นส่วนตาข้างของชงโค........ 25
3.7.3.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดชงโค........ 25
3.7.3.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างชงโค........ 26
3.7.4 การศึกษาการเจริญของเมล็ดชงโค........ 28
3.7.5 การศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง........ 28
3.7.6 การศึกษาการชักนำยอดให้เกิดราก........ 29
3.7.7 การปรับสภาพต้นอ่อน........ 29
3.7.8 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์........ 30
3.7.8.1 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ 30
3.7.8.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ 32
3.7.8.3 การตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส........ 33
3.7.8.4 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ........ 34
3.7.9 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ........ 34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล........ 35
4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเมล็ดชงโค........ 35
4.2 ผลการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างชงโค........ 36
4.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างชงโค........ 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดราก........ 40
4.5 ผลการศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อน........ 43
4.6 ผลการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ไอเอสเอสอาร์........ 44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ........ 47
5.1 สรุปผลการวิจัย........ 47
5.2 ข้อเสนอแนะ........ 49
เอกสารอ้างอิง........ 50
ภาคผนวก........ 55
ภาคผนวก ก........ 56
ภาคผนวก ข........ 58
ภาคผนวก ค........ 61
ประวัติผู้เขียน........ 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงวิธีการต่างๆที่ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างของชงโค..............	27
3.2	แสดงรหัสตัวอย่างและแหล่งที่มาของตัวอย่างต้นชงโคที่นำมาตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์..	31
3.3	แสดงชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ Annealing Temperature ของไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์ ที่ใช้ตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Innark *et. al.*, 2014)......................	32
3.4	แสดงองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง............	33
3.5	แสดงสภาวะในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของแต่ละไพรเมอร์..............................	33
4.1	แสดงผลการชักนำการเจริญเติบโตของเมล็ดชงโค หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์..	36
4.2	แสดงผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างชงโคด้วยวิธีการต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์............	38
4.3	แสดงผลการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP หรือ Kn ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.......................................	40
4.4	แสดงผลการชักนำยอดให้เกิดรากหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..	42
4.5	แสดงผลการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดรากของชงโคหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.................	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.6	แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์...	46
ภาคผนวกที่ 1	แสดงองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS)...	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชงโค ได้แก่ ลำต้น (ก) ดอก (ข) ใบ (ค) และฝัก (ง)..	5
2.2	แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)..	16
3.1	ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชของชงโคโดย เมล็ด (ก) ต้นชงโครหัส C2-462 (ข) และตาข้าง (ค)..	25
4.1	แสดงการเจริญเติบโตของเมล็ดชงโคที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS แบบครึ่งสูตรที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร...................	36
4.2	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย (ก) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ (ข) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..	39
4.3	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และ (ข) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์......................................	42
4.4	แสดงลักษณะของต้นอ่อนชงโคเมื่อปรับสภาพในกระถางพลาสติกที่ประกอบไปด้วยดิน และเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 2:1 คลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรู และนำไปเพาะเลี้ยงในที่ร่มเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์..	44
4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชงโค ประกอบด้วย ต้นเริ่มต้น และต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 และ UBC844..	45
4.6	แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชงโค ได้แก่ ต้นเริ่มต้น และต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ที่อุณหภูมิ Annealing 50 องศาเซลเซียส..	45
4.7	แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชงโค ได้แก่ ต้นเริ่มต้น และต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ที่อุณหภูมิ Annealing 45 องศาเซลเซียส..	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
BAP	6-Benzylaminopurine
BPA	Bauhinia purpurea agglutin
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
GA_3	กรดจิบเบอเรลลิก
$HgCl_2$	สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
Kn	Kinetin
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
NaOCl	สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์
NN	อาหารสังเคราะห์สูตร Nitsch and Nitsch
MS	อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPM	Plant Preservative Mixture
TBE	Tris-borate
TDZ	Thidiazuron
TEA	Tris-acetate
TPE	Tris-phosphate
UV	Ultraviolet
WPM	อาหารสังเคราะห์สูตร Woody Plant Medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ชงโค (Orchid tree) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bauhinia purpurea* อยู่ในวงศ์ Fabaceae สามารถพบได้ตั้งแต่ทางตอนใต้ของจีน ลงมาถึงแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า เวียดนาม และกัมพูชา เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในบางพื้นที่ของอินเดียรวมไปถึงขึ้นไปที่ระดับความสูงกว่า 1,300 เมตรบนเทือกเขาหิมาลัย (Khare *et al*., 2004) สำหรับในประเทศไทยสามารถพบชงโคได้ทุกภาคของประเทศ มักพบอยู่ในป่าโปร่งผสม และป่าเบญจพรรณ ในภาคเหนือ และภาคกลางมากกว่าภาคอื่น ชงโคจัดเป็นไม้ยืนต้นประเภทผลัดใบที่มีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง โดยลำต้นมีลักษณะกลม สมมาตร ทรงพุ่มแผ่กว้าง พุ่มมีความหนาปานกลาง ความสูงประมาณ 5-10 เมตร เปลือกมีสีน้ำตาลเทาอ่อน กิ่งบางมีสีเขียวอ่อน แก่นไม้มีสีน้ำตาลเข้ม แข็ง และทนทาน ลักษณะใบมีสีเขียวอ่อนถึงเขียวสด ขอบมนคล้ายรูปหัวใจ ขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบ ขอบใบเล็ก 1 ถึง 2 มิลลิเมตร ยาว 2.5 ถึง 3.5 เซนติเมตร ก้านใบยาว มีขนบริเวณก้านใบเล็กน้อย ยาว 4.5 ถึง 11 เซนติเมตร ดอกมีสีชมพู สีม่วง สีชมพูผสมสีขาว หรือสีม่วงผสมสีขาว สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี ฝักมีลักษณะเรียวแบนสีน้ำตาล มีขนปกคลุมที่ฝัก ยาวประมาณ 20 ถึง 25 เซนติเมตร ฝักจะเริ่มทยอยติดตั้งแต่ช่วงเดือนกรกฎาคม จนแก่ในช่วงเดือนกันยายน ฝักแก่จะมีสีน้ำตาล และเมื่อแก่จัดจะมีสีดำ (Orwa *et al.,* 2009)

ชงโคมักนิยมปลูกเป็นไม้ประดับเพื่อความสวยงามตามสถานที่ต่างๆ ทั้งในสวนสาธารณะ สวนหย่อม อีกทั้งนิยมปลูกไว้ในบริเวณบ้านและอาคารต่างๆอีกด้วย นอกจากนี้ใบของชงโคยังสามารถนำไปต้มช่วยรักษาอาการไอ ช่วยขับปัสสาวะ และนำไปพอกฝีและแผลได้ ส่วนเปลือกต้นสามารถนำไปรักษาอาการท้องเสีย ท้องร่วง และแก้บิดได้ ในส่วนของดอกชงโคสามารถแก้พิษไข้ร้อนจากเลือดและน้ำดี และช่วยเป็นยาระบายได้ดีเช่นเดียวกับรากชงโค นอกจากนี้ชงโคยังเป็นพืชที่เป็นแหล่งของ Bauhinia purpurea agglutin (BPA) ซึ่งเป็นเลคตินที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลแลคโตสใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาทางด้าน Biochemical Immunochemical และ Histochemical เป็นต้น มีรายงานว่าบางส่วนของพืชประกอบไปด้วย Flavone glycosides Foliar flavonoids 6-butyl-3-hydroxy flavanone Amino acids Phenyl fatty ester Lutine และ β-sitosterol ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้เป็นสารออกฤทธิ์ที่ใช้ในการรักษาทางการแพทย์ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบทางโภชนาการ และปริมาณสารต่อต้านอนุมูลอิสระในชงโค พบว่า ใบชงโคที่ผ่านการดึงน้ำออก (Dehydration) 100 กรัม อุดมไปด้วยธาตุเหล็ก 21.73 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลเซียม 240 มิลลิกรัม คาร์โบไฮเดรต 66.82 กรัม และพลังงาน 365 กิโลแคลอรี ถึงแม้ว่าชงโคจะเป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนแล้ง รวมทั้งมีประโยชน์ และข้อดีมากมาย แต่ชงโคยังพบปัญหาในการขยายพันธุ์ และการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน ทั้งหนอน ไรศัตรูพืช และตัวอ่อนของแมลงหลายชนิดที่เจาะกินเมล็ดพืช ใบ และต้นอ่อนของชงโค นอกจากนี้ยังพบปัญหาไวรัส Clitoria Yellow Vein Tymovirus และ Turnip Rosette Sobemovirus ซึ่งตามรายงานพบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคใบจุด โรคใบไหม้ และลำต้นแคระแกรนในชงโค ปัญหาทั้งหมดนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ดัชนีการเจริญเติบโตของชงโคลดลง และเพิ่มโอกาสสูญพันธุ์ได้ในอนาคต

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่มีการศึกษามาเป็นระยะเวลานาน อีกทั้งยังมีการนำเทคนิคดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เพื่อขยายพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น การขยายพันธุ์บอนสี (ขวัญเดือน, 2565) ต้นชะเอมเทศ (Mousa *et al.* (2006)) ถั่วอัลฟัลฟ่า (Li J.J. *et al.* (2009)) และต้นคารอบ (Ahmed M. *et al.* (2021)) เป็นต้น นอกจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีความสำคัญต่อการขยายพันธุ์พืชแล้ว ยังเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการลดโอกาสการสูญพันธุ์ และการกลายพันธุ์ของพืชอีกด้วย

จากปัญหาที่เกิดขึ้นกับต้นชงโคประกอบกับข้อดีของเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่กล่าวมาข้างต้น ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณต้นชงโคให้มีปริมาณมากขึ้นโดยใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณต้นชงโคอันสั้น เพื่อเป็นการลดโอกาสที่จะเกิดการสูญพันธุ์ของต้นชงโคได้ โดยปราศจากปัญหาการกลายพันธุ์ (Mutation) โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR) โดยเปรียบเทียบจากต้นชงโคเริ่มต้น และต้นอ่อนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างของชงโค

1.2.2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของชงโค

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำพืชออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก

1.2.4 เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอส-เอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนพืชของชงโค โดยศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) medium ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญของเมล็ด ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง และศึกษาการชักนำยอดให้เกิดราก จากนั้นศึกษาสภาวะแวดล้อม และอัตราส่วนของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการนำตัวอย่างพืชออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก และตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR) ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 9 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814 UBC824 UBC825 UBC834 UBC836 UBC844 UBC847 UBC855 และ UBC880 โดยเปรียบเทียบจากต้นชงโคเริ่มต้น และต้นตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถเพิ่มปริมาณต้นชงโคที่ปลอดโรคให้ได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น

1.4.2 ได้ผลผลิตต้นชงโคที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นเริ่มต้นทุกประการ

1.4.3 งานวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาวิจัยด้านอื่นๆเพิ่มเติมได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของชงโค

ชงโค (Orchid tree) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Bauhinia purpurea* อยู่ในวงศ์ Fabaceae สามารถพบได้ตั้งแต่ทางตอนใต้ของจีน ลงมาถึงแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า เวียดนาม และกัมพูชา เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในบางพื้นที่ของอินเดียรวมไปถึงขึ้นไปที่ระดับความสูงกว่า 1,300 เมตรบนเทือกเขาหิมาลัย (Khare *et al.*, 2004) สายพันธุ์ของชงโคมีประมาณ 300 ชนิดทั่วโลก และสำหรับในประเทศไทยมีรายงานในหนังสือพฤกษชาติของไทยว่าพบชงโคทั้งหมด 37 ชนิด และสามารถพบชงโคได้เกือบทุกภาคของประเทศไทย ทั้งภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดเชียงราย จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา กรุงเทพมหานคร จังหวัดมหาสารคาม จังหวัดนครพนม และจังหวัดขอนแก่น เป็นต้น (พีระพล และคณะ, 2558) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้จำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ไว้ดังนี้

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Bauhinia*

Species: *Bauhinia purpurea*

ชงโคจัดเป็นไม้ยืนต้นประเภทผลัดใบที่มีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง โดยลำต้นที่ลักษณะกลมสมมาตร ทรงพุ่มแผ่กว้าง พุ่มมีความหนาปานกลาง ความสูงประมาณ 5 ถึง 10 เมตร เปลือกมีสีน้ำตาลเทาอ่อน ผิวเปลือกขรุขระ กิ่งมีลักษณะบางสีเขียวอ่อน แก่นไม้มีสีน้ำตาลเข้ม แข็ง และทนทาน ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวสลับข้างกันบนข้อกิ่ง ใบมีสีเขียวอ่อนถึงเขียวสด ลักษณะค่อนข้างมน แผ่นใบและขอบใบเรียบ โคนใบและส่วนปลายจะหยักโค้งมนตรงกลาง ทำให้ใบคล้ายใบแฝดหรือคล้ายรูปหัวใจ กว้างประมาณ 8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 12 เซนติเมตร ใบอ่อนกางแผ่น้อยทำให้คล้ายปีกผีเสื้อเริ่มผลัดใบไปเรื่อยตั้งแต่ช่วงเดือนธันวาคม เริ่มแทงยอด และใบอ่อนเมื่อเข้าสู่ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤดูฝน หลังจากนั้นจะเริ่มแทงช่อดอก ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ รูปร่างคล้ายดอกกล้วยไม้ มีสีชมพู สีม่วง สีชมพูผสมสีขาว หรือสีม่วงผสมสีขาว ดอกจะออกเป็นช่อ แต่ละช่อมี 5 ถึง 10 ดอก มีกลีบดอก 5 กลีบ ออกดอกบริเวณซอกใบที่ปลายกิ่ง สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี และเมื่อดอกบานจะส่งกลิ่นหอมอ่อนๆ เกสรเพศผู้มี 10 อัน สามารถสืบพันธุ์ได้ 3 อัน และเป็นหมัน 7 อัน ก้านชูอับเรณูมีสีม่วงและอับเรณูมีสีน้ำตาล ก้านชูอับเรณูยาว 3 ถึง 4 เซนติเมตร อับเรณูยาว 7 ถึง 9 มิลลิเมตร กว้าง 3 ถึง 4 มิลลิเมตร ในขณะที่เกสรเพศผู้ที่เป็นหมันลดรูปเหลือเพียง 2 ถึง 4 มิลลิเมตร เกสรเพศเมียมีรังไข่ลักษณะแบนเป็นรูปขอบขนาน มีสีม่วง ยาว 5 ถึง 7 มิลลิเมตร กว้าง 2 ถึง 3 มิลลิเมตร ก้านเกสรเพศเมียมีสีขาวยาว 1 ถึง 2 มิลลิเมตร (พีระพล และคณะ, 2558) ฝักมีลักษณะเรียวแบนสีน้ำตาล มีขนปกคลุมที่ฝัก ยาวประมาณ 20 ถึง 25 เซนติเมตร ฝักจะเริ่มทยอยติดตั้งแต่ช่วงเดือนกรกฎาคม จนแก่ในช่วงเดือนกันยายน ฝักแก่จะมีสีน้ำตาล และเมื่อฝักแก่จัดจะมีสีดำ (Orwa *et al.*, 2009) เมล็ดมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ มีลักษณะกลมและแบน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1) ในส่วนของการกระจายพันธุ์นั้นต้นชงโคจะเป็นพรรณไม้หลักในป่าดิบแล้ง ชอบขึ้นบนภูเขาหินปูนและตามป่าเบญจพรรณ โดยปกติแล้วสามารถขึ้นได้ดีทุกสภาพดิน นอกจากนี้การขยายพันธุ์โดยทั่วไปจะเป็นการขยายพันธุ์จากเมล็ดเพียงอย่างเดียว (สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้, 2564)

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชงโค ได้แก่ ลำต้น (ก) ดอก (ข) ใบ (ค) และฝัก (ง)

(ที่มา: (ก) https://www.sohosandiego.org (ข) https://animals.sandiegozoo.org (ค) https://www.southernliving.com และ (ง) https://commons.wikimedia.org)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ประโยชน์ของชงโค

ชงโคถือว่าเป็นพืชที่มีประโยชน์มากมายชนิดหนึ่ง โดยทั่วไปแล้วชงโคมักนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับในสวนเพื่อความสวยงามตามสถานที่ต่างๆ เนื่องจากรากของต้นชงโคไม่ชอนไชและทำลายโครงสร้างของอาคาร เช่น สวนสาธารณะ ห้างสรรพสินค้า มหาวิทยาลัย เป็นต้น นอกจากการปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับแล้วชงโคในช่วงแตกใบใหม่จะมีทรงพุ่มหนาทำให้เป็นร่มเงาได้เป็นอย่างดี ใบอ่อนของชงโคสามารถนำมาปรุงอาหารเพื่อรับประทานได้ หรือนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงเพื่อเพิ่มรสชาติ และเพิ่มกลิ่นหอมให้อาหาร อีกทั้งชงโคยังอุดมไปด้วยสารโพลีฟีนอล (Polyphenols) ซึ่งเป็นสารที่มีสรรพคุณขึ้นชื่อทางการแพทย์ ซึ่งงานวิจัยของ สุธิรา และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากดอกชงโค โดยสกัดดอกชงโค 1 กรัม พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 37.51 mg GAE และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดจากดอกชงโคมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 36.70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดจากดอกชงโคมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 25.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ใบชงโคยังมีสรรพคุณบรรเทาอาการไอ ขับปัสสาวะ และใช้พอกฝีและแผลได้ ดอกชงโคบรรเทาพิษไข้ร้อนจากเลือดและน้ำดี ใช้เป็นยาระบายและบรรเทาอาการบิด เปลือกต้นใช้บรรเทาอาการท้องร่วง ท้องเสีย และปวดท้องบิดได้ นอกจากนี้ใบของชงโคยังสามารถนำไปต้มช่วยรักษาอาการไอ ช่วยขับปัสสาวะ และนำไปพอกฝีและแผลได้ ส่วนเปลือกต้นสามารถนำไปรักษาอาการท้องเสีย ท้องร่วง และแก้บิดได้ ในส่วนของดอกชงโคสามารถแก้พิษไข้ร้อนจากเลือดและน้ำดี และช่วยเป็นยาระบายได้ดีเช่นเดียวกับรากชงโค (Dhyani *et al.*, 2016) นอกจากนี้เมล็ดชงโคยังอุดมไปด้วยสารอาหารต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน กรดไขมัน สารต้านอนุมูลอิสระ และแร่ธาตุต่างๆ (Vadivel *et al.*, 2011) รวมทั้งยังอุดมไปด้วยสาร Bauhinia Purpurea Agglutinin (BPA) เป็นเลคตินที่จับกับกาแลคโตส และแลคโตส ซึ่งถูกนำไปประยุกต์ใช้ทาง Biochemical Immunochemical และ Histochemical (Orwa *et al.*, 2009)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ ปลายยอด (shoot tip) ปลายราก (root tip) เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ใบเลี้ยง (cotyledon) ใบ (leaf) เมล็ด (seed) เอ็มบริโอ (embryo) อับเรณู (anther) เรณู (pollen) รังไข่ (ovary) ตาข้าง (axillary bud) และดอก (flower) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุอาหารต่างๆที่พืชต้องการ เช่น น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องทำในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้น เป็นต้น และในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะรวมถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และโพรโทพลาสต์ (protoplast) ด้วย (อนุรักษ์, 2550)

Arya *et al.* (2009) ศึกษาการทำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของต้นชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glaba* L.) ต้นชะเอมเทศเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae การศึกษาเริ่มจากการนำชิ้นส่วนตาข้างของต้นชะเอมเทศฟอกฆ่าเชื้อโดยเขย่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปเขย่าในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เติมเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยการเขย่าในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS อาหารสังเคราะห์สูตร WPM อาหารสังเคราะห์สูตร B5 และอาหารสังเคราะห์สูตร NN ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ Kinetin ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และการรวมกันของ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการเสริมการชักนำให้เกิดยอดด้วยการเพิ่มสาร Adenine Sulphate (ADS) ที่ความเข้มข้น 25 50 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารเสริม ADS ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร คือความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอด โดยมีอัตราการเกิดยอดหลายยอดอยู่ที่ 10.53 ยอดต่อ 4 สัปดาห์

จากข้างต้นจะเห็นว่า อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลากหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของอาหารที่มีต่อสภาพชิ้นส่วนพืช และสายพันธุ์พืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง โดยอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น จะต้องมีองค์ประกอบต่างๆใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อวิเคราะห์สูตรอาหารต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว สามารถจำแนกองค์ประกอบต่างๆของอาหารได้ดังนี้ (ดัดแปลงจาก อนุรักษ์, 2550)

2.3.1 ธาตุอาหารจำพวกสารอนินทรีย์ (inorganic salts) ได้แก่ ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แบ่งได้เป็น

- ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และขาดไม่ได้ เช่น คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) เป็นต้น

- ธาตุอาหารรอง (micronutrients) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก (Fe) โคบอลต์ (Co) ทองแดง (Cu) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ธาตุอาหารจำพวกสารอินทรีย์ (organic salts) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) เช่น คาร์โบไฮเดรต วิตามิน กรดอะมิโน รวมไปถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่างๆ

- ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ การรวมเป็นกลุ่มของแคลลัสรวมทั้งควบคุมการขยายขนาด และการยืดตัวของเซลล์ และมีผลในการกระตุ้นการเกิดรากอีกด้วย ออกซินสามารถพบได้ทั้งชนิดที่พืชสังเคราะห์ตามธรรมชาติ เช่น กรดอินโดลอะซิติก (IAA) และชนิดที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น เช่น กรดแอลฟาแนพทาลีนอะซิติก (NAA) กรดอินโดล-3-บิวทีริก (IBA) เป็นต้น

- ไซโทไคนิน (cytokinin) ช่วยชักนำให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการเจริญของตาข้างของพืช และสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดหลายๆยอดได้ เช่น 6-Benzylaminopurine (BAP) 6-furfurylaminopurine (Kinetin) เป็นต้น

- จิบเบอร์เรลลิน (gibberellin) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีการนำสารกลุ่มนี้มาใช้น้อย โดยสารที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid หรือ GA_3) ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ช่วยขยายขนาดเซลล์ รวมทั้งช่วยชักนำให้เมล็ดเกิดการงอกอีกด้วย

2.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. การขยายพันธุ์พืช (Micropropagation) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถผลิตต้นพืชได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศและฤดูกาล นอกจากนี้ยังสามารถผลิตต้นพืชที่สมบูรณ์ ปลอดโรค และได้ต้นใหม่ที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว (Rapid asexual propagation)

2. การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank) การเก็บแคลลัสของพืชไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (Cryopreservation) ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นาน และเมื่อนำกลับมาชักนำให้เกิดเป็นต้นอีกครั้ง ต้นใหม่ที่เกิดขึ้นจะไม่มีการกลายพันธุ์ นอกจากจะอยู่ในสภาพปลอดเชื้อแล้ว ยังปลอดภัยจากธรรมชาติอีกด้วย

3. การแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศ (International transfer) การแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชในสภาพที่อยู่ในขวดสะดวกกว่าการใช้ส่วนอื่นๆ ของพืช ในการขนย้ายเพื่อแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช นอกจากนี้พืชในขวดยังสะอาด และปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และรา

4. การผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบเซลล์แขวนลอย (Suspension culture) สามารถผลิตสารต่างๆได้ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในพืชสมุนไพรเพื่อผลิตยารักษาโรคใช้ทางด้านการแพทย์

5. การปรับปรุงพันธุ์พืช ประโยชน์มหาศาลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งสามารถสร้างพันธุ์พืชต่างๆ ได้ตามความต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 การเพาะเลี้ยงเอมบริโอหรือคัพภะ ซึ่งสามารถช่วยชีวิตพืชพันธุ์ต่างๆ ให้รอดชีวิตได้ พืชบางชนิดถ้าปล่อยเอมบริโอให้เจริญอยู่ภายในเมล็ดตามธรรมชาติอาจตายได้เนื่องจากไม่มีอาหารสะสมในเมล็ด เช่น กล้วยไม้

5.2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร และละอองเกสรของพืช ในอาหารสังเคราะห์จะได้เป็นต้นพืชที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid plant) ซึ่งสามารถเพิ่มโครโมโซมได้เป็น 2 ชุด (homozygous diploid) ซึ่งเป็นพันธุ์แท้โดยใช้สารพวกโคลชิซีน (colchicine) ปกติแล้วการทำพืชพันธุ์แท้ทำได้โดยผสมตัวเองซ้ำหลายๆชั่วอายุ (generations) ซึ่งใช้เวลานานประมาณ 6 ถึง 7 ปี แต่วิธีการนี้สามารถลดเวลาในการสร้างพันธุ์แท้ได้ โดยใช้เวลาเพียง 1 ถึง 2 ปี

5.3 การชักนำให้พืชกลายพันธุ์เป็นพันธุ์ใหม่ๆ เช่น การนำพืชไปฉายรังสีต่างๆ เช่น รังสีแกมมา หรือการนำสารเคมีมาใช้กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ดีขึ้น (อรดี, 2542)

2.5 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชเป็นขั้นตอนการทำความสะอาดชิ้นส่วนพืช ช่วยในการขจัดสิ่งสกปรกรวมทั้งกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆออกจากผิวของชิ้นส่วนพืช เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ เป็นต้น ไม่ให้มีการเจริญเติบโตและทำให้เกิดความเสียหายต่อชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์นั้นสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การปนเปื้อนจากเครื่องมือ และอุปกรณ์ การปนเปื้อนจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การปนเปื้อนจากสภาพแวดล้อมหรืออากาศ รวมทั้งการปนเปื้อนจากผู้ทำการทดลองอีกด้วย (รุจิรา, 2561) นอกจากนี้ จันทร์วิภา (2550) กล่าวว่าโดยทั่วไปการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชอาจใช้สารเคมีต่างๆ เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) แอลกอฮอล์ เป็นต้น หรือในบางครั้งอาจใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อซึ่งนิยมใช้กับการฆ่าเชื้อเมล็ดเนื่องจากเป็นส่วนที่แข็งแรงสามารถปกป้องเนื้อเยื่อภายในไม่ให้เสียหายจากความร้อนได้ และในกรณีที่ต้องการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชบางชนิดที่มีผิวขรุขระหรือมีขนที่บริเวณผิวทำได้ยาก จึงอาจใช้สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อหลายชนิดร่วมกันได้ (ศิวพงศ์, 2546; รังสฤษฎ์, 2541) โดยสารฟอกฆ่าเชื้อทั่วไปมีดังนี้

2.5.1 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95

2.5.2 เซฟโฟแทกซีม (cefotaxime) สามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆได้เพื่อกำจัดแบคทีเรียของไม้ยืนต้นบางชนิด และยังพบว่าเซฟโฟแทกซีมสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสและชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ (สิริรักษ์, 2547)

2.5.3 ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) สามารถใช้เพื่อกำจัดแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ได้

2.5.4 สารป้องกันการปนเปื้อน (Plant Preservative Mixture, PPM) สามารถใช้กำจัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยสารชนิดนี้สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสามารถเติมได้ทั้งก่อนและหลังการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารได้ (Julie, 2015 ; Mechanda *et al,* 2003)

2.5.5 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกบริเวณผิวจำพวกไขมันที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้สิ่งสกปรกแขวนลอยอยู่ในน้ำ เช่น น้ำสบู่ น้ำยาล้างจาน หรือ tween-20 เป็นต้น

2.5.6 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite; NaOCl) ใช้สำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยเข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของชิ้นส่วนพืช

2.5.7 เมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride; $HgCl_2$) ใช้ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี แต่ควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนพืชเนื่องจากมีฤทธิ์กัดกร่อนอาจทำให้ชิ้นส่วนพืชเสียหายได้

ในการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชนั้นควรใช้ปริมาณความเข้มข้นและชนิดของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของพืช ขนาดและชนิดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการศึกษา เช่น เมล็ด ตาข้าง และใบ เป็นต้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sirimat *et al.* (2019) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อ และการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดของต้นสิรินธรวัลลี โดยการเริ่มศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างที่มีความยาว 2.0 ถึง 2.5 เซนติเมตร ทำความสะอาดด้วยสารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้น้ำไหลผ่าน เป็นเวลา 30 นาที และเขย่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติมสารละลาย Tween - 20 ปริมาณ 3 ถึง 5 หยด เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้น 5.0 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และเขย่าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างได้แก่ เริ่มทำความสะอาดด้วยสารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้น้ำไหลผ่าน เป็นเวลา 30 นาที และเขย่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติมสารละลาย Tween-20 ปริมาณ 3 ถึง 5 หยด เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาทีอีกครั้ง นอกจากนี้งานวิจัยของ Obisensan *et al.* (2021) ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้นมันแกว (*Pachyrhizus erosus* (L.)) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยทำการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนลำต้น ใบ ตาข้าง หัวราก และเมล็ดของมันแกว โดยศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อคือ 5 และ 10 นาที จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนลำต้นและใบพบว่า เมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที ชิ้นส่วนลำต้นและใบเกิดการปนเปื้อน เมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ได้เพียง 1 สัปดาห์ชิ้นส่วนลำต้นและใบจะตายและเปลี่ยนสีเป็นสีดำ สำหรับการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที คือสภาวะที่เหมาะสมมากที่สุด ในขณะที่เมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที ทำให้ชิ้นส่วนตาข้างเกิดการปนเปื้อนและตายตามลำดับ นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหัวรากคือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที และสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมากที่สุดคือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 10 นาที ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การฆ่าเชื้อเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 5 นาที มีเปอร์เซ็นต์การฆ่าเชื้อเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์

2.6 การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่

อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่า การชักนำพืชให้เกิดเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเกิดขึ้นในกรณีที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารสังเคราะห์ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น มีสารอาหารสังเคราะห์ที่สมบูรณ์ น้ำ แสงสว่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นต้น ซึ่งในการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่สามารถเกิดได้จาก 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจเนซีส (embryogenesis) คือการพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยเกิดจากกลุ่มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง และพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ และออร์แกโนเจเนซีส (organogenesis) คือ การพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวกันของกลุ่มเซลล์พาเรงไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกันเป็นเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งสามารถเจริญต่อไปกลายเป็นจุดกำเนิดของยอดหรือรากได้ โดยการเกิดเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆจะเป็นอิสระต่อกัน ขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อเจริญนั้นได้รับสารกระตุ้นให้เจริญไปเป็นเนื้อเยื่อใด ซึ่งสารกระตุ้นที่ใช้คือสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มต่างๆ เช่น ออกซิน ไซโทไคนิน เป็นต้น โดยชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตจะเป็นตัวควบคุมการเกิดเป็นแคลลัส ยอด และราก ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดสามารถกระตุ้นการเกิดยอดและราก สารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดสามารถจะยับยั้งการเกิดยอดและรากได้เช่นกัน

จากงานวิจัยของ Arya *et al.* (2009) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของต้นชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glaba* L.) ต้นชะเอมเทศเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae ที่มีสรรพคุณทางยามากมาย สารที่สำคัญที่พบในต้นชะเอมเทศคือสาร Glycyrrhizic acid ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่สามารถพบได้ในราก โดยนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS อาหารสังเคราะห์สูตร WPM อาหารสังเคราะห์สูตร B5 และอาหารสังเคราะห์สูตร NN ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP หรือ Kinetin ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และการรวมกันของ BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการเสริมการชักนำให้เกิดยอดด้วยการเพิ่มสาร Adenine Sulphate (ADS) ที่ความเข้มข้น 25 50 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารเสริม ADS ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ ความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอด โดยมีอัตราการเกิดยอดหลายยอดอยู่ที่ 10.53 ยอดต่อ 4 สัปดาห์ จากนั้นศึกษาการชักนำยอดให้เกิดรากโดยศึกษาอาหารสังเคราะห์สูตร MS แบบครึ่งและเต็มสูตรที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA NAA และ IAA ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตรครึ่ง MS ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำรากมากที่สุดอยู่ที่ ร้อยละ 83.33 ขณะที่จำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 18.00 ราก และมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 2.79 เซนติเมตร

Gutierrez *et al.* (2010) เริ่มศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ในต้น *Bauhinia cheilantha* โดยศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP เพียงอย่างเดียว และอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด และศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ที่มีต่อการชักนำยอดให้เกิดราก และศึกษาอิทธิพลของผงถ่านกัมมันต์ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Woody Plant Medium (WPM) พบว่า จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.84 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และร้อยละการเกิดรากมากที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 65 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในส่วนของการศึกษาอิทธิพลของผงถ่านกัมมันต์พบว่า ผงถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ช่วยกระตุ้นการชักนำยอดให้เกิดราก และช่วยเพิ่มร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนที่ย้ายออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก

Akhter S. *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของต้นกาหลง (*Bauhinia acuminata* L.) โดยศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่มีผลต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 0.10 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0.20 0.30 0.40 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำยอดให้เกิดราก โดยศึกษาอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.20 0.60 และ 0.80 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.20 0.60 และ 0.80 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมดพบว่า ร้อยละการงอกของเมล็ดมีค่ามากที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 95 เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.86 เซนติเมตร และมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.50 ยอด ในขณะที่ความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.11 เซนติเมตร และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.44 ราก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร

Singh *et al.* (2012) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของต้นเสี้ยวดอกขาว (*Bauhinia variegata* L.) โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS หลังจากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาตัดให้มีความยาว 1 เซนติเมตร และนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 และ 5.0 ไมโครโมลาร์ หรือ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 ไมโครโมลาร์ และ BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BAP ความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์คือความเข้มข้นที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด โดยมีจำนวนตาข้างเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 7.45±0.6 ตาข้าง และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 63.30±5.3 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำออกปลูกในกระถางที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ที่มีสัดส่วนดินต่อทราย เท่ากับ 1:1 พบว่า ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโต สมบูรณ์แข็งแรง และสามารถปลูกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกต่อไปได้

Jaime *et al.* (2013) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของพืชในสปีชีส์ *Bauhinia* spp. ได้แก่ ต้นกาหลง ต้นเสี้ยวดอกขาว ต้นชงโค ต้นโยทะกา ต้นกาหลงแดง และต้นชงโคฮอลแลนด์ อ้างอิงจากการศึกษาของ Kumar A. (1992) นำไปเพาะเลี้ยงพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2-4,D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำชิ้นส่วนพืชให้เกิดแคลลัส และเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ นอกจากนี้พบว่า สามารถชักนำรากของต้นชงโคได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 30 วัน

Sharma U. *et al.* (2017) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดใหม่ในหลอดทดลอง และการชักนำยอดให้เกิดรากภายนอกหลอดทดลองของต้น *Bauhinia racemose* โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP หรือ Kn ที่ความเข้มข้น 0.0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว หรือเติมสารควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.004 หรือ 0.008 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 ถึง 35 วัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดคือ การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP หรือ Kn ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.004 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการชักนำให้เกิดยอดได้เท่ากับ 21.81±1.26 ยอด หลังจากนั้นทำการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดรากภายนอกหลอดทดลอง โดยนำไปแช่ในสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ/หรือ NOA ความเข้มข้น 0.0 200 400 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 นาที พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดรากภายนอกหลอดทดลองคือ การนำยอดไปแช่ในสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 นาทีก่อนนำไปเพาะเลี้ยงและย้ายออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก ซึ่งมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ ร้อยละ 85

2.7 การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นสารประกอบประเภทหนึ่งของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสาย (Double-strand) มาพันกันเป็นเกลียวฮีลิกซ์ ซึ่งในหนึ่งนิวคลีโอไทด์จะประกอบด้วยองค์ประกอบสามส่วน คือ น้ำตาลเพนโทส (Pentose sugar) ชนิดดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) กลุ่มฟอสเฟต (Phosphate group) และไนโทรจีนัสเบส (Nitrogenous base) (ตรีทิพย์, 2552) โดยทั่วไปเบสที่พบในดีเอ็นเอจะมี 4 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีองค์ประกอบ และโครงสร้างที่แตกต่างกันออกไป คือ กลุ่มเบสไพริมิดีน (Pyrimidine) จะมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 1 วง เบสในกลุ่มนี้ได้แก่ เบสไซโทซีน (Cytosine; C) และเบสไธมีน (Thymine; T) ส่วนกลุ่มเบสพิวรีน (Purine) จะมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 2 วง คือ วงแหวนของเบสไพริมิดีนเชื่อมกับวงแหวนอิมิดาโซล (Imidazole) เบสในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบสอะดีนีน (Adenine; A) และเบสกัวนีน (Guanine; G) (วิชัย และคณะ (2541)) ซึ่งเบสทั้ง 4 ชนิดจะต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบส ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม ที่ตำแหน่ง C-1' โดยมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5' ของน้ำตาลโมเลกุลถัดไปด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (Phosphodiester bond) ทำให้สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น มีปลายด้านหนึ่งเริ่มต้นด้วย 3'-OH (เรียกปลาย 3') และปลายอีกด้านหนึ่งสิ้นสุดด้วย 5'-phosphate (เรียกปลาย 5') (หัทยา, 2548)

กันตา (2567) กล่าวว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตมีหลายวิธีด้วยกันแตกต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หลักการเบื้องต้นในการสกัดดีเอ็นเอ คือ การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงผนังเซลล์ในกรณีของเซลล์พืชและแบคทีเรีย เพื่อทำให้ดีเอ็นเอหลุดออกมาได้ จากนั้นแยกดีเอ็นเอออกจากส่วนที่เหลือของเศษเซลล์ ซึ่งจีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตมักอยู่รวมกับโปรตีนฮิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตนและโปรตีนอื่น ๆ เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อน ทั้งนี้ภายในเซลล์ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และอาร์เอ็นเอ โดยวิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากพืชสามารถเตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ใบ ลำต้น ราก เมล็ด และเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น เพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เพื่อการศึกษาวิจัยในด้านต่างๆ โดยมีหลักการและขั้นตอนวิธีการ ดังนี้

1. การทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) โดยการทำให้ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืชและแบคทีเรียมีผนังเซลล์และแคปซูลหุ้มเยื่อหุ้มเซลล์อีกชั้น การทำให้เซลล์แตกสามารถทำได้ทั้งวิธีการทางกายภาพด้วยการใช้แรงกล โดยใช้สารพวก detergent ได้แก่ sodium dodecyl sulfate (SDS) โดย SDS จะเข้าไปละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมทั้งจับกับโปรตีนพวก hydrophobic protein ทำให้เซลล์แตกปลดปล่อยองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือต่างๆ น้ำตาล อาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอ ออกมาในสารละลาย การผสมในขั้นนี้จึงต้องระวังไม่เขย่าหรือคนสารละลายแรงเกินไป

2. การกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออก เมื่อเซลล์ถูกทำให้แตกออกจะมีสารอื่นๆที่อยู่ในเซลล์จะถูกปล่อยออกมาด้วย เช่น โปรตีน อาร์เอ็นเอ และเศษเซลล์ เป็นต้น การย่อยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (Deproteinization) ออกจากดีเอ็นเอ โดยใช้ protease และ RNase จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform บางครั้งอาจเติมเกลือ sodium chloride หรือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีนและเศษเซลล์ และเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงจะพบว่ามีการแยกชั้นออก ดีเอ็นเอจะแยกชั้นอยู่ส่วนใสด้านบน ส่วนโปรตีนจะอยู่ในชั้นตะกอนสีขาวขุ่น และชั้นล่างจะเป็นสารอินทรีย์อื่นๆ

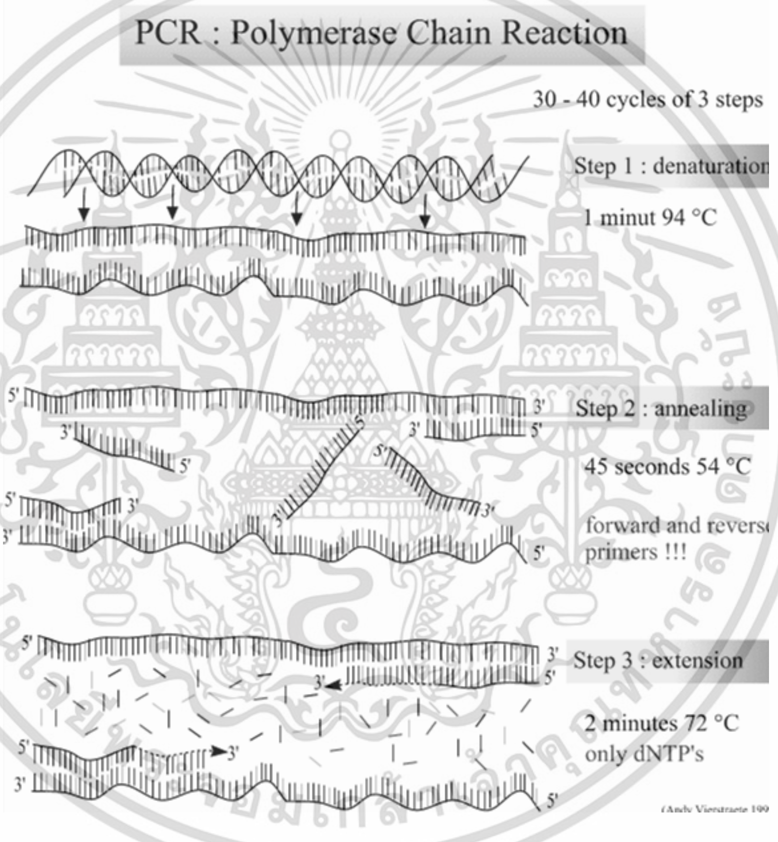
3. การตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนโดยใช้ iso-propanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ หรือ absolute ethanol แช่เย็น เนื่องจาก ethanol มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ ดังนั้นเมื่อเติม ethanol ลงไป ethanol จะลอยอยู่ด้านบนและละลายในน้ำได้ดีกว่าดีเอ็นเอมาก จึงไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่จับกับดีเอ็นเออยู่ ทำให้ดีเอ็นเอจับตัวกันเองแล้วตกตะกอนเป็นสีขาวอยู่ก้นหลอด อาจเติมเกลือ sodium acetate ด้วย เพื่อให้เกิด dehydrate water ออกจากสายดีเอ็นเอ จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำหรือ TE buffer และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (กรมวิชาการเกษตร, 2563)

2.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) คือ เทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis และคณะ บริษัท Cetus Corporation ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาไม่นาน PCR เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากโดยสามารถนำไปใช้ได้กับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง DNA probe และการวิจัยประยุกต์ เช่น การสร้างยีนกลายพันธุ์ (PCR based mutagenesis) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เป็นต้น หลักการพื้นฐานของ PCR คล้ายกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอสายหนึ่งเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส และอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอแยกจากกันหรือจับคู่กันใหม่ ซึ่งปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (รูปที่ 2.2) ดังนี้ (Bara scientific, 2546)



รูปที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)
(ที่มา: สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.))

1. Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพที่เป็นสายคู่ ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92 ถึง 95 องศาเซลเซียส

2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 ถึง 14 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37 ถึง 60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงนามไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5’ ของไพรเมอร์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 ถึง 75 องศาเซลเซียส ซึ่งสารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มีดังนี้

1. Template คือดีเอ็นเอแม่แบบที่ต้องการเพิ่มปริมาณ

2. Primers ซึ่งประกอบด้วย forward และ reverse primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ต้องการเพิ่มปริมาณ

3. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP และ dTTP

4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg++) อยู่ด้วย

5. *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

2.9 เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (ISSR; inter simple sequence repeats)

เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงที่มีการนำข้อดีของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP; amplified fragment length polymorphisms) และเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD; random amplified polymorphic DNA) ไว้ด้วยกัน (Liu and Wendel (2001)) ซึ่งปัจจุบันมีการนิยมใช้เทคนิคนี้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งคล้ายกับเทคนิคอาร์เอพีดี แต่จะมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) เกิดความแตกต่าง (polymorphism) สูง สามารถแยกในระดับชนิด (species) ของสิ่งมีชีวิตได้ เทคนิคลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำๆ เช่น $(AC)_6$ $(TG)_8$ หรือ $(AGC)_4$ เป็นต้น และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ยังใช้เวลาน้อย และเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน (Powell *et al.*, 1996) (กิตติศักดิ์ และคณะ, 2560)

2.10 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟริซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุขนาดและโครงรูปโมเลกุลของสาร การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอนิยมใช้แผ่นเจลอะกาโรสเป็นตัวกลาง สามารถทำได้โดยใช้หลักการที่โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ เมื่อนำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณการย้อมอะกาโรสด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอธิเดียมโบรไมด์ ดังนั้นปริมาณแสงที่วัดได้จากปริมาณเอธิเดียมโบรไมด์จะสะท้อนถึงปริมาณโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกเอธิเดียมโบรไมด์เข้าไปแทรกจับ ซึ่งสามารถตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียม-โบรไมด์กับดีเอ็นเอได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรส

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

2. รูปแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีปลายเปิด

3. เปอร์เซ็นต์ของชนิดเจล หากเจลมีความเข้มข้นมากขึ้น ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) หากเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า แต่หากใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่สูงเกินไปดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วแต่การแยกตัวของดีเอ็นเอจะไม่ดี และถ้าหากใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไป แถบดีเอ็นเอจะไม่ชัดเนื่องจากเกิดการแพร่

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ TEA (Tris-acetate), TBE (Tris-borate) และ TPE (Tris-phosphate) ซึ่งการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานนั้นๆ

Lau P.Y.C. *et al.* (2005) ศึกษาการตรวจสอบสายพันธุ์ผสม (hybrid) ของต้น *Bauhinia blakeana* โดยศึกษาจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การขยายพันธุ์ และศึกษาข้อมูลระดับโมเลกุล โดยในการศึกษาระดับโมเลกุลได้ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ซึ่งศึกษาจากตัวอย่างพืช 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. variegata B. purpurea* และ *B. blakeana* และใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 สายไพรเมอร์ ได้แก่ UBC807 [(AG)8-T] UBC810 [(GA)8-G] UBC834 [(AG)8-YT] UBC835 [(AG)8YC] UBC842 [(CA)8-YG] UBC844 [(CT)8-RC] UBC866 [(CTC)6] และ UBC889 [DBD-(AC)7] เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยมีขั้นตอน 1. อุณภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 3. อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที 4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ 4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโพรีซิสที่ใช้แผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน 0.1X TBE buffer และเมื่อนำผลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 105 แถบ โดยเกิดแถบดีเอ็นในลักษณะแตกต่างกันจำนวน 49 แถบ (ร้อยละ 46.7) และพบแถบดีเอ็นเอในพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ จำนวน 30 แถบ (ร้อยละ 28.6) นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอของ *B. purpurea* และ *B. blakeana* ร่วมกันจำนวน 18 แถบ และพบแถบดีเอ็นเอของ *B. variegata* และ *B. blakeana* ร่วมกันจำนวน 25 แถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุทวัฒน์ และคณะ (2557) ศึกษาการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์จากการทดสอบไพรเมอร์ 60 ไพรเมอร์ พบว่า 57 ไพรเมอร์ ที่เกิดแถบดีเอ็นเอหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) (โดยงานวิจัยฉบับนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ UBC814 UBC824 UBC836 และ UBC880 ที่ปรากฎในการทดลองของ สุทวัฒน์, 2557) หลังจากนั้นนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 240 แถบ (39 เปอร์เซ็นต์) แถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 160 ถึง 3,000 คู่เบส ค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.98 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) สามารถจัดมะละกอออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถช่วยในการประเมินและปรับปรุงพันธุ์มะละกอได้ต่อไป

สถาพร และคณะ (2562) ศึกษาการประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาและกระเจียว ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ โดยเริ่มจากนำตัวอย่างใบอ่อนพืชได้แก่ ปทุมมา กระเจียว และลูกผสม มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAsecure Plant Kit (Tiangen, China) หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) 3 ขั้นตอนได้แก่ 1.บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 2. บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ Ta องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 3. บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ละลายในบัพเฟอร์ 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และเมื่อนำผลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 250 ถึง 3,000 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งสิ้น 71 แถบ จากทั้งหมด 72 แถบ คิดเป็น 98.61 เปอร์เซ็นต์ และมี 9 ไพรเมอร์ คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ของต้นพ่อแม่พันธุ์พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.04 ถึง 0.57 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์นั้นเหมาะสมต่อการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาและกระเจียว

สุรเชษฐ และสุมาลี (2563) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR)) จำนวนไพรเมอร์ 5 สายไพรเมอร์ ได้แก่ UBC807 UBC808 UBC823 UBC827 และ UBC847 โดยเริ่มสกัดดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป RBC Genomic DNA Extraction Kit จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ 1. Pre denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 2. Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 3. Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที 4. Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 5. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และนำผลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 26 แถบ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 16 แถบ (ร้อยละ 59.34) มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.45 ถึง 0.97 และเมื่อทำการวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจำแนกยาสูบได้เป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน คือยาสูบสายพันธุ์พื้นเมือง และยาสูบสายพันธุ์การค้า ซึ่งมีความสอดคล้องกับแหล่งที่มาของยาสูบ

จีรานันท์ และคณะ (2564) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเสาวรส ในอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยนำตัวอย่างเสาวรส 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ผลสีเหลืองและสายพันธุ์ผลสีม่วง จำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธีการ Doyle and Doyle ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์เริ่มต้น จำนวน 16 ไพรเมอร์ ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้ 1. Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 3. Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 5. Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 120 โวลต์ และทำการวิเคราะห์ผล พบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และขึ้นแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้รวมทั้งหมด 20 แถบ มีขนาดประมาณ 200 ถึง 900 คู่เบส และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (Polymorphic band) จำนวน 13 แถบ คิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่าง (Monomorphic band) จำนวน 7 แถบ คิดเป็น 35 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.50 ถึง 0.95

Ahmad A. *et al.* (2021) ศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นมาร์ซูเปียม (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเพิ่มปริมาณดีเอ็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 24 ไพรเมอร์ โดยมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (จำนวน 40 รอบ) ขั้นตอนที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอนที่ 5 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC818 UBC825 UBC827 UBC834 UBC836 UBC839 UBC841 UBC847 UBC849 และ UBC855 โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) ทั้งหมด 60 แถบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.0 แถบต่อไพรเมอร์ และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าต้นมาร์ซูเปียมที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่เกิดความแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

จากการศึกษางานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจึงได้มีการคัดเลือกขั้นตอนวิธีการ สภาวะการทดลองที่เหมาะสม สารเคมีที่เกี่ยวข้องในความเข้มข้นและปริมาณต่างๆ รวมถึงการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพในแต่ละงานวิจัยมาทั้งหมดจำนวน 9 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814 UBC824 UBC825 UBC834 UBC836 UBC844 UBC847 UBC855 และ UBC880 เพื่อใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ชงโค (*Bauhinia purpurea*)

3.2 ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการศึกษา

3.2.1 เมล็ด

3.2.2 ตาข้าง

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

3.3.1 เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)

3.3.2 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl)

3.3.3 Teepol detergent

3.3.4 Plant Preservative Mixture (PPM) ; Plant Cell Technology

3.3.5 Cefotaxime ; Nida Pharma Incorporation Co.,Ltd.

3.3.6 Antibiotic Antimycotic Solution (100x) ; Sigma Life Science

3.3.7 สารลดแรงตึงผิว (tween-20)

3.3.8 น้ำกลั่น (distilled water)

3.3.9 เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

3.3.10 สารละลายยากำจัดเชื้อรา (Carbendazim)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.4.1 อาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962); Phyto Technology

3.4.2 น้ำตาลทราย (Sugar)

3.4.3 ผงวุ้น (Agar)

3.4.4 6-Benzylaminopurine (BAP)

3.4.5 Kinetin (Kn)

3.4.6 Indole-3-acetic acid (IAA)

3.4.7 Indole-3-butyric acid (IBA)

3.4.8 Gibberellic acid (GA_3)

3.4.9 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.4.10 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 และ 1 นอร์มอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.11 น้ำกลั่น (Distilled water)

3.4.12 เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

3.5.1 น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน

3.5.2 *Taq* DNA polymerase

3.5.3 แม็กนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)

3.5.4 สารละลาย dNTP mixture (dATP dCTP dGTP dTTP)

3.5.5 Primer

3.5.6 PCR buffer

3.5.7 2X CTAB buffer

3.5.8 Chloroform : isoamyl ในอัตราส่วน 24 : 1

3.5.9 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.5.10 เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.5.11 TE buffer

3.5.12 Loading buffer

3.5.13 TBE buffer

3.5.14 DNA marker

3.5.15 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

3.5.16 ผงวุ้นอะกาโรส

3.5.17 β – Mercaptone

3.5.18 Proteinase K

3.5.19 10% CTAB buffer

3.5.20 Isopropanol

3.5.21 Absolute Ethanol

3.6 อุปกรณ์

3.6.1 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (bottle)

3.6.2 กระบอกตวง (cylinder)

3.6.3 บีกเกอร์ (beaker)

3.6.4 แท่งแก้วคนสาร (glass stirrer)

3.6.5 ช้อนตักสาร (spatula)

3.6.6 ถ้วยชั่งสาร (weighing boat)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.7 ไมโครปิเปต (micropipette)

3.6.8 ทิปขนาดต่างๆ (tip)

3.6.9 หลอดดูดอาหาร (syringe)

3.6.10 จานแก้ว (petri dish)

3.6.11 ปากคีบ (forceps)

3.6.12 มีดผ่าตัด (knives)

3.6.13 กรรไกร (scissor)

3.6.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)

3.6.15 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)

3.6.16 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.6.17 เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven)

3.6.18 เครื่องเขย่าชนิดธรรมดา (shaker)

3.6.19 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

3.6.20 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (autoclave)

3.6.21 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.6.22 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

3.6.23 ไมโครปิเปตทิปปลายตัด (micropipette tips)

3.6.24 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.6.25 กล้องถ่ายภาพ (camera)

3.6.26 กระถางต้นไม้ (flowerpot)

3.6.27 โกร่งบดยา (pestle & mortar)

3.6.28 หลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.6.29 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.6.30 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

3.6.31 เครื่อง UV transilluminator

3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.7.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการศึกษาคือ เมล็ด และชิ้นส่วนตาข้างของชงโค ทำการคัดเลือกเมล็ด โดยคัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่แก่ และไม่แห้งจนเกินไป (รูปที่ 3.1 ก) สำหรับชิ้นส่วนตาข้าง ได้รับการอนุเคราะห์จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง รหัสต้นชงโค C2-462 (รูปที่ 3.1 ข) โดยทำการคัดเลือกชิ้นส่วนตาข้างที่มีสีเขียว มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบูรณ์ ไม่ติดโรค ไม่มีรอยแผล และควรเป็นชิ้นส่วนที่เพิ่งแตกใหม่ ไม่อ่อนและไม่แก่จนเกินไป (รูปที่ 3.1 ค)

รูปที่ 3.1 ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชของชงโคโดย เมล็ด (ก) ต้นชงโครหัส C2-462 (ข) และตาข้าง (ค)
(ที่มา: (ก) https://www.farmorganicseed.com (ข) ผู้จัดทำ และ (ค) ผู้จัดทำ)

3.7.2 การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วย อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) (Murashike *et.al.* (1962)) ความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่างๆ และสารละลาย PPM ความเข้มข้น 2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ระหว่าง 5.6 ถึง 5.8 แบ่งใส่ขวดแก้วเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ ปริมาตรขวดละ 15 ถึง 20 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

3.7.3 การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด และชิ้นส่วนตาข้างของชงโค

3.7.3.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดชงโค

นำเมล็ดชงโคมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่ และปล่อยให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำความสะอาดด้วยการนำไปเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที นำไปล้างต่อด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายยากำจัดเชื้อราความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปตากลมในตู้ปลอดเชื้อให้แห้ง และใช้ปากคีบ (forceps) ลอกเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ออก ก่อนนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญของเมล็ดในขั้นตอนต่อไป (ข้อที่ 3.7.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างชงโค

นำชิ้นส่วนตาข้างชงโคทำการตัดแต่งชิ้นส่วนตาข้างให้มีขนาด 1 ถึง 2 เซนติเมตร มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่ และปล่อยให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำความสะอาดด้วยการนำไปเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลาย Teepol detergent ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที นำไปล้างต่อด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแบ่งวิธีการฟอกฆ่าเชื้อออกเป็น 6 วิธี เพื่อศึกษาสภาวะการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม ดังนี้ (ตารางที่ 3.1)

วิธีที่ 1 นำชิ้นส่วนตาข้างเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

วิธีที่ 2 นำชิ้นส่วนตาข้างเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำไปเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

วิธีที่ 3 นำชิ้นส่วนตาข้างเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำไปเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

วิธีที่ 4 นำชิ้นส่วนตาข้างเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

วิธีที่ 5 นำชิ้นส่วนตาข้างเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำไปเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

วิธีที่ 6 นำชิ้นส่วนตาข้างเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำไปเขย่าในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อในแต่ละวิธีที่กล่าวมาข้างต้นไปผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลองวิธีการละ 50 ชิ้น จากนั้นบันทึกผลและสังเกตการปนเปื้อนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งการบันทึกผลการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างจะคำนวณเป็นร้อยละการรอดชีวิตของตาข้าง ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตตาข้าง} = \frac{\text{จำนวนตาข้างที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนตาข้างที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.1)$$

หมายเหตุ: การรอดชีวิตคือ ชิ้นส่วนตาข้างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ มีสีเขียวสด และมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ตารางที่ 3.1 แสดงวิธีการต่างๆที่ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างของชงโค

วิธีการที่	สารฟอกฆ่าเชื้อที่ 1	ระยะเวลา (นาที)	สารฟอกฆ่าเชื้อที่ 2	ระยะเวลา (นาที)	สารฟอกฆ่าเชื้อที่ 3	ระยะเวลา (นาที)
1	0.1% ยากำจัดเชื้อรา	15	10% NaOCl	10	-	-
2	0.1% ยากำจัดเชื้อรา	15	10% NaOCl	10	1.0% $HgCl_2$	5
3	0.1% ยากำจัดเชื้อรา	15	10% NaOCl	10	2.0% $HgCl_2$	5
4	0.1% ยากำจัดเชื้อรา	15	20% NaOCl	10	-	-
5	0.1% ยากำจัดเชื้อรา	15	20% NaOCl	10	1.0% $HgCl_2$	5
6	0.1% ยากำจัดเชื้อรา	15	20% NaOCl	10	2.0% $HgCl_2$	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.4 การศึกษาการเจริญของเมล็ดชงโค

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจากข้อที่ 3.7.3.1 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Gibberellic Acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ชิ้นต่อสูตรอาหาร ทำการสังเกตและบันทึกผล 2 สัปดาห์ โดยบันทึกระยะเวลาที่เมล็ดเริ่มเกิดการงอก บันทึกความยาวยอดเฉลี่ยด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ และบันทึกร้อยละการงอกของเมล็ด ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการงอกของเมล็ด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.2)$$

$$\text{ความยาวยอดเฉลี่ย} = \frac{\text{ความยาวยอดทั้งหมด}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \qquad (3.3)$$

3.7.5 การศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้าง

ชิ้นส่วนตาข้างที่ใช้ในการศึกษานำมาจาก 2 แหล่งคือ ชิ้นส่วนตาข้างจากต้นเริ่มต้นภายนอกหลอดทดลองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจากข้อที่ 3.7.3.2 และชิ้นส่วนตาข้างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดภายในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP หรือ Kn ที่ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ชิ้นต่อสูตรอาหาร ทำการย้ายชิ้นส่วนพืช (subculture) ทุกๆ 4 สัปดาห์ และบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นเพื่อคำนวณจำนวนยอดเฉลี่ย และวัดความยาวยอดที่เกิดขึ้นเพื่อหาความยาวยอดเฉลี่ยด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{จำนวนยอดเฉลี่ย} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิด}}{\text{จำนวนตาข้างที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \qquad (3.4)$$

$$\text{ความยาวยอดเฉลี่ย} = \frac{\text{ความยาวยอดทั้งหมด}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด}} \qquad (3.5)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.6 การศึกษาการชักนำยอดให้เกิดราก

คัดเลือกยอดเกิดใหม่ที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่ให้ผลการชักนำยอดได้ดีที่สุด โดยคัดเลือกยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง และมีความสูงตั้งแต่ 3 เซนติเมตรขึ้นไป ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 0.25 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ชิ้นต่อสูตรอาหาร บันทึกผลการทดลองโดยบันทึกร้อยละการเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และวัดความยาวรากเฉลี่ยด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนยอดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{จำนวนรากเฉลี่ย} = \frac{\text{จำนวนรากที่เกิดขึ้น}}{\text{จำนวนยอดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \quad (3.7)$$

$$\text{ความยาวรากเฉลี่ย} = \frac{\text{ความยาวรากทั้งหมด}}{\text{จำนวนรากทั้งหมด}} \quad (3.8)$$

3.7.7 การนำต้นอ่อนออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก

นำต้นอ่อนชงโคสภาพสมบูรณ์แข็งแรงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ให้ผลการชักนำให้เกิดยอด และการชักนำยอดให้เกิดรากได้ดีที่สุด มาล้างทำความสะอาดให้ปราศจากวุ้น จากนั้นแช่ต้นอ่อนลงในสารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้ย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติกที่ประกอบไปด้วยดินและเพอร์ไลท์ ในอัตราส่วน 2:1 คลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรู 3 ถึง 5 รู แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่ร่มโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ รดน้ำต้นอ่อนด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาลตลอดการเพาะเลี้ยง บันทึกผลเป็นร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนหลังจากปรับสภาพ 2 สัปดาห์ ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นอ่อนที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นอ่อนทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.9)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.8 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอส-เอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR)

3.7.8.1 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากต้นเริ่มต้นภายนอกหลอดทดลอง (C2-462) และสุ่มตัวอย่างพืชที่เพาะเลี้ยงภายในหลอดทดลอง ได้แก่ ตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ อย่างละ 1 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างพืชเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นจึงทำการสุ่มตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมซ้ำอีกครั้ง ซึ่งรหัสและแหล่งที่มาของตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 3.2 และวิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีการ CTAB (Doyle and Doyle, 1987) เริ่มจากทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่งแช่เย็น หลังจากนั้นตักส่วนผสมทั้งหมดใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ เติมสารละลาย 2X CTAB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย β – mercaptone ethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (กลับหลอดทุกๆ 15 นาที) หลังจากนั้นเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พร้อมกับกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกใส่หลอดใหม่แล้วเติม CTAB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร พร้อมกับกลับหลอดไปมา และเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้ง และทำให้ตะกอนแห้งด้วยการตากที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ทำการละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

การตรวจสอบคุณภาพ และการวัดปริมาณของดีเอ็นเอ ทำได้โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยสารละลาย TE buffer (1X) ในอัตราส่วน 1:100 (ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตรต่อ TE buffer (1X) 297 ไมโครลิตร) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ng/μl) = ค่า OD_{260} x 50 μg/mL x dilution factor (3.10)

โดยค่า OD_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ของสารละลายดีเอ็นเอ

50 μg/mL คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ OD_{260} มีค่าเท่ากับ 1

dilution factor คือ อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง

การวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอทำได้โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างค่า OD_{260} และ OD_{280} โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีค่าอยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 1.8 ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ (ng/μl)} = \frac{\mathbf{OD260}}{\mathbf{OD280}} \qquad (3.11)$$

ตารางที่ 3.2 แสดงรหัสตัวอย่าง และแหล่งที่มาของตัวอย่างต้นชงโคที่นำมาตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

ตัวอย่างต้นชงโค	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา
ต้นชงโคเริ่มต้น	C2-462	คณะวิศวกรรมศาสตร์ สจล.
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 4 สัปดาห์	Bp-4w	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 8 สัปดาห์	Bp-8w	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 12 สัปดาห์	Bp-12w	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 1	Bp-1	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 2	Bp-2	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 3	Bp-3	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 4	Bp-4	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 5	Bp-5	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 6	Bp-6	ห้องปฏิบัติการ
ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 7	Bp-7	ห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ 1/ ต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 4 8 และ 12 สัปดาห์ ได้มาจากการสุ่มตัวอย่าง

2/ ต้นชงโคเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 1 ถึง 7 ได้มาจากการสุ่มตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ Annealing Temperature ของไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์ ที่ใช้ตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Ahmad A. *et al.*, 2021)

ลำดับที่	ไพรเมอร์ (primer)	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Annealing Temperature (°C)
1	UBC814	5’-CTCTCTCTCTCTCTCTA-3’	45
2	UBC824	5’-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3’	50
3	UBC825	5’-ACACACACACACACACT-3’	50
4	UBC834	5’-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3’	45
5	UBC836	5’-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3’	50
6	UBC844	5’-CTCTCTCTCTCTCTCTRC-3’	50
7	UBC847	5’-CACACACACACACACARC-3’	45
8	UBC855	5’-ACACACACACACACACYT-3’	45
9	UBC880	5’-GGAGAGGAGAGGAGA-3’	45

3.7.8.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชทั้งหมดในข้อที่ 3.7.8.1 (รหัสตัวอย่าง C2-462 Bp-4w Bp-8w Bp-12w และ Bp-1 ถึง Bp-7) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ซึ่งมีไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 9 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814 UBC824 UBC825 UBC834 UBC836 UBC844 UBC847 UBC855 และ UBC880 (ตารางที่ 3.3) โดยองค์ประกอบของสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการทดลอง ดังตารางที่ 3.4 และสภาวะที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ดังตารางที่ 3.5 โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ ซึ่งสภาวะที่ใช้ในขั้นตอนดังกล่าวมีการดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Ahmad A. *et al.*, 2021 ซึ่งการทดลองเริ่มจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของต้นเริ่มต้นและสุ่มหยิบตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ (Bp-4w Bp-8w และ Bp-12w) เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงภายในหลอดทดลองในระยะเวลาแตกต่างกัน แล้ววิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยแผ่นเจลอะกาโรสตามขั้นตอนที่ 3.7.8.3 ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่าง Bp-4w Bp-8w และ Bp-12w ไม่มีความแตกต่างกัน จึงสุ่มหยิบตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (Bp-1 ถึง Bp-7) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์อีกครั้ง หลังจากนั้นจึงนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยแผ่นเจลอะกาโรสตามขั้นตอนที่ 3.7.8.3 อีกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง

สารเคมี	**ความเข้มข้นเริ่มต้น**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**
Template DNA	50 ng	50 ng	2
PCR buffer	10X	1X	2.5
dNTP mix	100 mM	1.25 mM	4
Taq DNA polymerase	5000U	1U	0.2
Primer	100 pmol	10 pmol	1
H_2O			15.3
ปริมาตรรวม			25

ตารางที่ 3.5 แสดงสภาวะในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของแต่ละไพรเมอร์ (Ahmad *et al*., 2020)

ลำดับที่	**ไพรเมอร์ (primer)**	**ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)**				
		Pre - denaturation	**Denaturation**	**Annealing**	**Extension**	**Final extension**
1	UBC 814	94° C 5 นาที	94° C 1 นาที	45° C 1 นาที	72° C 2 นาที	72° C 10 นาที
2	UBC 834					
3	UBC 847					
4	UBC 855					
5	UBC 880					
6	UBC 824	94° C 5 นาที	94° C 1 นาที	50° C 1 นาที	72° C 2 นาที	72° C 10 นาที
7	UBC 825					
8	UBC 836					
9	UBC 844					

3.7.8.3 การตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

หลังจากได้ผลผลิตดีเอ็นเอแล้วจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ในขั้นตอนที่ 3.7.8.2 จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งใช้ผลผลิตดีเอ็นเอ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 3X Loading dye

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ด้วยแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (VC 100 bp) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 ถึง 45 นาที จากนั้นย้อมแผ่นเจลอะกาโรสด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำกลั่น 10 นาที เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออก จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพสารพันธุกรรม (Gel documentation)

3.7.8.4 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ

หลังจากนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพสารพันธุกรรม (Gel documentation) ในขั้นตอนที่ 3.7.8.3 แล้ว นำภาพถ่ายแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น มานับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยบันทึกขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบจากดีเอ็นเอมาตรฐาน (VC 100 bp) บันทึกจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน บันทึกจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน จากนั้นนำไปคำนวณร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.12)$$

$$\text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.13)$$

หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน} = 100 - \text{ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน} \quad (3.14)$$

3.7.9 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิธีการคำนวณ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบโดยใช้วิธี Duncan’s multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistics Package for the Social Sciences) เวอร์ชั่น 29 (IBM SPSS Statistics program version 29) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเมล็ดชงโค

หลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดชงโคตามขั้นตอนที่ 3.7.3.1 และทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดชงโคโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ที่ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการงอกของเมล็ดเท่ากับ ร้อยละ 100 และ GA_3 ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการงอกของเมล็ดเท่ากับ ร้อยละ 93.33 ในขณะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีร้อยละการงอกของเมล็ดเท่ากับ ร้อยละ 80 (ตารางที่ 4.1) แต่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสังเกตเห็นการเจริญของเมล็ดได้อย่างชัดเจนในวันที่ 3 ในขณะที่ GA_3 ความเข้มข้น 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถสังเกตการเจริญของเมล็ดได้อย่างชัดเจนในวันที่ 4 และ วันที่ 5 ในส่วนของการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า สามารถสังเกตการเจริญของเมล็ดได้ในวันที่ 7 นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 71.14 มิลลิเมตร ในขณะที่เมื่อนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า ความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 55.05 60.80 และ 63.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีความยาวยอดเฉลี่ยเพียง 48.90 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1) ซึ่งลักษณะยอดที่งอกมาจากเมล็ดจะมีสีเขียว สมบูรณ์ โดยยอดแรกเกิดมีความยาวค่อนข้างสูง แต่ละเมล็ดจะมียอดงอกออกมาเพียงเมล็ดละ 1 ยอดเท่านั้น รากที่เกิดมีสีขาวค่อนข้างยาว มีลักษณะหนา แตกแขนงและมีขนรากเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.1) ซึ่งงานวิจัยของ Gupta และ Chakrabarty (2013) ที่ศึกษากลไกการทำงานของกรดจิบเบอริลลิก (GA_3) ในพืชพบว่า GA_3 มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและกลไกต่างๆของพืช เช่น การงอกของเมล็ด การยืดของลำต้น การพัฒนาเนื้อเยื่อและอวัยวะรวมทั้งยังทำลายการพักตัวของเมล็ดอีกด้วย นอกจากนี้ความเข้มข้นของ GA_3 ยังมีผลต่อการงอกของเมล็ดเมื่อความเข้มข้นของ GA_3 เหมาะสมต่อชนิดของพืช ส่งผลให้การพักตัวของเมล็ดลดลง และกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการชักนำการเจริญเติบโตของเมล็ดชงโค หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	จำนวนเมล็ดที่งอก	ร้อยละการงอกของเมล็ด	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Control	0	45	36	80.00	$48.90^{e}\pm0.507$
GA_3	1.0	45	42	93.33	$55.05^{d}\pm0.552$
	2.0	45	45	100.00	$60.80^{c}\pm0.483$
	3.0	45	45	100.00	$71.14^{a}\pm0.528$
	4.0	45	45	100.00	$63.17^{b}\pm0.321$

หมายเหตุ 1/ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 เมล็ด

2/ ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3/ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan’s multiple range test

รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเมล็ดชงโคที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 ผลการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างชงโค

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างชงโคทั้ง 6 วิธี โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ ร้อยละ 64 ในขณะที่วิธีที่ 2 คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และใช้สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ซึ่งมีการปนเปื้อนน้อยกว่าวิธีที่ 1 โดยชิ้นส่วนตาข้างมีร้อยละการรอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวิตเพิ่มขึ้นเท่ากับ ร้อยละ 68 จากการทดลองวิธีที่ 3 คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และใช้สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที พบว่า มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ลดลง และชิ้นส่วนตาข้างเริ่มมีการเกิดสีน้ำตาลไหม้ มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ ร้อยละ 72 และเมื่อทำการทดลองวิธีที่ 4 คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์น้อยลง แต่ยังมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อยู่ ไม่พบการเกิดสีน้ำตาลบริเวณชิ้นส่วนตาข้าง และมีร้อยละการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเท่ากับ ร้อยละ 84 ทำการทดลองด้วยวิธีที่ 5 คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และใช้สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ลดลงมาก และไม่พบการเกิดสีน้ำตาลบนชิ้นส่วนตาข้าง และมีร้อยละการรอดชีวิตมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 92 และวิธีที่ 6 คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และใช้สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด แต่ชิ้นส่วนตาข้างเกิดสีน้ำตาลเป็นจำนวนมาก และชิ้นส่วนตาข้างไม่มีการเจริญเติบโตต่อ มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ ร้อยละ 68 จากผลการทดลองพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างของชงโคคือ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างชงโคด้วยวิธีการที่ 5 ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดคือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ ร้อยละ 92 (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sirimat และ Sakulsathaporn (2019) ที่พบว่า สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อต้น *Phanera sirindhorniae* มากที่สุด นอกจากนี้งานวิจัยของ Block (2001) ได้กล่าวไว้ว่า สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆทั้ง แบคทีเรีย โปรโตซัว ไวรัส และอื่นๆได้อย่างรวดเร็วด้วยวิธีการทำลายเอนไซม์ ดีเอ็นเอ และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งได้มีการนำไปใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อพืชอีกหลากหลายชนิด และยังถูกใช้อย่างกว้างขวางอีกด้วย นอกจากนี้สารละลายที่มีความสำคัญอีกหนึ่งชนิดคือ สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ซึ่งงานวิจัยของ Yadav และ Singh (2011) พบว่า สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชของต้น *Albizia lebbeck* มากที่สุด และพบว่านอกจากสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์เป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพแล้วยังสามารถช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างชงโคด้วยวิธีการต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การทดลอง	จำนวนตาข้างที่ทดลอง (ชิ้น)	จำนวนตาข้างที่รอดชีวิต (ชิ้น)	ร้อยละการรอดชีวิต
วิธีการที่ 1	50	32	64
วิธีการที่ 2	50	34	68
วิธีการที่ 3	50	36	72
วิธีการที่ 4	50	42	84
วิธีการที่ 5	50	46	92
วิธีการที่ 6	50	34	68

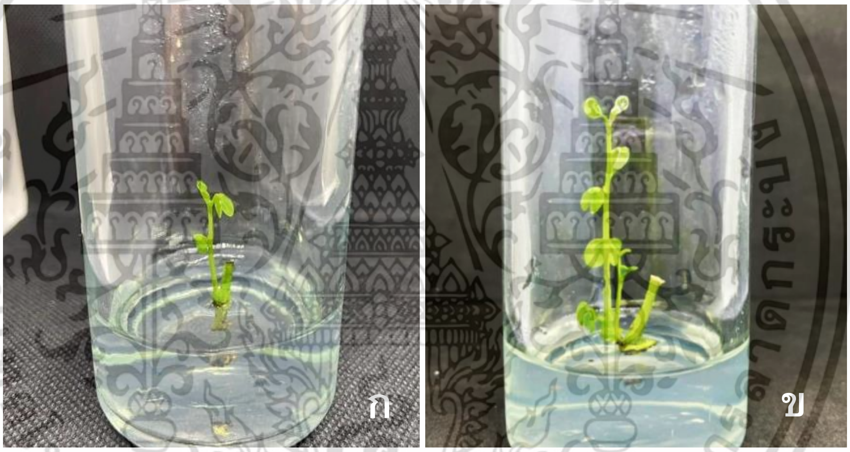
หมายเหตุ กำหนดเกณฑ์การบันทึกผลการรอดชีวิตคือ ชิ้นส่วนตาข้างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และมีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง มีสีเขียวสด หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

4.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างชงโค

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนตาข้างที่นำมาทดลองจาก 2 แหล่ง คือ ชิ้นส่วนตาข้างจากต้นเริ่มต้นภายนอกหลอดทดลองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ และชิ้นส่วนตาข้างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดภายในหลอดทดลอง โดยนำชิ้นส่วนตาข้างจากทั้ง 2 แหล่ง มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP หรือ Kn ที่ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 24.27±0.984 มิลลิเมตร ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2) ในขณะที่ชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ความเข้มข้น 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 17.90±0.968 14.90±0.511 และ 11.95±0.847 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ที่ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 18.23±0.403 12.04±0.493 9.20±0.525 และ 7.48±0.615 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ในขณะที่จำนวนยอดเฉลี่ยที่สูงที่สุดเท่ากับ 2.07±0.799 ยอดต่อชิ้นส่วนตาข้าง ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นกัน ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นอื่นๆมีจำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.3) และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 5.38±0.731 มิลลิเมตร และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 1 ยอดต่อชิ้นส่วนตาข้าง (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้พบว่า ยอดที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วย BAP มีการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่ายอดที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วย Kn ลักษณะยอดที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วย BAP มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง มีสีเขียว เกิดแคลลัสเล็กน้อยบริเวณฐาน และยอดมีขนาดใหญ่กว่ายอดที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วย Kn ซึ่งการทดลองนี้ได้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Borthakur และคณะ (2012) ที่ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของต้น *Albizzia chinensis* พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงตาข้างบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินเป็นปัจจัยสำคัญอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาให้เกิดยอดในพืช โดยพืชแต่ละชนิดมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินในปริมาณที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย (ก) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ (ข) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BAP หรือ Kn ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ตาข้าง)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)
Control	0	1.00^{b}±0.000	5.38^{g}±0.731
BAP	1.0	2.07^{a}±0.799	24.27^{a}±0.984
	2.0	1.20^{b}±0.414	17.90^{b}±0.968
	3.0	1.13^{b}±0.352	14.90^{c}±0.511
	4.0	1.07^{b}±0.258	11.95^{d}±0.847
Kn	1.0	1.20^{b}±0.414	18.23^{b}±0.403
	2.0	1.13^{b}±0.352	12.04^{d}±0.493
	3.0	1.07^{b}±0.258	9.20^{e}±0.525
	4.0	1.00^{b}±0.000	7.48^{f}±0.615

หมายเหตุ 1/ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ชิ้น

2/ ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3/ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan’s multiple range test

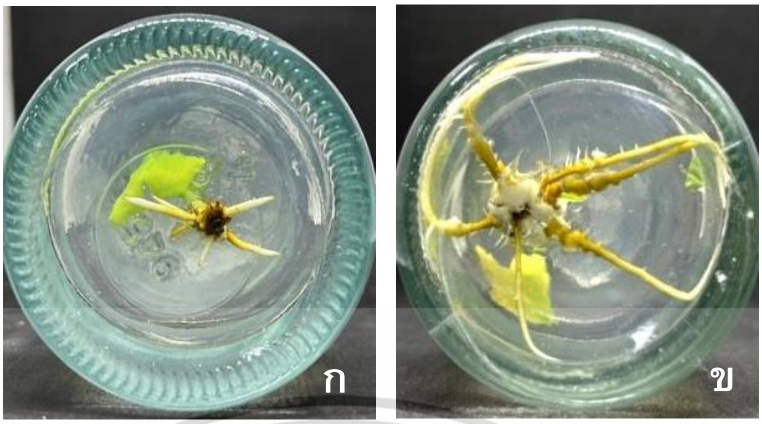
4.4 ผลการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดราก

จากการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดรากของชงโคโดยทำการคัดเลือกยอดเกิดใหม่ที่ได้จากขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอด ที่มีสภาพสมบูรณ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 0.25 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีรากใหม่เกิดขึ้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ แต่ไม่พบการงอกของรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA หรือ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมทั้งอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหาร (subculture) และเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่า ยอด ลำต้นและใบอ่อนที่เกิดจากการชักนำยอดเริ่มมีสีเหลือง ลำต้นและใบอ่อนเริ่มเหี่ยว และเริ่มร่วง ในทางกลับกัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้น 0.25 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ร้อยละการเกิดรากมีค่ามากที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 100 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และร้อยละการเกิดรากเท่ากับ ร้อยละ 84 และ ร้อยละ 70 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้น 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 33.45±0.401 มิลลิเมตร และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.60±0.737 รากต่อยอด (รูปที่ 4.3) ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 26.94±0.131 มิลลิเมตร มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 2.53±0.743 รากต่อยอด และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 24.66±0.412 มิลลิเมตร และจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 2.40±0.910 รากต่อยอด (ตารางที่ 4.5) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Borthakur และคณะ (2012) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงต้น *Albizzia chinensis* บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ให้ร้อยละการเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด และแตกต่างจากงานวิจัยของ Upreti และ Dhar (1996) ที่พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงต้น *Bauhinia vahlii* บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ให้ร้อยละการเกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด จากงานวิจัยต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า ในพืชแต่ละชนิดมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันตามที่งานวิจัยของ Abdullahil และคณะ (2010) ที่กล่าวไว้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆในกลุ่มออกซิน เช่น IAA NAA และ IBA มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเกิดรากในพืชที่แตกต่างกันไป เมื่อศึกษาพืชในวงศ์ (Family) และสกุล (Genus) เดียวกันแต่สายพันธุ์ (Species) ต่างกัน ผลการทดลองย่อมมีความแตกต่างกันได้ เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความต้องการชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และ (ข) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการชักนำยอดให้เกิดรากหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเกิดราก
Control	0	0
IAA	0.25	100.00
	0.50	84.44
	1.00	68.88
IBA	0.25	0
	0.50	0
	1.00	0
NAA	0.25	0
	0.50	0
	1.00	0

หมายเหตุ 1/ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ชิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดรากของชงโคหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความยาวรากเฉลี่ย (มิลลิเมตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก)
Control	0	0	0
IAA	0.25	33.45^{a}±0.401	3.60^{a}±0.737
	0.50	26.94^{b}±0.131	2.53^{b}±0.743
	1.00	24.66^{c}±0.412	2.40^{b}±0.910

หมายเหตุ [1/] ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ชิ้น
[2/] ค่าเฉลี่ย ± SE แสดงจากการทดลอง 3 ซ้ำ
[3/] ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test

4.5 ผลการศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อน

หลังจากได้ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดในข้อที่ 4.3 และการชักนำยอดให้เกิดรากในข้อที่ 4.4 แล้ว ทำการคัดเลือกต้นอ่อนที่มียอด ลำต้น และรากที่สมบูรณ์แข็งแรงมาล้างทำความสะอาดให้ปราศจากวุ้น จากนั้นแช่ต้นอ่อนลงในสารละลายยากำจัดเชื้อรา ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้ย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติกที่ประกอบไปด้วยดินและเพอร์ไลท์ ในอัตราส่วน 2:1 คลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรู 3 ถึง 5 รู และนำไปเพาะเลี้ยงในที่ร่มเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ รดน้ำต้นอ่อนด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาลตลอดการเพาะเลี้ยงพบว่า ร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนเท่ากับ ร้อยละ 73.33 (รูปที่ 4.4) เมื่อปลูกในดินที่ผสมเพอร์ไลท์ ในอัตราส่วน 2:1 ซึ่งต้นอ่อนที่รอดชีวิตจะมีลักษณะสมบูรณ์ และมีสีเขียว นอกจากนี้พบว่ามีต้นอ่อนบางส่วนเริ่มมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และต้นอ่อนบางต้นที่บริเวณใบเริ่มเหี่ยวและเริ่มมีสีเหลือง หลังจากปรับสภาพเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในขณะที่ต้นอ่อนส่วนใหญ่เริ่มมีการเจริญเติบโตเล็กน้อย ซึ่งงานวิจัยของ Thonnalak และคณะ (2012) พบว่าต้นอ่อนของ *B. vahlii* มีร้อยละการรอดชีวิตมากที่สุดเมื่อปรับสภาพด้วยพีทมอส ส่วนงานวิจัยของ Dhar และคณะ (1999) พบว่าอัตราส่วนของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกต้นอ่อนของ *B. vahlii* คือ ดินที่ผสมด้วยเวอร์มิคูไลท์ในอัตราส่วน 1:1 และงานวิจัยของ Bhatt และคณะ (2000) พบว่าอัตราส่วนของวัสดุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลูกที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกต้นอ่อนของ *B. vahlii* คือ soil rite ดิน และทราย ในอัตราส่วน 2:1:1

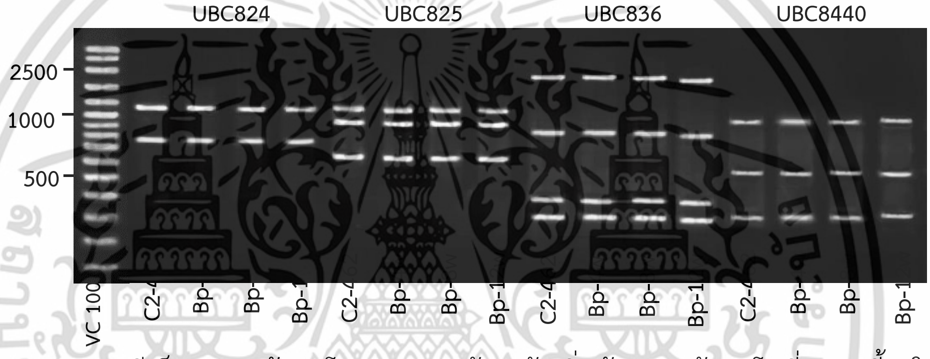
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของต้นอ่อนชงโคเมื่อปรับสภาพในกระถางพลาสติกที่ประกอบไปด้วยดินและเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 2:1 คลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรู และนำไปเพาะเลี้ยงในที่ร่มเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

4.6 ผลการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

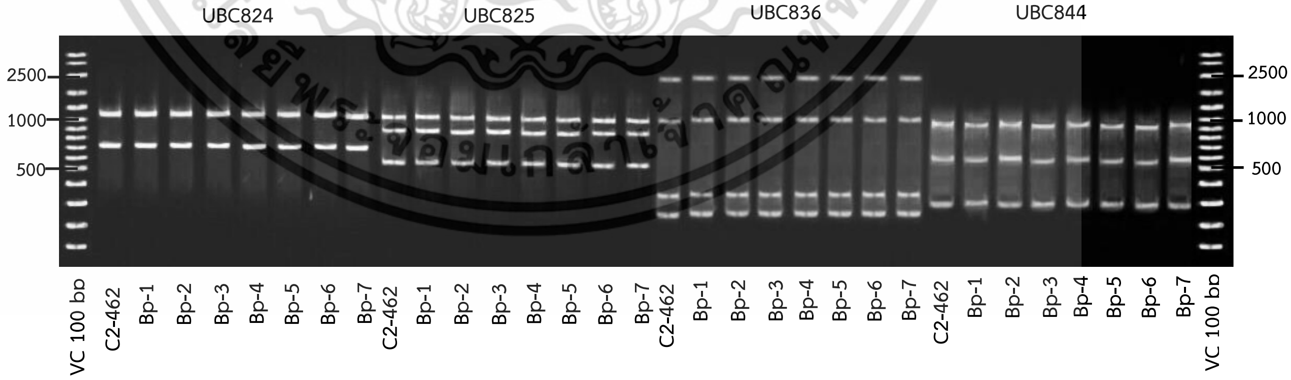
ผลการศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของตัวอย่างต้นชงโคเริ่มต้น (C2-462) และสุ่มตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ (Bp-4w Bp-8w และ Bp-12w) อย่างละ 1 ตัวอย่างกับไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวน 9 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814 UBC824 UBC825 UBC834 UBC836 UBC844 UBC847 UBC855 และ UBC880 เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันในทุกไพรเมอร์ (รูปที่ 4.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าตัวอย่างต้นชงโคในหลอดทดลองจะมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน แต่ไม่มีการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเลย จึงคัดเลือกต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์มาเป็นตัวอย่างในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมซ้ำอีกครั้ง โดยทำการสุ่มตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ Bp-1 Bp-2 Bp-3 Bp-4 Bp-5 Bp-6 และ Bp-7 มาตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์กับไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 40 แถบ มีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 250 ถึง 2400 คู่เบส โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic band) จำนวน 40 แถบ คิดเป็นร้อยละ 100 และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันเฉลี่ยเท่ากับ 4.44 แถบ ซึ่งแสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละคู่ไพรเมอร์ดังตารางที่ 4.6 และลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมกับไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอร์ทั้งหมดจำนวน 9 ไพรเมอร์ แสดงดังรูปที่ 4.6 และรูปที่ 4.7 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ahmad และคณะ (2021) ที่ใช้ไพรเมอร์ UBC825 UBC834 UBC836 UBC847 และ UBC855 ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และใช้ขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนั้นมีลักษณะไม่แตกต่างกัน (monomorphic) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lau และคณะ (2005) ที่มีการใช้ไพรเมอร์ UBC834 และ UBC844 ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ดังนั้นงานวิจัยข้างต้นสามารถนำขั้นตอนวิธีการ และไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงภายในหลอดทดลองสำหรับการศึกษานี้ได้อีกด้วย

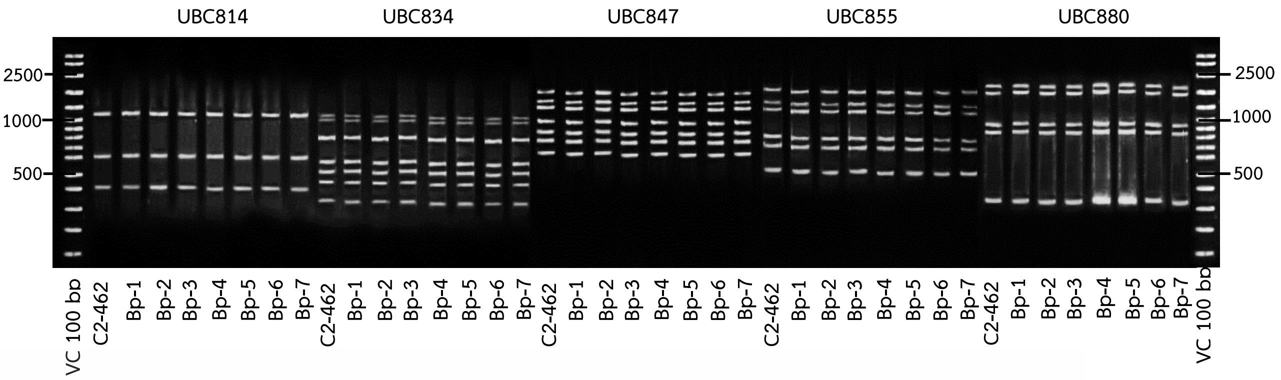


รูปที่ 4.5 แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชงโค ประกอบด้วย ต้นเริ่มต้น และต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ UBC824 UBC825 UBC836 และ UBC844



รูปที่ 4.6 แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชงโค ได้แก่ ต้นเริ่มต้น และต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ที่อุณหภูมิ Annealing 50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงแถบดีเอ็นเอของต้นชงโค ได้แก่ ต้นเริ่มต้น และต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ที่อุณหภูมิ Annealing 45 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน
UBC814	400-1250	0	3	3	100
UBC824	700-1200	0	2	2	100
UBC825	550-1000	0	3	3	100
UBC834	320-1100	0	7	7	100
UBC836	250-2400	0	4	4	100
UBC844	300-950	0	3	3	100
UBC847	650-1900	0	7	7	100
UBC855	500-1900	0	6	6	100
UBC880	320-2100	0	5	5	100
รวม		0	40	40	
เฉลี่ย		0	4.44	4.44	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเจริญของเมล็ดชงโคพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการงอกของเมล็ดมากที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 100 แต่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสังเกตการเจริญของเมล็ดได้อย่างชัดเจนในวันที่ 3 ในขณะที่ GA_3 ความเข้มข้นอื่นๆสามารถสังเกตได้ในวันที่ 4 ถึง 5 นอกจากนี้เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วย GA_3 ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังมีความยาวยอดเฉลี่ยของต้นอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 71.14 มิลลิเมตร ซึ่งต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดมีลักษณะสูงยาว ลักษณะสมบูรณ์มีสีเขียว และไม่พบการเกิดสีน้ำตาลบริเวณต้นอ่อน

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างของชงโคเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาข้างของชงโคมากที่สุด ซึ่งชิ้นส่วนตาข้างของชงโคมีร้อยละการรอดชีวิตมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 92 นอกจากนี้พบว่าชิ้นส่วนตาข้างมีลักษณะสมบูรณ์ และมีสีเขียว ในขณะที่การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ลดลงมาก และไม่พบการเกิดสีน้ำตาลบนชิ้นส่วนตาข้างของชงโค

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของชงโคพบว่า ชิ้นส่วนตาข้างของชงโคที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตได้ดี ลักษณะยอดสมบูรณ์ และมีค่าความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 24.27 มิลลิเมตร และมีจำนวนยอดเฉลี่ยที่สูงที่สุดเท่ากับ 2.07 ยอดต่อชิ้นส่วนตาข้าง อีกทั้งยังพบว่า ยอดที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP มีการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่ายอดที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ซึ่งลักษณะยอดที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง มีสีเขียว และยอดที่เกิดใหม่มีขนาดใหญ่กว่าการเพาะเลี้ยงด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn

จากการศึกษาการชักนำยอดให้เกิดรากของชงโคพบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีรากใหม่เกิดขึ้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ และไม่พบการงอกของรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ และอาหารสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อโดยทำการเปลี่ยนอาหาร (subculture) พบว่า ยอด ลำต้นและใบอ่อนเริ่มมีสีเหลือง ลำต้นและใบอ่อนเริ่มเหี่ยว และใบอ่อนเริ่มร่วง ในทางกลับกัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า ร้อยละการเกิดรากมีค่ามากที่สุดเท่ากับร้อยละ 100 และมีค่าความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 33.45 มิลลิเมตร และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.60 รากต่อยอด

จากการศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อนพบว่า พบว่า ร้อยละการรอดชีวิตของต้นอ่อนเท่ากับร้อยละ 73.33 เมื่อปลูกในดินที่ผสมเพอร์ไลท์ ในอัตราส่วน 2:1 ซึ่งต้นอ่อนที่รอดชีวิตจะมีลักษณะสมบูรณ์ และมีสีเขียว นอกจากนี้พบว่ามีต้นอ่อนบางส่วนเริ่มมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และต้นอ่อนบางต้นที่บริเวณใบเริ่มเหี่ยวและเริ่มมีสีเหลือง หลังจากปรับสภาพเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในขณะที่ต้นอ่อนส่วนใหญ่เริ่มมีการเจริญเติบโตเล็กน้อย

จากการศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงภายในหลอดทดลองด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยเริ่มจากตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ที่ได้จากการสุ่มกับต้นเริ่มต้นภายนอกหลอดทดลอง พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic band) ในทุกไพรเมอร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในกรณีนี้ตัวอย่างต้นชงโคที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน แต่ไม่มีการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเลย จากนั้นจึงนำต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มาเป็นตัวอย่างในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมอีกครั้ง โดยทำการสุ่มตัวอย่างต้นชงโคที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์กับไพรเมอร์ จำนวน 9 ไพรเมอร์อีกครั้ง พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 40 แถบ โดยขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 250 ถึง 2400 คู่เบส โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic band) จำนวน 40 แถบ คิดเป็นร้อยละ 100 และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันเฉลี่ยเท่ากับ 4.44 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ต้นชงโคที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองไม่พบการแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับต้นชงโคเริ่มต้นหลังจากตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR) โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวน 9 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814 UBC824 UBC825 UBC834 UBC836 UBC844 UBC847 UBC855 และ UBC880

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบของต้นชงโคเพิ่มเติม เพื่อนำไปต่อยอดการเพิ่มปริมาณของต้นชงโค หรือนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิในอนาคต

5.2.2 ควรศึกษาส่วนประกอบของวัสดุปลูกในขั้นตอนการนำต้นอ่อนออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอกเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มโอกาสในการเจริญเติบโตของต้นอ่อนชงโคให้มากขึ้น

5.2.3 ในการศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบให้มากขึ้น เพื่อเป็นการเพิ่มความแม่นยำให้ผลการทดลอง

5.2.4 ควรศึกษาการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชงโคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นๆเพิ่มเติมเพื่อเป็นการเพิ่มความแม่นยำในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ เฉนียง และคณะ. 2560. “การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยจากลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์.” หน้า 687-692. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 3.** พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

จันทร์วิภา รัตนอานันต์. 2567. **การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. [Online]. Available : https://www3.rdi.ku.ac.th/cl/knowledge/2564/surface_sterilization.pdf.

จีรานันท์ ดงบัง, รุ่งอรุณ นาบำรุง, ฉันทนา เคนศรี และวิไลลักษณ์ สุดวิไล. 2564. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเสาวรส ในอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์.” หน้า 170-178. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และนวัตกรรม ครั้งที่ 3 ประจำปี 2564.** เลย : คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย.

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552. **มหัศจรรย์ของดีเอ็นเอ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พีระพล ใสสะอาด, วรรณชัย ชาแท่น และสุธิรา มณีฉาย. 2558. “ความหลากหลายของพืชสกุลชงโค (*Bauhinia* L.) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.” *SDU Research Journal*. 8(2) : 87-115.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุจิรา รักราวี, อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, แก้วนภา กิตติบรรพชา และปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์. 2561. “การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดอ่อนให้เจริญเป็นต้นใหม่และการชักนำข้อให้เกิดยอดของต้นรักใหญ่ รหัสสายพันธุ์ 005Glabar (*Gluta usitata* (Wall.) Ding Hou) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.” *Agricultural Science Journal*. 49(2)(ฉบับพิเศษ) : 309-312.

วิชัย บุญแสง อัญชลี ทัศนาขจร ชัยณรงค์ ธีรทรัพย์ นุสรา สิทธิดิลกรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2541. **จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล.** กรุงเทพฯ : สำนักพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. อุดรธานี : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

สถาพร สุขจิตร ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และนฤมล เข็มกลัดเงิน. 2562. “การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนดระหวางปทุมมาและกระเจียว.” *Thai Journal of Science and Technology*. 8(3) : 287-299.

สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์. 2547. “สูตรอาหารและความเข้มข้นสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกแคลลัส Stylosanthes hamata cv. Verano เพื่อใช้ในการถ่ายยีน.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์ ปิยะวดี เจริญวัฒนะ คำรพ รัตนสุต และอรุโณทัย ซาววา. 2557. “การใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอ.” *แก่นเกษตร.* 42(3) : 210-215.

สุธิรา มณีฉาย และประสบอร รินทอง. 2559. “ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากดอกชงโค อัญชัน เข็มฝรั่งและพู่จอมพล.” *J Sci Technol MSU.* 36(2) : 148-153.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และสุมาลี พิมพันธุ์. 2562. “การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์.” *แก่นเกษตร.* 48(3) : 567-574.

สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2567. **ต้นชงโค.** [Online]. Available : https://forprod.forest.go.th/forprod/techtransfer/document/.pdf.

หัทยา กาก็วงศ์. 2548. **อณูพันธุศาสตร์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : บุญไชยการพิมพ์.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : วี.เจ. พริ้นติ้ง.

อรดี สหวัชรินทร์. 2542. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ahmad, A. Ahmad, N. Anis, M Alatar, A.A. Abdel-Salam, E.A. Qahtan, A.A. and Faisal, M. 2020. “Gibberellic Acid and Thidiazuron Promote Micropropagation of an Endangered Woody Tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) Using *In Vitro* Seedlings.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* (2021)144 : 449-462.

Akhter, S. Rahman, M.S.M. and Rahman, H. 2012. “Micropropagation of *Bauhinia acuminata* L.” *International Research Journal of Applied Life Sciences*. 1(3) : 35-43.

Arya, S. Rathi, N. and Arya, I.D. 2009. “Micropropagation Protocol for *Glycyrrhiza glabra* L.” *International Journal of Plant Morphology.* 59(1&2) : 71-76.

Belaid, Y. Chtourou-Ghorbel, N. Marrakchi, M. and Trifi-Farah, N. 2005. “Genetic Diversity within and between Populations of *Lathyrus genus* (Fabaceae) Revealed by ISSR Markers.” *Genetic Resources and Crop Evolution.* (2006)53 : 1413-1418.

Borthakur, A. Das, S.C. Kalita, M.C. and Sen, P. 2012. “An *in vitro* Plant Regeneration System for Conservation of the Leguminous Tree *Albizzia chinensis* (Osbeck) Merr.” *Pelagia Research Library.* (3)3 : 1727-1732.

Dhyani, N. and Gupta, A. 2016. “Nutritional Composition of Dehydrated Kachnar Leaves (*Bauhinia purpurea*) Powder.” *International Journal of Home Science*. 2(2) : 363-364.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gutierrez, I.E.M. Nepomuceno, C.F. Ledo, C.A.S. and Santana, J.R.F. 2010. "Micropropagation and Acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an Important Medicinal Plant)" *African Journal of Biotechnology*. 10(8) : 1353-1358.

Hien, T.T.V and Phong, D.T. 2012. "Genetic Diversity among Endangered Rare *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae) Genotypes in Vietnam Revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers." *African Journal of Biotechnology*. 11(35) : 8632-8644.

Jaime, A. 2013. "A Review of the *In Vitro* Propagation of *Bauhinia* spp." *Journal of Horticultural Research*. 21(1) : 39-47.

Julie Richard. 2015. **Use of PPM in the SASRI Tissue Culture Laboratory.** [Online]. Available : http://www.ppm4plant-tc.com/testimonials-02.htm.

Khare, CP. 2004. "Encyclopaedia of Indian Medicinal Plant." *New York: Springer – Verlag Berlin Heidelburg*. 95-96.

Kumar, A. 1992. "Micropropagation of a Mature Leguminous Tree - *Bauhinia purpurea*." *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 31: 257-259.

Li, J.J. Wu, Y.M. Wang, T. and Lui, J.X. 2009. "*In Vitro* Direct Organogenesis and Regeneration of *Medicago sativa*." *International Journal for Experimental Botany*. 53(2) : 325-328.

Lau, P.Y.C. Ramsden, L and Saunders, M.K.R. 2005. "Hybrid Origin of "*Bauhinia Blakeana*" (Leguminosae: Caesalpinioideae), Inferred Using Morphological, Reproductive, and Molecular Data." *American Journal of Botany*. 92(3) : 525-533.

Mechanda, S.M. Baum, B.R. Johnson, D.A. and Arnason, J.T. 2003. "Direct Shoot Regeneration from Leaf Segments of Mature Plants of *Echinacea purpurea* (L.) moench." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 39 : 505-509.

Mousa, N. Siaguru, P. Wiryowidagdo, S. and Wagih, M.E. 2006. "Rapid Clonal Propagation of Licorice (*Glycyrrhiza Glabra*) by *in vitro* Shoot Culture." *International Journal of Sugar Crops and Related Industries*. 8(4) : 292-298.

Murashike, T. and Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures." *Journal of Plant Physiology*. 15 : 473-497.

Nosrati, H. Feizi, M.H. Razban-Haghighi, A. and Seyed-Tarrah, S. 2015. "Impact of Life History on Genetic Variation in *Trifolium* (Fabaceae) Estimated by ISSR." *Environmental and Experimental Biology*. 13(1) : 83-88.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Obisesan, I.A. Sakpere, A.M.A. Amujoyegbe, B.J. and Akinropo, M.S. 2021. "Explants Selection for *In Vitro* Propagation of *Pachyrhizus erosus* L." *Notulae Scientia Biologicae*. 13(1) : 10844.

Orwa, C. Mutua, A. Kindt, R. Jamnadass, R. and Anthony, S. 2009. **Agroforestree Database:a tree reference and selection guide version 4.0.** [Online]. Available : http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp.

Phong, D.T. Hien, V.T.T Thanh, T.T.V. and Tang, D.V. 2011. "Comparison of RAPD and ISSR Markers for Assessment of Genetic Diversity among Endangered Rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) Genotypes in Vietnam." *Genetics and Molecular Research*. 10(4) : 2382-2393.

Rout, G.R. 2005. "Micropropagation of *Clitoria ternatea* Linn. (Fabaceae) an Important Medicinal Plant." *Society for In Vitro Biology*. 41(1) : 516-519.

Sanghani, J.M. Golakiya, B.A. Dhedhi, K.K. and Patel, S.V. 2015. "Molecular Characterization of Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Genotypes through RAPD, ISSR and SSR Markers." *Legume Research*. 38(4) : 452-456.

Sharma, U. Kataria, V. and Shekhawat, N.S. 2017. "*In Vitro* Propagation, *Ex Vitro* Rooting and Leaf Micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: a Leguminous Tree with Medicinal Values." *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 23(4) : 969-977.

Singh, B.M. Wawrosch, C. Joshi, S.D. and Kopp, B. 2012. "Micropropagation of *Bauhinia variegata* L. from Tissue Culture." *Nepal Journal of Science and Technology*. 13(1) : 39-41.

Singh, B.M. 2014. "Effects of Sugars on *In Vitro* Culture of *Bauhinia purpurea* L." *Nepal Journal of Science and Technology*.15(2) : 47-50.

Singh, B.M. 2019. "Effects of N-Benzyl -9-(2-tetrahydropyranyl and Indole –3-Acetic Acid *In Vitro* Culture of *Bauhinia purpurea* L." *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. 6(3) : 238-242.

Singh, B.M.S. 2020. "Effects of Cytokinin on *In Vitro* Propagation of *Bauhinia variegata* L." *European Journal of Biology and Biotechnology*. 1(6) : 1-4.

Singh, B.M.S. 2020. "Micropropagation of *Bauhinia variegata* L. Through Tissue Culture." *American Journal of Humanities and Social Sciences Research*. 4(9) : 255-258.

Sirimat, S. and Sakulsathaporn, A. 2019. "Optimization of Explant Surface Sterilization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงวันเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Conditions and Multiple Shoot Induction in Threatened Plant *Phanera sirindhorniae*." *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. 6(4) : 263-266.

Tippani, R and Thammidala, C. 2020. "TDZ Induced Plant Regeneration from Immature Cotyledons of *Pterocarpus marsupium* Roxb. and Validation of Genetic Homogeneity using ISSR Markers*." International Journal of Plant Research & Biotechnology*. 2021(34) : 144-152.

Upreti, J. and Dhar, U. 1996. "Micropropagation of *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott- a Leguminous Liana." *Plant Cell Reports*. 16(1) : 250-254.

Vadivel, V. and Biesalski, H.K. 2011. "Role of Purple Camel's Foot (*Bauhinia purpurea* L.) Seeds in Nutrition and Medicine." *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention*. 55(1) : 423-431.

Vijayan, R. Joseph, S and Mathew, B. 2018. "Anticancer, Antimicrobial, Antioxidant, and Catalytic Activities of Green-Synthesized Silver and Gold Nanoparticles Using *Bauhinia purpurea* Leaf Extract." *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 10(1) : 35-49

Yadav, K. and Singh, N. 2011. "Effect of Seed Harvesting Season and Sterilization Treatment on Germination and *in vitro* Propagation of *Albizia lebbeck* (L.) Benth." *Analele University din Oradea - Fascicula Biologie*. 8(2) : 151-156.

Yadav, Y. Yadav, N. and Kumar, S. 2015. "An Improved Micropropagation and Assessment of Genetic Fidelity in Multipurpose Medicinal Tree, *Acacia auriculiformis*." *The National Academy of Sciences*. 86(4) : 921-929.

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แสดงดังนี้

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_4PO_4	170
ธาตุอาหารรอง	
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
เหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
วิตามินและสารอินทรีย์	
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้สำหรับศึกษาการเจริญเติบโตของเมล็ด การชักนำให้เกิดยอด และการชักนำยอดให้เกิดราก มีวิธีการดังนี้

1. ชั่งอาหารสังเคราะห์สูตร MS ความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร
2. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินหรือไซโทไคนินที่ต้องการศึกษา โดยคำนวณปริมาตรสารควบคุมการเจริญเติบโต จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

3. ปรับค่า pH ของอาหารให้มีค่า pH อยู่ระหว่าง 5.6 ถึง 5.8
4. เติมผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันจนวุ้นละลายโดยให้ความร้อน
5. นำแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยแบ่งแต่ละขวดให้มีปริมาตรเท่าๆ กัน
6. นำขวดอาหารที่แบ่งแล้วไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	Tris-base	108	กรัม
	Boric acid	61.83	กรัม
	EDTA	9.305	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับ pH ให้มีค่า 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (สุวิชญา, 2565)

2. การเตรียม 10% CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	CTAB	10	กรัม

ละลายด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (สุวิชญา, 2565)

3. การเตรียม 2X CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียม Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ค่า pH เท่ากับ 8.0 NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ละลายในน้ำกลั่น ทำการผสม CTAB ปริมาณ 2 กรัม Polyvinylpyrolidone (PVP) ปริมาณ 1 กรัม จากนั้นละลายด้วย Tris-Base ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร และ EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (สุวิชญา, 2565)

4. การเตรียม Tris-EDTA (TE) buffer

เตรียม Tris-EDTA (TE) buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยเตรียมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (จันทร์จีรา, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณปริมาตรสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ตัวอย่างการคำนวณปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ

เมื่อต้องการเตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ความเข้มข้น 50 ng/µL ปริมาตร 2 µL โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 288.60 ng/µL

คำนวณได้จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นสุดท้าย

V_1 คือ ปริมาตรเริ่มต้น

V_2 คือ ปริมาตรสุดท้ายที่ต้องการเตรียม

แทนค่า $288.60\ ng/\mu L \times V_1 = 50\ ng/\mu L \times 2\ \mu L$

$V_1 = (50\ ng/\mu L \times 2\ \mu L) / 288.60\ ng/\mu L$

$V_1 = 0.35\ \mu L$

ดังนั้น ต้องดูดสารละลายดีเอ็นเอมา 0.35 µL ผสมกับน้ำกลั่น 1.65 µL เพื่อให้ได้สารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 50 ng/µL ปริมาตร 2 µL

ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย dNTPs

เมื่อต้องการเตรียมสารละลายปริมาตร 200 µL ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25 mM จากความเข้มข้นเริ่มต้น (stock solution) เท่ากับ 100 mM (สารละลาย dNTPs ประกอบด้วยสารละลาย dATP dTTP dGTP และ dCTP ผสมกัน)

คำนวณได้จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นสุดท้าย

V_1 คือ ปริมาตรเริ่มต้น

V_2 คือ ปริมาตรสุดท้ายที่ต้องการเตรียม

แทนค่า $100\ mM \times V_1 = 1.25\ mM \times 200\ \mu L$

$V_1 = (1.25\ mM \times 200\ \mu L) / 100\ mM$

$V_1 = 2.5\ \mu L$

ดังนั้น ต้องดูดสารละลาย dATP dTTP dGTP และ dCTP อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 190 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย dNTPs ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมแผ่นเจลอะกาโรส

การเตรียมแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์สำหรับการตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งผงวุ้นอะกาโรส 0.8 กรัม เทผงวุ้นลงในสารละลาย 1X TBE buffer
2. ละลายผงวุ้นด้วยความร้อน และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 40 มิลลิลิตร
3. เทลงแม่พิมพ์ที่เสียบหวีไว้เพื่อให้เกิดหลุมแล้วทิ้งไว้ให้แผ่นเจลแข็งตัว
4. นำถาดเจลที่ตรียมไว้ไปวางบนเครื่อง แล้วเติมสารละลาย 0.5X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจลพอดี
5. นำดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) และตัวอย่างผลผลิตดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโหลดลงในหลุมเจลเพื่อตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายเป็นโมลาร์

หน่วยโมลาร์ หรือ โมล หมายถึง ในสารละลายปริมาตร 1 ลิตร มีปริมาณเนื้อสารอยู่ 1 กรัมโมล

ตัวอย่างการคำนวณ ถ้าต้องการเตรียม KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.5 โมล

วิธีทำ KH_2PO_4 1 กรัมโมล = 39.0983 + (1.0079x2) + 30.9737 + (15.9994 x 4)

= 136.07 กรัม

KH_2PO_4 0.5 โมล = 136.07 x 0.5 กรัม

= 68.035 กรัม

ดังนั้น ต้องช่างสาร KH_2PO_4 68.035 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1 ลิตร จะได้สารละลาย KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.5 โมล

หรือคำนวณได้จากสูตร

$$\text{โมล} = \frac{\text{ปริมาณเนื้อสาร } (m)}{\text{น้ำหนักโมเลกุล } x \text{ ปริมาตร } (\text{ลิตร})}$$

$$0.5 = \frac{m}{136.07 \times 1.0 \text{ ลิตร}}$$

$$m = 68.035 \text{ กรัม}$$

การเตรียมสารละลายเป็นเปอร์เซ็นต์

สารละลายเป็นหน่วยเปอร์เซ็นต์ หมายถึง ปริมาณส่วนเนื้อสารในสารละลาย 100 ส่วน

ตัวอย่างการคำนวณ ถ้าต้องการเตรียมแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

วิธีทำ คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้น = 95 เปอร์เซ็นต์

C_2 คือ ความเข้มข้นสุดท้าย = 70 เปอร์เซ็นต์

V_1 คือ ปริมาตรเริ่มต้น = ต้องการหา

V_2 คือ ปริมาตรสุดท้ายที่ต้องการเตรียม = 500 มิลลิลิตร

แทนค่า $95 \times V_1$ = 70 x 500 มิลลิลิตร

V_1 = (70 x 500) / 95

V_1 = 368.42 มิลลิลิตร

ดังนั้นต้องใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 368.421 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววิภาดา ทรัพย์อร่าม

วัน เดือน ปีเกิด วันพุธที่ 14 มกราคม พ.ศ.2541

ที่อยู่ปัจจุบัน 276 ซอยร่มเกล้า 27 ถนนร่มเกล้า แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10520

ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. 2563 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปี พ.ศ. 2567 จบการศึกษาระดับปริญญาโท ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ทุนอุดหนุนการศึกษา ประเภททุนยกเว้นค่าธรรมเนียมแบบเหมาจ่าย สำหรับหลักสูตรปริญญาโท เป็นระยะเวลาไม่เกิน 2 ปี

ผลงานทางวิชาการ

1. นำเสนอผลงานวิจัยด้วยการบรรยาย (Oral presentation) ในงาน The 11th International Conference on the Integration of Science and Technology for Sustainable Development 2024 ณ เมืองเจนไน รัฐทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย
2. ตีพิมพ์งานวิจัยในวารสาร International Journal of Agricultural Technology Saparam, W. Poeaim, A. Pongtongkam, P. Chareonsap, P. P. and Poeaim, S. 2024. “Plant Regeneration of *Bauhinia purpurea* by Tissue Culture Technique.” *International Journal of Agricultural Technology*. 20(3) : 1247-1258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้