สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการจำแนกสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

นางสาวฐานิตา โรจน์กาญจนรักษ์
นางสาวณัฐมณฑ์ ตั้งภาธร

มท.
ว2217
ส54ค

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72616
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b.11330053
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A study on optimization of tissue culture and genetic variation in *Cassava*

Thanita Rojkarnjanarak

Natthamon Tangphatorn

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	การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการจำแนกสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง
นักศึกษา	นางสาวฐานิตา โรจน์กาญจนรักษ์ รหัสประจำตัว 46050117
	นางสาวณัฐมณฑ์ ตั้งภาธร รหัสประจำตัว 46050151
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชรวาลย์	
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	การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการจำแนกสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง
นักศึกษา	นางสาวฐานิตา โรจน์กาญจนรักษ์ นางสาวณัฐมณฑ์ ตั้งภาธร
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) สายพันธุ์ต่างๆ จากส่วนใบ ก้านใบ และลำต้น เพื่อให้เจริญเป็นแคลลัส ในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่วนของก้านใบ และลำต้นของสายพันธุ์ CAS05 CAS06 CAS07 และ CAS11 สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดี บนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเจริญเป็นแคลลัสของใบในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน สายพันธุ์ CAS05 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สายพันธุ์ CAS06 และ CAS08 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ CAS07 และ CAS11 สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ CAS09 ส่วนของใบ ก้านใบ และลำต้นสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร การชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นใหม่โดยใช้อาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สายพันธุ์ CAS06 และ AS11 สามารถพัฒนายอดอ่อนได้ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน และสามารถพัฒนาให้เกิดรากได้ในระยะเวลา 60 วัน

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ชนิด คือ OPA-07 OPA-20 OPB-14 และ OPC-04 พบว่าไพรเมอร์ OPA-07 OPB-14 OPC-04 สามารถบอกข้อแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ และจากการศึกษาไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด พบว่ามันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS05 และ CAS08 มีลักษณะใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากที่สุด และในสายพันธุ์ CAS09 ไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุกไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A Study on Optimization of Tissue Culture and Genetic Variation in Cassava.
Name	Miss Thanita Rojkarnjanarak Miss Natthamon Tangphatorn
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

Study on callus induction and plant regeneration varieties of cassava (*Manihot esculenta*) ; leaf, leaf stalk and branch. The callus formation were culture on solid MS medium supplemented with 2, 4-D different concentrate at 0.5 1 3 and 5 mg/l. The results show that the explants of leaf stalk; variety CAS05 CAS06 CAS07 and CAS11 culture on 3 mg/l 2, 4-D can develop to be callus formation higher than other media. Moreover, media which can induce the highest callus formation from leaf; CAS05 was cultured on 1 mg/l 2, 4-D, CAS06 and CAS08 were cultured on 5 mg/l 2, 4-D, CAS07 and CAS11 were cultured on 3 and 5 mg/l 2, 4-D. But in all of tissue of CAS11 were developed higher callus formation on 3 mg/l 2, 4-D. The study on plant regeneration were culture on solid medium MS supplemented with BA different concentrate at 1 2 3 and 4 mg/l. We have found that the species of CAS06 and CAS11were developed shoots after 30 days and roots after 60 days.

In a study of genetic variation by RAPD technique in cassava that use 4 types of primers (OPA-07 OPA-20 OPB-14 and OPC-04). The result, primers OPA-07 OPB-14 and OPC-04 can separate the different of cassava genetics. After use all of primers, we found CAS05 and CAS08 was similarly than other species.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้คำแนะนำแนวทางในการค้นคว้าวิจัย การทำวิจัย การเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัดรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการสอบโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในทุกๆเรื่องสำหรับการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ประธานคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง สำหรับโอกาส ความรัก คำแนะนำและกำลังใจในการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายขอขอบพระคุณอาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเพื่อนทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ให้คำปรึกษา การสนับสนุน ช่วยเหลือรวมทั้งเป็นกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

นางสาวฐานิตา โรจน์กาญจนรักษ์
นางสาวณัฐมณฑ์ ตั้งภาธร

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 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง..... 2
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ..... 18
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง..... 24
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 53
เอกสารอ้างอิง..... 55
ภาคผนวก..... 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการคัดแยกสายพันธุ์ของมันสำปะหลังโดยเทคนิค RAPD.....18
4.1 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....26
4.2 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....27
4.3 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....28
4.4 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....29
4.5 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....30
4.6 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....31
4.7 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....32
4.8 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....34
4.10 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....35
4.11 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....36
4.12 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....37
4.13 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....38
4.14 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....39
4.15 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....40
4.16 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....41
4.17 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร....42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.18 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....43

4.19 จำนวนยอดอ่อนที่เกิดจากการชักนำแคลลัสของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 ให้เป็นต้นใหม่ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....47

4.20 จำนวนยอดอ่อนที่เกิดจากการชักนำแคลลัสของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS11 ให้เป็นต้นใหม่ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร.....48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะของราก และหัวมันสำปะหลัง (รากสะสม).....2

2.2 ภาพตัดตามขวางแสดงส่วนต่างๆของหัวมันสำปะหลัง.....3

2.3 แสดงภาพใบ และการจัดเรียงตัวของใบมันสำปะหลัง.....4

2.4 ดอกของต้นมันสำปะหลัง (ก) ดอกตัวผู้ (ข) ดอกตัวเมีย.....4

2.5 ลักษณะของแคลลัสมันสำปะหลัง.....12

2.6 การหาความแตกต่างระหว่างจีโนมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีแบบที่ 1.....15

2.7 การหาความแตกต่างระหว่างจีโนมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีแบบที่ 2.....16

2.8 ความแตกต่างของแถบที่เกิดขึ้นของ product A และ product B.....17

4.1 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบ
ของมันสำปะหลังพันธุ์CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....26

4.2 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้าน
ของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....27

4.3 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้น
ของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....28

4.4 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบ
ของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....29

4.5 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบ
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....30

4.6 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้น
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.7 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบ
ของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....32

4.8 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้าน
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....33

4.9 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้น
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....34

4.10 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบ
ของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....35

4.11 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบ
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....36

4.12 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้น
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....37

4.13 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบ
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....38

4.14 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบ
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....39

4.15 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้น
ของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.16 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบ
ของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS11บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....41
4.17 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบ
ของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....42
4.18 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้น
ของมันสำปะหลัง พันธุ์CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS
ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....43
4.19 การเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS05
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร).....44
4.20 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS06
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร).....44
4.21 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS07
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร).....45
4.22 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS08
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร).....45
4.23 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS09
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร).....46
4.24 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS11
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร).....46
4.25 แสดงลักษณะของยอดอ่อน ที่พัฒนาจากแคลลัสของส่วนลำต้น
ของมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS06 และCAS11
หลังจากย้ายลงบนอาหารชักนำการพัฒนาเป็นต้นใหม่ เป็นเวลา 30 วัน.....48
4.26 แสดงการพัฒนาของยอดอ่อนไปเป็นต้นใหม่ที่เกิดราก และยอดอย่างสมบูรณ์
ของมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS06 และCAS11
หลังจากย้ายลงบนอาหารชักนำการพัฒนาเป็นต้นใหม่ เป็นเวลา 60 วัน.....49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.27 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดย
ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder,
(1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05,
(6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10.....50
4.28 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดย
ใช้ไพรเมอร์ OPA-20 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder,
(1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05,
(6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10.....51
4.29 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดย
ใช้ไพรเมอร์OPB-14 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder,
(1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05,
(6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10.....51
4.30 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดย
ใช้ไพรเมอร์OPC-04 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder,
(1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05,
(6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10.....52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ ถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อประมาณ 50 ปีที่ผ่านมา ปัจจุบันเป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 5 รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง และได้พัฒนาขึ้นเป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญต่อการเกษตร อุตสาหกรรมในหลายๆด้าน และสามารถผลิตเป็นพลังงานทดแทน (เอทานอล) ของประเทศ เพราะเป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายในหลายสภาพพื้นที่ โดยเฉพาะในเขตเกษตรน้ำฝน และพื้นที่ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ ทั้งยังสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพแห้งแล้ง

มันสำปะหลังถูกจัดให้อยู่ในพืชกลุ่มที่เร่งพัฒนาการผลิตเพื่อการส่งออก เพื่อนำรายได้เข้าประเทศ เนื่องจากการเพาะปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทยโดยประมาณถึง 6.7 ล้านไร่ และสามารถเก็บผลผลิตมันสำปะหลังได้ถึง 22.2 ล้านตัน ซึ่งสัดส่วน 55% - 60 % ของผลผลิตหัวมันสำปะหลังทั้งหมดถูกนำมาแปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตหัวมัน แป้งมันสำปะหลังมีมูลค่าตลาดถึง 28,000 ล้านบาท และครองสัดส่วน 10% ของมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตรทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าส่งออก 19,000 ล้านบาท และยังคงมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ที่มา :ตลาดสินค้าเกษตรล่วงหน้าแห่งประเทศไทย)

รวมถึงการนำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมการผลิตต่างๆ ทั้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบหลัก และใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปสินค้า เช่น การผลิตเอทานอลเป็นพลังงานทดแทน อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ผงชูรส เป็นต้น ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าการส่งออกอย่างมหาศาลแก่ประเทศ นอกจากนี้การเพาะปลูกมันสำปะหลังยังสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอีก 500,000 ครัวเรือน แต่ในปัจจุบันมีแผนการลดพื้นที่ปลูกโดยคงปริมาณผลผลิตเพื่อการส่งออกอยู่เช่นเดิม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตต่อพื้นที่ (ผลผลิตต่อไร่) ตลอดจนการปรับปรุงคุณภาพของผลผลิตโดยการคัดเลือกสายพันธุ์ ทั้งยังต้องคำนึงถึงการรักษาสภาพแวดล้อม และทรัพยากรธรรมชาติให้เหมาะสมอีกด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลังที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถชักนำใบ หรือตาข้างให้เจริญเป็นแคลลัส

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นใหม่

3. ศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิค RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎี และหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 มันสำปะหลัง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Manihot esculenta* Crantz

Class: Angiospermae

Subclass: Dicotyledonae

Order: Geraniales

Family: Euphorbiaceae

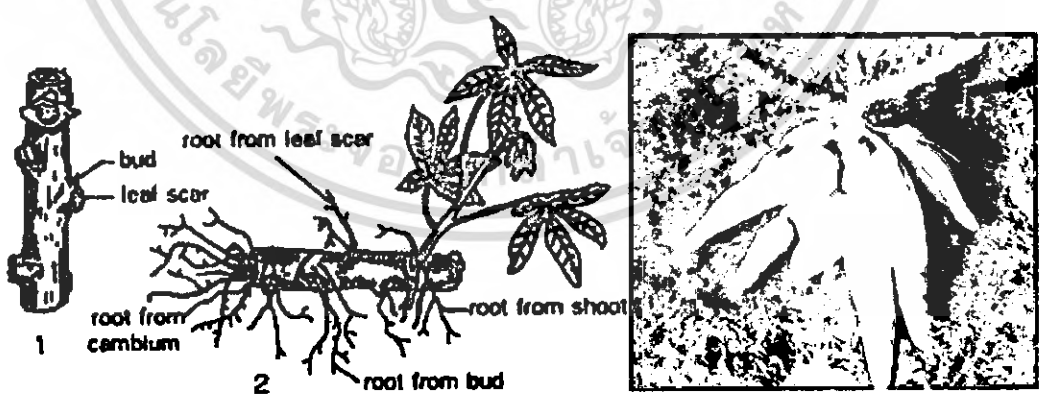
ชื่อสามัญ : Cassava Root , Tapioca ,Mandioca ,Manioc , Yuca

ชื่ออื่น : ต้าวน้อย ต้าวบ้าน (ภาคเหนือ) มันต้น มันไม้ (ภาคใต้) มันสำโรง สำปะหลัง (ภาคกลาง) มันหิ่ว (พังงา) (http://www.doa.go.th/fieldcrops/cas/index.htm)

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชหัวชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ ถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อประมาณ 50 ปีที่ผ่านมา ปัจจุบันเป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 5 รองจาก ข้าว สาลี ข้าวโพด ข้าว และ มันฝรั่ง และได้พัฒนาขึ้นเป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญต่อการเกษตร และด้านการผลิตเป็นพลังงานทดแทน (เอทานอล) ของประเทศ เพราะเป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายในหลายสภาพพื้นที่ โดยเฉพาะในเขตเกษตรน้ำฝน และพื้นที่ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ ทั้งยังสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพแห้งแล้ง (http://www.doa.go.th/pl_data/CASS/1STAT/st01.html)

2.1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลัง (รศ.ดร.รังสฤษดิ์ และคณะ, 2545)

2.1.1.1 ราก (Root)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของราก และหัวมันสำปะหลัง (รากสะสม)

(ที่มา : http://aggie.kps.ku.ac.th/agron/lesson9.shtml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

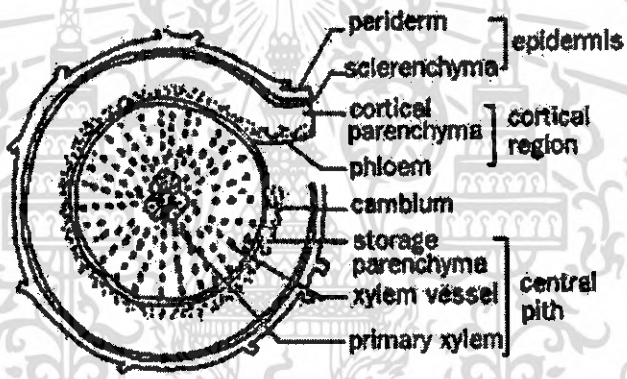
ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) รากเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก และขยายใหญ่เป็นหัว (thickened root) (รูปที่ 2.1) เพื่อสะสมอาหารแป้งในส่วนเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) จำนวนหัวจะมี 5-15 หัว ขนาดของรากขึ้นอยู่กับ อายุ พันธุ์ ดิน และสภาพภูมิอากาศ

เมื่อตัดตามขวางของส่วนหัว หรือรากสะสม จะพบส่วนต่างๆ 3 ชั้น

1. เปลือกชั้นนอก (periderm) เป็นชั้นของเซลล์ผิวชั้นนอก (epidermal cell) และชั้นของคอร์ก (cork layer) รวมกัน

2. เปลือกชั้นใน (cortical region) เป็นส่วนของคอร์เทกซ์ (cortex) และกลุ่มโฟลเอ็ม (phloem bundle) เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในเรียกรวมกันว่าพีล (peel)

3. ส่วนสะสมแป้งหรือไส้กลาง (starchy flesh หรือ central pith) ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) กลุ่มท่อน้ำ (xylem bundle) และท่อน้ำยาง (latex tube)



รูปที่ 2.2 ภาพตัดตามขวางแสดงส่วนต่างๆของหัวมันสำปะหลัง

(ที่มา : http://aggie.kps.ku.ac.th/agron/lesson9.shtml)

2.1.1.2 ลำต้น (Stem)

ลำต้นตั้งตรง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-6 เซนติเมตร เป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 1-5 เมตร มีการแตกกิ่ง กิ่งที่แตกจากลำต้นหลักเรียกว่า กิ่งชุดแรก (primary branch) และกิ่งที่แตกจากกิ่งชุดแรกเรียกว่า กิ่งชุดที่สอง (secondary branch) มันสำปะหลังจะแตกกิ่งเป็นแบบ 2 กิ่ง (dichotomous branching) หรือ 3 กิ่ง (trichotomous branching) บนลำต้นจะเห็นรอยของก้านใบที่หลุดร่วงไปเรียกว่า รอยแผลใบ (leaf scar) ระหว่างรอยแผลใบเรียกว่า ความยาวของชั้น (storey length) เหนือรอยแผลใบมีตา (bud)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.3 ใบ (Leaf)

ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) เกิดเวียนสลับรอบลำต้น (spiral) มีการจัดเรียงต (phyllotaxy) ค่อนข้างคงที่แน่นอนเท่ากับ 2/5 แผ่น ใบเว้าลึกเป็นแฉก (lobe) แบบพัลเมท(palmate) จำนวนหยักมีตั้งแต่ 3-9 หยัก ใบมีก้านใบ (petiole) ที่โคนก้านใบติดกับลำต้นมีหูใบ (stipule)

รูปที่ 2.3 แสดงภาพใบ และการจัดเรียงตัวของใบมันสำปะหลัง
(ที่มา : http://aggie.kps.ku.ac.th/agron/lesson9.shtml)

2.1.1.4 ช่อดอก (Inflorescences)

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่อยู่คนละตำแหน่ง เรียกว่า monoecious plant ดอกตัวผู้มีก้านดอก (pedicel) กลีบเลี้ยง (sepal) ไม่มีกลีบดอก (petal) ภายในดอกมีเกสรตัวผู้ (stamen) ประกอบด้วย ก้านเกสรตัวผู้ (filament) อับละอองเกสรตัวผู้ (anther) ดอกตัวเมีย มีก้านดอก มีกลีบเลี้ยง ไม่มีกลีบดอก เกสรตัวเมีย (pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) 3 คาร์เพล (carpel) แต่ละคาร์เพลมี 1 ออวุล (ovule)

รูปที่ 2.4 ดอกของต้นมันสำปะหลัง (ก) ดอกตัวผู้ (ข) ดอกตัวเมีย
(ที่มา : http://aggie.kps.ku.ac.th/agron/lesson9.shtml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.5 ผล (Fruits) และเมล็ด (Seed)

หลังการผสมเกสรแล้ว รังไข่ก็จะเจริญเติบโตขยายใหญ่กลายเป็นผลแบบแคปซูล (capsule) ขนาดโตเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ยาว 1-1.5 เซนติเมตร ภายในมี 3 ช่อง แต่ละช่องมีเมล็ด 1 เมล็ด มีสีน้ำตาล และมีลายดำ รูปร่างยาวรี หลังการผสมเกสรประมาณ 3 เดือน ผลจะสุกเต็มที่ แล้วแตกดีดเมล็ดกระเด็นออกไป (dehiscent)

2.1.2 ความสำคัญของอุตสาหกรรมและผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลัง (http://www.doa.go.th/fieldcrops/cas/pro/index.htm)

2.1.2.1 อุตสาหกรรมมันเส้น

มันเส้น (Chip) ได้จากการนำหัวมันสำปะหลังสดเข้าเครื่องหั่นที่เรียกว่า เครื่องโม่มันเส้น ซึ่งจะหั่นหัวมันสดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปตากแดดบนลานซีเมนต์ 2-3 วันให้แห้ง

2.1.2.2 อุตสาหกรรมมันอัดเม็ด

มันอัดเม็ดเป็นการแปรรูปมันเส้นเพื่อลดปริมาตรลง เพื่อให้ค่าขนส่งถูกลง ต้องใช้มันเส้นเป็นวัตถุดิบมันอัดเม็ดแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะทางกายภาพคือ ชนิดแข็ง (hard pellets) และชนิดนิ่ม (soft pellets) มันอัดเม็ดทั้งชนิดแข็งและชนิดนิ่มจะมีรูปร่างคล้ายดินสอ มีเส้นผ่าศูนย์ กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร

2.1.2.3 อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

หัวมันสำปะหลังมีแป้งเป็นส่วนประกอบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ แป้งมันสำปะหลังที่สกัดจากหัวมันสำปะหลัง และยังไม่มีการแปรรูปเรียกว่า แป้งดิบ (Tapioca starch , Native starch) อัตราการแปรรูปจากหัวมันสดเป็นแป้งมัน ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์แป้งของหัวมันสด ถ้าหัวมันสดมีแป้งประมาณร้อยละ 20 จะใช้หัวมันสด 5 กิโลกรัมในการผลิตแป้ง 1 กิโลกรัม

2.1.2.4 การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบประกอบในอุตสาหกรรมอื่น

1. อุตสาหกรรมทอผ้า

อุตสาหกรรมทอผ้านั้นจะต้องใช้แป้งมันสำปะหลังด้วยโดยด้ายที่จะใช้ทอผ้านั้นจะต้องผ่านการชุบแป้งเสียก่อน ด้ายจึงจะลื่นและเรียบไม่มีขนและไม่ให้เส้นด้ายติดกันระหว่างการทอผ้า นอก จากนี้ในขั้นตอนการพิมพ์ลายผ้าแป้งจะช่วยทำให้พิมพ์ลายได้สม่ำเสมอ

2. อุตสาหกรรมกระดาษ

การทำกระดาษนั้นต้องใช้เยื่อกระดาษที่ทำจากไม้ต่างๆ ทำให้เป็นเยื่อกระดาษ อย่างไรก็ตามแผ่นกระดาษจะไม่เรียบ จะต้องมีการฉาบผิวด้วยกาวจากแป้งทำให้กระดาษเรียบ และช่วยทำให้กระดาษไม่ซึมหมึกเวลาเขียนด้วยน้ำหมึกหรือพิมพ์สี นอกจากนั้นกาวจากแป้งยังช่วยทำให้กระดาษเหนียวยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อุตสาหกรรมไม้อัด

แป้งมันสำปะหลังมีคุณสมบัติเป็นกาวจึงถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมไม้อัด เนื่องจากในการผลิตไม้อัดต้องประกบไม้ให้ติดกันโดยใช้กาว

4. อุตสาหกรรมกาว

แป้งมันมีคุณสมบัติพิเศษคือ เมื่อถูกความร้อนหรือถูกสารเคมีจะมีความเหนียว และมีคุณสมบัติสามารถรักษาสภาพความเหนียวได้เหมือนเดิม ไม่มีการคืนตัว กาวเหล่านี้ส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในการผลิตซองจดหมาย สติ๊กเกอร์ กระดาษกาว (gummed paper) และ เทปกาว (gummed tape)

5. อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

มีอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภทที่ต้องใช้แป้งมันเป็นส่วนประกอบ โดยมีวัตถุประสงค์ในการใช้ที่แตกต่างกัน เช่น ใช้เพื่อเพิ่มความข้นใช้เพิ่มปริมาณหรือลดต้นทุน และใช้ทำให้อาหารคงสภาพที่ต้องการ ผลิตภัณฑ์บะหมี่สำเร็จรูป ก๋วยเตี๋ยว วุ้นเส้น สาคู ซอสต่างๆ เช่น ซอสมะเขือเทศ อาหารกระป๋อง ลูกกวาด นอกจากแป้งจะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มแล้ว ยังใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์

2.1.2.5 ผลิตภัณฑ์อื่นๆ

1. สารดูดน้ำ

โพลิเมอร์ดูดซึมน้ำมาก (High-water absorbing polymer ,HWAP) เป็นโพลิเมอร์ที่สามารถดูดซึมของเหลว เช่น น้ำ สารละลายอิเลกโทไรต์ หรือของเหลวในร่างกายมนุษย์ได้ตั้งแต่ 15 เท่า ถึงหลายร้อยเท่าของน้ำหนักตนเอง โดยนำมาใช้งานในด้านต่างๆ เช่น ผ้าอ้อมสำหรับเด็กและผู้ใหญ่ ผ้าอนามัยสตรีและแผ่นดูดซับที่ใช้ในโรงพยาบาล ปรับสภาพดินให้อุ้มน้ำได้มากขึ้น วัสดุดูดน้ำออกจากเชื้อเพลิง วัสดุป้องกันน้ำสำหรับสายเคเบิ้ลใต้ดิน เป็นต้น

2. พลาสติกที่สลายได้ทางชีวภาพ

เป็นการนำแป้งมันสำปะหลังเข้าไปใช้ร่วมกับพลาสติก ทำให้มีความสามารถในการย่อยสลายง่ายขึ้นซึ่งจะช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมลงไปได้

3. ไซโคลเดกซ์ทริน

เป็นผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ มีประโยชน์ในการรักษาสภาพรส กลิ่น สี ลดการระเหย เพิ่มความเสถียรและเพิ่มการละลายของสารบางชนิด ตลอดจนใช้ในการกำจัดสารที่ไม่ต้องการออกจากระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง

แป้งสามารถเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ชนิดที่เรียกว่า เอทานอล (Ethanol) แอลกอฮอล์ที่ได้นี้เมื่อนำไปผสมน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 10-20 : 90-80 สามารถใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ที่เรียกว่า ก๊าซโซฮอลล์(Gasohol) เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน ลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง และยังช่วยลดภาวะเป็นพิษของบรรยากาศ เพราะช่วยลดปริมาณสารตะกั่วในน้ำมันเบนซินลง

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (สุรินทร์, 2548)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) เป็นการนำเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้นเป็นต้น โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้เนื้อเยื่อจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ เพราะทุกชิ้นส่วนของต้นอ่อนสามารถนำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงส่วนเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนต่างๆ ที่ได้จากพืชต้องนำมาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวก่อนนำไปใช้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำได้บนอาหารวุ้นกึ่งแข็งและในอาหารเหลว หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อไปได้สักระยะเวลาหนึ่งต้องมีการถ่ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่ เนื่องจากอาหารเดิมลดน้อยลง และของเสียที่เซลล์ขับออกมาเพิ่มมากขึ้น

Kartha และคณะ (1974) ได้นำเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ของมันสำปะหลัง 5 สายพันธุ์ คือ ColombiaNo.800, Llanera, Venazuela No.255, Ecuador No.133 และ Mexico No.35 เพาะเลี้ยงในอาหาร MS (Murashige-Skoog medium) ที่เติมฮอร์โมนพืช BA (benzyladenine) , GA3 (gibberellic acid) และ NAA (naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้น $5x10^{-7}$, 10^{-7} , 10^{-7} โมลาร์ ตามลำดับผลที่ได้คือสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ในอาหาร MS ที่เติม วิตามิน B_5 เมื่อทดลองใช้ GA3 ร่วมกับ NAA จะมีรากเกิดขึ้น ขณะที่ใช้ BA ร่วมกับ NAA จะเกิดแคลลัส และ รากสะสม (Storage root) โดยเนื้อเยื่อเจริญ(meristem) จะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มแสงประมาณ 4000 ลักซ์ โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาวที่ไม่เกิดความร้อน และให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับที่มืด 6 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกำเนิดมาจากหลักการโททิโพเทนซี่ (totipotency) ที่ว่า "เซลล์พืชเดี่ยวๆ ทุกเซลล์มีลักษณะ และองค์ประกอบทางพันธุกรรมสมบูรณ์เหมือนต้นแม่ ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชทั้งต้นได้" เซลล์พืชเหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่หรือเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่าง ได้แก่ เนื้อเยื่อใบที่สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัสหรือพัฒนาเป็นอวัยวะ เช่น ยอดอ่อน และรากซึ่งสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นพืชทั้งต้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากหลักการนี้ได้มีการประยุกต์เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปใช้ประโยชน์ในทางเกษตรกรรมต่างๆ อาทิเช่น

- ใช้ในการขยายพันธุ์พืช โดยเฉพาะพืชที่มีค่าทางเศรษฐกิจ พืชที่มีปัญหาด้านการเพาะปลูกเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมและพืชสมุนไพรที่หายาก

- นำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ให้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง เพิ่มความต้านทาน หรือเพิ่มความทนทานต่อความแห้งแล้ง

- ต้นพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญในสภาพปราศจากเชื้อ จึงใช้ในการแยกและเลี้ยงพืชปลอดโรคได้ ได้แก่ การกำจัดโรคไวรัสในพืช

- การผสมโปรโตพลาสต์ของพืชสองชนิดเข้าด้วยกัน ทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่รวมคุณลักษณะดีของพืชสองชนิดไว้ด้วยกัน

- การเก็บรักษาพันธุ์ไว้ได้เป็นระยะเวลานาน โดยเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิต่ำๆ

นอกจากนี้ ยังมีการประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ ที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม หรือเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางยา โดยเริ่มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้วหาวิธีการหรือเทคนิคต่างๆ ไปกระตุ้นให้เซลล์พืชผลิตสารให้มากขึ้น ได้แก่ การปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร การปรับเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อสารสำคัญนั้นๆ การเติมสารตั้งต้นของขบวนการทางชีว-เคมี ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และการเหนี่ยวนำเซลล์พืชให้เกิดความเครียด เป็นต้น

ข้อได้เปรียบของการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อประโยชน์ในทางการค้าเหนือกว่าการปลูกแบบดั้งเดิม หลายประการดังนี้

1. สามารถกำหนดและควบคุมสภาวะมาตรฐานในการเจริญเติบโตได้แน่นอน
2. ไม่มีการผันแปรทางสภาพภูมิอากาศและฤดูกาล
3. ใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกสั้น
4. สามารถควบคุมปริมาณการผลิตให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาด
5. สามารถควบคุมคุณภาพของสารทุติยภูมิให้คงที่
6. การสกัดแยกสารทุติยภูมิทำได้ง่ายกว่า ลดต้นทุนการผลิต

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางยามีศักยภาพ และความเป็นไปได้สูงที่จะนำมาใช้ผลิตสารทุติยภูมิแทนการสกัดจากพืชทั้งต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรส่วนใหญ่ประสบปัญหาเนื่องจากสารที่ได้มีปริมาณต่ำ และสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงมักมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ง่าย ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่คงที่หรือลดต่ำลง ฉะนั้นงานวิจัยทางด้านนี้ยังต้องการผู้ทำงานวิจัยหลายๆด้านมาทำงานร่วมกัน เพื่อพัฒนาให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่วางไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/media.html)

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับความเหมาะสมต่อชนิดของพืชพันธุ์ตลอดจนชนิด และสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด คือ อาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์ หรือแคลลัส ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็งที่ประกอบด้วย เกลือของธาตุอาหารที่ต้องการครบ คือ สารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง

2.2.1.1 ประเภทของอาหาร

1. อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium)

เทคนิคที่ใช้ในยุคแรกๆ นั้น ใช้วุ้นเพื่อปรับอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น โดยนึ่งในหม้อนึ่งความดันเพื่อหลอมละลายอาหารแล้วเทใส่ภาชนะและทิ้งให้แข็งตัวอยู่ในสภาพอาหารกึ่งแข็ง แต่มักพบว่าคุณสมบัติต่างๆ ของสารประกอบเคมีในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว กระนั้นก็ตามวุ้นยังคงถูกนำมาใช้แต่จำเป็นต้องดัดแปลงให้เหมาะสม และต้องแน่ใจว่ามีความบริสุทธิ์จริงๆ และการใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ ความเข้มข้นที่ใช้กันแพร่หลาย และได้ผลดีเพื่อวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ คือ 0.8 เปอร์เซนต์

2. อาหารเหลว (liquid medium)

อาหารเหลวเป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากเนื้อเยื่อจะจมหรือแขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา แต่ในทางปฏิบัติอาจอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มในอาหารเหลว หรือใช้ glass wool ช่วยพยุงเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้เช่นกัน ซึ่งจะช่วยในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานเกิดได้ดีขึ้น เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจถูกคนที่ความเร็ว 90 - 150 รอบต่อนาที เพื่อช่วยในการหายใจ

2.2.1.2 ส่วนประกอบของอาหาร (media constituents)

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน มีส่วนประกอบของอาหาร ดังต่อไปนี้

1. น้ำ (water)

ประมาณร้อยละ 95 ของอาหารเป็นน้ำ ในการทำงานวิจัยควรใช้น้ำกลั่นจากเครื่องกลั่นแก้ว เครื่องกลั่นควรได้รับการทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ และควรบรรจุน้ำกลั่นในขวดพลาสติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วุ้น (agar)

เนื้อเยื่อส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีวุ้น ซึ่งมีหน้าที่ช่วยพยุงเนื้อเยื่ออยู่บนอาหารได้ ในกรณีที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะวางบนเครื่องเขย่า หรือเลี้ยงบนสะพานกระดาษกรองเพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศเพียงพอ วุ้นผลิตมาจากสาหร่ายทะเลทำให้อาหารแข็งตัว วุ้นเป็นพอลิแซ็กคาไรด์มีโมเลกุลขนาดใหญ่ การใช้วุ้นในปริมาณที่ต่ำ (ร้อยละ 0.5) จะทำให้อาหารไม่แข็งตัวไหลไปมาได้ โดยเฉพาะเมื่อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำจึงไม่สามารถพยุงเนื้อเยื่อพืชไว้ได้ แต่ถ้าใช้วุ้นในปริมาณที่สูง (ร้อยละ1.0) จะทำให้อาหารแข็งมากจนทำให้น้ำไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของพืช และยังทำให้พืชดูดอาหารไปใช้ได้ยาก

3. แหล่งให้ธาตุคาร์บอน (carbon sources)

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อการเจริญ เติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงในสภาพที่เพาะเลี้ยง หรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำ และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ น้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้ โดยปกติมักใช้ในปริมาณร้อยละ 1-5 สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส และฟรุคโตส มีการใช้บ้างซึ่งปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิด และอายุของพืช โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นเมื่อได้รับปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง จากนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นอีกจะลดการเจริญเติบโตลง น้ำตาลอาจเปลี่ยนรูปได้เมื่อถูกนึ่งฆ่าเชื้อ

4. เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt)

ธาตุอาหารมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อรองลงมาจากน้ำตาล แยกออกได้เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมาก และธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย แม้ว่า สูตรอาหารในระยะแรกจะเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์และแคลลัส แต่ในระยะต่อมาสูตรอาหารได้รับการพัฒนาให้เหมาะต่อการเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช ทั้งยังมีผลดีในการกระตุ้นการเกิดอวัยวะ โดยมีการกำหนดปริมาณเกลืออนินทรีย์ให้เหมาะต่อการเจริญของเซลล์พืชที่เลี้ยง โดยปกติสารละลายเกลืออนินทรีย์ของ Murashige and Skoog (MS) ถูกใช้เป็นส่วนผสมหลัก เนื่องจากเกลือสูตรนี้มีความเข้มข้นสูง และ ธาตุอื่นๆ บางชนิดมีปริมาณที่สูงมาก ซึ่งจำเป็นต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิดที่จะพัฒนา ธาตุอาหารรองที่ใช้ในสูตรอาหารโดยปกติมีการเจือปนของธาตุอื่นและให้ธาตุอาหารหลัก N, P และ K เพิ่มเติมในปริมาณที่น้อยมาก

5. วิตามิน (Vitamins)

พืชสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ทุกชนิด แต่เซลล์พืชที่เลี้ยงในสภาพหลอดแก้วต้องการวิตามินเพิ่ม โดยเฉพาะวิตามินบี 1 เพื่อช่วยในการพัฒนาให้เป็นปกติวิตามินที่ใช้ เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 5 วิตามินเอ็ม วิตามินบี 2 วิตามินเอช และวิตามินอี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ความเป็นกรดและด่างของอาหาร (pH of nutrient medium)

ความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 5.0 - 6.5 ถ้าต่ำมากไป (< 4.5) หรือสูงมากเกินไป (> 7.6) จะทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต ถ้าความเป็นกรดและด่างสูงกว่า 6 จะทำให้อาหารแข็งมาก ถ้าความเป็นกรดและด่างต่ำกว่า 5.2 อาหารวุ้นจะอ่อนตัว ไม่เหมาะในการพยุงเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ความเป็นกรดและด่างที่มีค่าสูงหรือต่ำเกินไปควรหลีก เลี่ยงเพราะจะไปขัดขวางการนำธาตุอาหารไปใช้ประโยชน์ การเติมสารประกอบ EDTA ลงในอาหารมีความสำคัญในการรักษาความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็กและธาตุโลหะอื่นๆ เนื่องจากความเป็นกรดและด่างจะเปลี่ยนแปลงไปตลอดเวลาขณะเพาะเลี้ยง

7. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโต (Hormones and growthregulators)

ฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในต้นพืช ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์เนื้อเยื่อก็เป็นผลมาจากฮอร์โมนเหล่านี้ทั้งสิ้น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่จำเป็นเสมอไป อย่างไรก็ตามโดยปกติจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการเกิดอวัยวะ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญที่สุด พืชบางชนิดสร้างสารเหล่านี้อยู่แล้ว แต่ควรเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อช่วยให้การเจริญดีขึ้น บางครั้งอาจต้องใช้จิบเบอเรลลินหรือเอทิลีน การเก็บฮอร์โมนพืชมักเก็บในตู้เย็นในรูปสารละลายเข้มข้น การนำฮอร์โมนพืชไปใช้อาจมีปัญหาการทำละลายของฮอร์โมนพืช การละลายออกซินควรทำในด่าง เช่น 0.1 KOH ไซโทไคนินก็เช่นเดียวกัน แต่จิบเบอเรลลินละลายได้ดีในแอลกอฮอลล์ ออกซินและไซโทไคนินที่เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นควรเก็บไว้ในที่มืด หรือใส่ขวดสีชาเพราะจะเสื่อมสภาพเมื่อได้รับแสง

8. สารอินทรีย์ (organic salt)

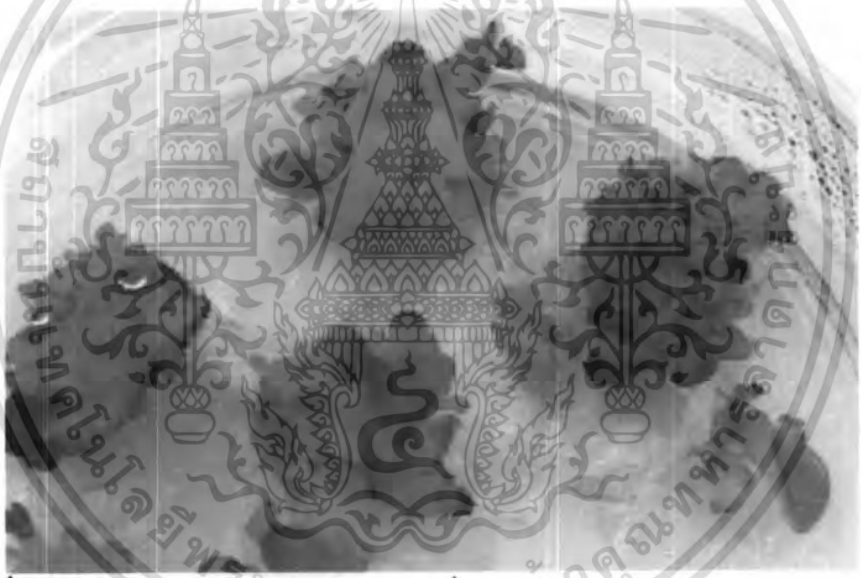
สารอินทรีย์จากผักหรือผลไม้ที่สำคัญมากคือ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำมะเขือเทศ สารสกัดจากยีสต์ น้ำแอปเปิ้ล กล้วยบด สารเหล่านี้ไม่ควรใช้ในงานวิจัย เนื่องจากไม่ทราบส่วนประกอบแน่นอน ส่วนสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เช่น กรดอะมิโน ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะเกิดเป็นต้นได้ เช่น ทริปโทน และสารสกัดจากมอลท์ สารเหล่านี้ประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโน ส่วนสารสกัดจากยีสต์ซึ่งมีวิตามินบีสูง มักใช้ในปริมาณ 0.25 - 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/ Tissue%20Culture/ callus.html)

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลล์พาแรนไคมาที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุแต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) หรือสีอื่นๆ ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง

แคลลัสที่ได้จะมีรูปร่าง สี แตกต่างออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและอาหารที่เลี้ยง เช่น แคลลัสของมันสำปะหลัง จะเป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันหลวมๆ สามารถหลุดได้ง่าย เรียกว่า friable callus แคลลัสบางชนิดจะประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันแน่น หลุดได้ยาก เรียกว่า compact callus โดยทั่วไปไม่ว่าแคลลัสจะอยู่ในที่มืดหรือมีแสง จะมีสีครีมหรือสีเหลืองอ่อน



รูปที่ 2.5 ลักษณะของแคลลัสมันสำปะหลัง (ที่มา : http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/ Tissue%20Culture/callus.html)

คำว่า การเจริญ หมายถึง การเพิ่มขนาดโดยถาวร เกิดจากการแบ่งเซลล์แล้วเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญของแคลลัสในอาหารแข็งเห็นได้จากการที่มีกลุ่มของเซลล์ที่โตขึ้น วิธีวัดการเจริญของแคลลัสทำได้หลายวิธี เช่น ชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง การนับจำนวนเซลล์ นอกจากนี้ ยังอาจใช้การหาค่าโปรตีนทั้งหมด (total protein) เป็นพารามิเตอร์ในการวัด แต่ไม่นิยมใช้กันมากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. ขนาดและรูปร่าง (size and shape)

ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงแม้ไม่มีข้อจำกัด แต่ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก แต่ถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กกว่านี้แล้วจะไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ ตัวอย่าง ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารของรากแครอท (Daucus carota) ที่มีน้ำหนักเพียง 3.8 มิลลิกรัม สามารถเกิดแคลลัสได้ แต่ถ้าเป็นเนื้อเยื่อจากหัว (tuberous meristematic tissues) ของ Jesusalem artichoke แล้ว อาจมีขนาดเล็กเกินไป

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators)

โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วๆ ไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนิน(สูง) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนออกซินน้อยกว่าไซโตไคนิน(ต่ำ) จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ นั้น ทั้งปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

3. ธาตุอาหาร (nutrients)

นอกจากจะต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่วๆ ไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อ เยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโนเช่น กลูตามิน แอสปาติน สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย

4. แหล่งคาร์บอน (carbon sources)

ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส หรือ แซคคาโรส ความเข้มข้น 2 – 4 เปอร์เซนต์

5. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors)

โดยเฉพาะแสงซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย(เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์

6. สภาพอาหาร (media status)

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

2.2.2.2 ประโยชน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. การขยายพันธุ์ โดยชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก

2. การผลิตโพรโทพลาส แคลลัสมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำไปย่อยผนังเซลล์เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้ว และเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม (secondary metabolites) ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมได้

4. ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด โดยใช้สารโคลซิซินชักนำ

5. การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน เช่น ทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อนและหนาว หรือต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรค และสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

6. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (cryopreservation)

2.3 วิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD)

เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์แบบหนึ่ง โดยที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (arbitrary primer) และมีขนาดสั้นๆ 10 - 20 นิวคลีโอไทด์ จึงเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสและตรวจสอบโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ ในทางปฏิบัติต้องทดลองใช้ไพรเมอร์หลายๆ ชนิด เพื่อดูว่าไพรเมอร์ใดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5' --> 3') จึงจะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกจากกันจะไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (http://www.gpo.or.th/rdi/html/DNAfingerprinting.html) ดังตัวอย่างต่อไปนี้

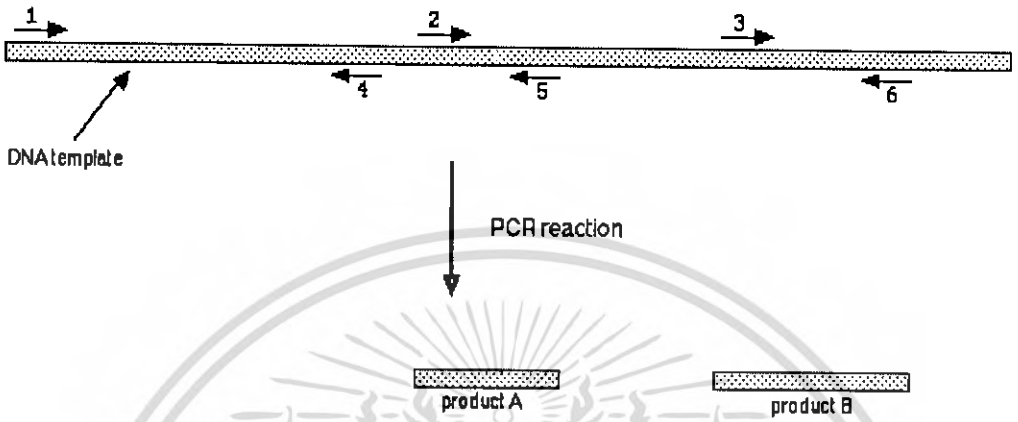
การวิเคราะห์ด้วยอาร์เอพีดีจะไม่ทราบลำดับเบสเป้าหมาย นักวิทยาศาสตร์จะทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสที่กำหนดขึ้นเอง โดยใช้ลำดับเบส 10 คู่ในการสร้างไพรเมอร์ หรืออาจใช้คอมพิวเตอร์สุ่มเอาลำดับเบส 10 คู่ แล้วนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์และวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสเพื่อดู ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอใดที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่ใส่ลงไปหรือไม่ จากรูปที่ 2.6 จะอธิบายให้เห็นการทำงานของปฏิกิริยา โดยใช้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่เป็นเทม-เพลทในปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์สายสั้นๆ หลายเส้นเข้าจับอยู่

Colombo และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างมันสำปะหลังพันธุ์ *Manihot esculenta* Crantz และสายพันธุ์ธรรมชาติ 2 สายพันธุ์ คือ *M. flabellifolia* และ *M. peruviana* ด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *M. flabellifolia* และ *M. peruviana* ซึ่งเป็นการยืนยันถึงความคล้ายคลึงกันทางพฤกษศาสตร์ระหว่าง 2 สายพันธุ์นี้ และทำการคำนวณหาค่าความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลัง และสายพันธุ์ธรรมชาติทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการผลการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP พบว่ามีค่าความแตกต่างเท่ากับ 0.59 ซึ่งเป็นการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า *M. flabellifolia* และ *M. peruviana* เป็นต้นกำเนิดทางสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

ปฏิกิริยาอาร์เอพีดีแบบที่ 1 :



รูปที่ 2.6 การหาความแตกต่างระหว่างจีโนมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีแบบที่ 1
(ที่มา : http://pharm.swu.ac.th/web_npec/content/JOURNAL/ workshop%20DNA.pdf)

- ลูกศรเป็นตัวแทนของไพรเมอร์ชนิดเดียวกันที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ทิศทางของลูกศรบ่งบอกถึงทิศทางของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้น

- ตัวเลขเป็นตัวแทนแสดงตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอต้นแบบที่มีไพรเมอร์จับอยู่

- ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง 1 2 3 จับอยู่บนเทมเพลทสายบนส่วนไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง 4 5 6 อยู่บนเทมเพลทสายล่าง

จากตัวอย่างนี้เกิดผลิตภัณฑ์ขึ้นเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นดังรูปที่ 2.6

1) product A เกิดจากการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสอยู่ระหว่างไพรเมอร์ตำแหน่งที่ 2 และ 5

2) product B เกิดจากการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสอยู่ระหว่างไพรเมอร์ตำแหน่งที่ 3 และ 6

ข้อสังเกต การไม่เกิดผลิตภัณฑ์ระหว่างไพรเมอร์ตำแหน่ง 1 และ 4 เนื่องจากไพรเมอร์ทั้ง 2 อยู่ไกลกันเกินกว่าที่จะเกิดผลิตภัณฑ์ได้

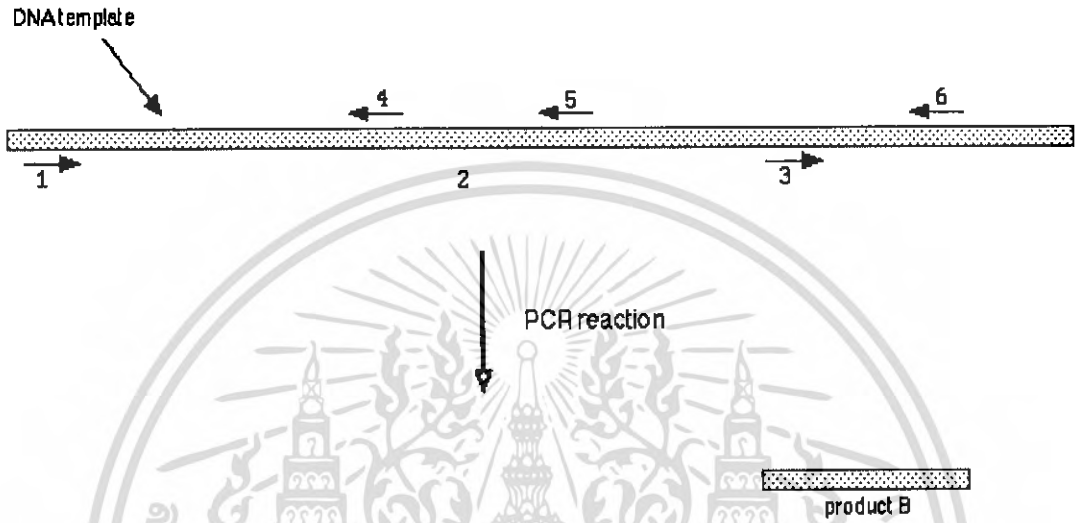
ข้อสังเกต การไม่เกิดผลิตภัณฑ์ระหว่างไพรเมอร์ตำแหน่ง 4 และ 2 หรือ 5 และ 3 เนื่องจากไพรเมอร์ทั้ง 2 ไม่มีทิศทางเข้าหากัน

การหาความแตกต่างระหว่างจีโนมโดยใช้เทคนิค RAPD พิจารณาจากรูปที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าดีเอ็นเอเทมเพลทอื่น (จีโนม) ที่มาจากคนละตัวอย่างกัน (แต่มีความใกล้เคียงกัน) มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดความแตกต่างกันของลำดับดีเอ็นเอของทั้ง 2 เทมเพลท สมมุติว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ไพรเมอร์เข้าจับ

ปฏิกิริยาอาร์เอพีดีแบบที่ 2 :

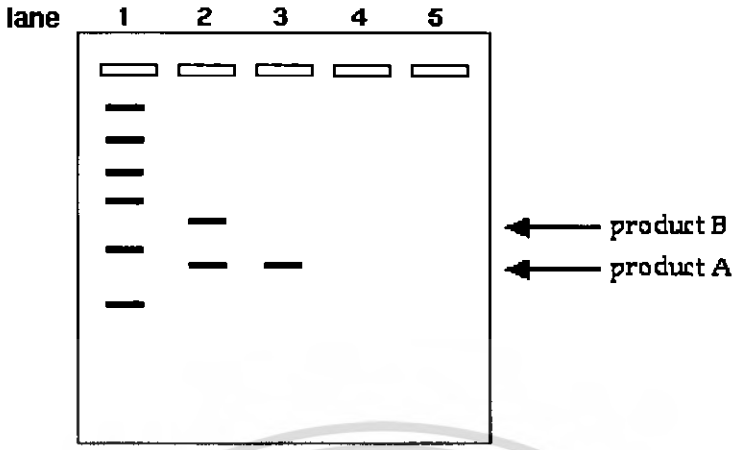


รูปที่ 2.7 การหาความแตกต่างระหว่างจีโนมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีแบบที่ 2
(ที่มา : http://pharm.swu.ac.th/web_npcc/content/JOURNAL/ workshop%20DNA.pdf)

จากรูปที่ 2.7 แสดงให้เห็นว่าไม่มีตำแหน่งที่ไพรเมอร์ใกล้พอจะจับที่จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เอ ได้จึงเกิดเพียงผลิตภัณฑ์บีเท่านั้น

ถ้าเราทำอิเล็คโทรโฟรีซิสผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำเทคนิค RAPD ทั้ง 2 แบบจะเกิดเป็นแถบดังที่เห็นบนอะกาโรสเจลซึ่งสามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของทั้ง 2 จีโนมได้ (รูปที่ 2.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



lane 1: molecular weight markers

lane 2: RAPD Rxn. #1

lane 3: RAPD Rxn. #2

รูปที่ 2.8 ความแตกต่างของแถบที่เกิดขึ้นของ product A และ product B

(ที่มา : http://pharm.swu.ac.th/web_npec/content/JOURNAL/ workshop%20DNA.pdf)

72616

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์

1. สายพันธุ์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยเขาหินซ้อน 10 ตัวอย่าง ดังนี้ CAS01 CAS02 CAS03 CAS04 CAS05 CAS06 CAS07 CAS08 CAS09 CAS10

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS

2.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ , สารเปียกใบ (tween 20)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2 ,4-D และ BA

2.4 แอลกอฮอล์ ร้อยละ95

2.5 วุ้น

2.6 น้ำตาลซูโครส

2.7 สารเคมีสำหรับทำเทคนิค RAPD ได้แก่ Deoxynucleotides (dNTPs) , DNA polymerase , ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1) , PCR buffer , ดีเอ็นเอต้นแบบ

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการคัดแยกสายพันธุ์ของมันสำปะหลังโดยเทคนิค RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
OPA-07	5'-GAA ACG GGT G-3'
OPA-20	5'-GTT GCG ATC C-3'
OPB-14	5'-TCC GCT CTG G-3'
OPC-04	5'-CCG CAT CTA C-3'

2.8 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy plant mini kit)

2.9 ไนโตรเจนเหลว

3. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1 บีกเกอร์

3.2 ขวดรูปชมพู่

3.3 ปิเปตต์(pipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.5 จานแก้ว

3.6 แท่งแก้วคน

3.7 กระบอกตวง

3.8 มีดผ่าตัด

3.9 ปากคีบ

3.10 อะลูมิเนียมฟลอยด์

3.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (bunsen burner)

3.12 ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.13 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air-flow cabinet)

3.14 ตู้อบความร้อน (Hot air oven)

3.15 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)

3.16 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (Balance)

3.17 อุปกรณ์การกรองฮอร์โมนและแผ่นกรองฮอร์โมน (Millipore filter)

3.18 ไมโครปิเปตต์และทิป ขนาดต่างๆ

3.19 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

3.20 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.21 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (digital camera)

3.22 กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo- microscope)

3.23 ช้อนตักสารเคมี (spatula)

3.24 ตู้เย็น(refrigelator)

3.25 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.26 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Machine or Thermal cycler Machine)

3.27 เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

3.28 โกร่ง

3.29 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

3.2.1.1. นำชิ้นส่วนของต้นมันสำปะหลังบริเวณใบ ลำต้น และก้านใบ ล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกภายนอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2. นำชิ้นส่วนของมันสำปะหลังใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีคลอรอกซ์ร้อยละ 15 และ tween-20 แล้วนำไปเขย่า ซึ่งส่วนของใบนำไปเขย่าเป็นเวลา 15 นาที และส่วนที่เหลือนำไปเขย่าเป็นเวลา 20 นาที

3.2.1.3. นำชิ้นส่วนของมันสำปะหลังมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยล้าง 3 ครั้งๆ ละ 4-6 นาที

3.2.1.4. นำชิ้นส่วนของมันสำปะหลังมาวางบนจานแก้วที่มีทิชชู่ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งให้แห้งเล็กน้อย

3.2.1.5. ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนของมันสำปะหลังให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ

- ใบ ตัดแต่งให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.4-0.6 เซนติเมตร ยาวประมาณ 0.4-0.6 เซนติเมตร
- ลำต้น และก้านใบดัดแต่งให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร

3.2.1.6. นำชิ้นส่วนของมันสำปะหลังที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เตรียมไว้ โดยทำอาหาร 4 สูตร คือ อาหารแข็งสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย ไฟดาเจลร้อยละ 2.5 น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และไทอะมีน(Thiamine) 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม 2 ,4-D 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิดให้สนิทด้วยพาราฟิล์ม

- นำชิ้นส่วนของใบ วางบนอาหารแข็งสูตร MS สูตรอาหารละ 3-4 ชิ้น ลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- นำชิ้นส่วนของลำต้น และก้านใบ วางลงบนอาหารแข็งสูตร MS สูตรอาหารละ 4-5 ชิ้นลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2.1.7. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ลงชิ้นส่วนของมันสำปะหลังไปไว้ในที่มืด ที่ควบคุมอุณหภูมิประ มาณ 25-28 องศาเซลเซียส

3.2.1.8. ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์

3.2.1.9. ตรวจสอบการเจริญเติบโตของแคลลัส โดยมีวิธีการดังนี้

1. ใช้เวอร์เนียวัดความกว้าง และความยาวของแคลลัสของทุกสูตรอาหาร โดยทำการวัดขนาดทุกๆ 14 วัน
2. นำความกว้างคูณกับความยาว จะได้พื้นที่ของแคลลัส
3. นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย จะได้ค่าประมาณของพื้นที่แคลลัส
4. เปรียบเทียบพื้นที่ของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัส

3.2.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA ที่แตกต่างกัน

3.2.2.1. นำแคลลัสที่ได้จากกการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2 ,4-D เป็นเวลา 60 วัน มาทำการเพาะเลี้ยงลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.2. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสงจากฟลูออเรสเซนต์ วันละ 16 ชั่วโมง

3.2.2.3. สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายในระยะเวลา 30-60 วัน โดยดูการเจริญของยอดและการเกิดราก เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (DNeasy Plant Mini Kit)

3.2.3.1 เตรียมชิ้นส่วนพืชที่ต้องการนำไปสกัดดีเอ็นเอ (อุปกรณ์ต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ)

1. นำโกร่งมาทำ Pre-cool โดยการเทไนโตรเจนเหลว (liquid N_2)

2. นำชิ้นส่วนพืชที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่ง แล้วเทไนโตรเจนเหลวลงไปค่อยๆ ทำการบดให้ละเอียด

3. นำตัวอย่างที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอมาประมาณ 100-150 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4. เติม AP 1(lysis buffer) 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปวอร์เท็กซ์ (lysis buffer ทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุนที่สามารถทำให้ดีเอ็นเอออกมาภายนอกได้)

5. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที โดยทุก 2-3 นาที นำมาผสมให้เข้ากัน 1 ครั้ง

6. เติม AP 2 (precipitate buffer) 130 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที (precipitate buffer เพื่อแยกชั้นของดีเอ็นเอออกจาก protein ,polysaccharide)

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ นาน 5 นาที

8. ดูดส่วนใสใส่ใน mini spin column (สีม่วง) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ นาน 2 นาที

9. ดูดส่วนใส 450 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม AP 3/E (binding buffer) 675 ไมโครลิตรหรือปริมาตร 1.5 เท่าของส่วนใส (binding buffer เพื่อดกตะกอนดีเอ็นเอ ส่วนที่ติดอยู่บนเมมแบรน คือ พวกโปรตีนต่างๆ ดีเอ็นเอ คือส่วนใส)

10. ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดมา 650 ไมโครลิตร ใส่ใน mini spin column อันใหม่ (สีขาว) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ นาน 1 นาที

11. ทำซ้ำข้อ 10. ในกรณีที่คิดว่าได้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย โดยนำส่วนใสที่เหลืออยู่ดูดใส่อีก 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. เติม buffer AW 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ นาน 1 นาที

13. ทิ้งส่วนใส และเติม buffer AW 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ นาน 2 นาที

14. ทำการย้ายเมมแบรนใส่ลงในหลอดที่ต้องการเก็บดีเอ็นเอ แล้วเติม AE buffer (Elution buffer) 70 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ นาน 1 นาที

ตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอหรือไม่ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง(Optical density : O.D.) ใช้ช่วงความยาวคลื่น(wave range) 260 นาโนเมตร ใช้ในการวัด DNA, 280 นาโนเมตร ใช้ในการวัดโปรตีน

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

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

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

และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ร้อยละ 1

3.2.4 การคัดแยกสายพันธุ์ของมันสำปะหลังโดยเทคนิค RAPD

1. การเตรียมสารละลายผสมลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เจริญไปเป็นแคลลัส และเจริญเป็นต้นใหม่

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ก้าน และ ลำต้น ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้น ของ 2,4-D แตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งระยะการวัดขนาดแคลลัสออกเป็น 0 14 28 และ 42 วัน ตามลำดับ โดยวัดขนาดของแคลลัสจากความกว้างและความยาวยาว แล้วนำมาหาพื้นที่เฉลี่ย (ตารางที่ 4.1-4.18) จากมันสำปะหลังทั้งหมด 6 สายพันธุ์ พบว่ามันสำปะหลังทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ทั้งหมด สีของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีตั้ง แต่สีเหลืองอ่อน เขียวอ่อน จนกระทั่ง สีน้ำตาลอ่อน และมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ดังนี้

มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS05 พบว่าในส่วนของใบ (รูปที่ 4.1) สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถเจริญบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ไม่ต่างกัน ส่วนก้านใบ (รูปที่ 4.2) และลำต้น(รูปที่ 4.3) นั้นเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารMS ที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในมันสำปะหลังสายพันธุ์CAS06 พบว่าในส่วนใบ (รูปที่ 4.4) สามารถเจริญบนอาหารMS ที่มี 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ดีที่สุด และไม่มีความแตกต่างกันที่ ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร ก้านใบ (รูปที่ 4.5) และลำต้น (รูปที่ 4.6) พบว่า เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารMS ที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในส่วนของก้านใบที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างกัน

มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS07 และCAS11 พบว่า มีการเจริญของชิ้นส่วนใบ (รูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.16)ไปเป็นแคลลัสได้ดีไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนก้านใบ (รูปที่ 4.8) และลำต้น (รูปที่ 4.9) ของสายพันธุ์CAS07 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารMS ที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และส่วนลำต้นของสายพันธุ์CAS11 (รูปที่ 4.18) นั้นสามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารMS ที่มี 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกัน ส่วนก้านใบของสายพันธุ์CAS11 (รูปที่ 4.17) นั้นเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารMS ที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นกัน และที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 0.5 และ1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ด้วย (รูปที่ 4.24 ค)โดยที่ส่วนของลำต้นสายพันธุ์ CAS07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารMSที่มี 2,4-D 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด และรากได้ตามลำดับ (รูปที่ 4.21 ข-ค)

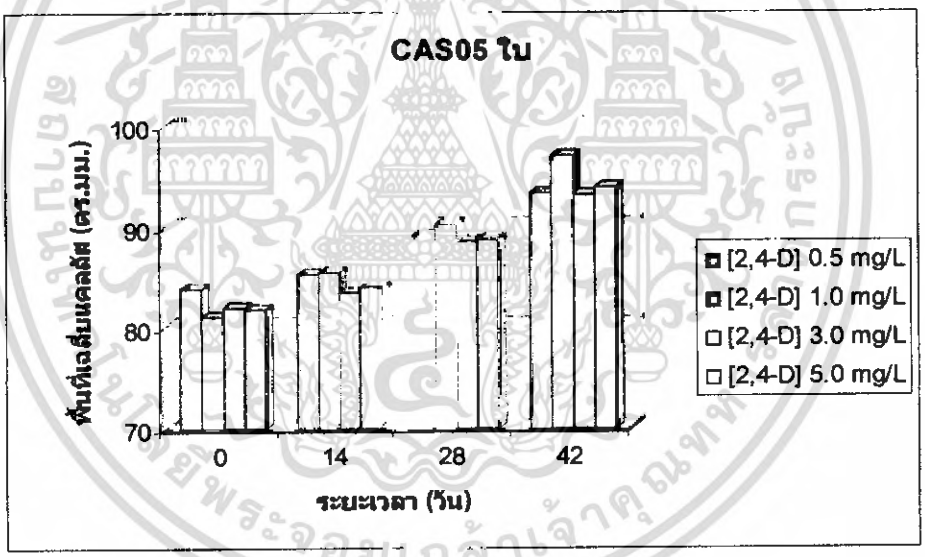
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสายพันธุ์ CAS08 พบว่าใบ (รูปที่ 4.10) สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ก้านใบ (รูปที่ 4.11) สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และในลำต้น (รูปที่ 4.12) พบว่าการเจริญเป็นแคลลัสบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 1 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดได้ดีไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนในมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS09 นั้น เจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด บนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกชิ้นส่วน(รูปที่ 4.13-4.15) และชิ้นส่วนใบ และก้าน ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 2,4-D 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้เช่นกัน (รูปที่ 4.23 ก-ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น(ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	83.72	85.24	89.12	93.36
1	80.99	85.49	90.26	97.15
3	81.88	83.42	88.58	93.24
5	81.7	84.02	88.71	93.86

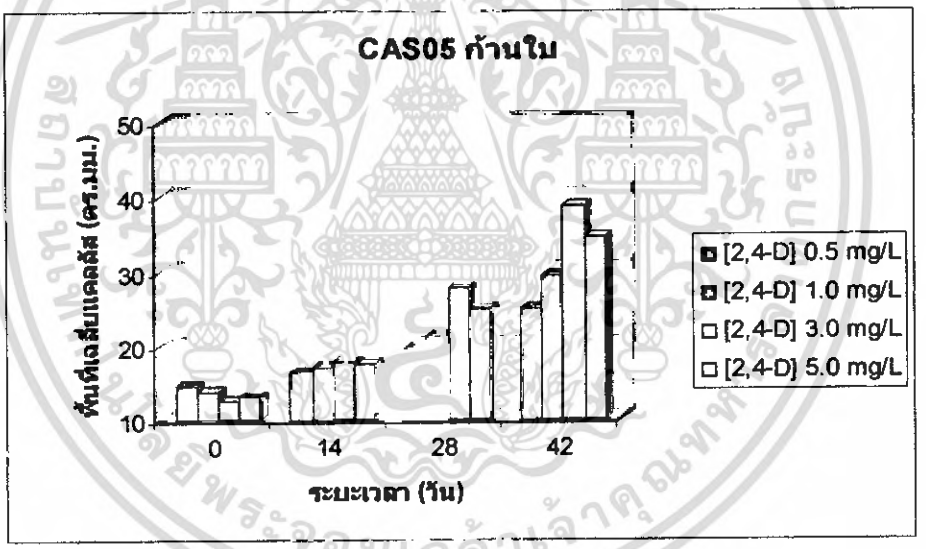


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบของมันสำปะหลังพันธุ์CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	14.53	16.32	19.69	24.81
1	13.65	16.85	21.12	29.38
3	12.48	17.64	27.68	38.75
5	13.08	17.48	24.94	34.62

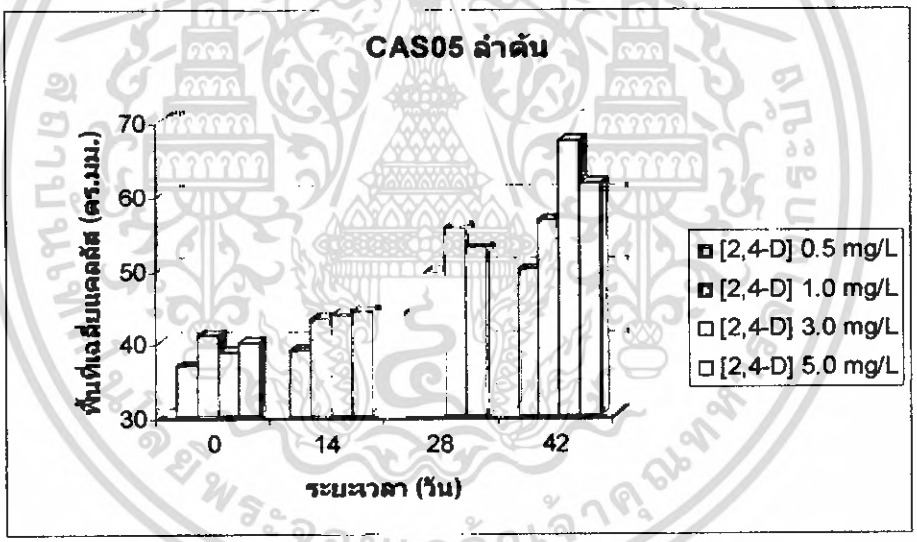


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	36.66	38.89	43.85	49.73
1	40.74	43.12	49.29	56.4
3	38.52	43.65	55.31	67.26
5	39.77	44.01	52.76	61.52

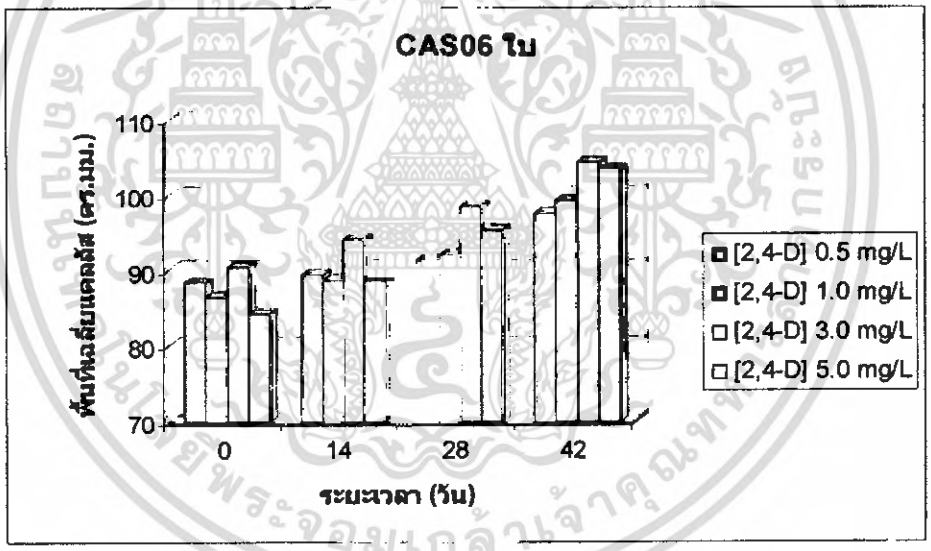


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS05 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	88.27	89.28	91.25	97.48
1	86.33	88.74	92.07	99.16
3	90.45	94.16	98.43	104.28
5	84.28	88.52	95.21	103.51

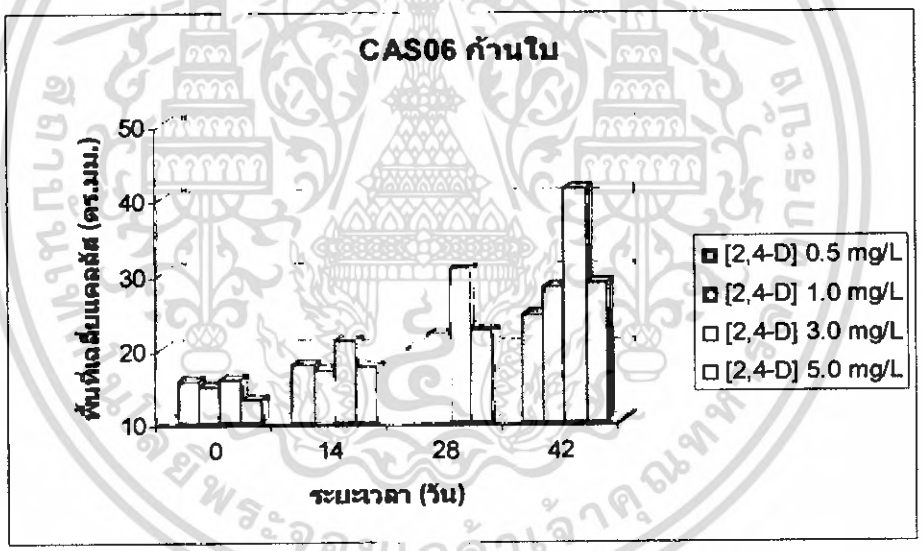


รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	15.52	17.64	19.85	24.41
1	14.78	17.01	21.78	28.13
3	15.66	20.92	30.49	41.27
5	13.07	17.36	22.3	28.59

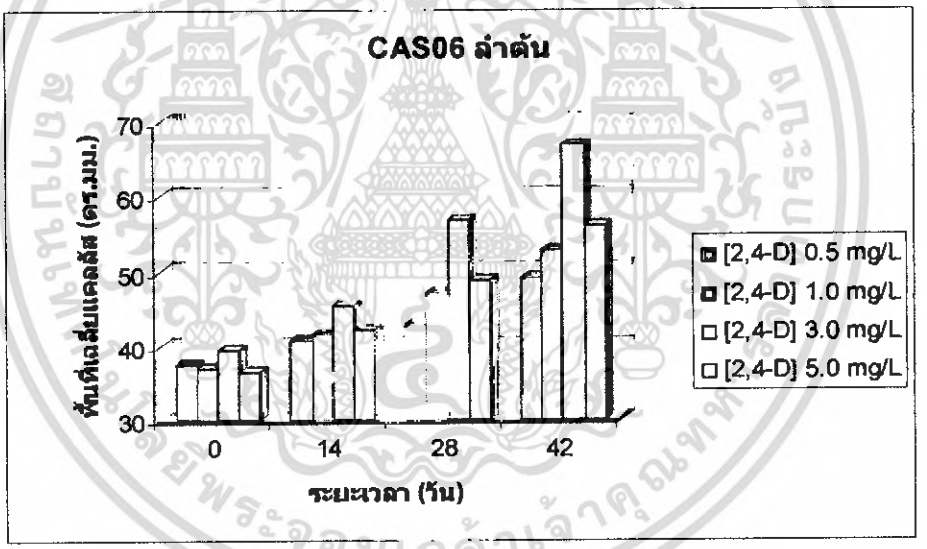


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	37.44	40.72	43.01	49.23
1	37.05	41.53	47.21	52.88
3	39.48	45.39	56.82	66.91
5	36.48	42.18	48.79	56.03

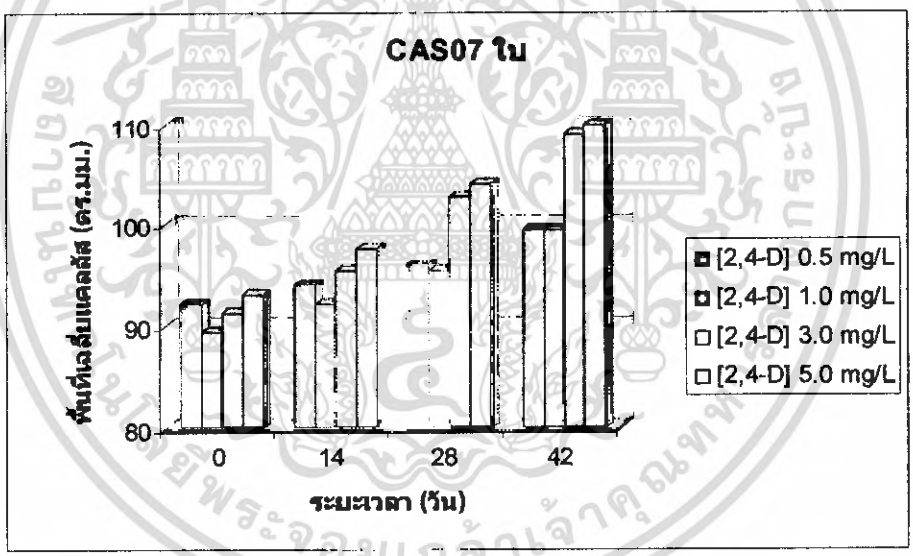


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS06 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	92.16	94.08	96.09	99.47
1	89.37	92.16	95.51	99.53
3	91.18	95.43	102.79	108.93
5	93.12	97.61	104.01	109.87

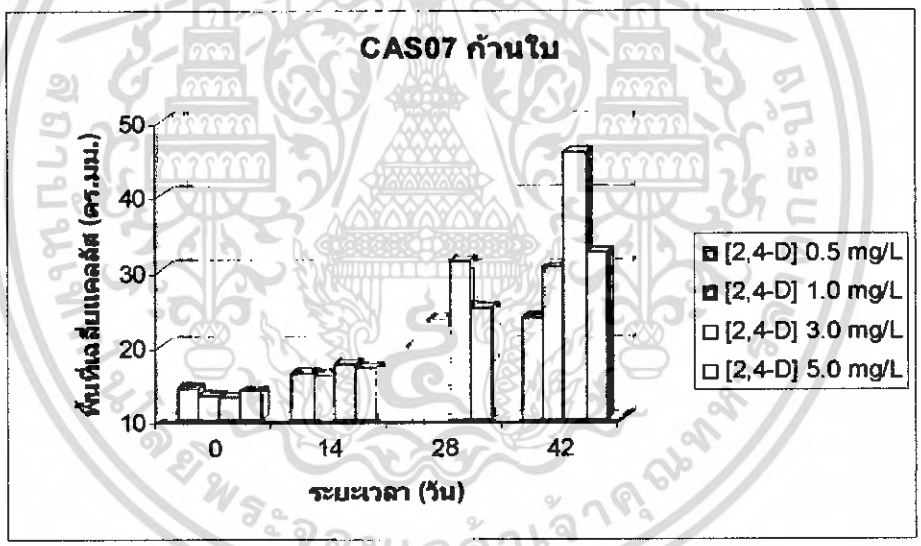


รูปที่ 4.7 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	14.18	16.12	19.93	23.71
1	13.23	16.03	23.35	30.25
3	12.97	17.45	31.21	45.86
5	13.85	16.96	24.84	32.43

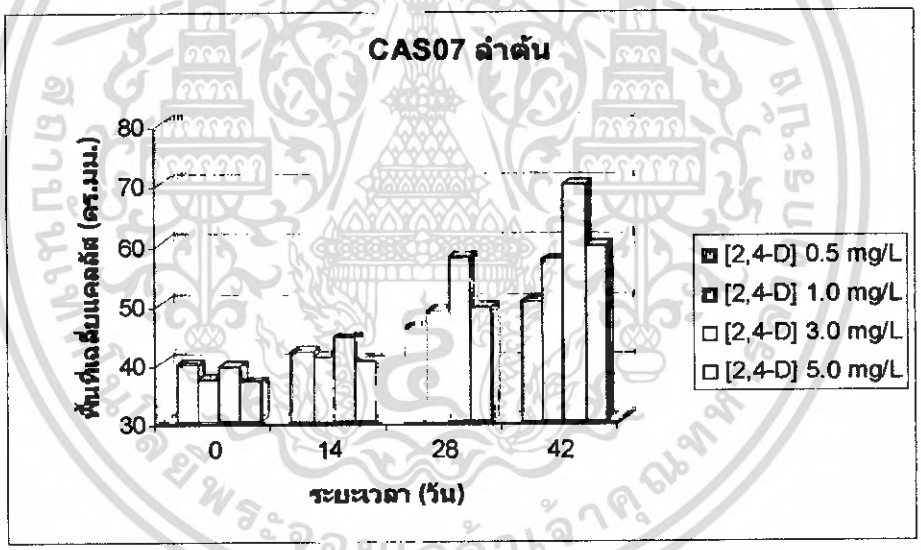


รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	39.48	41.74	45.98	50.24
1	37.24	40.95	48.57	57.19
3	39.18	44.11	57.6	69.73
5	36.66	40.18	49.29	59.64

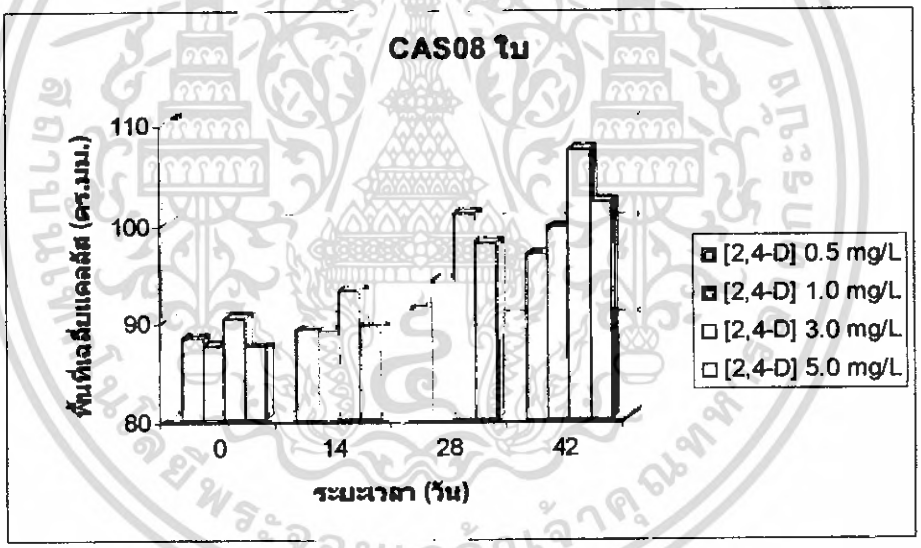


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS07 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	88.27	89.03	91.27	96.75
1	87.42	88.87	94.21	99.48
3	90.21	93.12	100.87	107.26
5	87.36	89.41	97.94	102.07

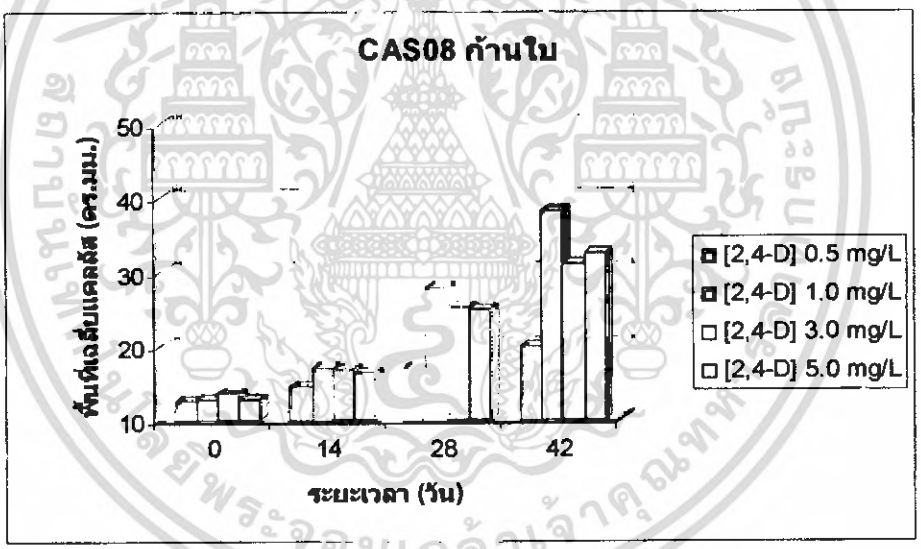


รูปที่ 4.10 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	12.48	14.43	17.22	19.87
1	12.74	16.94	27.86	38.43
3	13.58	16.67	25.08	31.14
5	12.67	16.09	24.95	32.51

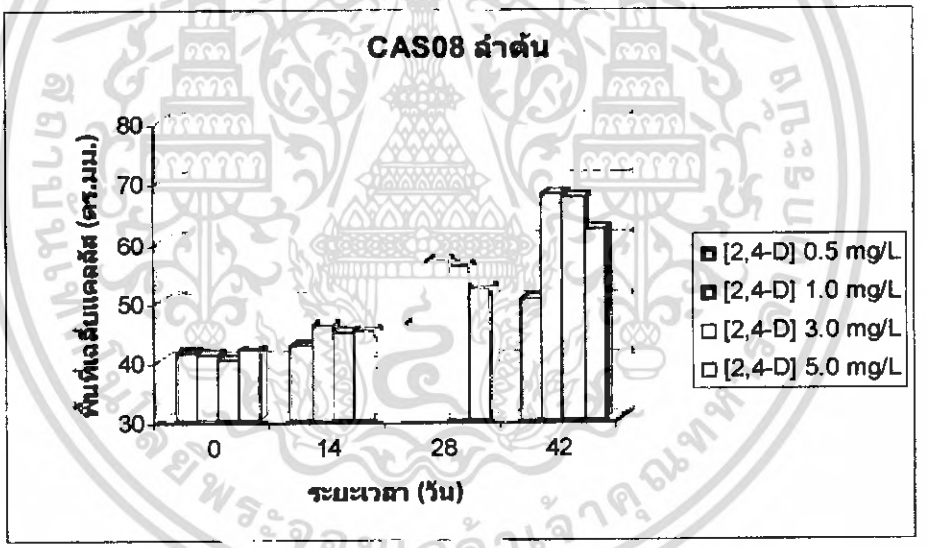


รูปที่ 4.11 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	41.28	42.36	46.27	50.12
1	40.74	45.85	56.71	67.81
3	39.85	44.67	55.83	67.2
5	41.62	44.91	52.15	62.04

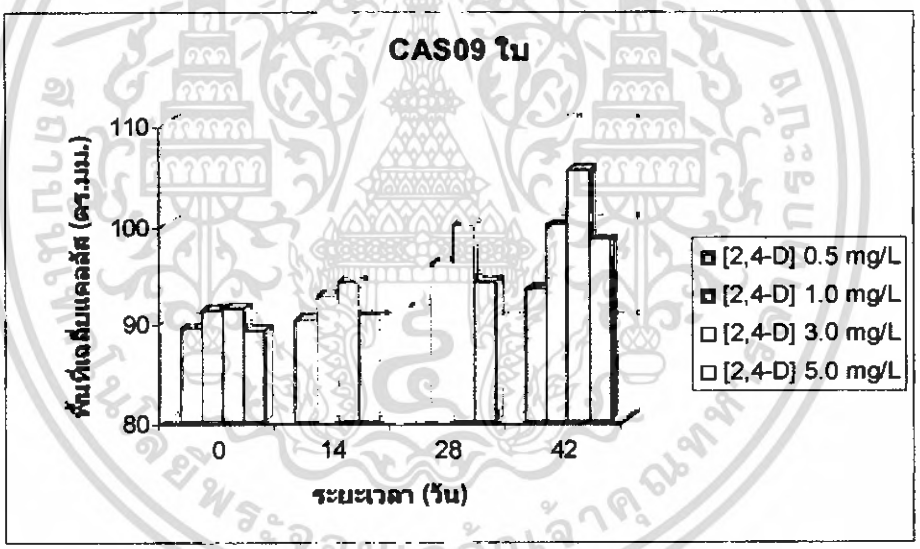


รูปที่ 4.12 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	89.3	90.25	91.68	93.44
1	91.2	92.69	95.97	99.84
3	91.37	94.09	99.98	105.29
5	89.18	90.71	94.09	98.36

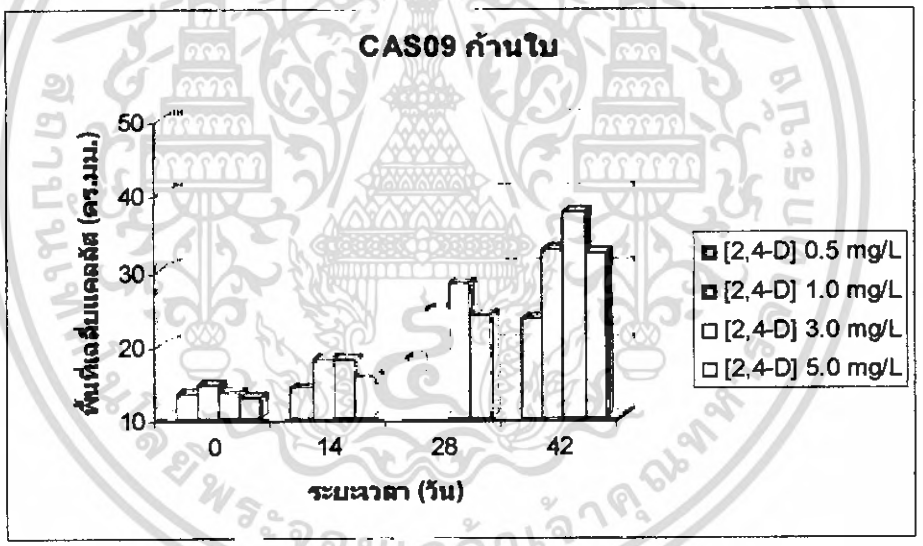


รูปที่ 4.13 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	13.28	14.07	18.25	23.47
1	14.56	17.98	24.79	32.59
3	13.44	17.85	28.03	37.62
5	12.61	15.72	23.84	32.11

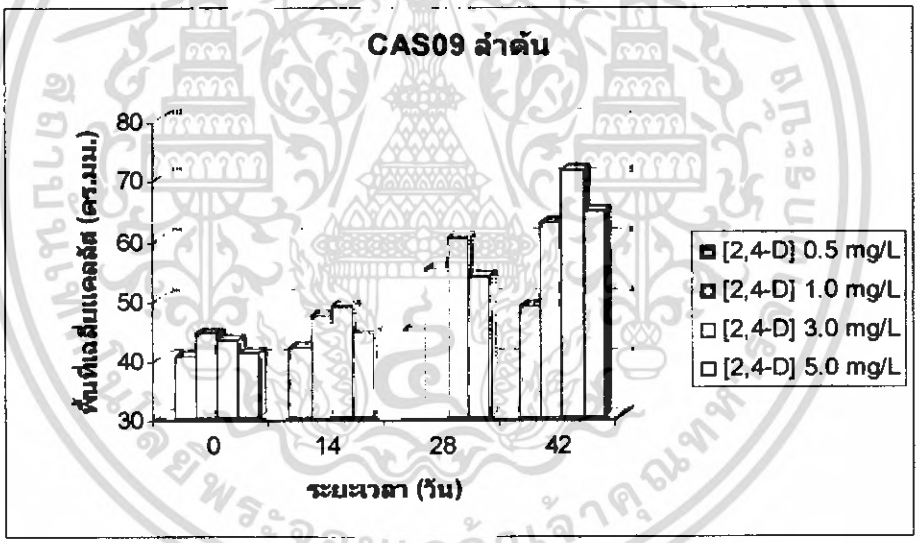


รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น(ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	40.32	41.75	45.02	48.68
1	44.1	47.03	54.95	62.73
3	43.12	48.61	60.01	71.35
5	40.79	44.28	53.55	64.42

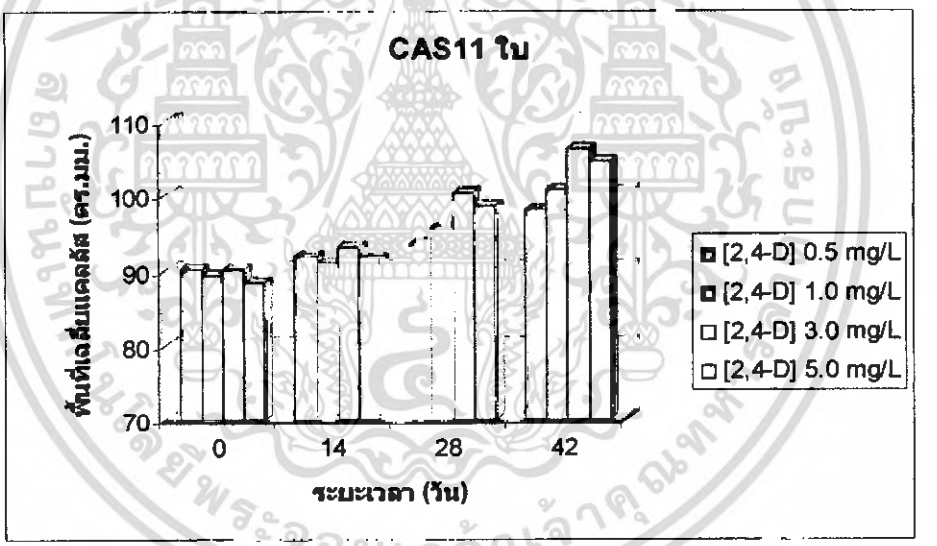


รูปที่ 4.15 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS09 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	90.21	91.76	93.58	98.03
1	89.3	91.01	95.72	100.86
3	90.17	93.14	100.39	106.21
5	88.35	91.75	98.67	104.47

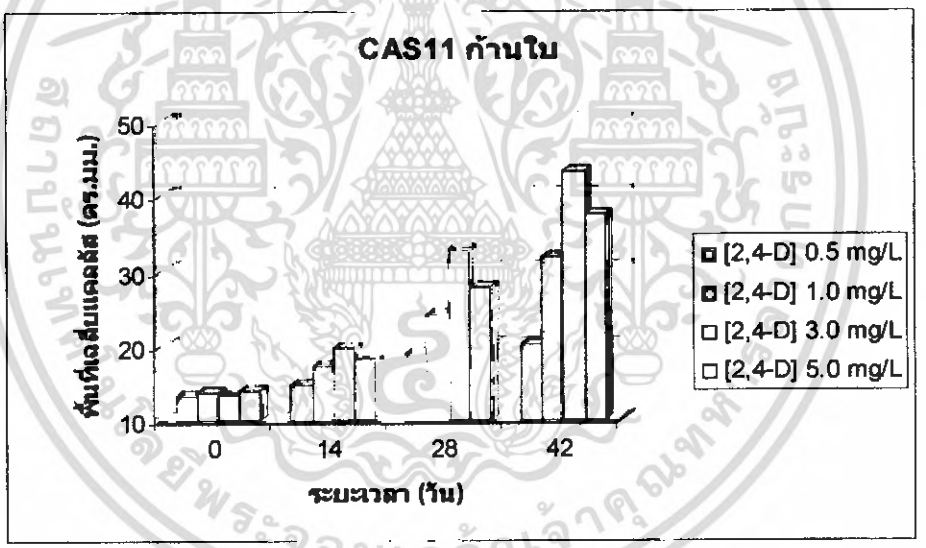


รูปที่ 4.16 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS11บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนก้านใบของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 20 ชิ้น(ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	13.3	14.75	18.92	20.14
1	13.78	17.09	24.17	31.92
3	13.35	19.71	32.84	43.37
5	13.87	18.07	27.93	37.58

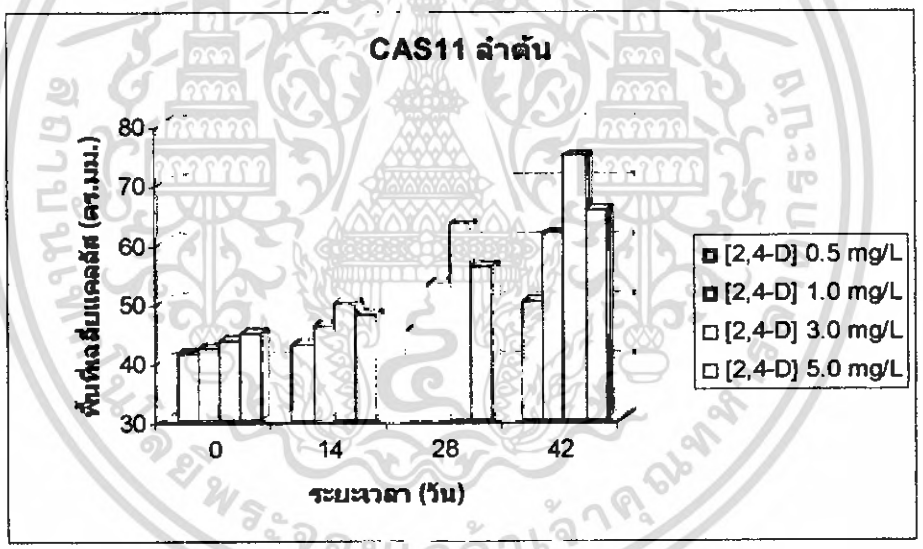


รูปที่ 4.17 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนก้านใบของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

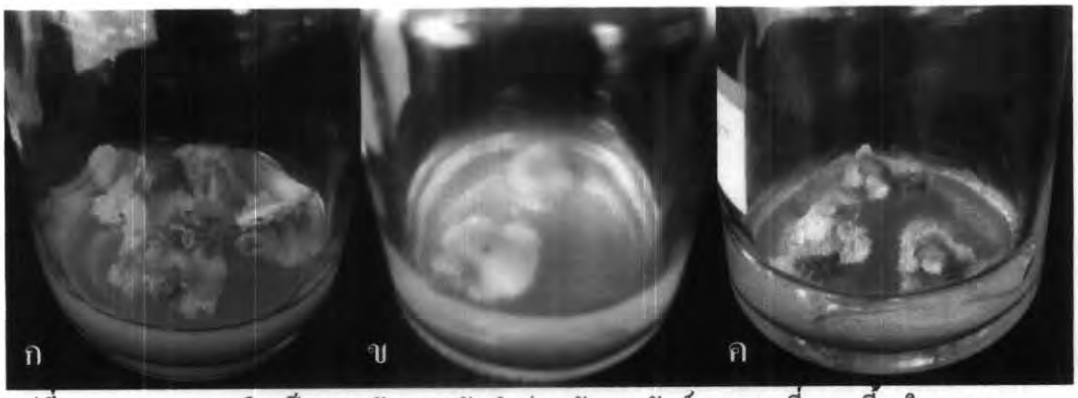
ตารางที่ 4.18 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากส่วนลำต้นของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 15 ชิ้น (ตารางมิลลิเมตร)			
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	42 วัน
0.5	41.28	42.65	45.23	49.76
1	42.16	45.87	52.91	61.54
3	43.24	49.52	63.08	74.58
5	44.62	47.56	55.7	65.32



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของขนาดแคลลัส(เฉลี่ย)จากส่วนลำต้นของมันสำปะหลัง พันธุ์ CAS11 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS05 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

(ค) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนลำต้น

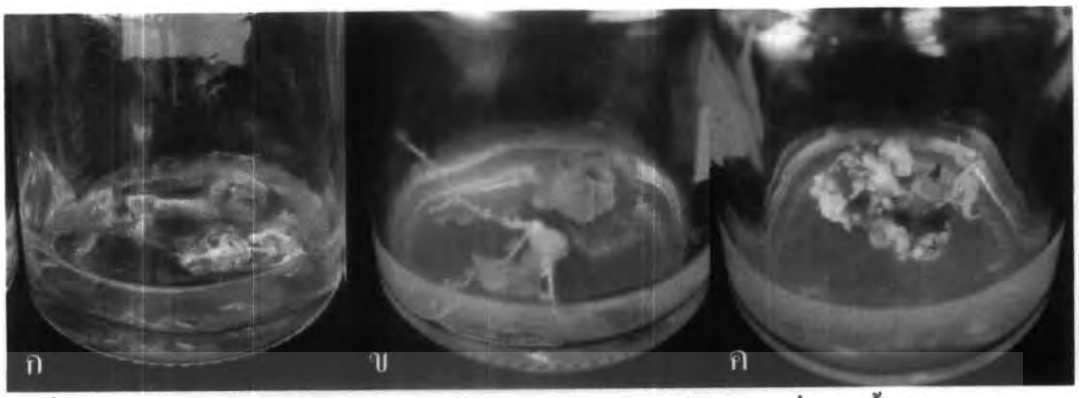
รูปที่ 4.20 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS06 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

(ค) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนลำต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS07 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

(ค) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนลำต้น

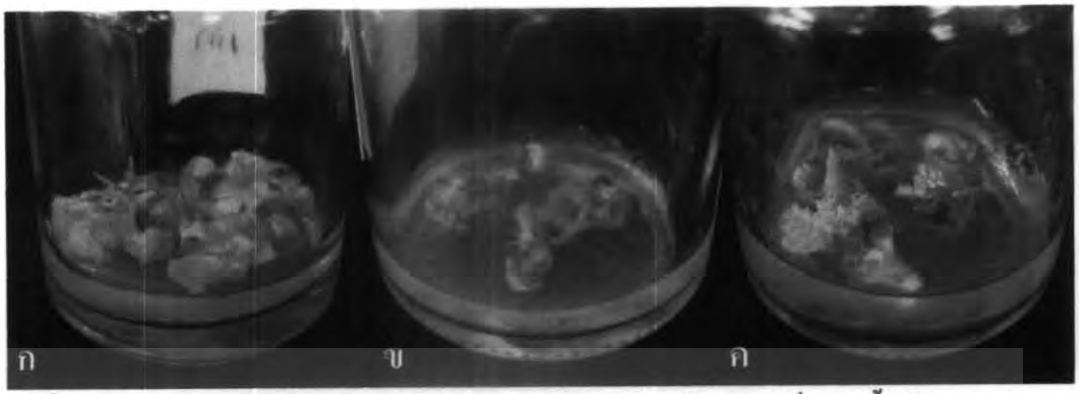
รูปที่ 4.22 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS08 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

(ค) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนลำต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS09 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

(ค) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนลำต้น

รูปที่ 4.24 แสดงการเจริญเป็นแคลลัสของ มันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS11 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)

(ก) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนใบ

(ข) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนก้านใบ

(ค) แคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนลำต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

โดยนำชิ้นส่วนของแคลลัส ที่มีอายุประมาณ 60 วันที่ได้จากอาหารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรที่เหมาะสม คือ อาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าในมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS06 และ CAS11 สามารถเกิดยอดอ่อนได้ (รูปที่ 4.25)ในอาหารสูตรMSที่มีความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.19-4.20) หลังจากย้ายลงบนอาหารชักนำการพัฒนาเป็นต้นใหม่เป็นเวลา 30 วัน และหลังจากย้ายลงบนอาหารชักนำการพัฒนาเป็นต้นใหม่เป็นเวลา 60 วัน พบว่ามันสำปะหลังสายพันธุ์CAS06 และ CAS11 มีการพัฒนาของยอดเพิ่มขึ้น และมีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (รูปที่ 4.26)

จากการทดลองได้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Kartha และคณะ (1974) ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อของมันสำปะหลังให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้โดยที่ใช้อาหาร MS ที่เติม BA และวิตามิน B5 แต่เนื่องจากระยะเวลาในการทดลองนี้สั้นเกินไปจึงยังไม่มีการพัฒนาเป็นรากสะสม

ตารางที่ 4.19 จำนวนยอดอ่อนที่เกิดจากการชักนำแคลลัสของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS06 ให้เป็นต้นใหม่ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร MS ที่เติม BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดที่เกิดขึ้น
1	10	2
2	10	1
3	10	1
4	10	-

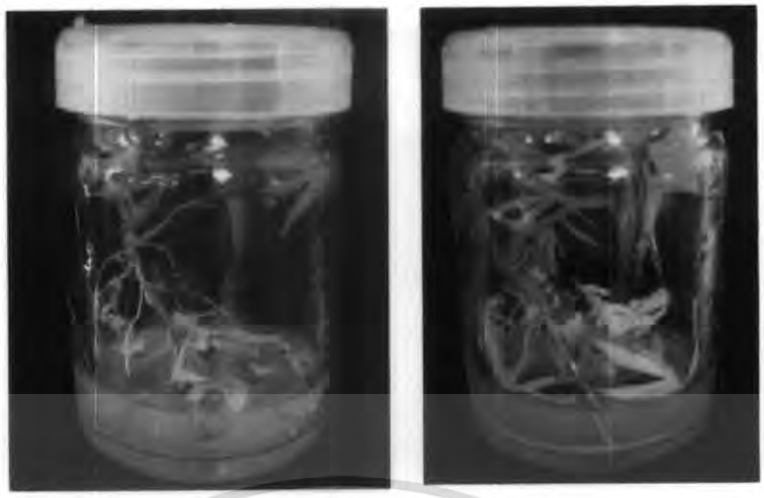
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 จำนวนยอดอ่อนที่เกิดจากการชักนำแคลลัสของมันสำปะหลังพันธุ์ CAS11 ให้เป็นต้นใหม่ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร MS ที่เติม BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดที่เกิดขึ้น
1	10	2
2	10	1
3	10	-
4	10	-

รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะของยอดอ่อน ที่พัฒนาจากแคลลัสของส่วนลำต้นของมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS06 และCAS11 หลังจากย้ายลงบนอาหารชักนำการพัฒนาเป็นต้นใหม่ เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



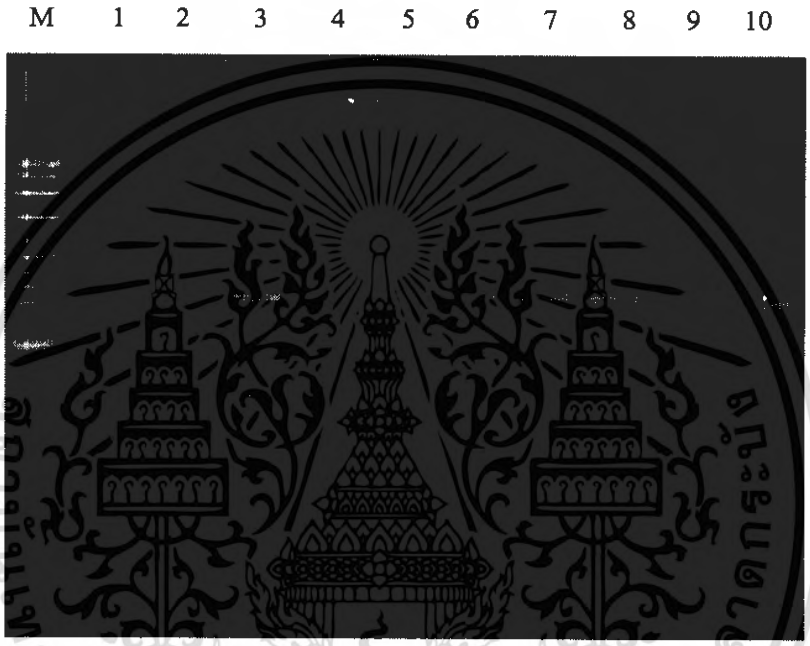
รูปที่ 4.26 แสดงการพัฒนาของยอดอ่อนไปเป็นต้นใหม่ที่เกิดราก และยอดอย่างสมบูรณ์ ของมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS06 และCAS11 หลังจากย้ายลงบนอาหารชักนำการพัฒนาเป็นต้นใหม่ เป็นเวลา 60 วัน

4.2 การทดลองเพื่อศึกษาและวิเคราะห์การคัดแยกสายพันธุ์ของมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิค RAPD

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ชนิด คือไพรเมอร์ OPA-07 OPA-20 OPB-14 และ OPC-04 กับมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ OPA-07 สามารถบอกความแตกต่างของมันสำปะหลังและแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน คือสายพันธุ์ CAS06 และ CAS08 กลุ่มที่ไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ CAS09 กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันคือสายพันธุ์ CAS01 CAS02 CAS03 CAS04 CAS05 CAS07 และ CAS10 (รูปที่ 4.27) ไพรเมอร์ OPA-20 ไม่สามารถแยกให้เห็นถึงลักษณะทางพันธุกรรมในแต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ เพราะเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 100 คู่เบสเหมือนกันในทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 4.28) ไพรเมอร์ OPB-14 สามารถบอกความแตกต่างของมันสำปะหลังและแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน คือสายพันธุ์ CAS05 และ CAS08 กลุ่มที่ไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือสายพันธุ์ CAS09 กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน คือสายพันธุ์ CAS01 CAS02 CAS03 CAS04 CAS06 CAS07 และ CAS10 (รูปที่ 4.29) ไพรเมอร์ OPC-04 สามารถบอกความแตกต่างของมันสำปะหลังและแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน คือสายพันธุ์ CAS05 และ CAS08 กลุ่มที่ไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ CAS09 กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน คือสายพันธุ์ CAS01 CAS02 CAS03 CAS04 CAS06 CAS07 และ CAS10 (รูปที่ 4.30)

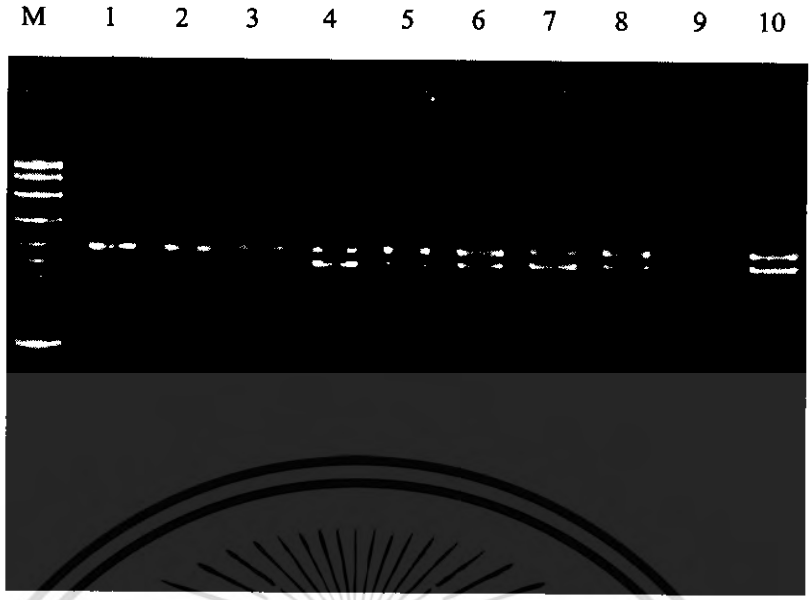
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองนี้ใช้เทคนิคในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพียงวิธีเดียว คือ RAPD จึงไม่สามารถที่จะบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน ดังเช่นในการทดลองของ Colombo และคณะ (2000) ที่ทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง *M. esculenta* และสายพันธุ์ตามธรรมชาติอีก 2 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุศาสตร์



รูปที่ 4.27 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder, (1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05, (6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.28 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder, (1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05, (6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10

รูปที่ 4.29 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์OPB-14 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder, (1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05, (6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

รูปที่ 4.30 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 10 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์OPC-04 ช่อง (M) 100 bp DNA Ladder, (1) CAS01, (2) CAS02, (3) CAS03, (4) CAS04, (5) CAS05, (6) CAS06, (7) CAS07, (8) CAS08, (9) CAS09, (10) CAS10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เจริญไปเป็นแคลลัสและเจริญเป็นต้นใหม่

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ก้าน และลำต้น พบว่าในมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS05 ในส่วนใบมีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และส่วนของก้านใบและลำต้น มีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สายพันธุ์ CAS06 นั้น ส่วนของก้านใบและลำต้น มีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นกัน แต่ในใบนั้นพบว่าสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในสายพันธุ์ CAS07 และ CAS11 ในชิ้นส่วนใบจะมีการเจริญของแคลลัสบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 3 และ 5 มิลิกรัมต่อลิตร ได้ดีไม่แตกต่างกัน และในส่วนของก้านใบ และลำต้นเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ CAS08 พบว่าใบมีการเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ก้านใบเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และส่วนลำต้นเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างกัน และสายพันธุ์ CAS09 นั้นทั้ง ใบ ก้านใบ และลำต้น พบว่าเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ พบว่าทั้งสายพันธุ์ CAS06 และ CAS11 ที่นำชิ้นส่วนของแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า สามารถพัฒนาเป็นยอดอ่อนได้ และมีการพัฒนาของยอดและมีรากเกิดขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

5.2 การทดลองเพื่อศึกษา และวิเคราะห์การคัดแยกสายพันธุ์ของมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิค RAPD

เมื่อนำมันสำปะหลังทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาความแตกต่างทางสายพันธุ์โดยเทคนิค RAPD และใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด คือไพรเมอร์ OPA-07 OPA-20 OPB-14 และ OPC-04 พบว่าไพรเมอร์ OPA-07 OPB-14 OPC-04 สามารถบอกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ และ ไพรเมอร์ OPA-20 ไม่สามารถบอกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์มันสำปะหลังได้ เนื่องจากเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 100 คู่เบสเหมือนกันในทุกสายพันธุ์

จากการศึกษาไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด พบว่าสามารถแบ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน คือสายพันธุ์ CAS06 และ CAS08 กับ CAS05 และ CAS08 ซึ่งสายพันธุ์ CAS05 และ CAS08 เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกันในไพรเมอร์ 2 ชนิด ดังนั้นในมันสำปะหลัง 2 สายพันธุ์นี้จึงมีลักษณะใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากที่สุด กลุ่มที่ไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุกไพรเมอร์ คือสายพันธุ์ CAS09 ซึ่งอาจเกิดจากในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ดีเอ็นเอมาน้อยไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในเทคนิค RAPD หรือไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดนี้ อาจยังไม่มีความจำเพาะต่อมันสำปะหลังสายพันธุ์ CAS09 กลุ่มที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันในทุกไพรเมอร์ คือสายพันธุ์ CAS01 CAS02 CAS03 CAS04 CAS07 และ CAS10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

รังสฤษฎ์ และคณะ. 2545. มันสำปะหลัง. ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล 2548. การโคลนยีน. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตร์ศาสตร์. กรุงเทพ: 106-121

Atehnkeng, J., Adetimirin, V.O. and Ng, S.Y.C. 2006. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. *African Journal of Biotechnology.* 5(14) : 1324-1329.

Bajaj, Y.P.S. 1983. Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years.*Field Crops Research.* 7 : 161-167.

Colombo, C., Second, G., Charrier, A. 2000. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M.flabellifolia* and *M.peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. *Genetic and Molecular Biology.* 23(2) : 417-423.

Donna Parke. 1978. Tissue Culture of Cassava on Chemically Defined Media. *Physiologia Plantarum.* 42(2): 195 –201.

Kartha, K.K., Gamborg, O.L., Constabel, F. and Shyluk, J.P. 1974. Regeneration of cassava plants from apical meristems. *Plant Science Letter.* 2(2) : 107-113.

Nigel J. Taylor, Michelle Edwards, Rebecca J. Kiernan, Christopher D.M. Davey, David Blakesley, Graham G. Henshaw. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology.* 14: 726 – 730.

Nigel J. Taylor, M.V. Masona, C. Schopke, R. Carcamo, T. Hao, C.M. Fauquet. 2001. production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica.* 120: 25-34.

N.K. Konan, C. Schopke, R. Carcamo, R.N. Beachy, C.M. Fauquet. 1997. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. *Plant cell reports.* 16: 444-449.

Raemakers, C.J.J.M., Amati, M., Staritsky, G., Jacobsen, E. and Visser, R.G.F. 1993. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. 71(4) : 289-294.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [Online].Available : http://classroom.psu.ac.th/users/spravit/510-211/cassava.htm
- [Online].Available : http://aggie.kps.ku.ac.th/agron/lesson9.shtml
- [Online].Available : http://www.doa.go.th/fieldcrops/cas/pro/index.htm
- [Online].Available : http://www.doa.go.th/pl_data/CASS/1STAT/st01.html
- [Online].Available : http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/media.html
- [Online].Available : http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/callus.html
- [Online].Available : http://www.gpo.or.th/rdi/html/DNAfingerprinting.html
- [Online].Available : http://pharm.swu.ac.th/web_npec/content/JOURNAL/ workshop%20DNA.pdf
- [Online].Available : http://www.koa.go.th/pldata/CASS/1stat/st01/html
- [Online].Available : http://www.phithan-toyota.com/news/ntopic84.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ (cc./ลิตร)
A	NH_4NO_3	82500	52	20
	KNO_3	95000	50	
B	H_3BO_3	1240	200	5
	KH_2PO_4	34000	200	
	KI	166	200	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	50	200	
	$CoCl_2.6H_2O$	5	200	
C	$CaCl_2.2H_2O$	88000	200	5
D	$MgSO_4.7H_2O$	74000	200	5
	$MnSO_4.4H_2O$	4460	200	
	$ZnSO_4.7H_2O$	1720	200	
	$CuSO_4.5H_2O$	5	200	
E	Na_2EDTA	7450	200	5
	$FeSO_4.7H_2O$	5570	200	
F	Glycine	400	200	5
	Nicotinic acid	100	200	
	Pyridoxine-HCL	100	200	
	Thiamine-HCL	20	200	
	Myo-inositol	20000	200	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้