สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเจริญเป็นต้นใหม่ของมันเทศ

นางสาวจิตรสุภาว์ ธิบูรณ์บุญ

นางสาวจีรภา อาคม

วพ.
QK524
จ54ค

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72604
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

.b 11726932
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genetic diversity and regeneration system of sweet potato *Ipomoea batatas* (L.)

Jitsupa Tiboonboon

Jeerapa A-kom

A Special Project submitted in Partial of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเจริญเป็นต้นใหม่ของมันเทศ	
นักศึกษา	นางสาวจิตรสุภาว์ ธิบูรณ์บุญ	รหัส 46050113
	นางสาวจีรภา อาคม	รหัส 46050116
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเจริญเป็นต้นใหม่ของมันเทศ
นักศึกษา นางสาวจิตรสุภาว์ ธิบูรณ์บุญ
นางสาวจีรภา อาคม
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2549
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร .อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงแคลลัสมันเทศ 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ไข่ กระต่าย พจ 205 พจ 206 พจ 226-24 และพจ 265-1 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรในที่มีแสง สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวได้ และพบว่าสายพันธุ์ พจ 206 ที่ความเข้มข้นของ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวได้มากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์

แคลลัสมันเทศ 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ไข่ กระต่าย พจ 205 และ พจ 206 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรในที่มีแสง สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวได้ทุกสูตร และพบว่าสายพันธุ์ พจ 206 ที่ความเข้มข้นของ BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวได้มากที่สุด คือ 75 เปอร์เซ็นต์

ศึกษาระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยมันเทศ 3 สายพันธุ์ คือ กระต่าย พจ 206 และ พจ 265-1 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สายพันธุ์กระต่ายที่ช่วงเวลา 15-21 วัน สายพันธุ์ พจ 206 ที่ช่วงเวลา 6-18 วัน และสายพันธุ์ พจ 265-1 ที่ช่วงเวลา 15-18 วัน เป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว นำเซลล์แขวนลอยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวทุกสายพันธุ์

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศ 9 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ พจ 65-16 พจ 189-257 พจ 205 พจ 206 พจ 226-24 พจ 226-31 พจ 227-6 พจ 265-1 และ พจ 95040-10 ด้วยวิธี Random Amplified Polymorophic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด OPA-07 OPB-14 OPC-04 OPD-02 และ OPG-13 พบว่า OPA-07 OPB-14 OPC-04 สามารถบอกข้อแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title Genetic diversity and regeneration system of sweet potato *Ipomoea batatas*) L.)

Name Miss Jitsupa Tiboonboon

Miss Jeerapa A-kom

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic Year 2006

Project Advisor Assist. Prof. Dr. Anurug Pocaim

Abstract

Callus of sweet potato were obtained from 6 cultivars Kai, Kratai, PJ 205, PJ 206 PJ 226-24 and PJ 265-1 were subcultured onto MS medium supplemented with varying levels (1, 2, 3 and 4 mg/l) of BA. The cultures were maintained under 16 hours photoperiod. All of treatments resulted in the green spots of callus. The best treatments for the cultivar PJ 206 to produce green spot was 2 mg/l of BA at 100 %

Callus of Kai, Kratai, PJ 205 and PJ 206 were subcultured onto LS medium supplemented with varying levels (1, 2, 3 and 4 mg/l) of BA. The cultures were maintained under 16 hours photoperiod. All of treatments resulted in the green spots of callus. The best treatments for the cultivar PJ 206 to produce green spot was 4 mg/l of BA at 75 %

Growth curve was established from Kratai to select the optimal stage at 15-21 days, PJ 206 to select the optimal stage at 6-18 days and PJ 265-1 to select the optimal stage at 15-18 days for cell active.

Cell suspension which active cell of Kratai, PJ 206 and PJ 265-1 cultured in MS medium supplemented with varying levels (1, 2, 3 and 4 mg/l) of BA. All of treatments resulted in the green spots of callus.

For study of genetic diversity of sweet potato from 9 cultivars PJ 65-16, PJ 189-257, PJ 205, PJ 206, PJ 226-24, PJ 226-31, PJ 227-6, PJ 265-1 and PJ 95040-10 by RAPD techniques. The primers OPA-07, OPB-14, OPC-04, OPD-02 and OPG-13. The resulted show that OPA-07, OPB-14 and OPC-04 can separate the different of sweet potato genetics.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้โอกาส คำแนะนำแนวทางในการค้นคว้าวิจัย การทำวิจัย การเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์และการให้คำแนะนำปรึกษาทุกๆอย่าง ไม่ว่าจะเป็นเรื่องใดก็ตามตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง สำหรับโอกาส ความรัก คำแนะนำ และกำลังใจในการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายขอขอบพระคุณอาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเพื่อนทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ให้คำปรึกษา การสนับสนุน ช่วยเหลือรวมทั้งเป็นกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

นางสาวจิตรสุภาว์ ธิบูรณ์บุญ
นางสาวจีรภา อาคม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... จ
สารบัญรูป..... ช
บทที่ 1 บทนำ..... 1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ..... 3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 32
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง..... 39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 73
เอกสารอ้างอิง..... 75
ภาคผนวก..... 78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของมันเทศโดยเทคนิค RAPD.....37
4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....41
4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์กระต่าย ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....43
4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....46
4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....49
4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....52
4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ กระต่าย ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....54
4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 205 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....56
4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....58
4.9 น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์กระต่าย.....61
4.10 น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์ พจ 206.....62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.11 น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1.....63
4.12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....66
4.13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....67
4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ กระต่าย ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ต้นและดอกของมันเทศ....3
2.2 หัวมันเทศ....4
2.3 แคลลัส....15
2.4 การทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสแยกขนาด DNA....25
2.5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส....26
2.6 การทำเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ภายนอกเซลล์....27
2.7 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD....29
4.1 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ไข่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....40
4.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....41
4.3 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์กระต่าย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....42
4.4 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ กระต่ายที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....43
4.5 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 205 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....44
4.6 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 206 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....45
4.7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....46
4.8 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 226-24 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.9 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 265-1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....48
4.10 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....49
4.11 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ไข่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....51
4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....52
4.13 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ไข่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....53
4.14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ กระต่ายที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....54
4.15 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 205 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....55
4.16 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 205 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....56
4.17 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 206 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....57
4.18 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมลิตร.....58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.19 เซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2, 4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ของมันเทศสายพันธุ์ต่างๆ....60
4.20 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยมันเทศพันธุ์กระต่าย โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง....61
4.21 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยมันเทศพันธุ์ พจ 206 โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง....62
4.22 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยมันเทศพันธุ์ พจ 265-1 โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง....63
4.23 การพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ของมันเทศสายพันธุ์ต่างๆ....65
4.24 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....66
4.25 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....67
4.26 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ กระต่าย ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร....68
4.27 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 265-1 (2) พจ 226-24 (3) พจ 95040-10 (4) พจ 227-6 (5) พจ 226-31 (6) พจ 65-16 (7) พจ 189-257 (8) พจ 205 และ (9) พจ 206....70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.28 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPB-14 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 206 (5) พจ226-24 (6) พจ 226-31 (7) พจ 227-6 (8) พจ 265-1 และ (9) พจ 95040-10.....70

4.29 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPC-04 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 206 (5) พจ226-24 (6) พจ 226-31 (7) พจ 227-6 (8) พจ 265-1 และ (9) พจ 95040-10.....71

4.30 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPD-02 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 206 (5) พจ226-24 (6) พจ 226-31 (7) พจ 227-6 (8) พจ 265-1 และ (9) พจ 95040-10.....71

4.31 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPG-13 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 205 (5) พจ 206 (6) พจ 226-24 (7) พจ 226-31 (8) พจ 227-6 (9) พจ 265-1 และ (10) พจ 95040-10.....72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

มันเทศจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ภาครัฐและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้ส่งเสริมและมีการสนับสนุนให้มีการเพาะปลูก เนื่องจากมันเทศเป็นพืชที่เพาะปลูกง่ายได้ทุกฤดูกาลและไม่ต้องการการดูแลเป็นพิเศษ แต่ผลตอบแทนทางการเกษตรยังน้อยเมื่อเปรียบเทียบจากต้นทุนการผลิต เนื่องจากยังไม่มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ที่จะสามารถทนทานและให้ผลผลิตได้สูง ซึ่งแนวทางที่จะแก้ไขสถานการณ์นี้คือจะทำอย่างไรที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ทางพันธุกรรมของมันเทศให้มีคุณภาพที่ดีสามารถนำไปเพาะปลูกได้และผลผลิตที่มีคุณภาพสูง

มันเทศเป็นพืชที่ปลูกง่าย ปลูกได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ดินที่เหมาะสมที่สุดเป็นดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำดี ประเทศไทยสามารถปลูกมันเทศได้ทั่วทุกภาค และปลูกได้ตลอดปี โดยเฉพาะฤดูการทำนา เกษตรกรเก็บเกี่ยวข้าวแล้วจะไถพื้นที่ปลูกมันเทศ โดยไม่มีการรดน้ำ อาศัยน้ำค้างในเวลากลางคืนเท่านั้น มันเทศก็จะลงหัวและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ จึงเป็นพืชหลังนาที่ใช้น้ำน้อยและน่าสนใจพืชหนึ่ง แหล่งปลูกมันเทศเพื่อการค้าที่สำคัญของไทย อยู่ที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิษณุโลก เพชรบูรณ์ พิจิตร กาฬสินธุ์ ขอนแก่น นครราชสีมา บุรีรัมย์ เลย สุรินทร์ อุตรธานี อุบลราชธานี พระนครศรีอยุธยา ตราต ระยอง สระแก้ว ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช ปัตตานี สงขลา สุราษฎร์ธานี พัทลุง ในปีเพาะปลูก 2546/47 มีพื้นที่ปลูกมันเทศทั่วประเทศ รวม 30,905 ไร่ มีปริมาณผลผลิต 56,432 ตัน เฉลี่ยผลผลิต 1.82 ตัน/ไร่ มันเทศที่ปลูกในประเทศไทยมีการนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภค ประกอบอาหาร คาวหวาน เป็นหลัก แต่ในต่างประเทศ เช่น ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ฟิลิปปินส์ อเมริกาใต้บางประเทศ มีการพัฒนาทำธุรกิจแปรรูปมันเทศเพื่อทำเป็นแป้งมันเทศ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทำเป็นเส้นก๋วยเตี๋ยวมันเทศ ทำเป็นส่วนผสมอาหารเด็ก ทำเป็นแอลกอฮอลล์ ทำเป็นสุรา ตลอดจนใช้เป็นอาหารว่าง ประเภทขนมขบเคี้ยวต่างๆมากมาย ในประเทศไทยเกษตรกรเก็บเกี่ยวผลผลิตมันเทศได้ระหว่างช่วงเดือนกุมภาพันธ์จนถึงกรกฎาคมจะได้ราคาที่ค่อนข้างดี แต่ผลผลิตออกในช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน ราคาถูกลง (นรินทร์ และ อรสา, 2548)

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นใหม่

1.2.2 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.3 ศึกษาการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย

1.2.4 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศด้วยวิธี Random Amplified Polymorophic DNA (RAPD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 มันเทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ipomoea batatas* Lamk. (**ชื่อพ้อง** : *Convolvulus batatas* L.)

วงศ์ : Convolvulaceae

ชื่อสามัญ : Sweet Potato

ชื่ออื่น : มันแกว (ตาก ภาคกลาง) มันเทศ (ภาคกลาง) ยอดมันแกว (น่าน) ยอดมันเทศ (มุกดาหาร) ยอดมันหลอง (ภูเก็ต) หมักอ้อย (ละว้า-เชียงใหม่) (http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/use/powder_sugar.htm)

รูปที่ 2.1 ต้นและดอกของมันเทศ

ที่มา : www.biology.clc.uc.edu

มันเทศเป็นไม้เลื้อยลงหัว ลำต้นทอดไปตามหน้าดิน รากงอกตามข้อ มียางขาว ใบเป็นใบเดี่ยวรูปหัวใจ มีแฉกแหลม ตรงแก้มใบทั้งสองข้างเป็นสีเขียวอมแดง ดอกเป็นช่อรูปปากแตร เป็นสีม่วงอ่อนผลรูปไข่ เมล็ดกินทำให้เกิดพิษถึงตาย (รูปที่ 2.1)

รากเป็นแบบ fibrous root system ซึ่งเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูกหรือข้อของลำต้นที่เลื้อยตามดิน รากจากจุดกำเนิดทั้งสองขยายใหญ่ และเป็นที่สะสมอาหารเรียกว่าหัว (root tuber)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวมีขนาดรูปร่างและสีแตกต่างกันไปตามพันธุกรรม หัวมักมีรากแขนง (lateral root หรือ secondary root) อยู่ หัวมันเทศใช้ขยายพันธุ์ได้ยอดอ่อนเจริญจาก adventitious bud ที่ด้านบนของหัว (รูปที่ 2.2)

ลำต้นเป็นเถาเลื้อย (vine) มีขนตามลำต้น (pubescence) ใบเป็นแบบ simple leaf การจัดเรียงของใบเป็นแบบเกลียว มี phyllotaxy2/5 ส่วนใบมี nectary gland 2 อัน

ช่อดอกแบบ raceme มี Peduncle ยาวและแข็งแรงกว่า petiole ส่วน sepal มี 5 กลีบเชื่อมติดกัน calyx tube สำหรับ petal มี 5 กลีบเชื่อมติดกัน corolla tube ผลเป็นแบบcapsule (http://cropthai.ku.ac.th/agron212/sweetpotato.pdf)

มันเทศจะให้สารอาหารที่สำคัญจำนวนมาก เช่น ascorbic acid riboflavin iron calcium anthocyanin และ protein (Prakash, 1994) นอกจากนี้มันเทศยังอุดมไปด้วย ß-carotene ซึ่งเป็นสารอาหารที่ช่วยป้องกันมะเร็ง ส่วนหัวสามารถนำมาปรุงอาหาร เช่น แกงเลียง แกงคั่ว มันเชื่อม มันเทศรังนก ทำไส้ขนมต่างๆ หรือรักษาเบาหวาน บำรุงกระเพาะ บำรุงม้าม ช่วยย่อย บำรุงกำลัง มีวิตามินสูง แก้โรคตาบอดกลางคืน แก้เมาคลื่น ยอด แก้ไขข้ออักเสบ บำรุงสายตา บำรุงม้าม ไต บำรุงธาตุ ใบ ตำพอกฝี ต้มดื่ม แก้ไขข้ออักเสบ หัว ชงน้ำดื่มแก้กระหาย บำรุงม้าม ไต แก้เมาคลื่น น้ำคั้นจากหัวทาแก้แผลไฟไหม้ ทั้งต้นและหัว มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในด้านอุตสาหกรรม มีการสกัดแป้งมันเทศเป็นส่วนผสมของอาหารเด็ก และกาว เป็นต้น นอกจากนี้มันเทศยังใช้เป็นอาหาร สัตว์ได้หลายชนิด เช่น สุกร วัว ควาย กระต่าย เป็ด ไก่ และปลา เป็นต้น

รูปที่ 2.2 หัวมันเทศ

ที่มา : www.flowersdirect.co.il

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์มันเทศแบ่งตามอายุการเก็บเกี่ยวได้ 3 ชนิด คือ

- พันธุ์เบา อายุประมาณ 90 วัน หลังจากปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เช่น พันธุ์พิจิตร 1 พจ. 113-7 พจ. 115-1 และ พจ. 166-5

- พันธุ์กลาง อายุประมาณ 120 วัน หลังจากปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เช่น พันธุ์แม่โจ้ และพันธุ์ห้วยสีทน

- พันธุ์หนัก อายุประมาณ 150 วัน หลังจากปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เช่น พันธุ์โอกุด (เกษตร) (http://www.doae.go.th/library/html/detail/paddy/c10.htm)

Prakash C.S. (1994) กล่าวว่า มันเทศมีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ของอเมริกา จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์ของประเทศเปรู มันเทศเป็นพืชที่สามารถเจริญได้ในหลายสภาวะ ทั้งในสภาวะที่ดินมีไนโตรเจนน้อย สภาวะแห้งแล้ง ในบริเวณที่มีวัชพืชหนาแน่น และทนต่อแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด ในประเทศเปรู The International Potato Center (CIP) ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมสายพันธุ์ต่างๆ ของมันเทศประมาณ 4000 สายพันธุ์ The Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) ในประเทศไต้หวัน และ The Agricultural Research Service of the United States Departments of Agriculture (ARS/USDA) ก็ได้เก็บรวบรวมสายพันธุ์ต่างๆของมันเทศไว้เช่นเดียวกันแต่จะมีจำนวนน้อยกว่า โดยทั้ง 3 แห่งนี้จะเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของมันเทศไว้ในหลอดทดลอง

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันเทศ โดย Magalhaes และคณะ (2006) ได้ศึกษาการชักนำให้มันเทศกลายเป็น somatic embryo ใช้มันเทศจำนวน 15 จีโนไทป์ โดยนำเนื่อเยื่อจากปลายรากหรือใบที่ 1 และ 2 จากปลายยอด เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยวิตามิน น้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 ไฟตาเจลร้อยละ 0.2 และฮอร์โมน 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แคลลัสที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้จะมีสีเหลือง ทึบแสง ลักษณะเป็นเม็ดๆ และอัดกันแน่น ส่วนแคลลัสที่ไม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนจะมีลักษณะกึ่งโปร่งแสงและร่วน โดยฮอร์โมน 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนมากที่สุด

Otani และ คณะ (1987) ได้ศึกษาเรื่อง การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากส่วนของใบมันเทศ โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จะเริ่มแบ่งตัวภายในเวลา 3 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 โปรโตพลาสต์สามารถเจริญเป็นกลุ่มโคโลนีภายใน 30 วัน จากนั้น ย้ายโคโลนีเหล่านี้ลงในอาหารแข็ง พบว่า โคโลนีเหล่านี้จะเจริญอย่างรวดเร็วและเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัสได้ และแคลลัสบางส่วนย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสามารถที่จะชักนำให้เกิดเป็นรากได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murata และคณะ (1989) ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดของมันเทศสายพันธุ์ Kokei No.14 และ Koganesengan ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เป็นต้นแล้วย้ายออกปลูกในแปลงได้ใน 90 วัน

Murata และคณะ (1991) ศึกษาการเพาะเลี้ยงลำต้นของมันเทศสายพันธุ์ Kokei No.14 ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร ประมาณ 6 เดือน สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

Murata และคณะ (1993) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ ของมันเทศ 10 สายพันธุ์ ในอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4 –D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร KIN 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และใช้วุ้น 8 กรัม สามารถชักนำให้เกิด แคลลัสได้ และเมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS สามารถชักนำให้เป็นต้นได้ ในสายพันธุ์ FV62-41 และ Chugoku No.25

Murata และคณะ (1994) ศึกษาการการแยกโปรโตพลาสต์จากมันเทศสายพันธุ์ Chugoku No. 25 จากส่วนของปลายยอดที่เจริญในหลอดทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงได้ในอาหารสูตร KM8p ที่ประกอบด้วยMS ซีเอติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำทำให้เกิดกลุ่มเซลล์ จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย KIN 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 2 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

Dessai และคณะ (1995) ทำการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของพืชมันเทศจากเนื้อเยื่อส่วนใบ ในการทดลองโดยใช้เป็น 2 ระยะ โดยระยะที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย myoinosital 100 มิลลิกรัมต่อลิตร thaimine-HCl 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0.-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะที่ 2 ใช้ zeatin riboside แทน 2,4-D ในอาหาร โดยเติมฮอร์โมนพืชที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้วซึ่งเติมหลังจากอาหารผ่านการฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะที่ 1 ประมาณ 2-4 วัน จะเกิดการบวมของก้านใบเกิดขึ้นแล้วจึงทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ขึ้นไป พบว่าความถี่สูงสุด มากกว่าร้อยละ 80 ในการเจริญเป็นต้นใหม่เกิดขึ้นใน จีโนไทป์ PI 318846-3 ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายไปยังอาหาร MS ที่ประกอบด้วย zeatin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติม zeatin riboside ลงในอาหารสูตร 1 ทำให้ความถี่ของการเจริญเป็นต้นใหม่ลดลง จาก 27 จีโนไทป์ พบว่า 19 จีโนไทป์ มีการแสดงออกของการเจริญเป็นต้นใหม่ที่ความถี่สูง และอีก 8 จีโนไทป์ ไม่มีการแสดงออก จากการพัฒนาระยะของใบ พบว่าส่วนของใบที่ยังอ่อนจากปลายยอดลำต้นซึ่งโดยส่วนมากแล้วสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Song และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย้ายยีน *Agrobacteriu tumefaciens* ในมันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) LAM.) จากเนื้อเยื่อลำต้น โดย two-step Kanamyein - Hygromycin selection method โดยในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชนั้นได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศบนอาหารสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ และ Indolc-3-acetic acid IAA ความเข้มข้น 1.14 ไมโครโมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าภายหลัง 3 สัปดาห์ ปลายยอดยาวขึ้น แล้วเก็บไว้ใช้เป็น stock plant สำหรับนำมาเลี้ยงชักนำให้เกิดแคลลัสใช้อาหารสูตร LS ร่วมกับ 6.49 ไมโครโมลาร์ 4-fluorophenoxy acetic acid (4-FA) (herein RM) และสำหรับการเจริญเป็นต้นใหม่ใช้อาหารสูตร LS ร่วมกับ 15.13 ไมโครโมลาร์ ABA ร่วมกับ 2.89 ไมโครโมลาร์ GA_3 (herein RM) ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีศักยภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมันเทศมีมากกว่าร้อยละ 90 ส่วนเนื้อเยื่อลำต้นสามารถสร้างแคลลัสสีเหลืองอ่อนภายใน 4 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร CIM ส่วนในอาหารสูตร RM มีค่าเฉลี่ยที่ร้อยละ 10 ที่มีแคลลัสสีเหลืองอ่อนหลังจาก 4 สัปดาห์ไปแล้ว ส่วนรากงอกในเวลา 3 สัปดาห์ และแคลลัสสีเหลืองอ่อนที่ปกติสามารถรักษาสภาพการเจริญบนอาหารสูตร CIM เป็นเวลา 2 เดือน ถ้าระยะเวลาที่มากเกินไปอาจทำให้แคลลัสสูญเสียสภาพและปริมาณความถี่ในการเจริญเป็นต้นใหม่ลดลง และเมื่อนำเคลัสที่ผ่านการย้ายยีน *Agrobacterium tumefaciens* มาปลูกในอาหารสูตรดังกล่าว พบว่าสามารถชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสและเจริญเป็นต้นใหม่ได้

2.2.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษฎ์, 2540)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทอย่างมากทั้งในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์ และอุตสาหกรรม ซึ่งจำแนกได้อย่างกว้างๆ ดังนี้

2.2.1.1 การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ จากตัวอย่างการเลี้ยงพืชเพียงต้นเดียวและย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง หากสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็น 10 ต้นแล้ว ในระยะเวลาเพียง 6 เดือน จะสามารถผลิตต้นพืชได้ถึง 1,000,000 ต้น

2.2.1.2 การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืชคือ การเกิดโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย วิสา และไมโครพลาสมา ที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้หากไม่แสดงอาการให้เห็นจะทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ได้ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากที่จะแก้ไขหรือป้องกันนอกจากกำจัดหรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป การใช้สารเคมีคลุกเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ก่อนปลูกแม้จะช่วยลดปริมาณเชื้อที่อาจติดมากับผิวของวัสดุปลูกได้ แต่ไม่อาจใช้ได้ผลดีในกรณีการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมาภายในเซลล์พืชได้ การผลิตพืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่จะให้ต้นพืชที่ปราศจากโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราและแบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้วจะแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรียและราเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถกำจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของวิสาซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมาก และดำรงชีวิตอยู่ได้ในเซลล์พืช จึงมักไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็นแม้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ตาม ในทางปฏิบัติจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงจนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อวิสา ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดภัยจากเชื้อวิสามากที่สุดคือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (vascular tissue) ได้แก่ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ที่ติดต่อกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืชที่เชื้อวิสาจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

2.2.1.3 การปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน (tolerant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (resistant plants) ได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือชักนำการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสี หรือสารเคมี เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดสายพันธุ์ทนดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ทนร้อนโดยเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง การสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษของโรค แมลง และสารเคมีกำจัดวัชพืช นอกจากนั้น จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการดัดต่อดีเอ็นเอ (DNA recombination) และการถ่ายยีน (gene transformation) ยังเปิดโอกาสให้ใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด

2.2.1.4 การผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางกรณีเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก ต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น

2.2.1.5 การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถดิดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการดอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

2.2.1.6 การเก็บรักษาพันธุ์พืช ในปัจจุบันพืชพรรณหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชที่หายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปในไม่ช้า สาเหตุสำคัญอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงทางสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์เอง นอกจากนั้นพืชบางชนิดยังยากที่จะขยายพันธุ์หรือเก็บรักษาพันธุ์ได้โดยวิธีปกติ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานและไม่คุ้มค่า นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆไว้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพหลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (wate stess) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ยาวนาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งเช่นปกติ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือ เก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชนั้นๆ

2.2.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช พันธุ์ ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืช (explant) ที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามที่นิยมใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุดคืออาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส เป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiated) มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมาก (highly vacuolated) และเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปร่างที่แน่นอน (unorganized) ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัส (callus culture) และเซลล์แขวนลอย (cell-suspension culture) ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) ที่อย่างน้อยที่สุดประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องการครบคือ สารประกอบอนินทรีย์ (inorganic substances หรือ inorganic salts) และสารประกอบอินทรีย์ (organic substances) ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง

แม้พืชทั้งต้นจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนมากนักก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า และมีลักษณะเป็น seldom autotrophic กล่าวคือ ต้องใช้ทั้งมหธาตุและจุลธาตุที่ใช้ตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย (hydropronic culture) นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามิน ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกออกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ต่างๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืชแล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม อย่างไรก็ตามผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) และการกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันได้โดยง่าย อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้ว สามารถจำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มๆได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (Inorganic substances)

1 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macronutrients) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปตัสเซี่ยม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) แร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณมากและขาดไม่ได้ โดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณ 25-60 มิลลิโมลลาร์ หรือมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micronutrients) ได้แก่ เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) โมลิบดินัม (Mo) และโบรอน (B) โดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.2.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (Organic substances) สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon sources) ใช้เป็นแหล่งในการให้พลังงาน มักเป็นสารประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ ปกติใช้น้ำตาล 20-40 กรัม หรือร้อยละ 2-4 สำหรับ การเตรียมอาหาร 1 ลิตร น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ ได้แก่ กลูโคส (glucose) ฟรุกโทส (fructose) แมนนิทอล (mannital) ซูโครส (sucrose) และมอลโทส (maltose)

2.2.2.3 วิตามิน (Vitamins) ที่ใช้กันมาก ได้แก่ ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl) อินโนสิทอล (inositol) ไนอะซิน (niacin) ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxine-HCl) ไบโอติน (biotin) กรดแพนโทเธอนิค (pantothenic acid) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดฟอลิค (foric acid) แคลเซียมแพนโทเธอเนต (calcium pantothenate) ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamine) โคลีนคลอไรด์ (choline chloride) และไรโบฟลาวิน (riboflavin)

2.2.2.4 กรดอะมิโนและเอไมด์ (Amino acids and Amides) มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญ เติบโตของเนื้อเยื่อพืช ความต้องการกรดอะมิโนของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงสามารถคำนวณได้โดยผันแปรกับปริมาณการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท (caseinhydrolysate) กรดอะมิโนและเอไมด์ที่ใช้แพร่หลายและได้ผลดี คือ อาร์จีนิน (L-argenin) กรดแอสปาร์ติค (L-aspartic acid) แอสปาราจีน (L-asparagine) กรดกลูตามิค (L-glutamic) และกรดกลูตามิน (L-glutamine)

2.2.2.5 ไนโตรเจนเบส (Nitrogen bases) สารประกอบพวกไนโตรเจนเบส กรดไซทิไดลิค (cytidylic acid) และกรดกัวไนลิค (guanylic acid) มีส่วนกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยง

2.2.2.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์เองได้ และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ สามารถแบ่ง ออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 สารในกลุ่มออกซิน (auxin) มีส่วนช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส เช่น กรด 3-อินโดลอะเซติค (3-indolacetic acid) กรดแอลฟาแนพธาลีนอะเซติค (α-napthalene acetic acid) กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกอะซีติค (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) กรด2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกอะซีติค (2,4-trichlorophenoxyacetic acid) และกรด 3-อินโดลบิวไทริค (3-idolbutyric acid)

2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน (adenine) สามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขณะที่มีออกซินผสมอยู่ด้วย และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในพืชที่กำลังเป็นโรคปุ่มปม สารพวกนี้ที่ใช้กันมาก ได้แก่ 6-ฟัลเฟอริลอะมิโนพิวรีน (6-furferylaminopurine) 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-benzylaminopurine) 2-ไอโซเพนทีนิลอะมิโนพิวรีน (2-isopentenyl aminopurine) และซีเอทิน (zeatin)

3 สารในกลุ่มจิบเบอร์เรลลิน (gibberellins) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อย ที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิค (gibberellic acid) สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิค (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญเกิดขึ้น

2.2.2.7 สารประกอบอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน (coconut milk) น้ำมะเขือเทศ (tomato juice) น้ำมันฝรั่ง (potato juice) เป็นต้น

แม้พืชทุกชนิดโดยปกติต้องการธาตุอาหารหลักที่เหมือนกัน แต่จะต้องการในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีความต้องการที่แตกต่างกันอย่างมาก

2.2.3 การเลี้ยงอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ควรคำนึงถึง

2.2.3.1 ชนิดและสายพันธุ์ (species and cultivars) พืชต่างชนิดและต่างสายพันธุ์ ส่วนใหญ่มักต้องการธาตุอาหารที่ไม่เหมือนกัน

2.2.3.2 อายุและระยะการพัฒนา (age and stage of development) แม้เป็นพืชชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน ถ้าอายุและระยะการพัฒนาต่างกัน ก็อาจต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน

2.2.3.3 ชนิดของชิ้นส่วนพืช (explant materials) พืชชนิดเดียวกัน หรือแม้กระทั่งต้นเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนของพืชจากส่วนต่างๆ เช่น ใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงจะต้องใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างไปจากสูตรที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนของรากหรือใบ

2.2.3.4 เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง (target of culture) พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่มีเป้าหมายของการเลี้ยงที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันด้วย เช่น ต้องการเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดก็ใช้อาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างไปจากสูตรที่ต้องการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือเกิดราก

2.2.3.5 สถานะของอาหาร (state of media) ชิ้นส่วนพืชเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารแข็ง อาจได้ผลที่แตกต่างไปจากการเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารกึ่งแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละสูตร ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติและข้อจำกัดแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องจัดแบ่งสารเหล่านี้ออกเป็นกลุ่ม ด้วยเหตุผลคือ

2.2.4.1 สารเคมีบางชนิดใช้ในปริมาณที่น้อยมาก ทำให้ต้องใช้เครื่องชั่งที่มีความละเอียดมากๆ และอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ง่าย ดังนั้นในทางปฏิบัติจะใช้วิธีเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าที่ใช้จริงหลายๆ เท่า (ประมาณ 50-1,000 เท่า) ซึ่งทำให้เตรียมได้ง่ายขึ้น และเรียกสารละลายที่เตรียมได้นี้ว่า stock solution

2.2.4.2 สารเคมีบางชนิด อาจทำปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่นเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ต้องการหรือเป็นพิษ ดังนั้นในแต่ละกลุ่มของสารละลายเข้มข้น (stock solutions) จึงต้องเป็นสารที่อยู่ร่วมกันได้

2.2.4.3 สารเคมีบางชนิด หากอยู่ร่วมกบสารอื่นๆ จะไม่ละลาย ละลายได้เล็กน้อย หรือละลายได้ไม่หมด จึงจำเป็นต้องแยกกลุ่มออกต่างหาก

2.2.5 ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

2.2.5.1 ดูดสารละลายจาก Stock solution ต่างๆ มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรที่คำนวณไว้

2.2.5.2 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส แต่อาจดัดแปลงใช้กลูโคส หรือฟรุกโตส แล้วแต่สูตรอาหารที่ใช้

2.2.5.3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่นๆตามความต้องการของสูตรอาหาร

2.2.5.4 ปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้ได้ครบตามที่ต้องการเตรียม

2.2.5.5 ปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วยกรดเกลือ (HCl) และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ให้ได้ประมาณ 5.6-5.8

2.2.5.6 เติมวุ้น ในกรณีเตรียมอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง

2.2.5.7 เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมละลายวุ้น

2.2.5.8 เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง เช่น ขวด หลอดทดสอบ หรือเพลท เป็นต้น

2.2.5.9 นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลง

ทุกส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ทั้งนั้น แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตอาจแตกต่างกันเพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัว (active) ไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ตื่นตัวมากที่สุด คือ เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ (Sterilization techniques)

ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็คือ การทำให้ชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากในสภาพธรรมชาติแล้ว ส่วนต่างๆ ของพืชจะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ติดอยู่ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อรา หรือแบคทีเรีย อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเพราะเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวเหล่านั้น สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และจะทำให้อาหารเน่าเสียอย่างรวดเร็ว ชิ้นส่วนพืชก็จะเน่าตายไปด้วย

มีสารเคมีหลายชนิดและวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการทำความสะอาดตัวอย่างพืชให้มีความปลอดเชื้อ ซึ่งผู้ทำการเพาะเลี้ยงต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้ให้เกิดความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชและประสิทธิภาพที่จะได้รับ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

2.2.6.1 มีประสิทธิภาพดี ให้เปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อสูง

2.2.6.2 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

2.2.6.3 เตรียมได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก

2.2.6.4 ไม่เป็นอันตราย หรือมีอันตรายน้อยที่สุดต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและชิ้นเนื้อเยื่อพืช

2.2.7 สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืช มีดังนี้

2.2.7.1 แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ($Ca(OCl)_2$) ความเข้มข้นที่ใช่ประมาณร้อยละ 9-10 เวลาที่ใช้ประมาณ 5- 30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.7.2 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.25-2.63 เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.7.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 10-12 เวลาที่ใช้ 5-15 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.2.7.4 คลอรอกซ์ (Chlorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน ที่จริงแล้วก็คือสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรด์นั่นเอง ความเข้มข้นที่ใช้ร้อยละ 5-10 เวลาที่ใช้ 5-20 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.7.5 สารละลายโบรไมด์ (Bromide water) ความเข้มข้นที่ใช้ร้อยละ 1-2 เวลาที่ใช้ 2-10 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.7.6 ซิลเวอร์ไนเตรท ($Ag(NO_3)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 1 เวลาที่ใช้ 5-30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.2.7.7 สารละลายไอโอดีน (Iodine water) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 3 เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.2.7.8 เมอคิวริคคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.1-1.0 เวลาที่ใช้ 2-10 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีพอสมควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.7.9 เมอคิวริคไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.5 เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.2.7.10 เมอคิวริคโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.5 เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดี

2.2.7.11 แอลกอฮอล์ (Alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ร้อยละ 70-95 เวลาที่ใช้ 2-5 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.7.12 กรดกำมะถันหรือกรดซัลฟิวริกริด (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 20-70 เวลาที่ใช้ 5-20 นาที ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีมาก

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ ในการฆ่าเชื้อโดยที่ใช้สารเคมี เช่น การอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือที่เรียกกันว่าแสง UV การเผาไฟซึ่งใช้กับตัวอย่างที่แข็งๆ เช่น เมล็ด ท่อนไม้ เป็นต้น

2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (ประศาสตร์, 2538)

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) แต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวทีนอยด์ (flavotcnoids) หรือสีม่วงจากแอนโธไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น เรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus (รังสฤษฎ์, 2541)ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่างๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงสุดในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของคัพภะ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่ออื่นๆ ของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้คือ แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้หรือแกนลำต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (pholoem vessels) ไซเลมพาเรนไคมา (xylem parenchyma) และเอ็นโดสเปอร์ม (endosperm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 แคลลัส

ที่มา : http://br.geocities.com/alccoelho/callus.jpg

2.3.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ควรมีสภาพเหมาะต่อการชักนำการเกิดแคลลัส กล่าวคือเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญจากเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ในทางปฏิบัตินิยมใช้เนื้อเยื่อจากเมล็ดที่เพาะให้งอกในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดส่วนราก ยอด และใบอ่อน ในกรณีของเนื้อเยื่อพิเศษ เช่น แคมเบียม เอ็นโดสเปอร์ม หรือไส้นั้นการเพิ่มจำนวนแคลลัสจะขึ้นอยู่กับเวลาของการแยกเนื้อเยื่อมาใช้ ส่วนของลำต้นโดยเฉพาะไม้เนื้อแข็งจะให้ชิ้นส่วนที่ยากต่อการชักนำการเกิดแคลลัส โดยทั่วๆไปแล้ว เมล็ดเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการให้ชิ้นส่วนพืชเพื่อเลี้ยงเป็นแคลลัส เนื่องจาก สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยตรง โดยเฉพาะเมล็ดทั้งเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเมล็ดให้งอกในอาหารวุ้นที่ปราศจาก หรือมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย จะชักนำให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบที่ปลอดเชื้อ ใช้เป็นชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อไป และสามารถแยกเอาเนื้อเยื่อส่วนของรากและปลายยอด ออกมาจากเมล็ดโดยตรง

ลักษณะของแคลลัส คล้ายคลึงกับเซลล์พาเรนไคมา ซึ่งไม่มีสีในพืชทั่วไป มีรูปร่างหลายแบบ ถ้ายังมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วจะมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเล็ก และถ้าการแบ่งเซลล์ลดลง เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและค่อนข้างยาว ถ้าเซลล์หยุดแบ่งตัวจะยืดขยายออกทำให้เซลล์ยาวขึ้น โดยการดูดน้ำเข้าเซลล์ มีผนังเซลล์บาง มีการไหลเวียนในไซโตพลาสซึม ไม่ค่อยมีการติดต่อระหว่างเซลล์ที่เรียกว่า พลาสโมเดสมาทา (plasmodesmata) (รูปที่ 2.3)

จากแคลลัสที่เกิดขึ้นอาจเจริญเป็นแคลลัสไปเรื่อยๆ หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่างๆ ในภายหลัง แคลลัสที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะต่างกัน 2 แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์หลวมๆ มักไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ สามารถแยกออกจากกันได้ง่ายเมื่อมีออกซินในความเข้มข้นสูง หรือมีความเข้มข้นของไซโทไคนินที่ต่ำลง และยังสามารถนำไปทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

เดนส์หรือคอมแพคต์แคสลัส (dense or compact callus) เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่แน่น มักเจริญต่อไปเป็นอวัยวะ

พืชที่เกิดจากแคลลัสมักมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงแคลลัสไปนานๆ และการเปลี่ยนแปลงเป็นการถาวร ซึ่งเป็นลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปยังรุ่นลูกได้ ลักษณะนี้อาจเป็นทางกายภาพและสัณฐาน เช่น อาจเกิดสายพันธุ์กลายที่ไม่ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต ที่เรียกว่า habituation มีความอ่อนแอหรือต้องการสารเคมีบางอย่าง การเจริญเติบโตเปลี่ยนไป และมีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่ผิดไป เช่น มีเม็ดสีเปลี่ยนไป เป็นต้น

หลังจากเลี้ยงแคลลัสในอาหารไปสักระยะหนึ่งจำเป็นต้องแบ่งย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) เพราะว่า อาหารถูกใช้หมดไป นอกจากนี้เซลล์จะขับถ่ายสารออกมาและเป็นพิษต่อเซลล์เอง แคลลัสจะหยุดการเจริญเติบโต การเปลี่ยนอาหารใหม่ควรทำทุกๆ 4-6 สัปดาห์ ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวอาจเปลี่ยนบ่อยกว่านี้ เช่น ทุกๆ 1-2 สัปดาห์ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งต้องการการย้ายอาหารประมาณ ทุกๆ 3 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในระยะ deceleration phase

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.3.2.1 ขนาดและรูปร่าง (size and shape) ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป ถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กเกินไปไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การถูกกระทบกระเทือนขณะแยกเนื้อเยื่อ จะสูงหากตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดเล็กมากในพืชบางชนิด

2.3.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน สัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วไปแล้ว ถ้าสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนินชิ้นส่วนนั้นพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนของออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินชิ้นส่วนนั้นพัฒนาไปเป็นยอดหรือลำต้น และหากสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนิน สมดุลพัฒนาไปเป็นแคลลัส ความเข้มข้นของออกซิที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆ อยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินที่ใช้อยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.2.3 ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักๆ ทั่วไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมของพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน กรดแอสปาติค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพวกเคซีน ไฮโดลเซท และน้ำมันมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย

2.3.2.4 แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส หรือแซคคาโรส ความ เข้มข้นร้อยละ 24

2.3.2.5 ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental facters) โดยเฉพาะแสง ที่ต้องการความเข้มข้นต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อหายใจด้วย

2.3.2.6 สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่สัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่าและตำแหน่งที่ชิ้นส่วนของแคลลัสสัมผัสกับอาหารมีสารที่เป็นของเสียจากเมตตาบอลิซึม (metabolic waste) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

2.3.3 ข้อควรพิจารณาในการเลี้ยงแคลลัส

ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อถูกนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและต้องการเทคนิคการกดเพียงเบาๆ ให้ชิ้นส่วนดังกล่าวจมลงไปในวุ้นเพียงเล็กน้อยเพื่อให้เนื้อเยื่อสัมผัสอาหารได้ดียิ่งขึ้น ถ้าเป็นส่วนปลายรากเกิดแคลลัสได้ดียิ่งขึ้นถ้าวางแนวราบลงบนอาหาร ขณะที่ชิ้นส่วนที่ตัดมาจากลำต้นควรวางในแนวตั้งให้ปลายที่ถูกดัดจมอยู่ในวุ้นปิดฝาจานด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ และขณะเดียวกันอากาศที่มีออกซิเจนก็สามารถผ่านเข้าไปได้ ปกติควรเพาะเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เหมาะสมชิ้นส่วนพืชสร้างแคลลัสมากพอสำหรับแบ่งและเปลี่ยนอาหารใหม่ ภายใน 3-8 สัปดาห์ ปกติการเปลี่ยนอาหารกระทำทุกๆ 4 สัปดาห์ และแคลลัสจากพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรควรแยกออกได้ 8-10 ชิ้น

2.3.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส

2.3.4.1 การขยายพันธุ์ (micropropagation) โดยชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก

2.3.4.2 การผลิตโปรโตพลาสต์ (protoplasts) แคลลัสเหมาะอย่างยิ่งในการนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้วและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

2.3.4.3 การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม (secondary metabolitcs) ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมได้

2.3.4.4 ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploids) โดยใช้สารโคลชิซินชักนำ

2.3.4.5 การผลิตพืชทนทานหรือพืชด้านทาน (tolerant and resistant plants) เช่นทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อนหรือหนาว หรือด้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

2.3.4.6 การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (cryopreservation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72604

2.3.5 การพัฒนาเป็นยอดและราก

โดยทั่วไปในกลุ่มเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชจะมีสมบัติที่ดีอย่างหนึ่งที่เรียกว่า totipotency ซึ่งจะหมายถึง ความสามารถของเซลล์ทุกส่วนของเนื้อเยื่อพืชสามารถที่จะเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งในคุณสมบัตินี้ไม่มีในเซลล์สัตว์

การพัฒนาเป็นเอ็มบริโอสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

Zygotic embryo เป็นเอ็มบริโอที่เกิดจากไข่ที่ได้รับการผสม หรือเรียกว่าไซโกต

Non-zygotic embryos เป็นเอ็มบริโอที่ไข่ไม่ได้รับการผสม แต่เกิดจากเซลล์อื่นๆ ที่ไม่ได้เกิดจากไซโกต สามารถแบ่งออกได้ดังนี้ Advance embryos เป็นเอ็มบริโอที่เกิดจากเซลล์ร่างกายทั่วๆ ไปของพืชเช่น ราก ลำต้น ยอด ใบ และตาข้าง เป็นต้น Parthenogenetic embryos เป็นเอ็มบริโอที่เกิดจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และ Androgenetic embryos เป็นเอ็มบริโอที่ได้รับการพัฒนาจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เช่น ไมโครสปอร์ และเรณู

การเจริญของเนื้อเยื่อพืชสามารถจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดหรือรากได้โดยแบ่งการพัฒนาไปเป็นยอดหรือราก ได้มี 2 กระบวนการคือ

กระบวนการเกิดออแกโนจีนีซิส (Organogenesis) คือ การพัฒนาไปเป็นยอด รากหรืออวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวกันของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกันเป็นเนื้อเยื่อเจริญซึ่งจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็ก ช่องว่างภายในเซลล์เล็ก และมีไซโตพลาสซึมที่มีความหนาแน่นมาก กลุ่มเซลล์จะมีการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดเวลา กลุ่มเซลล์เหล่านี้อาจเรียกว่า meristemoid ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นกลายเป็นจุดกำเนิดของยอดหรือราก และการจะเกิดเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ จะเป็นอิสระต่อกัน ไม่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อเจริญนั้นได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญไปเป็นเนื้อเยื่ออะไร

กระบวนการเกิดเอ็มบริโอจีนีซิส (Embryogenesis) คือการพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยเกิดจากกลุ่มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนเริ่มต้นเกิดจาก ไซโกตแบ่งเป็นเซลล์ 2 เซลล์ (proembryo) เซลล์ที่มีขนาดเล็กจะอยู่ด้านบน เรียกว่า apical cell ส่วนเซลล์ขนาดใหญ่อยู่ด้านล่างเรียกว่า basil cell มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า globular shaped embryo

ขั้นตอนที่ 2 กลุ่มเซลล์ globular shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ heart shaped embryo

ขั้นตอนที่ 3 กลุ่มเซลล์ heart shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ torpedo-shaped embryo

ขั้นตอนที่ 4 คือขั้นสุดท้ายกลุ่มเซลล์ torpedo-shaped embryo จะมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอซึ่งในขั้นตอนนี้กลุ่มเซลล์สามารถจะเจริญเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยเนื้อเยื่อด้านบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอ็มบริโอจะเจริญไปเป็นยอด และเนื้อเยื่อด้านล่างของเอ็มบริโอคือส่วนที่สัมผัสกับอาหารจะเจริญไปเป็นราก

2.4 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture) (คำนูณ, 2542)

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หมายถึง การนำเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์เล็กๆ (aggregate cells) มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะสมแก่การนำมาเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ แคลลัส (friable callus) ซึ่งเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน นอกจากนี้อาจใช้ส่วนของใบก็ได้ แต่ต้องทำการย่อยเนื้อเยื่อเสียก่อนโดยใช้เอนไซม์เพคติเนสร้อยละ 0.25 หรือใช้สารละลายโพแทสเซียม เดกแตรนซัลเฟต (potassium dextran sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 1

2.4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น เซลล์จะมีการเจริญเติบโตแบบต่างๆ กันแบ่งได้เป็น 3 ระยะดังนี้

2.4.1.1 Lag phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตน้อยมากเนื่องจากเซลล์แขวนลอยต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพอาหารใหม่หลังจากการเปลี่ยนอาหาร ระยะนี้จะยาวขึ้นเมื่อปริมาณเซลล์แขวนลอยเริ่มต้นมีอยู่น้อย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทั่วไปจึงเริ่มต้นด้วยเซลล์แขวนลอยในอัตราประมาณ 9,000-15,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตในระยะ Lag phase ไม่ยาวนัก

2.4.1.2 Exponential phase ระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตรวดเร็วมาก ทำให้ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้อัตราการตายของเซลล์แขวนลอยในระยะนี้ไม่ต่างจากระยะ Lag phase มากนัก เซลล์แขวนลอยจะอยู่ในระยะนี้จนกระทั่งเซลล์แขวนลอยมีอยู่ราว 1- 4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะต่อไป

2.4.1.3 Stationary phase ระยะนี้อัตราการเพิ่มปริมาณของเซลล์แขวนลอยมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการตายของเซลล์แขวนลอยคล้ายระยะ Lag phase ปกติเซลล์แขวนลอยจะเข้าสู่ระยะนี้หลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 18-25 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารที่ใช้ และชนิดของเนื้อเยื่อพืช) Lag phase เซลล์แขวนลอยที่อยู่ในระยะนี้จะเข้าสู่ระยะ Lag phase ค่อนข้างนานหากย้ายลงสู่อาหารใหม่ ดังนั้นระยะนี้จึงเป็นระยะสุดท้ายที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทั่วไป เพราะเซลล์แขวนลอยจะไม่ถูกปล่อยไว้นานจนอัตราการเกิดใหม่ของเซลล์แขวนลอยต่ำกว่าอัตราการตาย

ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยบนเครื่องเขย่า ต้องมีการหากราฟการเจริญเติบโตระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถทราบได้ว่าต้องมีการเปลี่ยนแปลงอาหารใหม่ประมาณช่วงเวลาใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยทำได้หลายรูปแบบ ดังนี้

2.4.2.1 การเลี้ยงแบบหมุนจุ่มอาหารอย่างช้าๆ (slowly rotate culture) โดยมีภาชนะที่ออกแบบพิเศษให้มีหลอดยื่นออกมารอบๆ เพื่อกักเก็บเซลล์ในขณะที่มอเตอร์หมุนภาชนะไปรอบแกนด้วยความเร็วประมาณ 1-2 รอบต่อนาที

2.4.2.2 การเลี้ยงแบบเขย่า (shake culture) วิธีนี้ทำได้ง่ายและนิยมกันทั่วไป โดยภาชนะที่ใส่ตัวอย่างวางเลี้ยงอยู่บนเครื่องเขย่าแบบวน (orbital platform shaker) ที่ความเร็วประมาณ 80-120 รอบต่อนาที

2.4.2.3 การเลี้ยงแบบหมุน (spinning culture) วิธีนี้เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงคราวละมากๆ หลักการก็คือ นำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างไปติดตั้งกับแกนหมุนที่วางเอียงทำมุม 45 องศาเซลเซียส ความเร็วประมาณ 80-120 รอบต่อนาที

2.4.2.4 การเลี้ยงแบบกวนหรือคน (Stirring culture) วิธีนี้เหมาะแก่การเลี้ยงในปริมาณมากๆ โดยภาชนะติดตั้งอยู่บนแท่นที่มีแท่งคนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และมีระบบการนำอากาศเข้า โดยปั๊มอากาศผ่าน carbon filter และ microfilter ส่วนทางอากาศออกอุดไว้ด้วยสำลี นอกจากนี้ยังมีระบบเติมอาหารและวัดสภาพอาหารในภาชนะ

2.4.3 เทคนิคการวัดการเจริญเติบโตของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ได้มีผู้พัฒนาการวัดการเจริญของเซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลวัดประสิทธิภาพของสูตรอาหารและปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงไว้หลายวิธี ดังนี้

2.4.3.1 การวัดปริมาตรของเซลล์ที่ผ่านการทำให้ตกตะกอน (packed cell volume หรือ PCV) กระทำโดยการย้ายเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 g เวลา 5 นาที ค่า PCV ที่ได้ก็คือปริมาตรของเซลล์ที่ตกตะกอน หน่วยคิดเป็นร้อยละ โดยเปรียบเทียบกับปริมาตรเริ่มต้น

2.4.3.2 การนับจำนวนเซลล์ (cell number) ถ้าเซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม (cell clump) ซึ่งยากแก่การนับ ให้ทำการแยกเซลล์เสียก่อน โดยการนำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 ส่วน มาเติมด้วยสารละลายโครมิคไตรออกไซด์ (chromic trioxide) ความเข้มข้นร้อยละ 8 (W/V) 2 ส่วน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 2-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน หรือใช้เอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 แช่นานประมาณ 30 นาทีก็ได้ ต่อจากนั้นก็ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer

2.4.3.3 การหาน้ำหนักสดของเซลล์ (fresh wieght) ทำโดยการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยกระดาษกรอง whatmam No.1 แล้วล้างเซลล์ออกจากกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วชั่งหาน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.4 การหาน้ำหนักแห้ง (dry wieght) กระทำโดยกรองเซลล์แขวนลอยด้วยกระดาษกรอง whatmam No.1 แล้วนำไปอบแห้งในเตาอบ (hot oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง บันทึกน้ำหนักเซลล์ครั้งสุดท้าย

2.4.3.5 การวัดการนำไฟฟ้าของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (medium conductivity) จากการศึกษาพบว่า ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลายอาหารจะแปรผกผันต่อน้ำหนักสดของเซลล์ กล่าวคือ เมื่อปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น การนำไฟฟ้าของสารละลายอาหารจะลดลง วิธีนี้เหมาะสำหรับการวัดและติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะต่างๆ การเปลี่ยนแปลงของการนำไฟฟ้าเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้ไนเตรตอิออน (NO_3^-) ของเซลล์

2.4.5 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เช่น

2.4.5.1 การศึกษาด้านสรีรวิทยาของเซลล์ ทั้งด้านโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยซึ่งมีความสม่ำเสมอกันทั้งด้านรูปร่างและคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นจำนวนคราวละมากๆ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาพฤติกรรมทางสรีรวิทยาของเซลล์ได้ง่ายขึ้น

2.4.5.2 ใช้ในการผลิตสารเคมี เซลล์พืชบางชนิดเมื่อได้รับการปฏิบัติดูแลอย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เลี้ยงในสภาพแสงเหนืออุณหภูมิหนึ่งด้วยอาหาร ซึ่งมีเกลือแร่และสารควบคุมการเจริญเติบโตเฉพาะเซลล์เหล่านั้น จะสร้างสารเคมีบางอย่างมากขึ้นกว่าปกติ ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิ เช่น สารฟีโนลิค เทอพีนอย และอัลคอลอยด์

ดังนั้นบริษัทอุตสาหกรรมจึงได้นำเซลล์แขวนลอยของพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเก็บเซลล์มาสกัดสารที่ต้องการ เช่น แคปไซซินจากเซลล์พริก วนิลลา (Vanilla) จากเซลล์วนิลลา สีเบทาเลียน (betalain) จากเซลล์พอร์ทูแลนซ์ (portulace) เป็นต้น

2.4.5.3 ใช้ในการคัดเลือก ปกติเซลล์แขวนลอยที่เริ่มเลี้ยงไว้ในระยะแรกจะมีความสม่ำเสมออยู่สูง แต่เมื่อเลี้ยงนานขึ้นเซลล์จะมีความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมขึ้น ทำให้เราอาจนำเซลล์เหล่านี้มาคัดพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษตามต้องการ แต่ต้นพืชที่เกิดจากเซลล์นั้นๆ อาจไม่มีลักษณะพิเศษก็ได้ เพราะการแสดงออกของยีนขณะเซลล์ยังอยู่ในสภาพเซลล์แขวนลอย ต่างจากการแสดงออกของยีนเมื่อเซลล์แต่ละเซลล์พัฒนาไปมีหน้าที่เฉพาะในต้นพืช

2.5 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษาถึงความหลากหลายของพันธุกรรมของมันเทศ โดย Satoru และคณะ (2001) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของมันเทศจำนวน 27 สายพันธุ์ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ของใบตัวอย่างมันเทศ แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 14 ชนิด พบว่า สามารถจำแนกสายพันธุ์มันเทศได้เป็น 4 กลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tseng และคณะ (2002) ศึกษาสายพันธุ์และทำการประเมินความสัมพันธ์ของยีนในมันเทศ โดยใช้ SAMPL (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci) เป็นยีน markers ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนของการเพาะปลูกมันเทศโดยการผสมข้ามสายพันธุ์ และใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มขยายปริมาณยีน พบว่า SAMPL maker สามารถที่จะใช้ค้นหาลำดับยีนซึ่งมีความน่าสนใจต่อทางด้านเกษตรกรรม

Ahn และคณะ (2004) ศึกษาความผันผวนทางพันธุกรรมและการผสมข้ามสายพันธุ์ที่เข้ากันไม่ได้ของมันเทศในประเทศเกาหลี โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ซึ่งใช้ไพรเมอร์เป็นจำนวน 15 ชนิด สามารถจำแนกกลุ่มดังกล่าวได้ 6 กลุ่ม และอนาคตในการศึกษาจำเป็นที่ต้องใช้ไพรเมอร์เป็นจำนวนมากในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD

2.5.1 ความหมายและที่มาของความหลากหลายทางพันธุกรรม (วิไลพร, 2547)

สิ่งมีชีวิตบนโลกใบนี้มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม กฎแห่งพันธุกรรมของเมนเดล ซึ่งพบในตอนต้นศตวรรษที่ 19 ช่วยให้เกิดความเข้าใจถึงที่มาของสิ่งมีชีวิต และบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic biodiversity) ปรากฏการณ์หลักที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การแยกตัว การเปลี่ยนแปลง และการต่อของยีน ซึ่งการกระทำร่วมกันทั้ง 3 อย่างนี้ ก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งที่มีชีวิตมากมาย

ในอดีตความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้มนุษย์สามารถคัดเลือกพืชและสัตว์เพื่อไว้ใช้ประโยชน์ได้ เช่น ข้าว ได้ถูก คัดเลือกจากพันธุ์ป่า เพื่อนำมาใช้เพาะปลูก และเกิดสายพันธุ์ใหม่ที่ดีขึ้นเองโดยธรรมชาติ ดังนั้นปัจจุบันเราจึงไม่ เพียงแต่มีพืชและสัตว์จำนวนมากกว่า 1.5 ล้านชนิดเท่านั้นแต่เรายังมีสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นในพืชและสัตว์แต่ละชนิดอีกด้วย

ความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) ความหลากหลายของชนิด (Species Diversity) และความหลากหลายของที่อยู่อาศัย (Habitat Diversity) อาจเรียกได้กว่า ความหลากหลายของระบบนิเวศ (Ecosystem Diversity) ความหลากหลายของที่อยู่อาศัยหรือระบบนิเวศจะมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมและความหลากหลายของชนิด ความหลาหลายทางพันธุกรรม หลายถึง ความหลากหลายของยีน (genes) ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สิ่งมีชีวิดชนิดเดียวกันอาจมียีนที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ เช่น ข้าวมีสายพันธุ์นับพันธุ์ชนิด พืชอื่นๆ ก็มีมากมายหลายสายพันธุ์

ความผันแปรทางพันธุกรรม มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutation) ร่วมกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ผ่านขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ทำให้เกิดการ crossing over มีผลทำให้ยีนรวมตัวกันใหม่ (gene recombination) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดไปสู่ลูกหลาน โดยการถ่ายทอดแต่ละรุ่นจะพบกับแรงกดดันทางวิวัฒนาการ (evolutionary forces) ต่างๆ กัน เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพ ทำให้โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเปลี่ยนไป ก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่างๆ ของสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 วิธีการที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางกายภาพหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชนั้น อาจมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่างๆในการหาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) STS (Sequence-Tagged Site) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprinting) เทคนิคเหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอซึ่งใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายของลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่เรียกว่าเรื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) หมายถึงการใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการตรวจและใช้ประโยชน์จากการเกิดความแตกต่างหรือ ภาวะที่มีหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของลำดับดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาทางชีวโมเลกุล

วิธีการที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มีอยู่หลายชนิด จำแนกเป็นการศึกษาในระดับโปรตีนและการศึกษาในระดับดีเอ็นเอ

2.5.2.1 การศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสันฐานวิทยา

สัณฐานวิทยา (Morphology) เป็นการศึกษารูปพรรณสัณฐานของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะรูปร่างของดอกไม้ หรือการจัดเรียงตัวของใบ สามารถศึกษาได้ง่าย เป็นที่สังเกตเห็นได้ชัดและถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามหลักเมนเดล ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงองค์ประกอบทางจีโนไทป์ที่ควบคุมลักษณะนั้น ถึงอย่างไรก็ตามลักษณะสันฐานวิทยาบางอย่างก็ไม่ได้สาเหตุมาจากพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว แต่อาจมีผลกระทบมาจากสิ่งแวดล้อมด้วย จึงทำให้ยากลำบากพอสมควรที่จะใช้ลักษณะสันฐานวิทยาเป็นเครื่องชี้แนะความแตกต่างทางพันธุกรรม ประกอบกับลักษณะทางลักษณะสันฐานวิทยาเป็นเพียงส่วนหนึ่งของจีโนมในพืชแต่ละชนิดเท่านั้น

2.5.2.2 การศึกษาในระดับโปรตีน

การตรวจสอบความหลาหลายทางพันธุกรรมโดยการใช้ความหลาหลายของโมเลกุลโปรตีน (protein polymorphism) ใช้วิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเพื่อแยกโมเลกุลของโปรตีนแล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม หลักการคือ กรดอะมิโน 5 ชนิดที่มีประจุ คือ lysine arginnine และ histidine ซึ่งมีประจุบวก ส่วนกรดอะมิโน aspartic และ glutamic มีประจุลบ ดังนั้นสายโพลีเปปไทป์แต่ละสายที่ประกอบกันด้วยกรดอะมิโนต่างๆ จะมีชนิดและปริมาณประจุสุทธิที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีนโดยใช้เจลอิเลคโทรโฟริซิส นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของโปรตีนยังแตกต่างกันตามขนาดและรูปร่างของโมเลกุลด้วย

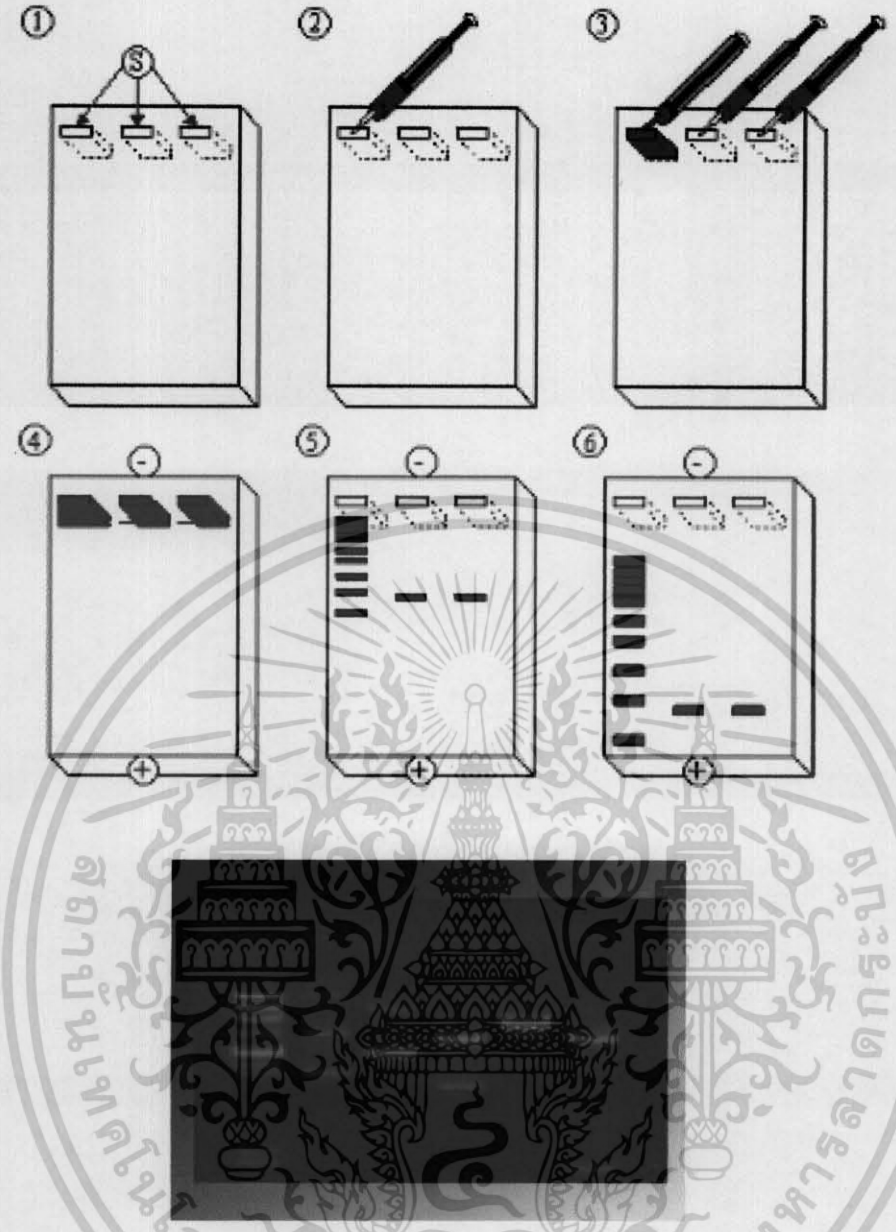
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.3 การศึกษาในระดับดีเอ็นเอ

เจลอิเลคโตรโฟรีซิสเป็นการแยกขนาดสารพันธุกรรมหรือโปรตีนออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวทำให้โมเลกุลขนาดและรูปร่างต่างๆ เคลื่อนที่ไปในเจลด้วยระยะทางที่แตกต่างกัน โมเลกุลขนาดใหญ่หรือรูปร่างเทอะทะจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็กหรือโมเลกุลที่รูปร่าเพรียวกว่า เช่น ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ดีเอ็นเอที่เป็นซูเปอร์คอยล์จะเคลื่อนที่เร็วกว่า ดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง และดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงก็ยังเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ดีเอ็นเอที่เป็นวงแหวนปกติ (relaxed circular DNA)

การทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เพื่อแยกดีเอ็นเอ (รูปที่ 2.4) เตรียมชิ้นวุ้นที่มีชนิดและขนาดของรูพรุนตามความเหมาะสม จากนั้นใส่ดีเอ็นเอลงไปด้านบนของชิ้นวุ้น แช่ในสารละลายแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยให้สารละลายเป็นสื่อพาให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปด้วยความเร็วที่ต่างกัน เมื่อปิดกระแสไฟฟ้าก็จะได้โมเลกุลดีเอ็นเออยู่ที่ตำแหน่งต่างกันในชิ้นวุ้น จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอ แล้วนำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลตจะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เพราะเอธิเดียมโบรไมด์ที่จับกับดีเอ็นเอจะเรืองแสงได้ชัดเจนขึ้น เมื่อเทียบกับโมเลกุล ดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (DNA marker) ว่าอยู่ในตำแหน่งใดเมื่อทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส จะสามารถระบุได้ว่าดีเอ็นเอแต่ละชิ้นมีขนาดเท่าใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

ที่มา : http://upload.wikimedia.org

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

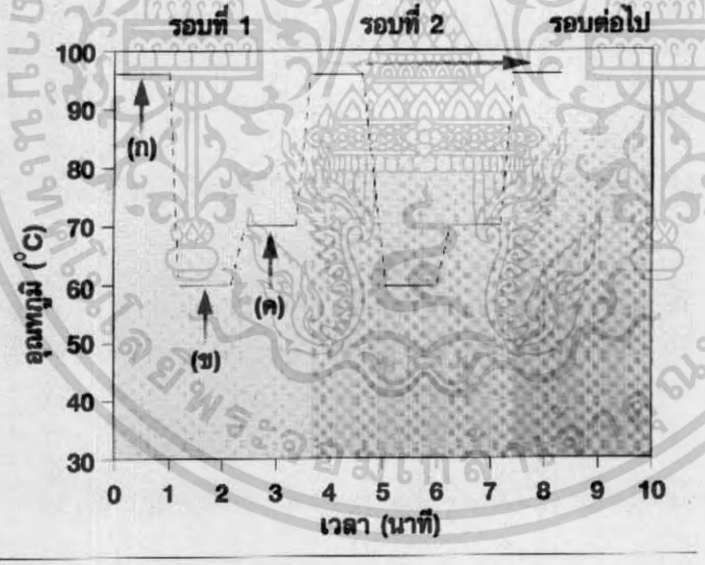
1 การศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR หรือ In Vitro enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอ ให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาสั้นๆ อาศัยหลักการการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ทำให้เกิดการจำลอง (replication) ในหลอดทดลองซ้ำๆ กันหลายๆ รอบ โดยมีขั้นตอนง่ายๆ 3 ขั้นตอน (รูปที่ 2.5) ได้แก่

การแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denaturation) โดย94–95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอคลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

การจับคู่ของสายดีเอ็นเอกับชิ้นของดีเอ็นเอไพรเมอร์ (Annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์ที่เป็นสายดีเอ็นเอชิ้นสั้นๆ เข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่ลำเบสเข้าคู่กัน

การขยายตัวของดีเอ็นเอ (Extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส สายดีเอ็นเออิสระที่รหัสตรงกับสายดีเอ็นเอจะจับตัวกับสายดีเอ็นเอในส่วนที่เหลือของทั้งสองสาย



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

(1) ช่วงอุณหภูมิ 90-95°C : แยกดีเอ็นเอเส้นคู่เป็นเส้นเดี่ยว

(2) ช่วงอุณหภูมิ 50-60°C : จับคู่ระหว่างดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวกับไพรเมอร์

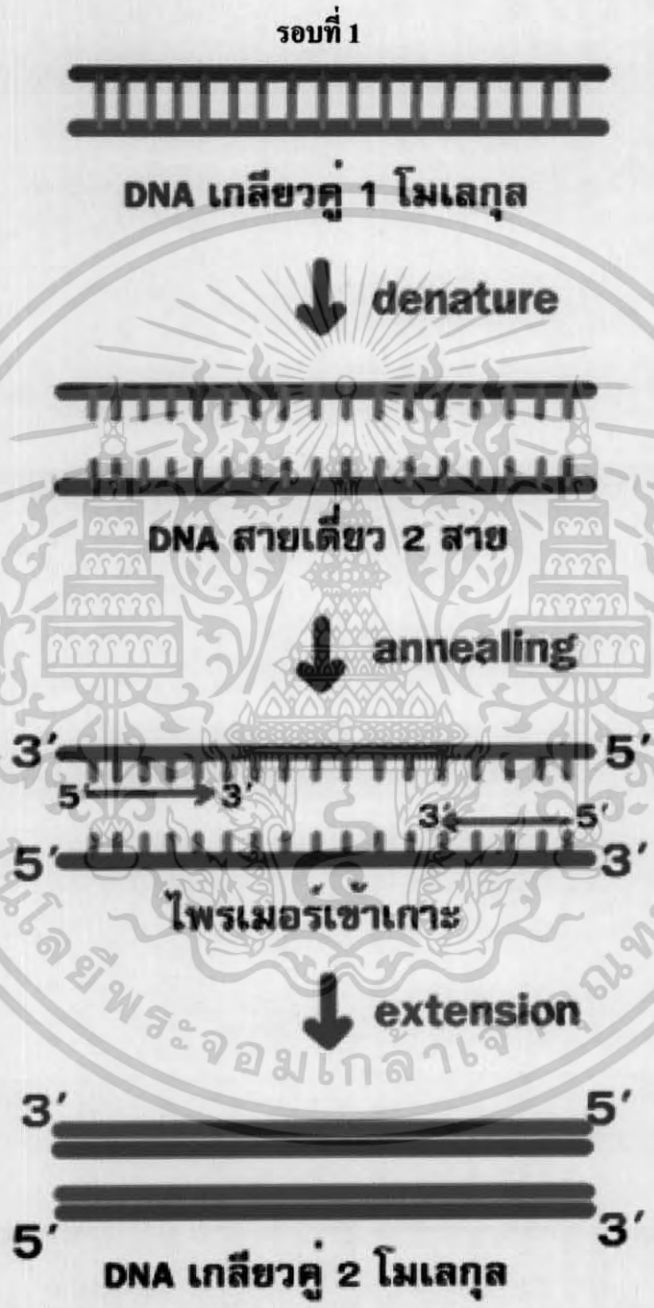
(3) ช่วงอุณหภูมิ 70-72°C : เติมเบสให้ดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่ปลาย 3′

ที่มา : วิชัย และคณะ, 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นเมื่อผ่านขบวนการ PCR หนึ่งรอบก็จะได้สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ที่เป็นสำเนาของตัวเองอีก 1 เส้นเมื่อทำเช่นนี้ไป n รอบก็จะได้ 2^n เส้น (รูปที่ 2.6)

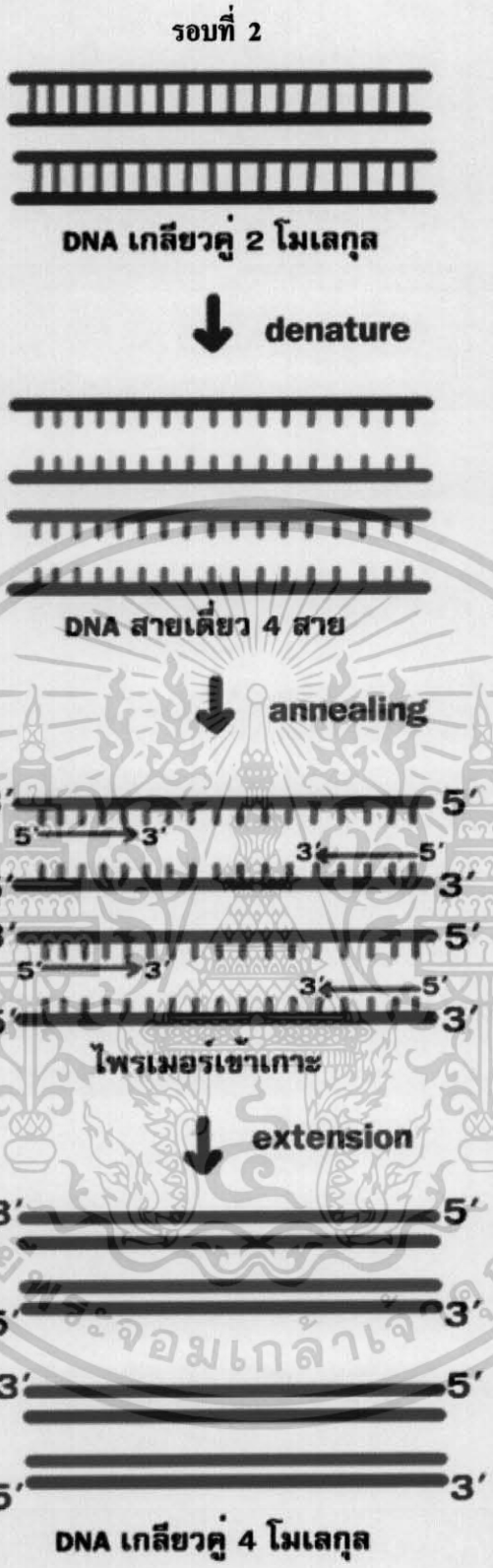
เทคนิค PCR นี้ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากปริมาณเพียงเล็กน้อยที่อยู่ปะปนกับดีเอ็นเออื่นๆ ให้มีปริมาณเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็ว



รูปที่ 2.6 การทำเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ภายนอกเซลล์

ที่มา : http://www.il.mahidol.ac.th/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



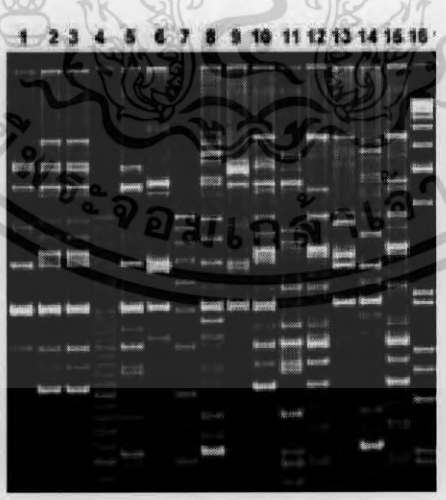
รูปที่ 2.6 (ต่อ) การทำเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ภายนอกเซลล์

ที่มา : http://www.il.mahidol.ac.th/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นวิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชและสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิค PCR ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจง หลักการคือใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 6-10 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) เพียงชนิดเดียว มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR ไพรเมอร์สายสั้นจะเกาะกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมหลายตำแหน่งและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างสุ่มจากดีเอ็นเอแม่แบบที่ซับซ้อน ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการการทำ PCR เกิดขึ้นเนื่องจากไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอแม่แบบในทิศทางตรงกันข้ามกันและห่างกันในระยะหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้โดยอาศัยเทคนิค PCR เทคนิค RAPD นี้มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือได้ และสามารถใช้ระบุความผันแปรทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตต่างๆ (รูปที่ 2.7) เทคนิค RAPD นี้มีข้อดีคือทำได้ง่าย ประหยัด รวดเร็วและให้ข้อมูลได้มากแต่มีข้อเสีย คือ การทดลองซ้ำที่บางครั้งได้ผลต่างจากเดิม ปัญหานี้เกิดจากตัวแรพื้นฐานต่างๆ เช่น คุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะให้ผลที่ดีกว่า เป็นต้น จึงต้องมีการควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก RAPD ยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถแยกความแตดต่างระหว่าง homozygous dominant และ heterozygous dominant ได้ ข้อดีของวิธี RAPD คือ ง่าย รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบส แต่มีข้อเสียคือ เมื่อทำซ้ำมักให้ผลที่ไม่เหมือนเดิม (http://cropthai.ku.ac.th/biotech/abs/mole.html)



รูปที่ 2.7 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD

ที่มา : http://www.elchrom.com/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 ข้อได้เปรียบของการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการตรวจสอบพันธุ์พืช (ประภัสสร, 2548)

2.5.3.1 สามารถทำซ้ำได้ง่าย ให้ผลแม่นยำ

2.5.3.2 สามารถทำได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจหาเอน ไซม์หรือโปรตีนซึ่งต้องมีการแสดงออกของยีน จึงต้องเลือกชนิดของเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการศึกษา ตัวอย่างเช่น โปรตีนบางชนิดพบในส่วนดอก หรือผล จึงทำได้ในระยะที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่เท่านั้น

2.5.3.3 ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย กรณีการปรับปรุงพันธุ์พืช จะสามารถคัดเลือกพันธุ์ได้ตั้งแต่ระ ยะต้นอ่อน โดยไม่จำเป็นต้องปลูกและรอให้ต้นโตเสียก่อน

2.5.3.4 เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีเท่ากันในทุกเซลล์ จึงสามารถใช้ส่วนใดของพืชในการศึกษาก็ได้ เช่น ดอก ใบ เมล็ด และเหง้า เป็นต้น

2.5.3.5 สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ (trait) ได้ เช่น การด้านทานต่อแมลง โดยที่ไม่ต้องทำการปลูกพืชให้โตแล้วรอสังเกตผลในแปลงทดลอง ช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

2.5.3.6 ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ส่วนของพืชที่ใช้ตรวจ หรือพื้นที่การเพาะปลูก มาเกี่ยวข้อง

2.5.3.7 ใช้ตรวจสอบพืชว่าเป็นพันธุ์พื้นเมือง หรือ พันธุ์ที่ได้รับการคุ้มครองสิทธิบัตร หรือตรวจสอบระหว่างพันธุ์แท้กับพันธุ์ลูกผสม

2.5.3.8 เทคโนโลยีมีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่าใช้จ่ายถูกลงและทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

2.5.3.9 ตรวจสอบชนิดของสมุนไพร (identification) เนื่องจากสมุนไพรที่มีจำหน่ายอยู่ในรูปผงหรือสารสกัด ยากในการตรวจสอบด้วยวิธีตรวจ morphology ว่าเป็นสมุนไพรอะไร มีการปลอมปนมาหรือไม่ การตรวจสอบโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถบอกได้ว่ามีการปลอมปนหรือไม่

2.5.3.10 การพัฒนาสายพันธุ์ ช่วยให้การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ (trait) ทำได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น การพัฒนาสายพันธุ์ทำได้เร็วขึ้นและประหยัดค่าใช้จ่าย ทั้งนี้ควรมีการคัดเลือกลักษณะที่ต้อง การร่วมกับการวิเคราะห์สารสำคัญทางเคมี

2.5.3.11 การคุ้มครองสิทธิสำหรับสายพันธุ์ปรับปรุง หรือปกป้องสิทธิสำหรับพันธุ์พื้นเมืองโดยการทำ DNA library ของพันธุ์พืชสมุนไพรเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงหรือเปรียบเทียบ

2.5.3.12 ช่วยในการจัดหมวดหมู่พืช (taxonomy) ในกรณีที่วิธีการแบบดั้งเดิมไม่สามารถ ตัด สินได้ การใช้ลายพิมพ์พันธุกรรมเข้ามาช่วย จะทำให้การจัดหมวดหมู่พืชถูกต้องยิ่งขึ้น

2.5.3.13 การตรวจสอบสายพันธุ์ก่อนเพาะปลูก (crop assurance) โดยเฉพาะสมุนไพรทางการค้าจำเป็นต้องมีสายพันธุ์ที่ดี มีปริมาณสารสำคัญสูง และมีคุณภาพสม่ำเสมอ ดังนั้นการตรวจสอบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ถูกต้องก่อนนำไปปลูก จะช่วยลดความเสี่ยงต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.14 การตรวจสอบจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคพืชที่ปนเปื้อน ซึ่งสามารถทำได้ตั้งแต่ระยะแรกๆ ของการปลูก ทำให้ป้องกันหรือกำจัดโรคได้ทันการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 มันเทศสายพันธุ์พิจิตร (พจ) และสายพันธุ์พื้นเมือง

3.1.1.1 พจ 65-16

3.1.1.2 พจ 189-256

3.1.1.3 พจ 205

3.1.1.4 พจ 206

3.1.1.5 พจ 226-24

3.1.1.6 พจ 226-31

3.1.1.7 พจ 227

3.1.1.8 พจ 265-1

3.1.1.9 พจ 95040-10

3.1.2 แคลลัสมันเทศสายพันธุ์พิจิตร (พจ) และสายพันธุ์พื้นเมือง

3.1.2.1 พจ 205

3.1.2.2 พจ 206265-1

3.1.2.3 พจ 226-24

3.1.2.4 พจ 265-1

3.1.2.5 มันเทศสายพันธุ์ไข่

3.1.2.6 มันเทศสายพันธุ์กระด่าย

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS และ LS

3.1.3.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ และสารเปียกใบ (tween 20)

3.1.3.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2 ,4-D และ BA

3.1.3.4 แอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และ 95

3.1.3.5 วุ้น

3.1.3.6 น้ำตาลซูโครส

3.1.3.7 ไนโตรเจนเหลว

3.1.3.8 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy Plant Mini Kit)

3.1.3.9 10X PCR buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.10 $MgCl_2$

3.1.3.11 Taq DNA polymerase

3.1.3.12 Mix dNTPs

3.1.3.13 น้ำปราศจากไอออน

3.1.3.14 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของมันเทศโดยเทคนิค RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
OPA-07	5'-GAA ACG GGT G-3'
OPB-14	5'-TCC GCT CTG G-3'
OPC-04	5'-CCG CAT CTA C-3'
OPG-13	5'-CCA CAC TAC C-3'

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 บีกเกอร์

3.1.4.2 ขวดรูปชมพู่

3.1.4.3 ปิเปตต์

3.1.4.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.4.5 ขวดดูแรน

3.1.4.6 จานแก้ว

3.1.4.7 แท่งแก้วคน

3.1.4.8 กระบอกตวง

3.1.4.9 มีดผ่าตัด

3.1.4.10 ปากคีบ

3.1.4.11 อะลูมิเนียมฟลอยด์

3.1.4.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (bunsen burner)

3.1.4.13 ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.1.4.14 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet)

3.1.4.15 ตู้อบลมร้อน

3.1.4.16 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)

3.1.4.17 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (balance)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.18 อุปกรณ์การกรองฮอร์โมนและแผ่นกรองฮอร์โมน (millipore filter)

3.1.4.19 ไมโครปิเปตต์และทิปขนาดต่างๆ

3.1.4.20 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

3.1.4.21 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.1.4.22 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล

3.1.4.23 กล้องสเตอริโอไมโครสโคป

3.1.4.24 ช้อนตักสารเคมี (spatula)

3.1.4.25 ตู้เย็น(refrigelator)

3.1.4.26 พาราฟิล์ม

3.1.4.27 เครื่อง Electropholysis

3.1.4.28 เครื่องกรอง

3.1.4.29 กระดาษกรองวอทแมน (what man)

3.1.4.30 ตะแกรงสแตนเลส

3.1.4.31 ช้อนโลหะ

3.1.4.32 เดซิเคเตอร์

3.1.4.33 กระดาษทิชชู

3.1.4.34 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler Machine)

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1. แยกชิ้นส่วนของแคลลัสที่มีลักษณะเกาะตัวกันแน่น (compact) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร

2. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ลงแลลัสแล้วไปไว้ในที่มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส นาน 2-6 สัปดาห์

3. ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

4. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร LS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1. แยกชิ้นส่วนของแคลลัสที่มีลักษณะเกาะตัวกันแน่น (compact) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร

2. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ลงแคลลัสแล้วไปไว้ในที่มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส นาน 2-6 สัปดาห์

3. ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

4. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

1. นำกระดาษกรองวอทแมนไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปดูดความชื้นและทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลาประมาณ 5 ชั่วโมง จึงนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด แล้วทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้น้ำหนักของกระดาษกรองคงที่

2. นำแคลลัสจำนวนหนึ่งมาขูดกับตะแกรงสเตนเลสเพื่อทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง

3. ชั่งแคลลัสที่มีขนาดเซลล์เล็กลงประมาณ 1 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

4. ดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปกรองน้ำออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกผลโดยลบน้ำหนักของกระดาษกรองออกได้เป็นน้ำหนักสด

5. นำเซลล์แขวนลอยที่หาน้ำหนักสดแล้ว ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปดูดความชื้นและทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลาประมาณ 5 ชั่วโมง จึงนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด บันทึกผลโดยลบน้ำหนักของกระดาษรองออกได้เป็นน้ำหนักแห้ง

6. ทำข้อ 4 และ 5 ซ้ำ ทุกๆ 3 วัน แล้วนำผลที่ได้ไปทำเป็นกราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

7. ทำการทดลองต่อไปจนกระทั่งกราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากเซลล์แขวนลอย ให้เป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1. ละลายอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร

2. ดูดแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง แล้วเทอาหารที่ละลายแล้วลงไปปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเลี้ยงให้อาหารกับแคลลัสเข้ากันดี แล้วปิดด้วยพาราฟิล์ม

3. นำจานเพาะเลี้ยงที่ไปไว้ในที่มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส นาน 2-6 สัปดาห์

4. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศด้วยวิธี Random Amplified Polymorophic DNA (RAPD)

การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit

1. นำโกร่งใส่ช่องแช่แข็งในตู้เย็นจนเย็นเพื่อทำ Pre-cool

2. นำใบมันเทศมาล้างด้วยน้ำประปาเพื่อขจัดเอาสิ่งสกปรกออก

3. นำใบมันเทศมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกรอบ แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ

4. เทไนโตรเจนเหลว (liquid N_2) ลงในโกร่ง แล้วคนให้ทั่วโกร่ง เพื่อให้โกร่งเย็น

5. นำชิ้นมันเทศที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่ง แล้วเทไนโตรเจนเหลวลงไป ค่อยๆ ทำการบดให้ละเอียด

6. ดักมันเทศที่บดแล้วใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 100-150 มิลลิกรัม แล้วสกัดดีเอ็นเอของมันเทศโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

7. เติม AP 1 (lysis buffer) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปวอร์เทกซ์ผสมให้เข้ากัน (lysis buffer ทำให้ผนังเซลล์พืชเกิดรูพรุนที่สามารถทำให้ดีเอ็นเอออกมาภายนอกเมมแบรนได้)

8. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที โดยทำการพลิกทุกๆ 2-3 นาที/ครั้ง ในระหว่างการบ่ม

9. เติม AP 2 (precipitate buffer) ปริมาตร 130 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน (mix) แล้วจึงนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที (precipitate buffer เพื่อแยกชั้นของดีเอ็นเอออกจากโปรตีนและโพลีแซกคาร์ไรด์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

11. ดูดส่วนใสใส่ใน QI Ashredder mini spin column (สีม่วง) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

12. ดูดส่วนใส 450 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วเติม AP 3 (binding buffer) 675 ไมโครลิตร (binding buffer เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ส่วนที่ติดอยู่บนเมมแบรน คือ พวกโปรตีนต่างๆ ดีเอ็นเอ คือส่วนใส)

13. ผสมให้เข้ากัน (mix) แล้วดูดมา 650 ไมโครลิตร ใส่ใน DNeasy mini spin column (สีขาว) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ดีเอ็นเอติดที่เมมแบรน)

14. ทำซ้ำข้อ 13. ในกรณีที่คิดว่าได้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย โดยนำส่วนใสที่เหลืออยู่ดูดใส่อีก 650 ไมโครลิตร ใส่ในDNeasy mini spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (โดยทิ้งส่วนใสในข้อ 13.)

15. เปลี่ยน mini spin column 2 ไมโครลิตร แล้วเติม buffer AW (ล้าง buffer) 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ล้างบัฟเฟอร์ออกเพื่อล้างดีเอ็นเอให้สะอาด)

16. ทิ้งส่วนใส และเติม buffer AW 500 ไมโครลิตร(ล้างบัฟเฟอร์) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที (เวลาหยด buffer AW ให้หยดลงบนเมมแบรนช้าๆ เพื่อป้องกันการขาดและให้ล้างสะอาด)

17. ทำการย้ายเมมแบรนใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ เพื่อเก็บดีเอ็นเอ แล้วเติม AE buffer (Elution buffer) 70 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (37 องศาเซลเซียส) 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (Elution buffer ละลายดีเอ็นเอออกจากเมมแบรน) สามารถทำซ้ำอีกครั้งได้

18. ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง Optical density (O.D.) ที่ความเข้มแสง 260 และ 280 นาโนเมตร

ถ้าค่า O.D.260/O.D.280 = 1.8-2.0 แสดงว่าเป็นดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ถ้าค่า O.D.260/O.D.280 < 1.8 แสดงว่าแสดงว่ามีการปนเปื้อนอาร์เอ็นเอ

ถ้าค่า O.D.260/O.D.280 > 2.0 แสดงว่าแสดงว่ามีการปนเปื้อนโปรตีนหรือฟีนอล

การจำแนกสายพันธุ์ของมันเทศโดยเทคนิค RAPD

1. การเตรียมสารละลายผสมลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร

10X PCR buffer	2.0 ไมโครลิตร
Mix dNTPs 1.25 มิลลิโมลาร์	3.2 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Primer	20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร	1.0 ไมโครลิตร
$MgCl_2$	50 มิลลิโมลาร์	1.2 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase		0.2 ไมโครลิตร
DNA		x ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน		15 – x ไมโครลิตร

2. ผสมสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยาให้เข้ากัน แล้ววางหลอดทดลอง ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการใช้อุณหภูมิในสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

Initiation	Denaturing Step	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
	Denaturing Step	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	45 รอบ
	Annealing Step	36 องศาเซลเซียส	1 นาที	
	Extention Step	72 องศาเซลเซียส	1.5 นาที	
Final Extention Step		72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1 รอบ
Cool Down		4 องศาเซลเซียส		

3. ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการแยกขนาดดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน 1X TBE buffer โดยการนำผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ 5 ไมโครลิตร และ Loading dye 1 หยด โดยใช้ DNA Marker ขนาด 100 คู่เบส เพื่อเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 70-90 นาที

4. ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 4 นาที แล้วล้างออก 20 นาที จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

การทดลองนี้จะทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ และนำผลที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบกัน โดยได้ทดลองเปรียบเทียบในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน 4 สูตร คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้แคลลัสจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ไข่ กระต่าย พจ 205 พจ 206 พจ 226-24 และพจ 265-1 พบว่า

สายพันธุ์ไข่ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.1) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) (รูปที่ 4.2)

สายพันธุ์กระต่าย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.3) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) (รูปที่ 4.4)

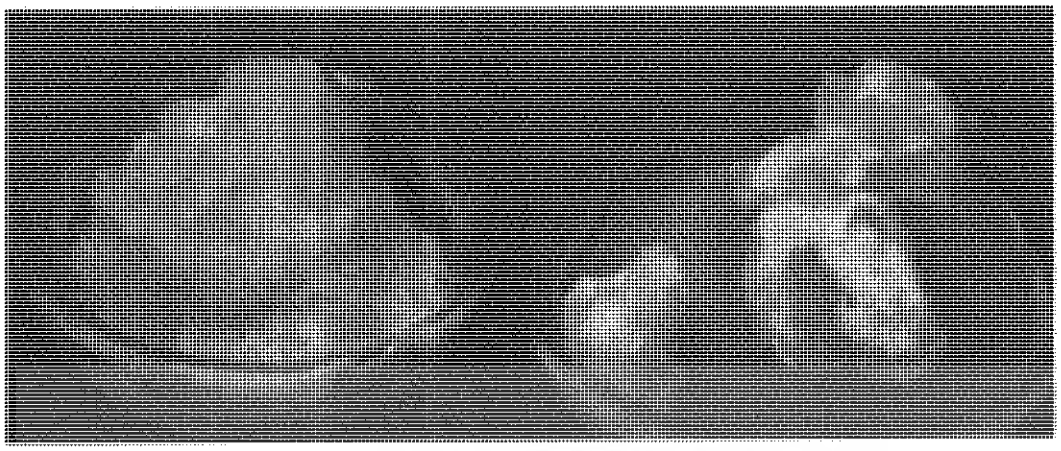
สายพันธุ์ พจ 205 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.5) ทุกสูตรไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว

สายพันธุ์ พจ 206 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.6) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) (รูปที่ 4.7)

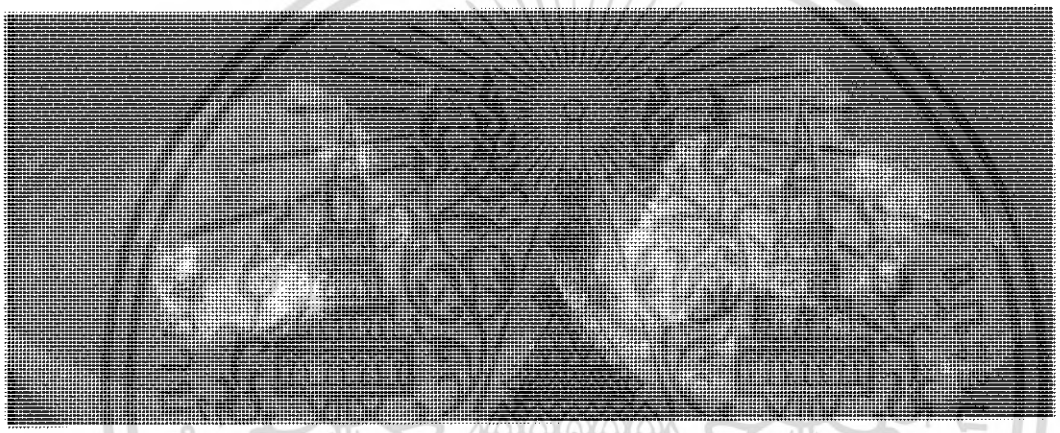
สายพันธุ์ พจ 226-24 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.8) ทุกสูตรไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว

สายพันธุ์ พจ 265-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.9) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 88.89 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) (รูปที่ 4.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค ง

รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ไข่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

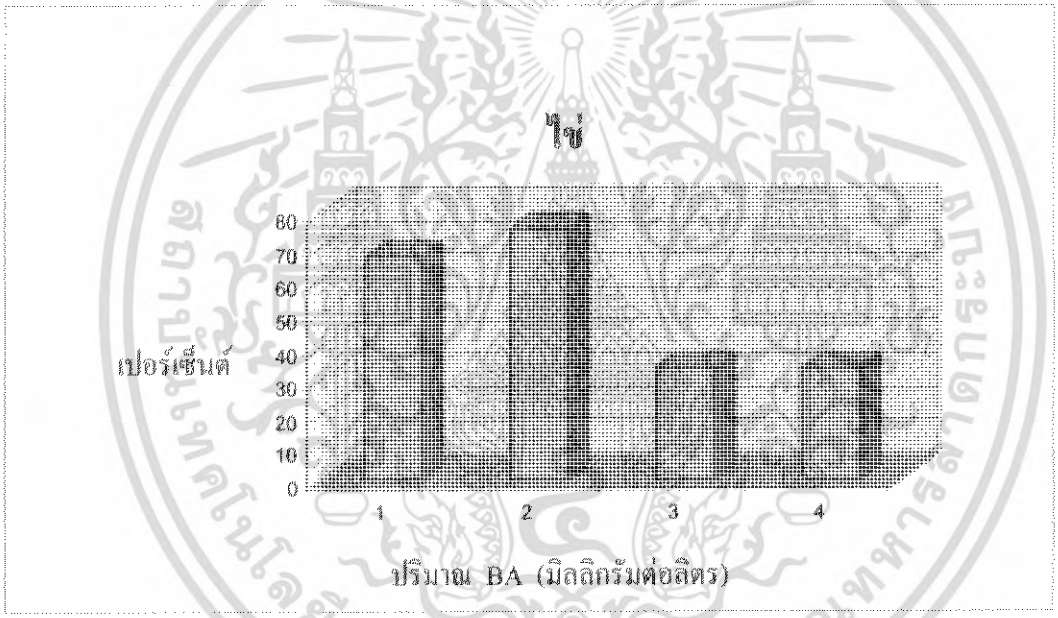
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

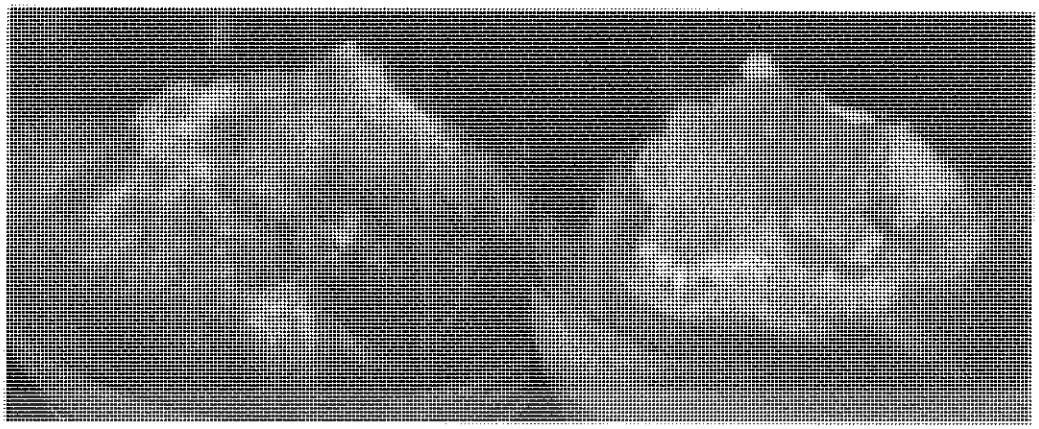
ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	9	6	66.67
2	8	6	75.00
3	9	3	33.33
4	9	3	33.33

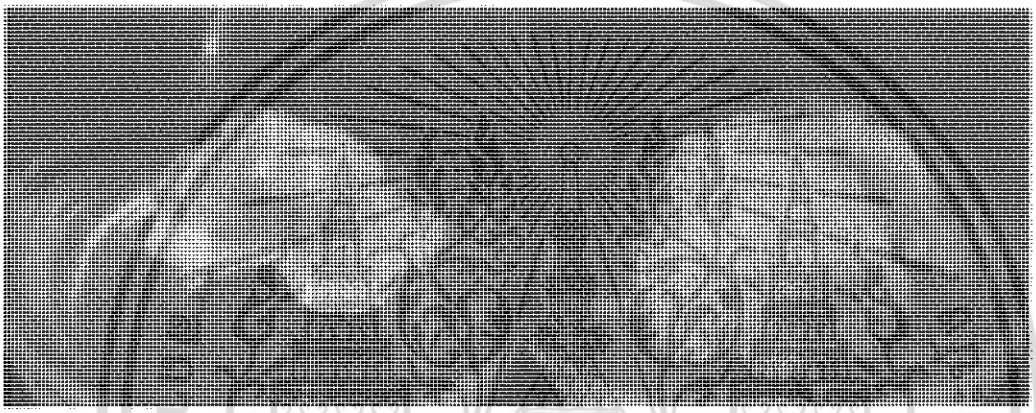


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค ง

รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์กระด่าย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

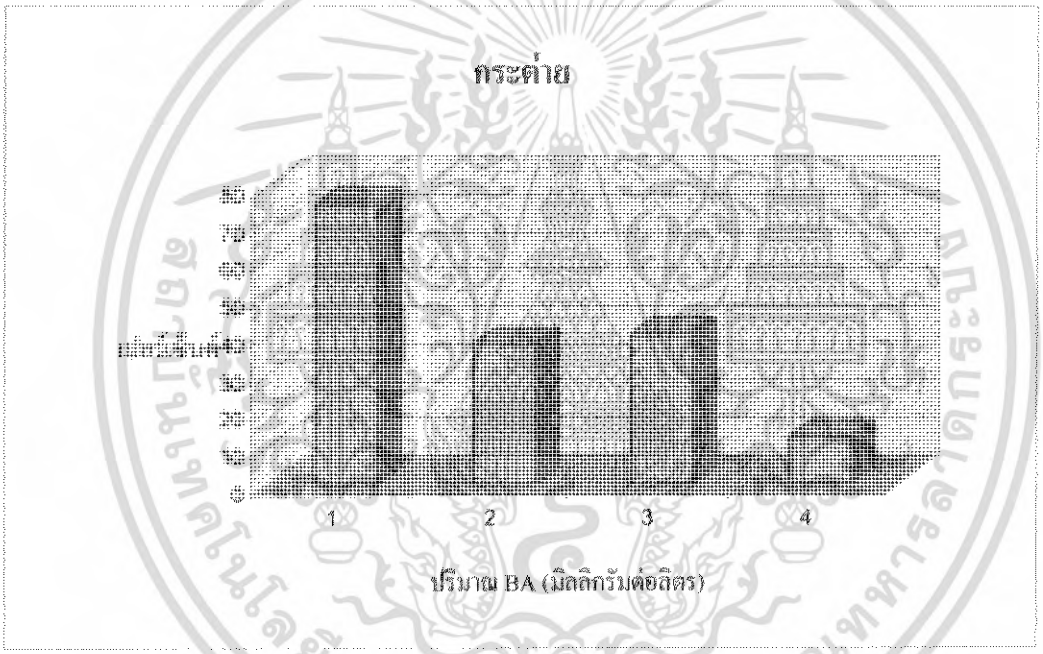
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

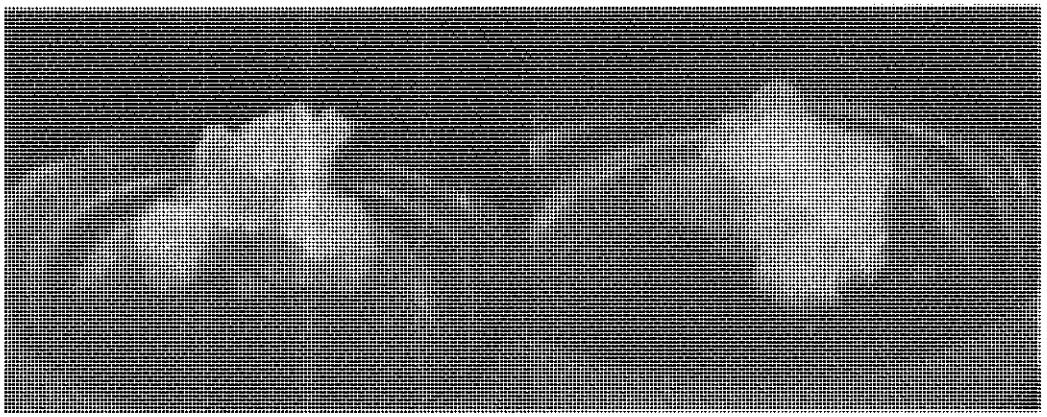
ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์กระด่ายที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	8	6	75.00
2	8	3	37.50
3	10	4	40.00
4	8	1	12.50

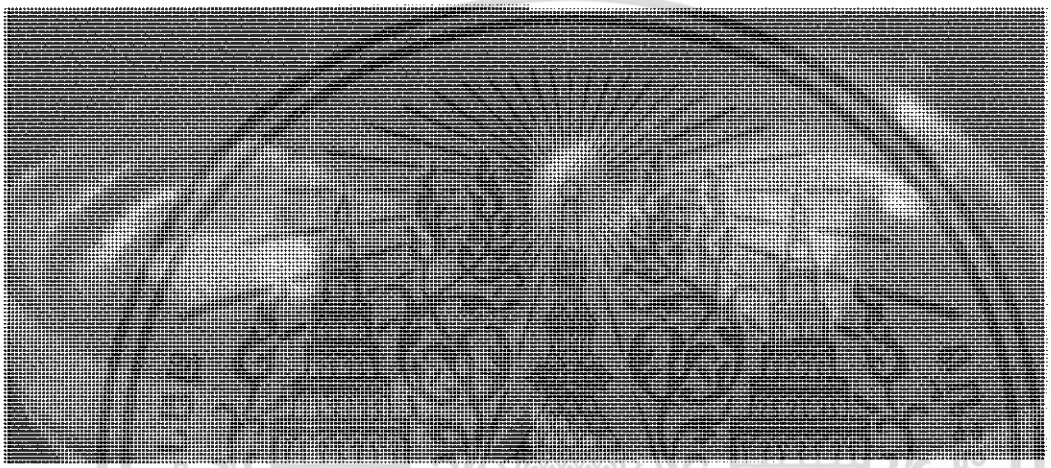


รูปที่ 4.4 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์กระด่ายที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค ง

รูปที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 205 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

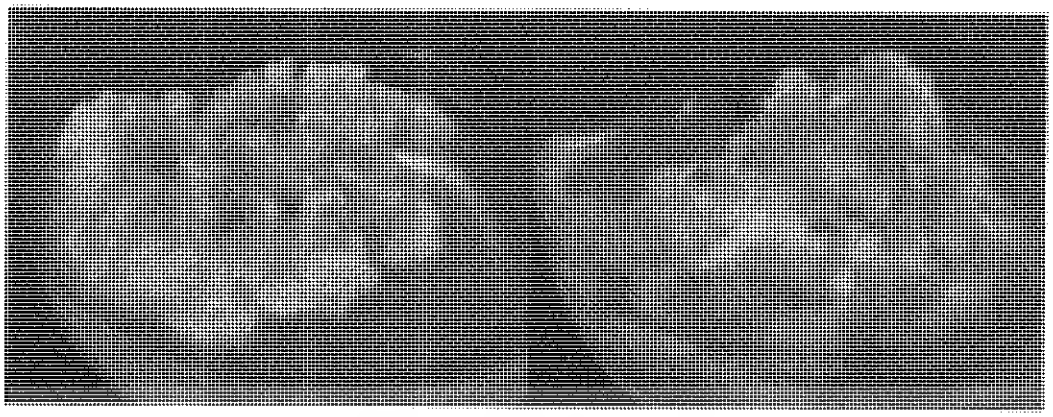
ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

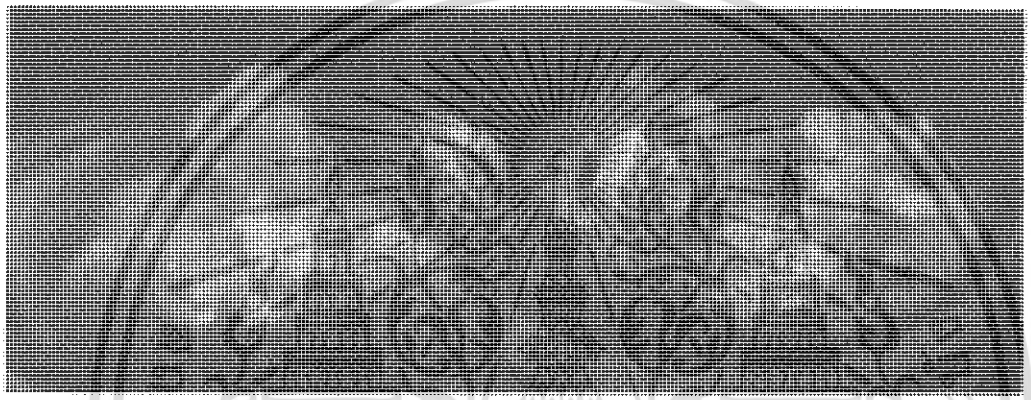
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค ง

รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 206 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

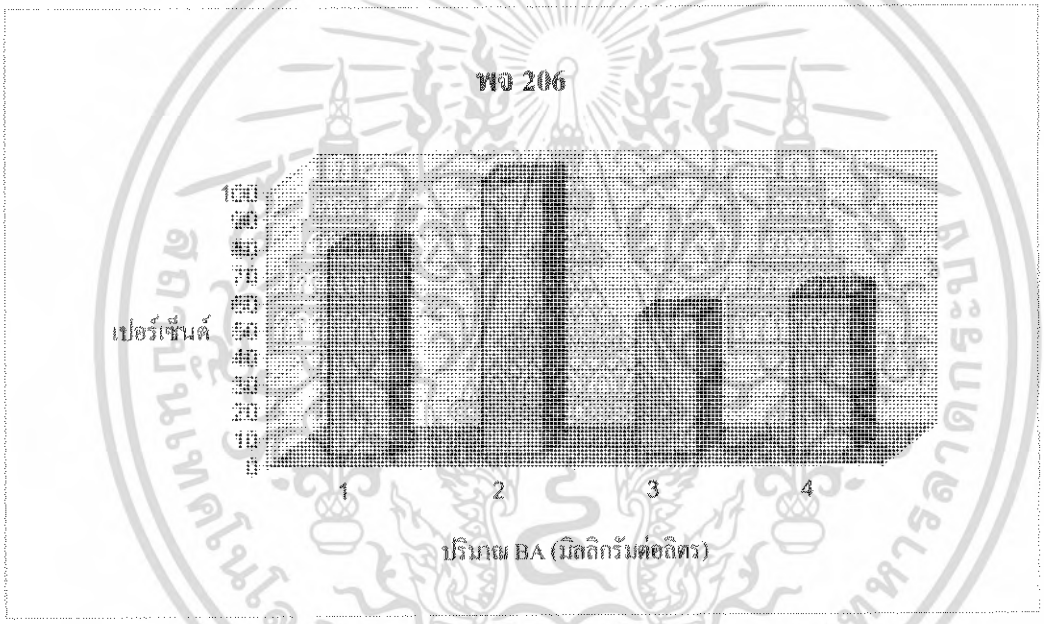
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

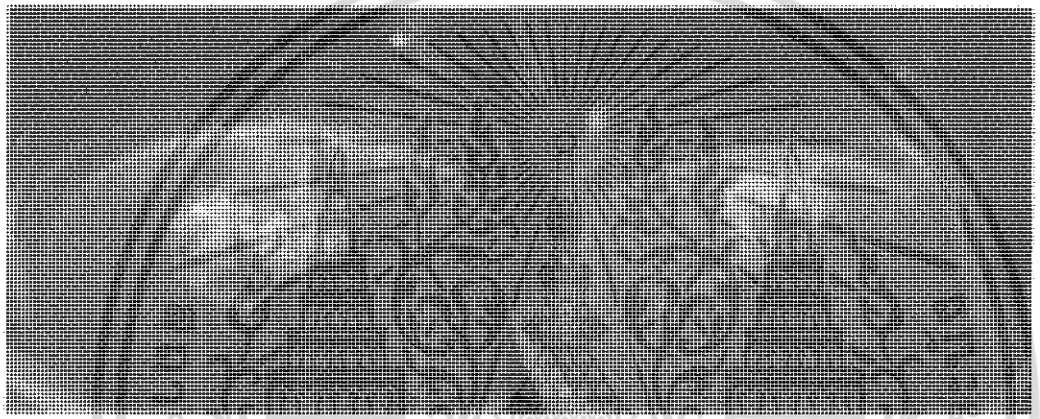
ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	8	6	75.00
2	8	8	100.00
3	8	4	50.00
4	7	4	57.14



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก ข



ค ง

รูปที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 226-24 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

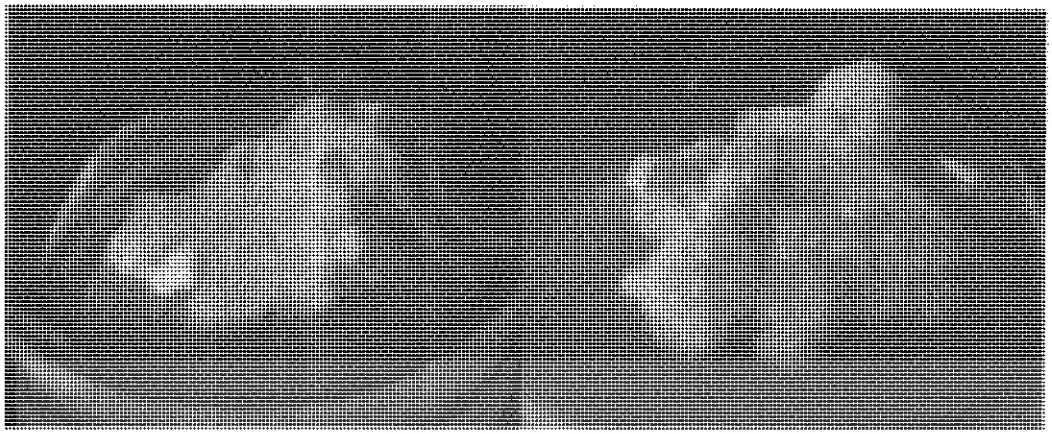
ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข

ค ง

รูปที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 265-1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร LS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

การทดลองนี้จะทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ และนำผลที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบกัน โดยได้ทดลองเปรียบเทียบในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน 4 สูตร คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้แคลลัสจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ไข่ กระต่าย พจ 205 พจ 206 พบว่า

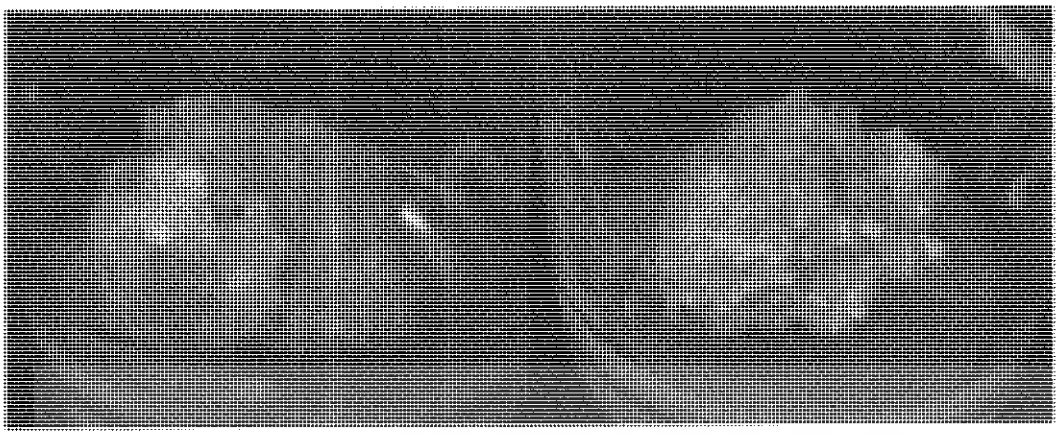
สายพันธุ์ไข่ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS (รูปที่ 4.11) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5) (รูปที่ 4.12)

สายพันธุ์กระต่าย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS (รูปที่ 4.13) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6) (รูปที่ 4.14)

สายพันธุ์ พจ 205 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS (รูปที่ 4.15) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.7) (รูปที่ 4.16)

สายพันธุ์ พจ 206 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS (รูปที่ 4.17) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) (รูปที่ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข

ค ง

รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ไข่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

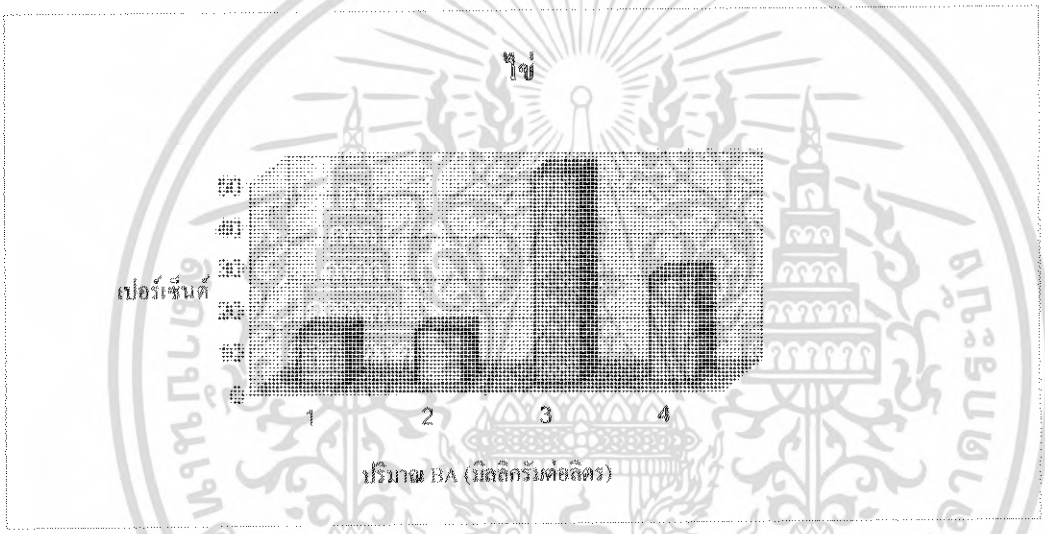
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

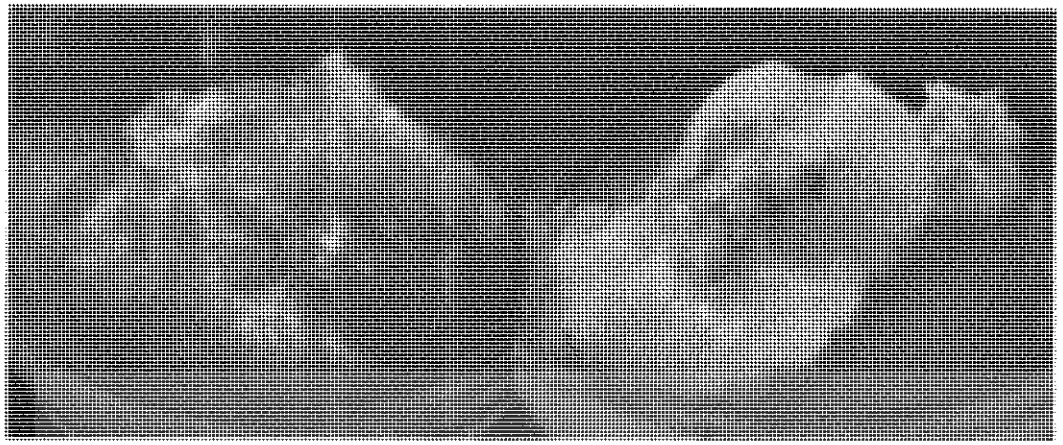
ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	8	1	12.50
2	8	1	12.50
3	8	4	50.00
4	8	2	25.00

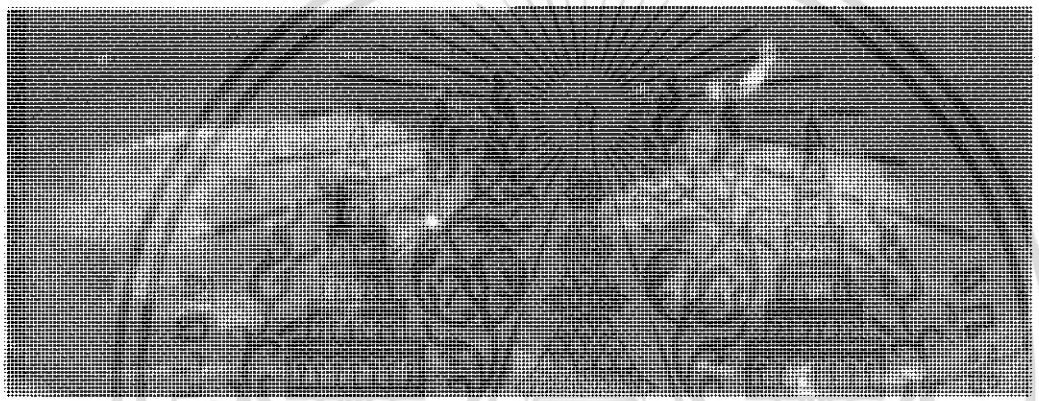


รูปที่ 4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ไข่ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค ง

รูปที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์กระต่าย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

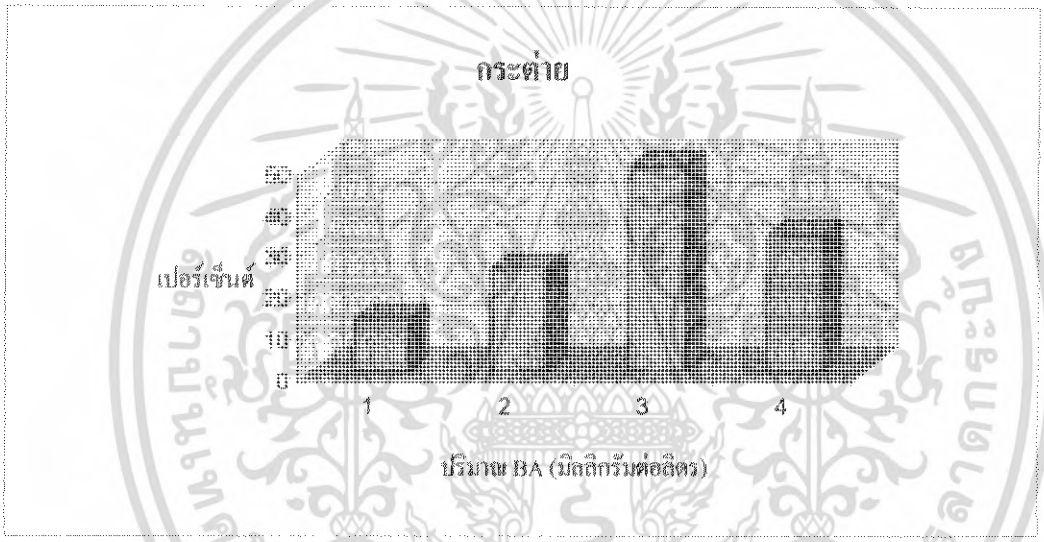
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

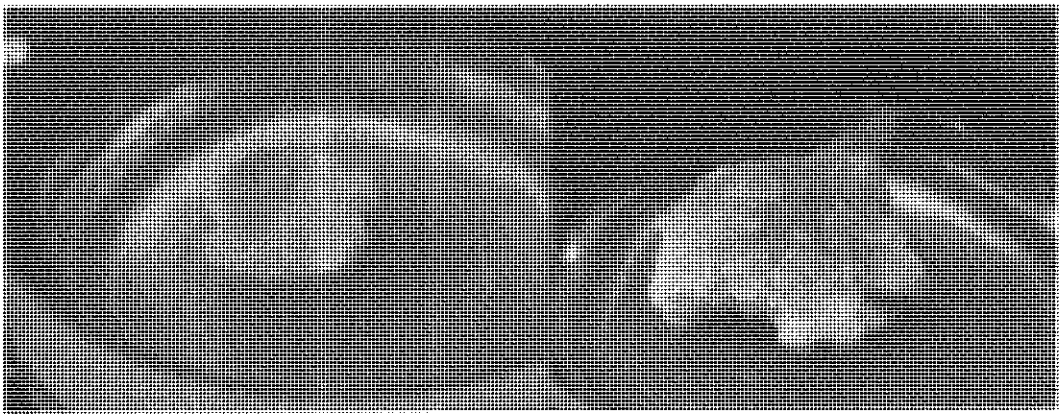
ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์กระต่ายที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซนต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	8	1	12.50
2	8	2	25.00
3	8	4	50.00
4	9	3	33.33

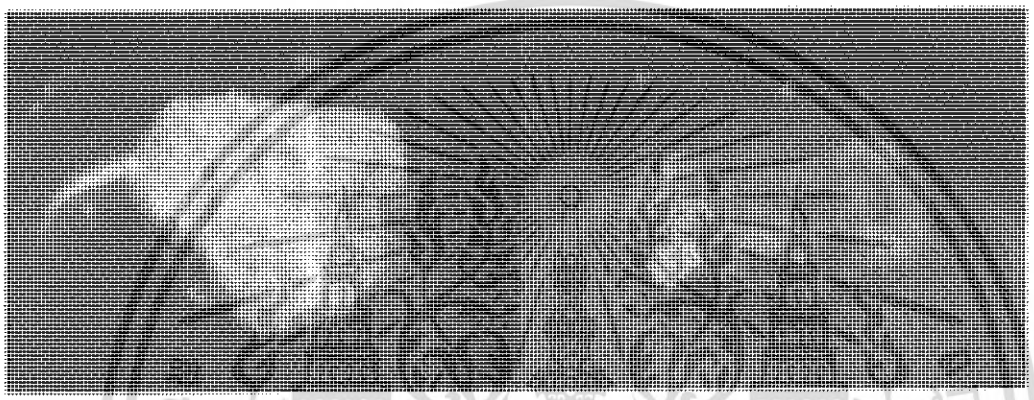


รูปที่ 4.14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์กระต่ายที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค ง

รูปที่ 4.15 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 205 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

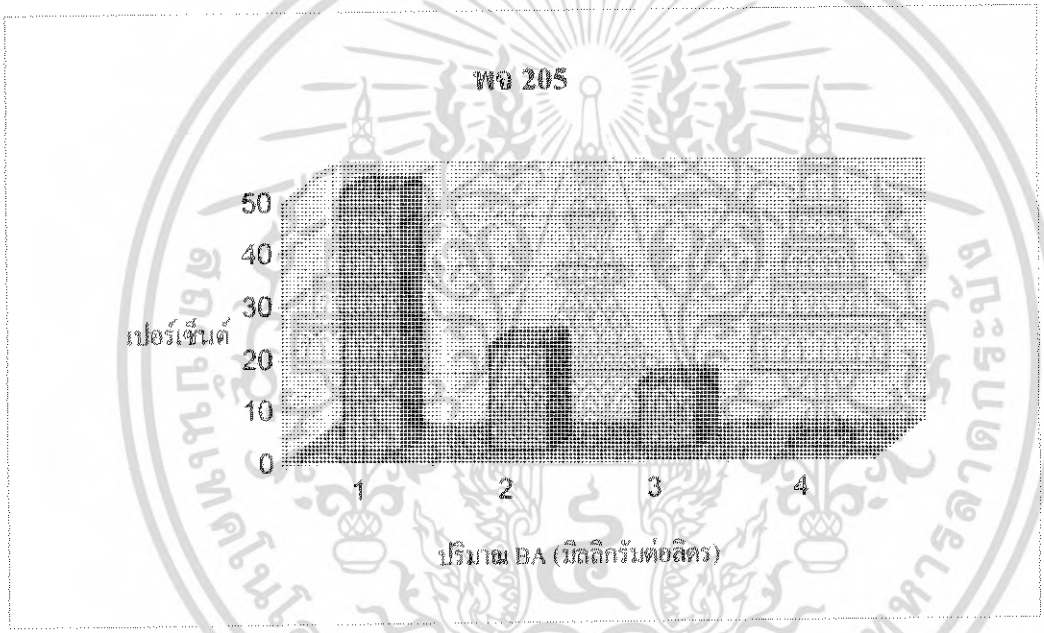
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

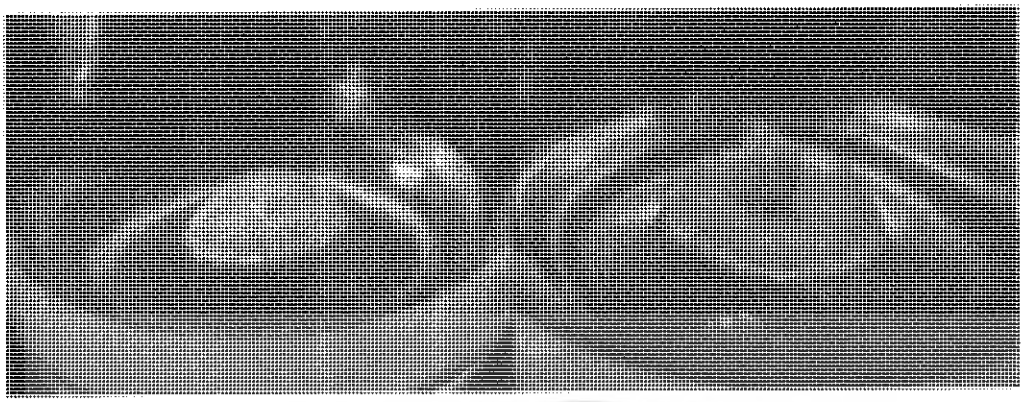
ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 205 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	8	4	50.00
2	8	2	20.00
3	8	1	12.50
4	8	0	0.00

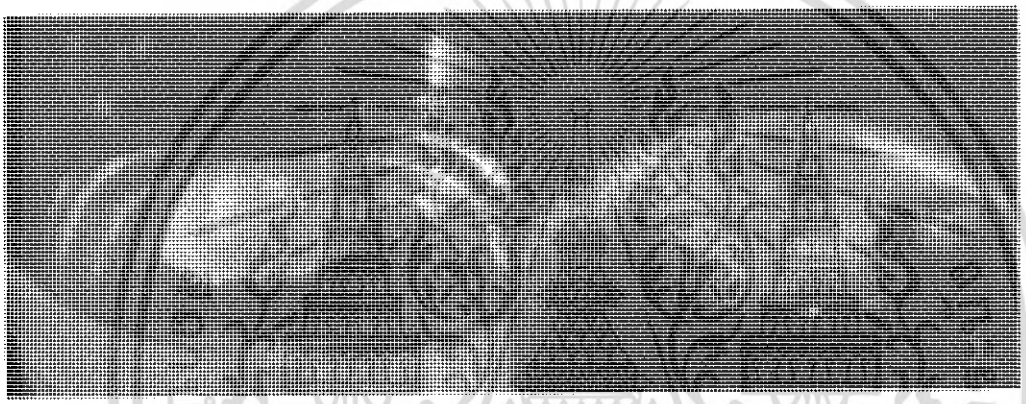


รูปที่ 4.16 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 205 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค ง

รูปที่ 4.17 แสดงการเปรียบเทียบแคลลัสสายพันธุ์ พจ 206 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

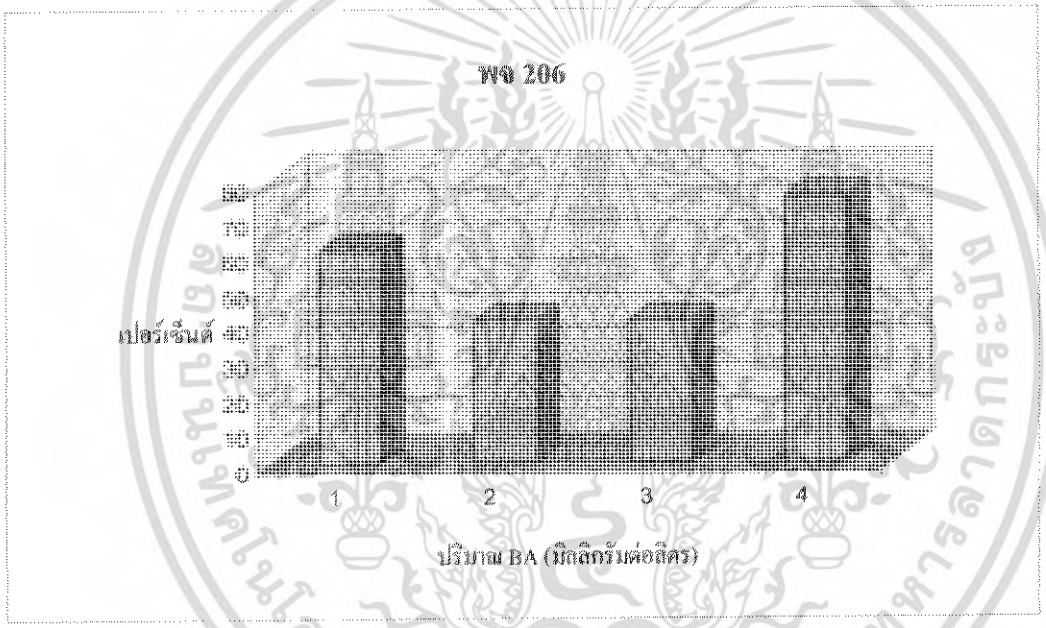
ค BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	10	6	60.00
2	10	4	40.00
3	10	4	40.00
4	8	6	75.00



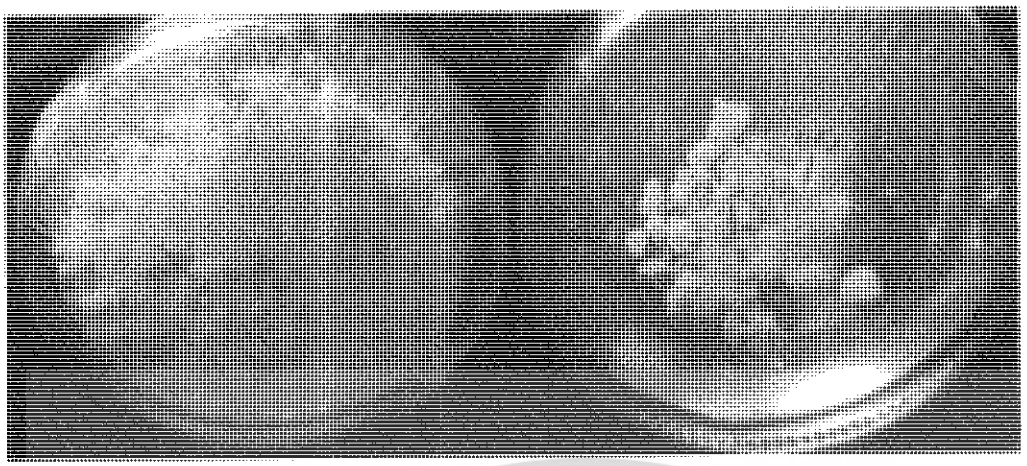
รูปที่ 4.18 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ BA แตกต่างกันคือ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

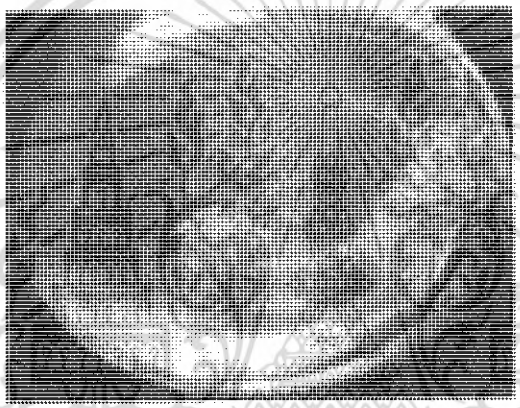
การทดลองที่ 3 การหาระยะเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของมันเทศ 3 สายพันธุ์ โดยการหาน้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาการหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของทั้งสามสายพันธุ์ (รูปที่ 4.19) ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส ทำการวัดหาค่าน้ำหนักแห้งในแต่ละระยะเวลา คือ 0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 และ 30 วัน ตามลำดับ ผลการทดลองดังตารางที่12 และ เมื่อนำผลที่วัดค่าน้ำหนักแห้งมาเขียนกราฟการเจริญ พบว่าเซลล์แขวนลอยของมันเทศพันธุ์กระต่าย มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 15-21 วัน (ตารางที่ 4.9) (รูปที่ 4.20) สำหรับเซลล์แขวนลอยของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-18 วัน (ตารางที่ 4.10) (รูปที่ 4.21) และมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 15-18 วัน (ตารางที่ 4.11) (รูปที่ 4.22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค

รูปที่ 4.19 เซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2, 4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรของมันเทศสายพันธุ์ต่างๆ

ก มันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1

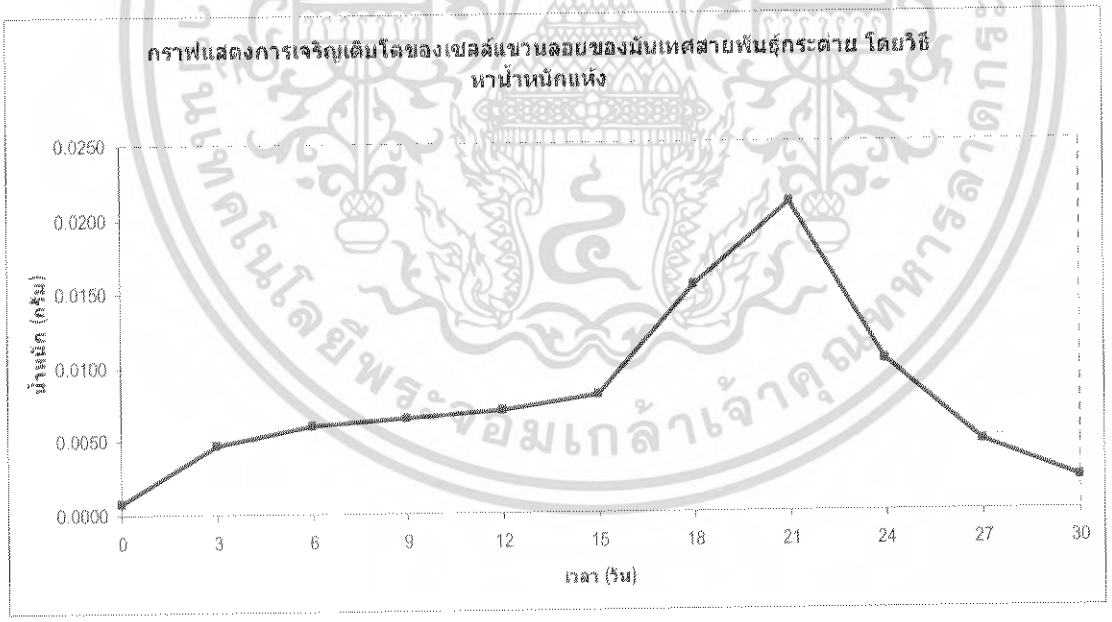
ข มันเทศสายพันธุ์ พจ 206

ค มันเทศสายพันธุ์กระต่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์กระต่าย

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
0	0.0008
3	0.0047
6	0.0060
9	0.0066
12	0.0071
15	0.0081
18	0.0154
21	0.0209
24	0.0103
27	0.0047
30	0.0022

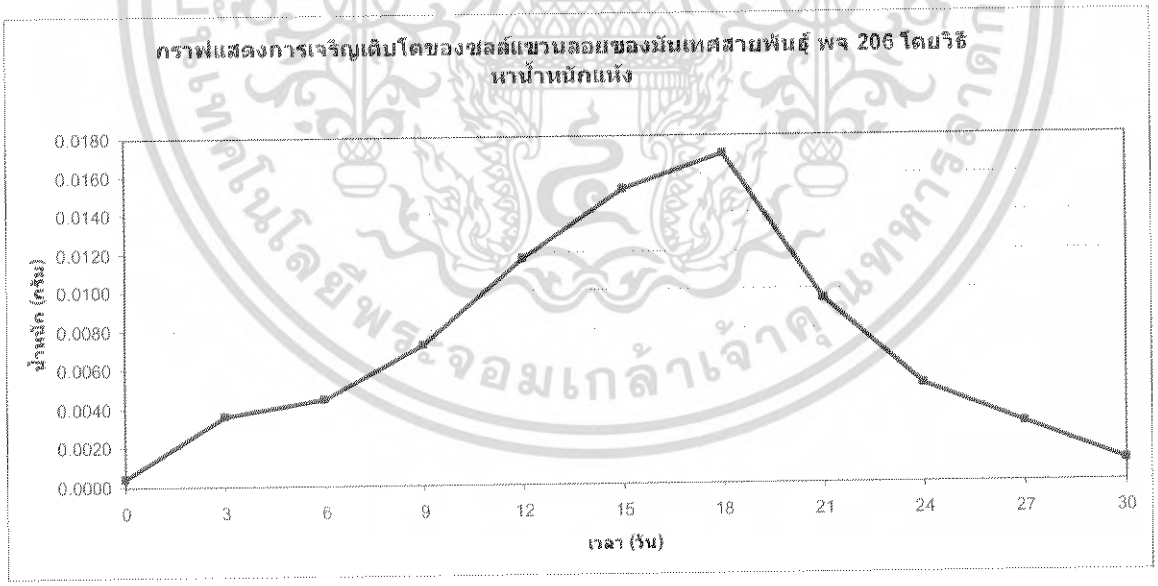


รูปที่ 4.20 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์กระต่าย โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์ พจ 206

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
0	0.0004
3	0.0036
6	0.0045
9	0.0073
12	0.0117
15	0.0152
18	0.0171
21	0.0095
24	0.0051
27	0.0030
30	0.0011

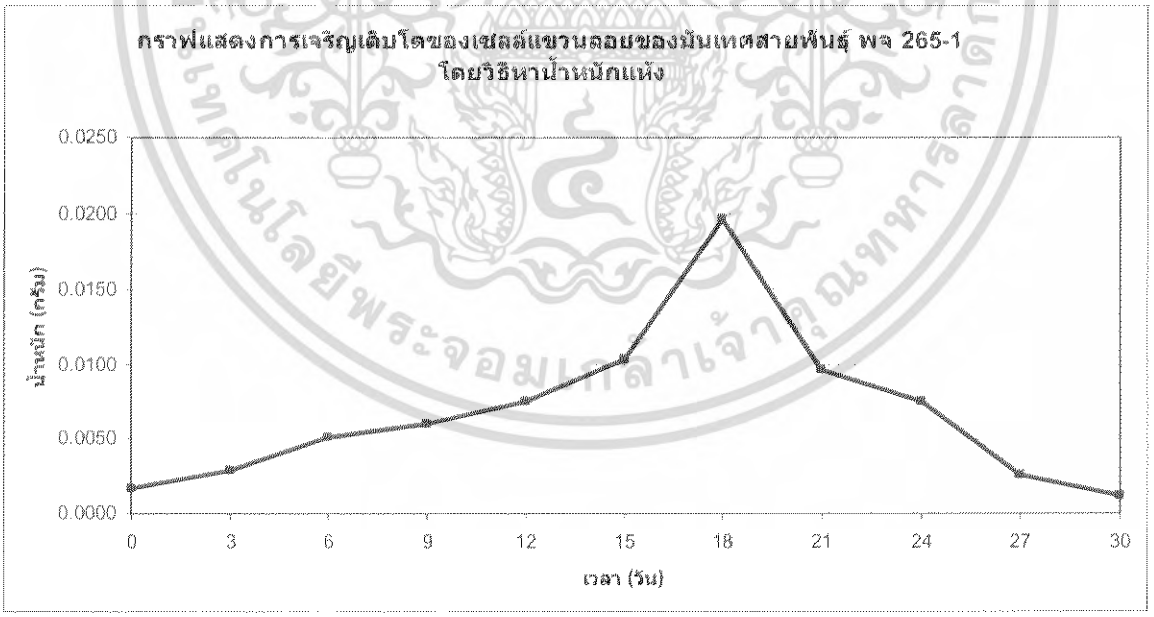


รูปที่ 4.21 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
0	0.0017
3	0.0029
6	0.0051
9	0.0061
12	0.0076
15	0.0104
18	0.0197
21	0.0097
24	0.0075
27	0.0027
30	0.0012



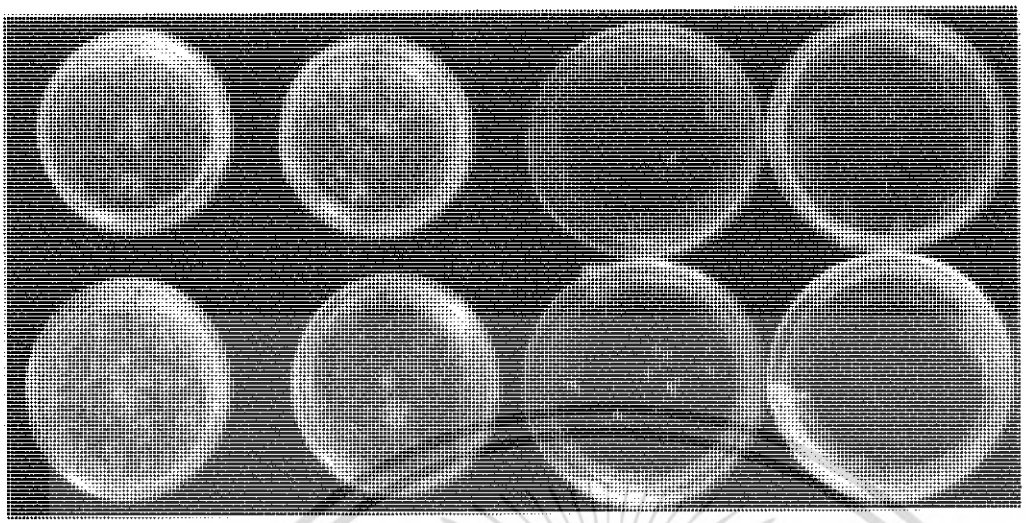
รูปที่ 4.22 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

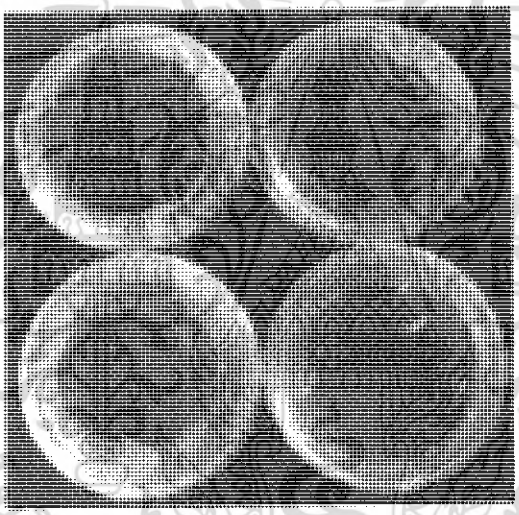
การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากเซลล์แขวนลอย ให้เป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองเพื่อศึกษาการพัฒนาแคลลัสของมันเทศทั้ง 3 สายพันธุ์โดยการเลี้ยงแบบผสมในอาหารแข็ง ซึ่งเป็นอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.23) พบว่า มันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 สามารถถูกชักนำให้เป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวได้ทุกความเข้มข้น โดยความเข้มข้นของ BA ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถถูกชักนำได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.12) (รูปที่ 4.24) มันเทศสายพันธุ์ พจ 206 สามารถถูกชักนำให้เป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวได้โดยความเข้มข้นของ BA ที่ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.13) (รูปที่ 4.25) และมันเทศสายพันธุ์กระต่ายสามารถถูกชักนำให้เป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวได้โดยความเข้มข้นของ BA ที่ 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.14) (รูปที่ 4.26)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข



ค

รูปที่ 4.23 การพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ของมันเทศสายพันธุ์ต่างๆ

ก มันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1

ข มันเทศสายพันธุ์กระต่าย

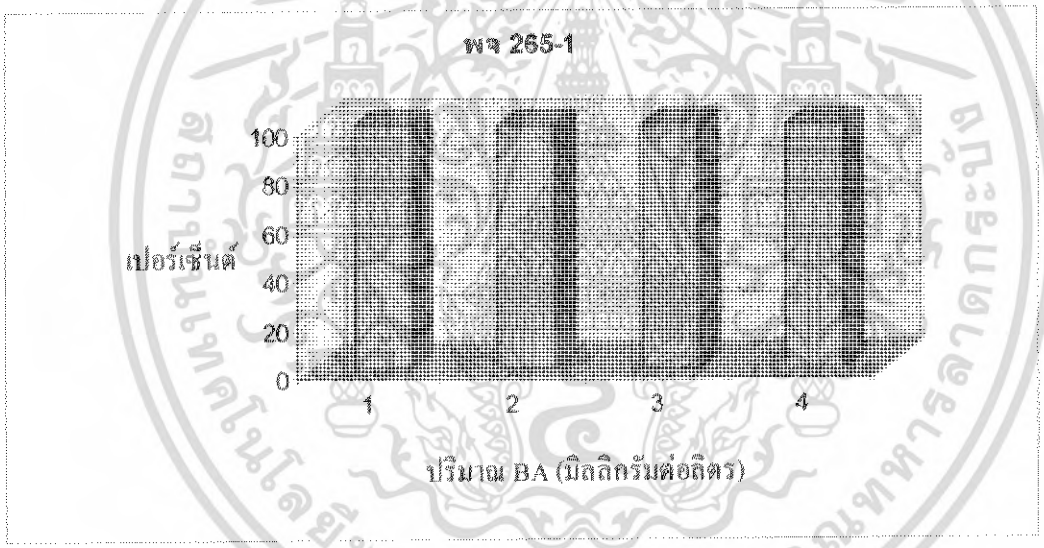
ค มันเทศสายพันธุ์ พจ 206

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนหน่วยการทดลอง	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	6	6	100
2	6	6	100
3	6	6	100
4	6	6	100

MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

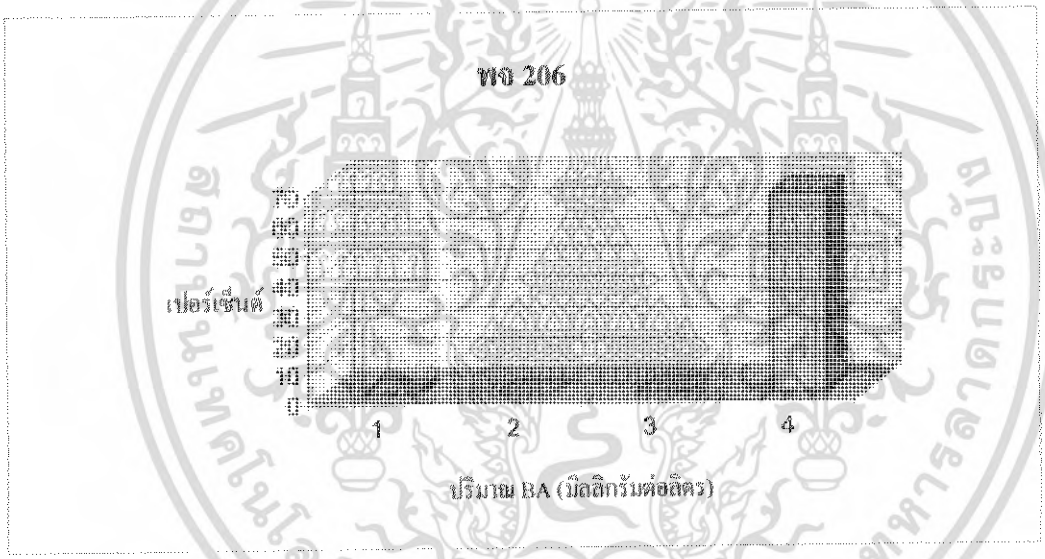


รูปที่ 4.24 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนหน่วยการทดลอง	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	6	0	0
2	6	0	0
3	6	0	0
4	6	4	66.67

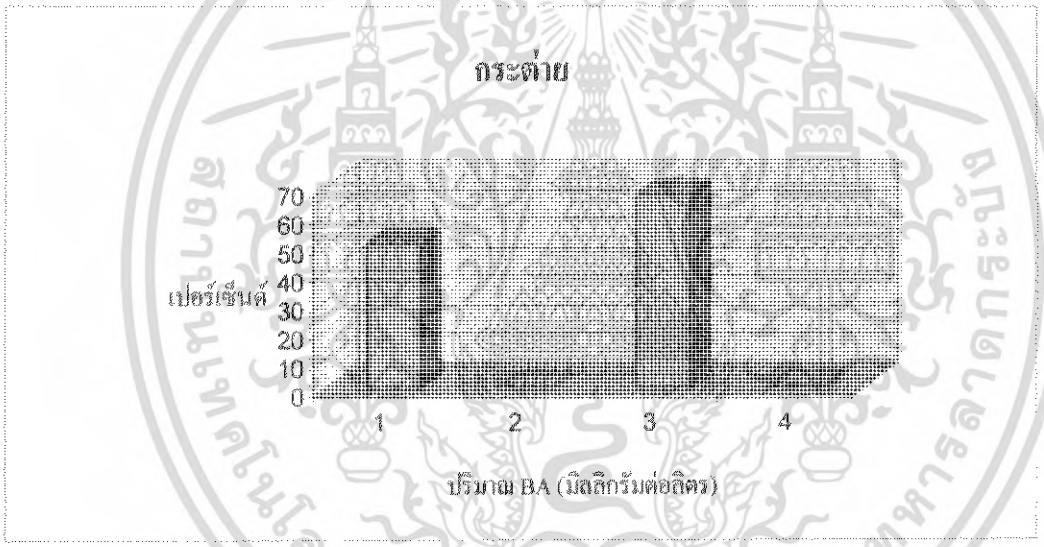


รูปที่ 4.25 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ พจ 206 ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์ กระด่าย ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปริมาณ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนหน่วยการทดลอง	การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว
1	6	3	50
2	6	0	0
3	6	4	66.67
4	6	0	0



รูปที่ 4.26 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวของแคลลัสของมันเทศสายพันธุ์กระด่าย ที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งโดยการเทผสมรวมกัน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

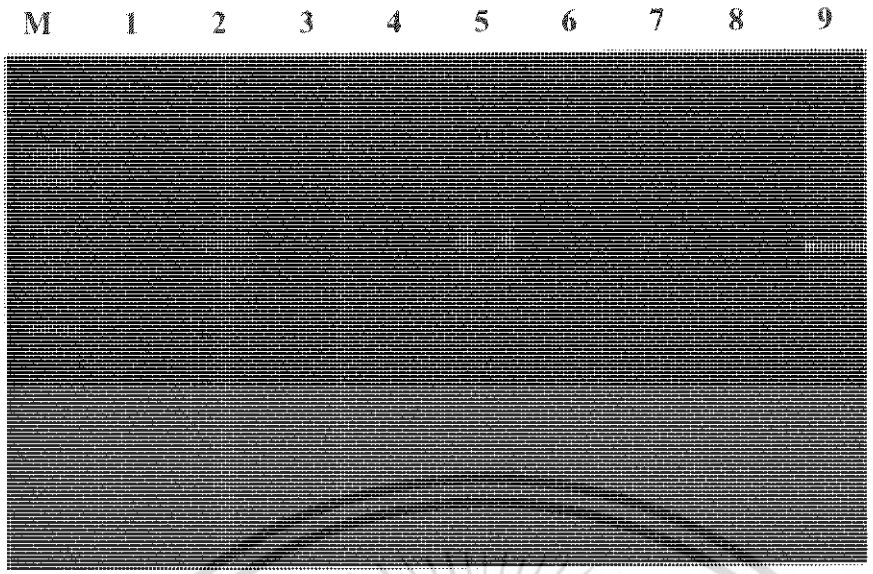
การทดลองที่ 5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศด้วยวิธี Random Amplified Polymorophic DNA (RAPD)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศด้วยวิธี RAPD ซึ่งทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของมันเทศทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด คือ OPA-07 OPB-14 OPC-04 OPD-02 และ OPG-13 ซึ่งสามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ กลุ่มที่ไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนี้ ไพรเมอร์ OPA-07 เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นในมันเทศ 7 สายพันธุ์ คือ พจ 65-15 พจ 189-257 พจ 206 พจ 226-24 พจ 226-31 พจ 227-6 และ พจ 256-1 และไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอใน 2 สายพันธุ์ คือ พจ 205 และ พจ 227-6 โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์ของ พจ 226-24 และ พจ 226-31 มีลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (รูปที่ 4.27) ไพรเมอร์ OPB-14 เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน คือ พจ 206 พจ 226-24 พจ 226-31 พจ 227-6 และ พจ 95040-10 และไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอใน 4 สายพันธุ์ คือ พจ 65-16 พจ 189-259 พจ 205 และ พจ 265-1 (รูปที่ 4.28) ไพรเมอร์ OPC-04 เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 7 สายพันธุ์ คือ พจ 65-16 พจ 189-259 พจ 206 พจ 226-24 พจ 226-31 พจ 227-6 และ พจ 95040-10 และไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 2 สายพันธุ์ คือ พจ 205 และ พจ 265-1

OPD-02 และ OPG-13 เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 8 สายพันธุ์ คือ พจ 65-16 พจ 189-259 พจ 206 พจ 226-24 พจ 226-31 พจ 227-6 พจ 256-1 และ พจ 95040-10 และไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 1 สายพันธุ์ คือ พจ 205 โดย พจ 205 ไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุกๆ ไพรเมอร์ที่ทำการศึกษาอาจมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยหรือไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาไม่เหมาะสม

ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศด้วยวิธี RAPD โดยการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่ยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของมันเทศได้ อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อย คือ 5 ชนิด แต่ก็สามารถเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปได้ ดังเช่น การศึกษาของ Satoru และคณะ (2001) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของมันเทศจำนวน 27 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD ต้องใช้ไพรเมอร์ถึง 14 ชนิด จึงสามารถจำแนกสายพันธุ์มันเทศได้เป็น 4 กลุ่ม

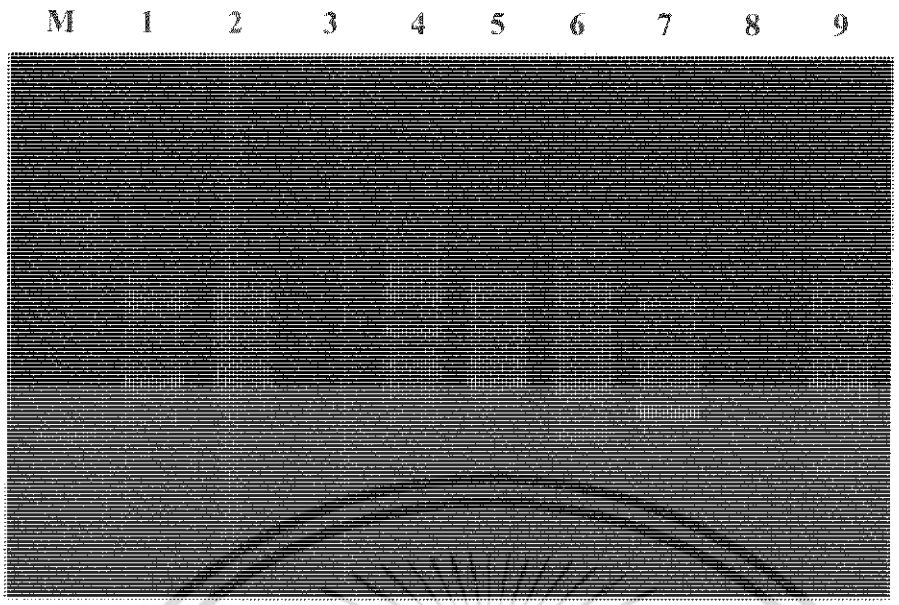
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 265-1 (2) พจ 226-24 (3) พจ 95040-10 (4) พจ 227-6 (5) พจ 226-31 (6) พจ 65-16 (7) พจ 189-257 (8) พจ 205 และ (9) พจ 206

รูปที่ 4.28 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPB-14 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 206 (5) พจ226-24 (6) พจ 226-31 (7) พจ 227-6 (8) พจ 265-1 และ (9) พจ 95040-10

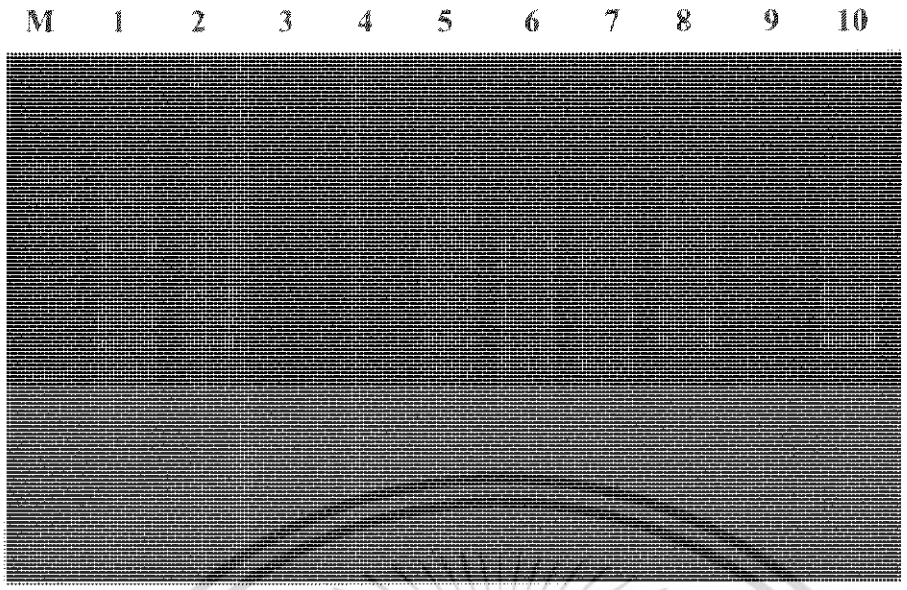
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPC-04 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 206 (5) พจ226-24 (6) พจ 226-31 (7) พจ 227-6 (8) พจ 265-1 และ (9) พจ 95040-10

รูปที่ 4.30 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPD-02 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 206 (5) พจ226-24 (6) พจ 226-31 (7) พจ 227-6 (8) พจ 265-1 และ (9) พจ 95040-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.31 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันเทศจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ OPG-13 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder (1) พจ 65-16 (2) พจ 189-259 (3) พจ 205 (4) พจ 205 (5) พจ 206 (6) พจ 226-24 (7) พจ 226-31 (8) พจ 227-6 (9) พจ 265-1 และ (10) พจ 95040-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงมันเทศ 6 สายพันธุ์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยศึกษาจากการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ พบว่า มันเทศสายพันธุ์ไข่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์

สายพันธุ์กระต่าย ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์

สายพันธุ์ พจ 206 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์

สายพันธุ์ พจ 265-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 83.33 เปอร์เซ็นต์

สายพันธุ์ พจ 205 และ พจ 226-24 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ทุกสูตรไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร LS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงมันเทศ 4 สายพันธุ์บนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยศึกษาจากการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ พบว่า มันเทศสายพันธุ์ไข่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 50 เปอร์เซ็นต์

สายพันธุ์กระต่าย ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 50 เปอร์เซ็นต์

สายพันธุ์ พจ 205 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 50 เปอร์เซ็นต์

สายพันธุ์ พจ 206 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 การหาระยะเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของมันเทศ 3 สายพันธุ์ โดยการหาน้ำหนักแห้ง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของมันเทศ 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการวัดหาค่าน้ำหนักแห้งทุกๆ 3 วัน พบว่า มันเทศสายพันธุ์กระต่าย มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 15-21 วัน สายพันธุ์ พจ 206 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-18 วัน และ สายพันธุ์ พจ 265-1 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 15-18 วัน

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของทั้ง 3 สายพันธุ์ จากลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย พบว่า สายพันธุ์ พจ 265-1 มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด

การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากเซลล์แขวนลอย ให้เป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของมันเทศ 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA ที่แตกต่างกัน พบว่า มันเทศสายพันธุ์ พจ 265-1 สามารถถูกชักนำให้เป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวได้ทุกความเข้มข้นของ BA ที่แตกต่างกัน และดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ BA ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สายพันธุ์ พจ 206 สามารถถูกชักนำให้เป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ BA ที่ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

มันเทศสายพันธุ์กระต่าย สามารถถูกชักนำให้เป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ BA ที่ 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศด้วยวิธี Random Amplified Polymorophic DNA (RAPD)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันเทศด้วยวิธี RAPD ของมันเทศ 9 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ 65-16 พจ 189-257 พจ 205 พจ 206 พจ 226-24 พจ 226-31 พจ 227-6 พจ 265-1 และ พจ95040-10 โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด คือ OPA-07 OPB-14 OPC-04 OPD-02 และ OPG-13 พบว่า สามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม ไพรเมอร์ที่สามารถบอกข้อแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์มันเทศได้ คือ OPA-07 OPB-14 และ OPC-04 และไพรเมอร์ที่ไม่สามารถบอกข้อแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์มันเทศได้ คือ OPD-02 และ OPG-13 จากไพรเมอร์ ชนิด OPA-07 พบว่า มันเทศสายพันธุ์ พจ 226-24 และ พจ 226-31 มีลักษณะใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากที่สุด เนื่องจากมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 162 หน้า.

นรินทร์ สมบูรณ์สาร และอรสา ดิสถาพร. 2548. [Online].Available : http://fs.doae.go.th/knowledge/7%20veget/mantat.doc

ประภัสสร สุรวัฒนาวรรณ. 2548. การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช. [Online].Available : http://www.gpo.or.th/rdi/html/DNAfingerprinting.html

ประเวศ วะสี และคณะ. 2537. ความหลากหลายทางชีวภาพกับการพัฒนาอย่างยั่งยืน. พิมพ์ครั้งที่2 : สถาบันชุมชนท้องถิ่นพัฒนา. 278 หน้า.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์. 158 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาลัยวิทยาเกษตรศาสตร์. 219 หน้า.

วิไลพร น้อยบุรี. 2547. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลือง [*Glycine max*(L.) Merril] โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิค RAPD และ AFLP. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 146 หน้า.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. อุดรธานี : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี. 219 หน้า.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). 2548. สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน. 159 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุศาสตร์เบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาลัยวิทยาเกษตรศาสตร์. 282 หน้า.

Ahn Y. S., Song Y. S., Jeong B. C. and Min K. S. 2004. Cross-Incompatible Groups and Genetic Variation by RAPD of Korean Sweetpotato [*Ipomoea batatas,* (L.) Lam.] Varieties. *Kor. J. Breed.* 34 : 534-833.

Dessai, A. P., Gosukonda, R. M., Blay, E., Dumenyo, C. K., Medina-Bolivar, F. and Prakash, C.S. 1995. Plant regeneration of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM.) from leaf explants in vitro using a two-stage protocol. *Scientia horticulture.* 62 : 217-365.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Magalhães, J. S., Santos, M. D., Filho, F. C., Blumer, L., Guerra, M. P. and Torres, A. C. 2006. Induction of somatic embryogenesis in sweet potato genotypes. *Horticultura Brasileira*. 24 : 1.

Murata T., Fukuoka H. and Miyaji Y. 1989. Culture condition on shoot tip culture of swwet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Proceeding of the Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University*. 8 : 9-14.

Murata T. and Fukuoka H. 1991. Plant regeneration from stem callus and rapid clonal propagation by roller tube culture of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Proceeding of the Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University*. 10 : 37-44.

Murata T. and Fukuoka H. 1993. Plant regeneration from anther culture of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Proceeding of the Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University*. 12 : 1-9.

Murata T., Fukuoka H., and Kishimoto M. 1994. Plant regeneration from mesopyll and cell suspension protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Breeding Science*. 44 : 35-40.

Satoru, T., Tadashi, A., Michio, O., Yoshitaka, S., Maki, Y., Mika, T., Atsushi, N. and Kotaro, K. 2001. Random Amplified Polymorphic Dna (RAPD) analysis of wild sweet potatoes and yams picked in the Yap islands. *Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands*. 34 : 105-111.

Otani M., Shimada T. and Niizeki H. 1987. Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *Plant Science*. 53 : 157-160.

Prakash C.S. 1994. Sweet potato Biotechnology. *Progress and potential, Biotechnology and Development Monitor*. 18 : 18-19.

Song, G., Honda, H. and Yamaguchi, K. 2004. Efficent *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sweet potato(*Ipomoea batatas* (L.) LAM.) from stem explants using a two-step Kanamycin-Hygromycin selection method. *Biol.-plant*. 40 : 359-365.

Tseng Y. T., Lo H. F. and Hwang S. Y. 2002. Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross breeding cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphisms. *Bot. Bull. Acad. Sin*. 43 : 99-105.

[Online].Available : http://br.geocities.com/alccoelho/callus.jpg

[Online].Available : http://cropthai.ku.ac.th/agron212/sweetpotato.pdf

[Online].Available : http://cropthai.ku.ac.th/biotech/abs/mole.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : http://upload.wikimedia.org

[Online].Available : http://www.biology.clc.ue.edu

[Online].Available : http://www.doae.go.th/library/html/detail/paddy/c10.htm

[Online].Available : http://www.flowersdirect.co.il

[Online].Available : http://www.elchrom.com/

[Online].Available : http://www.il.mahidol.ac.th/

[Online].Available : http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/use/powder_sugar.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิลิตร/ลิตร)
1	NH_4NO_3	33000	20	50
	KNO_3	38000		
	$CaCl_2.2H_2O$	8800		
	$MgSO_4.7H_2O$	7400		
	KH_2PO_4	3400		
2	H_3BO_3	6200	1000	1
	KI	830		
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	250		
	$CoCl_2.6H_2O$	25		
3	$MnSO_4.4H_2O$	6900	1000	1
	$ZnSO_4.7H_2O$	8600		
	$CuSO_4.5H_2O$	25		
4	Na_2EDTA	3725	100	10
	$FeSO_4.7H_2O$	2785		
5	Inositol	10000	100	10
	Nicotinic acid	50		
	Pyridoxine-HCL	50		
	Thiamine-HCL	10		
	Glycine	200		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร LS

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิลิตร/ลิตร)
1	NH_4NO_3	33800	20	50
	KNO_3	38000		
	$CaCl_2.2H_2O$	8800		
	$MgSO_4.7H_2O$	7400		
	KH_2PO_4	3400		
2	H_3BO_3	6200	1000	1
	KI	830		
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	250		
	$CoCl_2.6H_2O$	25		
3	$MnSO_4.4H_2O$	22300	1000	1
	$ZnSO_4.7H_2O$	8600		
	$CuSO_4.5H_2O$	25		
4	Na_2EDTA	3725	100	10
	$FeSO_4.7H_2O$	2785		
5	Inositol	10000	100	10
	Pyridoxine-HCL	50		
	Thiamine-HCL	40		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้