# รายงานการวิจัย

## การขยายพันธุ์สบู่ดำ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

## Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Propagation : Tissue Culture


ประยงค์ คงนคร Prayong Kongnakorn

สุนีย์รัตน์ ศรีเปารยะ Suneerat Sripaoraya

คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

**ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย**

**งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2550 - 2552**

# การขยายพันธุ์สบู่ดำ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ประยงค์ คงนคร และ สุนีย์รัตน์ ศรีเปารยะ[1]

## บทคัดย่อ

การฟอกฆ่าเชื้อใบสบู่ดำในสูตรอาหาร MS โดย มีการฟอก 4 วิธี หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 35 วัน พบว่า การจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และฟอกคลอร็อคซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ให้ผลดีที่สุด คือ ปลอดเชื้อ 25.77 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื้อเยื่อมีสีน้ำตาล การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ โดย ใช้ชิ้นส่วนของสบู่ดำจากต้นในแปลง พบว่า การเพาะเลี้ยงใบอ่อนในสูตรอาหาร MS เติม TDZ ระดับ 0,0.5,1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อในทุกสูตรอาหารเมื่ออายุครบ 60 วัน มีสีน้ำตาล ไม่เจริญและพัฒนา สำหรับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร Miller เป็นเวลานาน 35 วัน ระยะแรกมีสีเขียว และ สุดท้ายเป็นสีน้ำตาล การเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร WPM เติม BA และ IBA พบว่า ชิ้นส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 60 วัน มีสีคล้ำทั้งชิ้นในทุกระดับความเข้มข้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำจากเมล็ด ในสูตรอาหาร MSและ WPM เติม BA และ NAA พบว่า เมล็ดเริ่มงอกเมื่ออายุ 3 วัน เจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์เมื่ออายุ 15 วัน และเมื่ออายุครบ 60 วัน การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยความสูงสูงสุด 8.03 เซนติเมตร ส่วน การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 5 ใบ การเพาะเลี้ยงใบอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดในขวดทดลอง นำไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA และ IBA เป็นเวลานาน 60 วัน พบว่าใบอ่อนเกิดแคลลัสขนาดกลางถึงใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ,เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร,เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร,เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงใบอ่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA และ IBA เป็นเวลานาน 75 วัน พบว่า ใบอ่อนเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 1 ยอดและเกิดใบเฉลี่ยสูงสุด 8.5 ใบ ในสูตรอาหารที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน การเพาะเลี้ยงรากในสูตรอาหาร MS และWPM ที่เติม BA และ IBA เพาะเลี้ยงนาน 60 วัน พบว่าเกิดแคลลัสสูงสุด 84.66 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสูตรอาหาร MS ไม่เกิดแคลลัสเลย

การเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล(ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) ในสูตรอาหาร MS ที่เติมBA และ IBA นาน 60 วัน เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.33 ยอด เกิดใบเฉลี่ยสูงสุด 5 ใบ ในสูตรอาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน การเพาะเลี้ยงไฮโปคอทิลสบู่ดำในสูตรอาหาร MS ที่เติมBA และ IBA 75 วัน เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.14 ยอด เกิดใบเฉลี่ยสูงสุด 2 ใบ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในสูตรอาหารที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลในสูตรอาหาร MS ที่เติมBA และ IBA นาน 60 วัน พบว่า เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.0 ยอด เกิดใบเฉลี่ยสูงสุด 18.5 ใบ โดย เลี้ยงในในสูตรอาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลในสูตรอาหาร MSและWPM ที่เติมBA และ IBA นาน 60 วัน พบว่า เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.53 ยอด เกิดใบเฉลี่ยสูงสุด 7.24 ใบ ในสูตรอาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร การชักนำราก โดย ใช้ยอดจากการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลในสูตรอาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 60 วัน จากการทดลองนาน 45 วัน ในสูตรอาหาร MS,1/2MS และWPM พบว่า สูตรอาหาร 1/2MS เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากดีที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 1 รากต่อต้น และรากยาวเฉลี่ย 4.6 เซนติเมตร จากนั้นศึกษาต่อ โดย การชักนำรากในสูตรอาหาร 1/2MS นาน 30 วัน พบว่า การชักนำรากที่ดีที่สุด คือ การชักนำรากในสูตรอาหาร 1/2MS เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกัน NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน แล้วย้ายลงสู่สูตรอาหาร 1/2MS เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดราก 80 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 3.6 รากต่อต้น และรากยาวเฉลี่ย 5.52 เซนติเมตร

**คำสำคัญ : การสบู่ดำ,การขยายพันธุ์,การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ,ไบโอดีเซล,**

.....

[1]**คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช**

# Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Propagation : Tissue Culture

**Prayong Kongnakorn and Suneerat Sripaoraya**[1]

## Abstract

There are 4 methods of physic nut sterilization in MS media. After cultured for 35 days the resluts showed that Alcohol 70% dipping and Chlorog 10% purification for 15 minutes gave the best result; there was 25.77% of sterilization but it became brown tissue. Tissue culture of physic nut with a part of its tree from the plantation found that budding cultured in MS media with TDZ 0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg./litre became brown tissue, not grown and undeveloped for every media in 60 days. Inflorescence stem cultured in Miller media for 35 days showed that there was green in the first stage and finally became brown tissue. Inflorescence stem cultured in WPM media; BA and IBA adding found that all its part became brown tissue in all levels of concentration in 60 days.

The seed of physic nut tissue culture in MS and WPM media with BA and NAA adding identified that the seed grew in 3 days and matured in 15 days. And when it grew to 60 days, the tissue culture in MS media with BA 0.5 mg./litre showed the highest mean 8.03 cm. , the tissue culture in MS media with BA 0.1 mg./litre showed the highest average 5 leaves.Budding cultured from seed cultivation in bottle experiment cultured with WPA media; BA and IBA adding for 60 days found that there was middle to large callus in budding cultured with WPA media; BA adding 0.5 mg./litre together with IBA adding 0 mg./litre, BA adding 0 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre, BA adding 1.0 mg./litre together with IBA adding 0 mg./litre, BA adding 1.0 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre, and BA adding 1.0 mg./litre together with IBA adding 1.0 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre. Budding cultured with MS media; BA and IBA adding for 75 days identified that the highest average 1 peak budding and the highest average 8.5 leaves from the media; BA adding 1.0 mg./litre together with IBA adding 0 mg./litre. Root cultured with MS and WPM media; BA and IBA adding for 60 days showed that there was the highest callus 84.66 % from WPM media; BA adding 1.0 mg./litre together with

IBA adding 0.1 mg./litre. But there was no callus from MS media. Epicotyl cultured ( a few parts of epicotyl ) with MS media; ; BA and IBA adding for 60 days found that there was the highest average 1.33 peaks, the highest average 5 leaves from the media; BA adding 0.5 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre. And hypocotyl physic nut cultured with MS media; BA and IBA adding for 75 days found that there was the highest average 4.14 peaks, the highest average 2 leaves which there was significant different from media with BA adding 1.0 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre. Epicotyl cultured from MS media; BA and IBA adding for 60 days found that there was the highest 2.0 peaks, the highest average 18.5 leaves with the media ;BA adding 0.5 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre. Epicotyl cultured from MS and WPM media; BA and IBA adding for 60 days found that there was the highest 2.53 peaks, the highest average 7.24 leaves with the media;BA adding 0.5 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre.

The induction of roots by the peak from Epicotyl cultured with the media ;BA adding 0.5 mg./litre together with IBA adding 0.01 mg./litre for 60 days, from the experiment 45 days with MS, 1/2MS and WPM media found that the 1/2MS media; adding PG 100 mg./litre showed the best root 75%; the average 1 root per stem and the root was long average 4.6 cm. The futher study about the induction of roots from 1/2MS media for 30 days found that the best induction of root was from the 1/2MS media; adding PG 100 mg./litre together with NAA 2.5 mg./litre for 6 days and then moved to 1/2MS media; adding PG 100 mg./litre occurred root 80%; the average 3.6 roots/stem and the root was 5.52 cm.

**Keywords *: Jatropha curcas Lrcas* L,,Propagation, Tissue culture,Biodiesel**

……

**[1]Faculty of Agriculture. Rajamangala University of Technology Srivijaya, Tungyai, Nakhon Si Thammarat**

# กิตติกรรมประกาศ

**คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชมงคลศรีวิชัย ที่สนับสนุนทุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2550 – 2552 ขอขอบคุณ รศ.ดร.สุนีย์รัตน์ ศรีเปารยะ ที่ปรึกษาโครงการและให้ความอนุเคราะห์ต้นสบู่ดำสำหรับใช้ในการทดลอง**

**ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์และครอบครัว ที่ทำให้การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี**

**นายประยงค์ คงนคร**
**หัวหน้าโครงการวิจัย**

# สารบัญเรื่อง


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| **บทนำ** | |
| 1.ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 2.วัตถุประสงค์ | 1 |
| 3.ขอบเขตการทดลอง | 1 |
| **ตรวจเอกสาร** | |
| 1.สบู่ดำ | 4 |
| 2.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช | 4 |
| 2.1 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 4 |
| 2.2 ขั้นตอนการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 5 |
| 2.3 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช | 6 |
| 2.4 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืช | 8 |
| 2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ | 9 |
| **อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง** | |
| 1.อุปกรณ์และสารเคมี | 12 |
| 2.วิธีการทดลอง | 14 |
| **ผลการทดลอง** | |
| 1.การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อใบสบู่ดำ | 29 |
| 2.การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสบู่ดำ | 31 |
| 3.การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกสบู่ดำ | 32 |
| 4.การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของก้านช่อดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Miller | 33 |
| 5.การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร MS | 34 |
| 6.การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในอาหารสูตร WPM | 37 |
| 7.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดของสบู่ดำในสูตรอาหาร MS และ WPM | 39 |

# สารบัญเรื่อง(ต่อ)


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| **ผลการทดลอง** | |
| 8.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในอาหารแข็งสูตร WPM ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ | 44 |
| 9.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในอาหารแข็งสูตร MS ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ | 48 |
| 10.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBAในอาหารแข็งสูตร MS และWPM ต่อการเพาะเลี้ยงรากของสบู่ดำ | 57 |
| 11.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) | 60 |
| 12.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BAร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงไฮโพคอทิล ของสบู่ดำ | 64 |
| 13.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล ของสบู่ดำ | 69 |
| 14.ศึกษาความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร MS และ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล ของสบู่ดำ | 74 |
| 15.ศึกษาการชักนำรากในอาหารสูตร MS ครึ่งสูตรMS และ WPM | 79 |
| 16.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IBA และ NAA ต่อการชักนำราก ในสูตรอาหาร 1/2MS | 84 |
| **สรุปผลการทดลอง** | 89 |
| **ข้อเสนอแนะ** | 91 |
| **เอกสารอ้างอิง** | 92 |
| **ภาคผนวก** | 93 |

# สารบัญตาราง


**ตารางที่** **หน้า**

1.ความเข้มข้นของ TDZ ในอาหารแข็งสูตร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงแผ่นใบสบู่ดำ 14

2.ความเข้มข้นของ TDZ ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกสบู่ดำ 15

3.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในอสูตราหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอก ของสบู่ดำ 16

4.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร WPM สำหรับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอก ของสบู่ดำ 17

5.การเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำในสูตรอาหาร MS และWPM ที่เติม BA และ NAA ระดับต่างๆ 18

6.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร WPM สำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อน 19

7.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในอาหารแข็งสูตร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อน 20

8.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตร อาหาร MS และ WPM สำหรับการเพาะเลี้ยง 21-22 รากสบู่ดำ

9.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล (ตัดส่วนไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) 23

10.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงไฮโพคอทิล 24

11.ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล 25

12.ระดับความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS และ WPM สำหรับการ เพาะเลี้ยงอิพิคอทิล 26

13.การชักนำราก ในสูตรอาหาร MS , 1/2MS และWPM 27

14.การชักนำรากในสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม PG100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ และเติม IBA และ NAA ในระดับต่างๆ 28

15.เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อและลักษณะชิ้นส่วนของการเพาะเลี้ยงใบสบู่ดำ 29

16.การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนแผ่นใบสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ระดับความเข้มข้นต่างๆ 31

17.การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติมTDZ ระดับความเข้มข้นต่างๆ 32

18.การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารแข็ง Miller 33

# สารบัญตาราง(ต่อ)


| ตารางที่ | หน้า |
|---|---|
| 19.การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ | 34-35 |
| 20.การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารแข็งWPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ | 37-38 |
| 21.ค่าเฉลี่ยความสูงของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดสบู่ดำในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 และ 60 วัน | 41 |
| 22.ค่าเฉลี่ยใบอ่อนของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดสบู่ดำในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 45 และ 60 วัน | 42 |
| 23.การเปลี่ยนแปลงของใบอ่อนสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ | 44-45 |
| 24. การเปลี่ยนแปลงของใบอ่อนสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ | 48-50 |
| 25.การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสใบอ่อนสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ | 53 |
| 26.ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด จากใบอ่อนสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารMS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับต่างๆ ที่อายุ 30 , 45 , 60 และ 75 วัน | 54 |
| 27.ค่าเฉลี่ยจำนวนใบจากใบอ่อนของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่อายุ 30 , 45 , 60 และ 75 วัน | 55 |
| 28.ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส | 58 |
| 29.การให้คะแนนการพัฒนาของแคลลัสและค่าเฉลี่ยจำนวนยอดและใบของอิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) | 60 |
| 30.ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 45 , 60 และ 75 วัน | 66 |
| 31.ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 45 , 60 และ 75 วัน | 67 |
| 32.ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 และ 60 วัน | 71 |

# สารบัญตาราง(ต่อ)

**ตารางที่** **หน้า**

33.ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 และ 60 วัน 72

34.ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 , 60 และ 75 วัน 76

35.ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 30 , 45 , 60 และ 75 วัน 77

36.เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ค่าเฉลี่ยจำนวนรากและค่าเฉลี่ยความยาวราก จากการชักนำราก ในสูตรอาหารต่างๆ 80

37.เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ค่าเฉลี่ยจำนวนรากและค่าเฉลี่ยความยาวราก จากการชักนำราก ในสูตรอาหารต่างๆ 85

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | หน้า |
|---|---|
| 1.ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดสบู่ดำ ที่อายุ 30 วัน | 43 |
| 2.ผลของสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดสบู่ดำ ที่อายุ 30 วัน | 43 |
| 3.ผลของสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนสบู่ดำ ที่อายุ 45 วัน | 47 |
| 4.ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนสบู่ดำ ที่อายุ 10 สัปดาห์ | 56 |
| 5.ผลของสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของรากสบู่ดำ ที่อายุ 45 วัน | 59 |
| 6.ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของของอิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) ที่อายุ 60 วัน | 63 |
| 7.ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 75 วัน | 68 |
| 8.ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 60 วัน | 73 |
| 9.ผลของสูตรอาหาร MS และWPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ | 78 |
| 10.การชักนำรากในสูตรอาหาร MS, 1/2MS และ WPM | 81 |
| 11.การชักนำรากในสูตรอาหาร MS, 1/2MS และWPM ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 82 |
| 12.การชักนำรากในสูตรอาหาร MS, 1/2MS และ WPM ที่เติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ | 83 |
| 13.การชักนำรากในสูตรอาหาร1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และ NAA | 86 |
| 14.การชักนำรากในสูตรอาหาร1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และ NAA | 87 |

## สารบัญภาพ(ต่อ)


| ภาพที่ | หน้า |
|---|---|
| 15.การชักนำรากในสูตรอาหาร1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และ NAA | 88 |


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

# บทนำ

## 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เมล็ดจะมีน้ำมัน 55% หรือมากกว่า สามารถใช้แทนน้ำมันดีเซลหมุนเร็วได้ 100% และมีขั้นตอนการทำที่ไม่ยุ่งยาก สามารถส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกและทำน้ำมันไบโอดีเซลได้ด้วยตัวเกษตรกรเอง นำไปสู่การช่วยตัวเองหรือที่เรียกว่าเกษตรยั่งยืน ส่งผลให้ลดการนำเข้าน้ำมันและช่วยลดการขาดดุลเดินสะพัดของประเทศได้ในระยะยาว

สบู่ดำเป็นพืชผสมข้ามและมีหลายพันธุ์ เมื่อมีการคัดเลือกหรือสร้างพันธุ์ลูกผสมที่ดีได้แล้ว มีความจำเป็นต้องขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะสามารถผลิตกล้าสบู่ดำได้จำนวนมากในระยะเวลารวดเร็วและ ตรงตามพันธุ์ ทำให้การผลิตไบโอดีเซลมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นทั้งระบบเกษตรยั่งยืนและอุตสาหกรรม

## 2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการขยายพันธุ์สบู่ดำด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อเป็นแนวทางขยายพันธุ์สบู่ดำให้ได้จำนวนมากและรวดเร็ว

## 3. ขอบเขตการทดลอง

### 3.1 การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อใบสบู่ดำ

ทำการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อแผ่นใบที่เหมาะสมจำนวน 4 วิธี คือ

1. จุ่มแอลกอฮอล์ 70 % จากนั้นฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 10 นาที
2. จุ่มแอลกอฮอล์ 70 % จากนั้นฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 15 นาที
3. ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 10 นาที
4. ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 15 นาที

### 3.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสบู่ดำ

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ ในสูตรอาหาร MS โดยใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 4 สูตรอาหาร

### 3.3 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกสบู่ดำ

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ ในอาหาร MS โดยใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 4 สูตรอาหาร

**3.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของก้านช่อดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร Miller**

ทำการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร Miller แล้วบันทึกการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 7 วัน

**3.5 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร MS**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร

3.6 **การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร WPM**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร

**3.7 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดของสบู่ดำในสูตรอาหาร MS และ WPM**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 14 สูตรอาหาร

**3.8 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในสูตร อาหาร WPM ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร

**3.9 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในสูตรอาหาร MS ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร

**3.10 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในสูตร อาหาร MS และ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงรากของสบู่ดำ**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0,0.01 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 18 สูตรอาหาร

**3.11 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยง อิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโปคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย)**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร

**3.12 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงไฮโปคอทิลของสบู่ดำ**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร

**3.13 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง 5 สูตรอาหาร

**3.14 การศึกษาความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร MS กับ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง 4 สูตรอาหาร

**3.15 การศึกษาการชักนำรากในสูตรอาหาร MS, 1/2MS และ WPM**

ทำการศึกษาเปอร์เซ็นการเกิดราก จำนวนราก ความยาวรากและระยะเวลาที่เกิดราก

**3.16 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IBA และ NAA ต่อการชักนำรากในสูตรอาหาร 1/2MS**

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดราก

# ตรวจเอกสาร

## 1. สบู่ดำ

สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ไม้ยางพารา Euphorbiaceae เช่นเดียวกับสบู่แดง ปัตตาเวีย ฝิ่นต้นหรือมะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม ผักหวานบ้าน ซึ่งมีความหลากหลายกันค่อนข้างมากในลักษณะต้น ใบ ช่อดอก ผลและเมล็ด สบู่ดำเป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกสนำเข้ามาในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา เพื่อรับซื้อเมล็ดไปคัดบีบเอาน้ำมันสำหรับทำสบู่ นอกจากนี้ยังจัดเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง น้ำมันที่ได้จากเมล็ดสบู่ดำ สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่เกษตรกรใช้อยู่ได้ โดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค ใช้ปลูกเป็นแนวรั้ว เพื่อป้องกัน สัตว์เลี้ยงเข้าทำลายผลผลิต เนื่องจากมีสารพิษ Hydrocyanic มีกลิ่นเหม็นเขียว สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าให้ความสนใจเป็นอย่างยิ่งในสภาวะที่ราคาน้ำมันดีเซลมีราคาสูงอย่างในปัจจุบัน (ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดชัยนาท (จักรกลเกษตร))

**การขยายพันธุ์สบู่ดำ มีวิธีการหลักๆ 3 วิธี (3) คือ**

1. การเพาะเมล็ด เมื่อแกะเมล็ดออกจากผลแล้ว นำไปผึ่งแดดให้แห้ง เตรียมถุงดำขนาด 5x7 นิ้ว ใช้ดินผสมขี้เถ้าแกลบ หยอดเมล็ดลง รดน้ำและเก็บไว้ในเรือนเพาะชำ เมล็ดที่เพาะจะเริ่มงอกประมาณ 5-7 วันหลังหยอดเมล็ด จากนั้นย้ายถุงออกให้ได้แสงแดดรำไร รดน้ำ 2 วัน/ครั้ง ต้นกล้าอายุประมาณ 35 วัน นำไปปลูกในแปลงได้

2. การปักชำกิ่ง ควรใช้กิ่งพันธุ์ที่มีสีเขียวปนน้ำตาล ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป ยาวประมาณ 30-50 เซนติเมตร ปักชำลงในถุงดำที่มีวัสดุเพาะคือ ทราย : ดิน : ขี้เถ้าแกลบ อัตรา 1:1:1 รดน้ำเก็บไว้ในที่ร่มรำไร หลังจากแตกใบอ่อนและรากเริ่มเดินแล้ว อายุประมาณ 35 วัน เอาออกมาให้ได้รับแสงแดดประมาณ 50% รดน้ำทุกเช้าหรือเย็น วันเว้นวันประมาณ 7 วัน แล้วย้ายออกแดด 100% รดน้ำทุกเช้าหรือเย็น ประมาณ 10 วัน สามารถย้ายปลูกในแปลงได้เลย

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ส่วนต่างๆ ที่เหมาะสมจากต้นสบู่ดำ มาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตรที่เหมาะสม ซึ่งในปัจจุบันกำลังเป็นที่นิยมในการศึกษาค้นคว้ากันอยู่ทั่วไป

## 2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

### 2.1 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นเซลล์โปรโตพลาสต์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบไปด้วยเกลือแร่ น้ำตาล

วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหลายภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิ และแสงสว่าง (คำนูญ, 2542)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การนำชิ้นส่วนของพืชชนิดใดก็ได้ เช่น อวัยวะต่างๆ ข้อ ,ตา,ปลายยอด,ราก, เนื้อเยื่อ parenchyma หรือในระดับเซลล์หรือโปรโตพลาส มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้นซึ่งประกอบไปด้วย เกลือแร่ ธาตุอาหารต่างๆ ไวตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต(growth regulator) ในกลุ่มของ auxin หรือ cytokinin เนื้อเยื่อจะถูกเก็บไว้ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส ได้รับแสงประมาณ 1000 – 2000 ลักซ์ ชิ้นส่วนต่างๆของพืชจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชโดยตรง หรือเจริญเป็นแคลลัส หรือเอมบริออย(embryoid) และหลังจากนั้นพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป (รงรอง,2542)

**2.2 ขั้นตอนการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** (นพมณี, 2545)

<u>ระยะที่ 0 : การเตรียมต้นแม่พันธุ์</u> (the preparation stage)

ชิ้นส่วนตั้งต้นที่ได้จากต้นแม่พันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำคัญมาก จุดประสงค์ของการเตรียมต้นแม่พันธุ์ คือ เพื่อต้องการลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อนนำมาใช้ ซึ่งอาจทำได้โดย นำต้นแม่พันธุ์ที่คัดเลือกแล้วมาเลี้ยงไว้ในโรงเรือนที่มีการให้ปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เราต้องการ และควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมต่อลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ติดบนผิวต้นพืชให้น้อยที่สุด

<u>ระยะที่ 1 : การกระตุ้นการเกิดต้น</u> (initiation of culture)

เป็นการทำให้ชิ้นส่วนพืชปราศจากเชื้อที่ติดบนผิวชิ้นส่วนโดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ เลี้ยงลงในอาหารชักนำจนกระทั่งชิ้นส่วนพืชสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่งหมายถึง การพัฒนาต่อไปของปลายยอด การเกิดแคลลัสบนส่วนของลำต้น หรือการตอบสนองอื่นๆ ความสำเร็จของระยะนี้คือ การได้จำนวนต้นที่ถูกชักนำได้มากเพียงพอตามที่ต้องการและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

<u>ระยะที่ 2 : การเพิ่มปริมาณต้น</u> (multiplication)

ระยะนี้เป็นการเพิ่มปริมาณต้นที่กระตุ้นได้แล้วให้มากขึ้นในขวด รวมทั้งการเก็บรักษาต้นเพื่อใช้เป็นต้นพันธุ์หลักในรอบการผลิตใหม่ ปัจจัยสำคัญสำหรับการเพิ่มปริมาณต้นได้แก่ สารเคมีพิเศษที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณต้น

<u>ระยะที่ 3 : การยืดยาวของลำต้นและการกระตุ้นหรือการพัฒนาการออกราก</u> (elongation and root induction or development)

ต้นที่ได้จากระยะที่ 3 จะเป็นต้นขนาดเล็กเนื่องจากผลของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตให้เกิดการแตกต้น ไม่สามารถนำไปย้ายลงปลูกภายนอกได้ทันที ต้องมีการยืดลำต้นให้

สูงขึ้นและแข็งแรง วิธีการ คือ การย้ายลงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเลี้ยงในอาหารที่มีจิบเบอเรลลิน (gibberellin)

ส่วนการชักนำรากนั้นจะทำเมื่อต้นนั้นยืดยาวจนได้ขนาดที่เหมาะสมจึงย้ายลงสู่อาหารที่เหมือนขั้นตอนการเพิ่มปริมาณต้นแต่ไม่มีการเติมไซโตไคนิน

ระยะที่ 4 : การปรับสภาพและการย้ายปลูกต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (transfer to greenhouse conditions)

ต้นกล้าเล็กที่ย้ายออกมาจากขวด ต้องล้างรากให้สะอาดไม่ให้มีเศษอาหารวุ้นติดอยู่ เพราะจะเป็นที่เข้าทำลายของเชื้อรา แล้วนำไปไว้ใต้กระบะพ่นหมอก

**2.3 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ พืชต่างชนิดกันมีความต้องการอาหารต่างกัน ดังนั้น จึงมีการคิดค้นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชนิดของพืช

1. ธาตุอาหารอนินทรีย์ (Inorganic element) ประกอบด้วย

ธาตุอาหารที่พืชต้องการมาก (Macro element) เป็นสารอนินทรีย์ที่พืชต้องการใช้ในปริมาณมากได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ไนโตรเจน (N) ออกซิเจน (O) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งใช้ในรูปแอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$) โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เป็นต้น

ธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย (Micro element) เป็นสารอนินทรีย์ที่พืชต้องการเพียงเล็กน้อยแต่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ เหล็ก (Fe) คลอรีน (Cl) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) โมลิบดีนัม (Mo)

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์สาร (Organic Substances) ประกอบด้วย

2.1 วิตามิน (vitamin) ที่ใช้กันมากได้แก่ thiamin, Nicotinic acid, Pyridoxine, Inositol, Biotin, Penthothenic acid, Choline chlorine riboflavin และ Ascorbic acid

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth regulator) ได้แก่ (นพมณี, 2545)

2.2.1 สารในกลุ่มออกซิน (Auxin)

มีบทบาทในด้านการแบ่งตัวและการยืดตัวของเซลล์พืช การเกิดรากและการข่มตายอด รูปที่ใช้จะเป็น Indole–3 acetic acid (IAA) หรือ 3-Indole butyric acid (IBA) ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบในธรรมชาติ และ 1-Naphthylacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 2,4,5- trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) ที่เป็นกลุ่มสารสังเคราะห์ สารใน

กลุ่มออกซินจะสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงแดด ดังนั้น จึงไม่ควรเก็บอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วเป็นเวลานานๆ หรือ ถูกแสง

2.2.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin)

เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ลดการข่มตายอด จึงช่วยให้การแตกกอของพืชที่เจริญในอาหารดี แต่พบว่าหากใช้มากเกินไปจะระงับการสร้างรากหรือการเกิดเอ็มบริโอ รูปที่ใช้มีทั้งสารธรรมชาติ คือ Zeatin และอีกชนิด คือ พิวรีน ได้แก่ isopentenyl adenine (2-ip) และadenine ส่วนสารสังเคราะห์ คือ 6-benzyladenine (BA), 6-furfurylaminopurine (Kinetin) และ thidiazuron (TDZ) เนื่องจากสารธรรมชาติมีราคาแพงถึงแพงมาก ดังนั้น จึงนิยมใช้ในรูปของสารสังเคราะห์

2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น

- Gibberellic acid ($GA_3$)
- Paclobutrazol
- Abscissic acid (ABA)
- Daminozide
- Picloram

สารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านี้มีคุณสมบัติแตกต่างกันจำเป็นต้องใช้ทำละลายและเก็บรักษาในสถานภาพที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon sources) ได้แก่ สารประกอบพวกน้ำตาลต่าง ๆ เช่น glucose, sucrose, fructose และ mannitol

2.4 กรดอะมิโน (amino acid) ได้แก่ glutamine, asparagine, adenine, glycine และ casein hydrolysate

2.5 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว (Coconut water) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำมะเขือเทศคั้น กล้วยหอมบด และ จากมอลล์สกัด (malt extract) (รังสฤษฎ์, 2541)

3. สารอื่นๆ

3.1 วุ้น (agar) เป็นสารที่ได้จากสาหร่ายน้ำเค็มอยู่ในรูปของผงทำให้อาหารเพาะเลี้ยงแข็งตัว โดยทั่วไปเมื่อเอาวุ้นมาละลายน้ำจะเกิดเป็นเจล ซึ่งสามารถจับตัวกับน้ำ ถ้าความเข้มข้นของวุ้นสูง ความสามารถในการจับกับน้ำและสารต่างๆ ก็ยิ่งมากตาม ดังนั้น ถ้าใส่วุ้นมากชิ้นส่วนของพืชจะดูดน้ำและอาหารได้ยาก

3.2 พีเอส (pH) โดยทั่วไปมักใช้ค่าพีเอส 5.0 – 6.5 ถ้าต่ำกว่า 4.5 หรือสูงกว่า 7.0 เซลล์หรือเนื้อเยื่อจะหยุดการเจริญเติบโต

3.3 ผงถ่าน (activated charcoal) ถ่านที่ได้จากพืชจะมีผงถ่านในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าถ่านที่ได้จากสัตว์ คือ 95 – 99 เปอร์เซ็นต์ นิยมใช้ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่ออาหาร 1 ลิตร

**2.4 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืช**

สาเหตุที่สำคัญที่สุดของการปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ซึ่งเชื้อนั้นอาจอยู่ภายในหรือภายนอกชิ้นส่วนพืช ดังนั้น หากนำพืชที่มีเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงก็จะพบการปนเปื้อนอย่างแน่นอน เชื้อเหล่านี้สามารถสร้างความเสียหายต่างๆ ให้กับพืชที่เพาะเลี้ยง

สารฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ของชิ้นส่วนพืชเป็นวิธีการเตรียมพืชให้อยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อก่อนนำมาเพาะเลี้ยง ขั้นตอนนี้มีความจำเป็นจะต้องปฏิบัติเป็นอย่างยิ่ง ที่จะเป็นการกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เจริญและทวีจำนวนจนสร้างความเสียหายแก่พืชที่เพาะเลี้ยง สารฟอกฆ่าเชื้อที่หาซื้อได้ง่ายและนิยมใช้มากที่สุด คือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีชื่อทางการค้าว่า คลอรอกซ์ (Clorox®) โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้น 5-20% และระยะเวลาฟอกนาน 15-30 นาที ขึ้นกับชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืช และอาจเติมสารจับใบ (surfactant) เช่น Tween 20, Tween 80 และ Teepol ประมาณ 0.05% เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสาร โดยเมื่อเขย่าจะช่วยให้เกิดฟอง ทำให้สารฟอกฆ่าเชื้อสัมผัสกับผิวของเนื้อเยื่อที่มีลักษณะขรุขระ ไม่เรียบสารฟอกฆ่าเชื้ออื่นๆ ที่นิยมได้แก่ แอลกอฮอล์ หรือเอธานอล ความเข้มข้น 70-95% ใช้ฟอกฆ่าเชื้อในขั้นตอนก่อน โดยการจุ่มหรือแช่ชิ้นส่วนพืชในระยะเวลาสั้นๆ หลังจากนั้นจึงนำชิ้นส่วนพืชไปแช่ในสารฟอกฆ่าเชื้อชนิดอื่นต่อไป จะช่วยให้ประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อดียิ่งขึ้น

ประสิทธิภาพของสารฟอกฆ่าเชื้อจะมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่ใช้ในการฟอก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารสูงและระยะเวลาฟอกนานเกินไปก็จะไปทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชได้ นอกจากนี้ สภาพของเนื้อเยื่อพืชก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ดังนั้น ควรทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการฟอกเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เพื่อให้สามารถตัดสินใจเลือกความเข้มข้นของสารและระยะเวลาการฟอกที่สามารถลดเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนได้มากที่สุดและทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อน้อยที่สุด

Qin และคณะ (2004) ศึกษาการเพิ่มจำนวนของอิพิคอทิลจากต้นสบู่ดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดโดยการนำเมล็ดมาแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

5 ครั้ง แล้วแกะเปลือกเมล็ดออกมาจุ่มใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง

Datta และคณะ (2007) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำจากข้อของสบู่ดำ ทำการเตรียมต้นแม่พันธุ์โดยการเพาะเมล็ดในห้องที่ปลอดเชื้อ จากนั้นตัดชิ้นส่วนข้อ 2-3 เซนติเมตร จากต้นสบู่ดำที่มีอายุ 7 เดือน มาเก็บในตู้ฆ่าเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนข้อโดยจุ่มชิ้นส่วนข้อลงใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20-25 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง แล้วจึงตัดชิ้นส่วนเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ศึกษาต่อไป

นันท์นภัส (2549) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ ได้แก่ ตาข้าง, ก้านใบ, ใบ และยอดสบู่ดำ ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำยาล้างจานและล้างน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่มี Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำชิ้นส่วนมาตัดแต่งเพื่อนำไปเลี้ยงในสูตรอาหารที่ศึกษาต่อไป

**2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ**

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยกันอย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้พันธุ์สบู่ดำที่ต้องการและในจำนวนมากเพียงพอต่อความต้องการ โดยการใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นสบู่ดำมาทำการเพาะเลี้ยง เช่น ชิ้นส่วนใบ (leaf segment) ก้านใบ (petiole) ลำต้น (stem) ส่วนใต้ใบเลี้ยงหรืออิพิคอทิล (hypocotyl) ส่วนเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ก้านช่อดอก (peduncle) เอ็มบริโอ (embryo) ราก (root) และส่วนข้อ (nodal segment) ซึ่งมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำพอสรุปได้ดังนี้

Qin และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของอิพิคอทิลจากสบู่ดำโดยใช้อาหาร MS ที่เติม Indole-3-butyric acid (IBA) ร่วมกับ 6-benzyladenine (BA) พบว่า การเพาะเลี้ยง อิพิคอทิลในอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.2 - 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยที่อาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของยอดสูงที่สุด สำหรับการเจริญและพัฒนาของยอดที่ได้จากแคลลัสนั้น พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลในสูตรอาหารที่ศึกษา พบว่า อิพิคอทิล จะมีการขยายตัวภายใน 1 สัปดาห์ และจะเกิดแคลลัสภายใน 10 -15 วัน ของการเพาะเลี้ยงโดยอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 – 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.1 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีความสามารถในการเกิดแคลลัสประมาณ 82 - 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

จะไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหาร MS ที่เติม IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร , IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นยอดอย่างต่อเนื่องภายใน 10 วัน ของการเพาะเลี้ยง แต่สูตรที่ดีที่สุดคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ยอดมากที่สุด ยอดจะแข็งแรงและมีความสูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร ภายใน 30 วัน เมื่อยอดสูง 2.5 – 3.5 เซนติเมตร ก็จะนำไปชักนำราก ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์ (มปป.) ศึกษาการนำเนื้อเยื่อตายอด ตาข้าง และเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของต้นสบู่ดำ เช่น ใบอ่อน ก้านใบ และ hypocotyls จากต้นสบู่ดำสายพันธุ์ FBR2-2 และสายพันธุ์ A16, A20 และ A21 มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ และทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมน เช่น kinetin, BA, NAA, 2,4-D, IBA, thidiazuron, putrescine, picloram ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลปรากฏว่าเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของต้นสบู่ดำที่นำมาใช้การทดลอง มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว เนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะมีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ง่าย แคลลัสที่มีลักษณะดีเป็นแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม thidiazuron ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-1 มก.ต่อลิตร เป็นชนิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (embryogenic callus) ซึ่งจะพัฒนาเป็นต้นจำนวนมากต่อไปได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ชิ้นส่วนของใบอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม thidiazuron ความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ proline ความเข้มข้น 300-500 มก.ต่อลิตร หรือ casein hydrolysate ความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากได้โดยไม่ผ่านขบวนการเกิดแคลลัส (direct shoots) ซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้อีกมากมายเมื่อย้ายลงอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อไป

นันท์นภัส (2549) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณหลอดทดลองของสบู่ดำจากชิ้นส่วนที่เกิดจากตาข้าง ก้านใบ และใบของสบู่ดำ โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashing and Skoog (MS) ที่เติม 6-benzyladenine (BA) เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับ Indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดทวีคูณจากชิ้นส่วนยอด ขนาด 0.7 เซนติเมตร ที่เกิดจากตาข้างได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.049 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดเท่ากับ 5.88 ยอด ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ สำหรับการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากชิ้นส่วนก้านใบ ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร ของใบจากข้อที่ 2, 3 และ 4 และจากชิ้นส่วนใย ขนาด 0.5x 0.5 เซนติเมตร จากข้อที่ 2 และ 3 โดยชักนำให้เกิดแคลลัสในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 1 และชักนำการเกิดยอดในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 ซึ่งมีรอบการเพาะเลี้ยงรอบละ 30 วัน พบว่า ความเข้มข้นของสารควบคุมการ

เจริญเติบโตในอาหารสูตร MS ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนก้านใบและใบคือ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยชิ้นส่วนก้านใบและใบจากข้อที่ 2 มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบและชิ้นส่วนใบเท่ากับ 70 และ 83.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เกิดจำนวนยอด 5.4 และ 3.33 ยอด ตามลำดับ สำหรับการชักนำให้เกิดรากจากยอด ขนาด 1.5-2.0 เซนติเมตร ของต้นสบู่ดำที่ปลูกในแปลง สูตรอาหารที่เหมาะสมคือ สูตร basal rooting medium (BRM) ที่ประกอบด้วยอาหารครึ่งสูตรของ MS และ Phloroglucinol (PG) ความเข้มข้น 793 ไมโครโมลาร์ ที่เติม IBA ความเข้มข้น 24.46 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วย้ายลงบนอาหารสูตร BRM ที่ปราศจาก IBA โดยเกิดรากจากยอดหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9-10 วัน โดยให้เปอร์เซ็นต์ยอดที่เกิดราก 80 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 13.40 รากต่อยอดและ 2.13 เซนติเมตร ตามลำดับ

Datta และคณะ (2007) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำโดยใช้ชิ้นส่วนข้อจากต้นสบู่ดำที่มีอายุ 7 เดือน พบว่า จะเกิดยอดได้ดีที่สุดในอาหาร MS ที่เติม BA 22.2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ adenine sulphate 55.6 ไมโครโมลาร์ โดยจะเกิดยอด 6.2±0.56 ยอดต่อข้อ และมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 2.0±0.18 เซนติเมตร ภายใน 4-6 สัปดาห์ อัตราการเกิดยอดจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อย้ายลงสู่อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA 0.5 ไมโครโมลาร์และเติม adenine sulphate 27.8 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยจะพบว่า มีจำนวนยอด 30.8±5.48 ต่อข้อ และมีความยาวเฉลี่ย 4.8±0.43 เซนติเมตร จากนั้นทำการย้ายลงสู่อาหารที่ชักนำราก ซึ่งจากการศึกษาพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1.0 ไมโครโมลาร์ จะเกิดยอด 52 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2-3 สัปดาห์ โดยมีความยาวของราก 8.7±1.35 เซนติเมตร ต้นสบู่ดำที่มีอายุ 12-16 สัปดาห์ก็จะสมบูรณ์พร้อมที่จะลงปลูกในดิน โดยจะมีอัตราการรอด 87 เปอร์เซ็นต์

# อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

## 1. อุปกรณ์และสารเคมี

### 1.1 ตัวอย่างพืช

ชิ้นส่วนใบ ก้านช่อดอกและเมล็ดจากต้นสบู่ดำ (Jatropha curcas L.) จากแปลงทดลองสบู่ดำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ทุ่งใหญ่

### 1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1.2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหาร

- stock solution (MS) (ภาคผนวก)
- stock solution (Miller) (ภาคผนวก)
- ผงวุ้น
- น้ำตาลซูโครส (sucrose)

1.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

- 6- benzyladenine (BA)
- Indole-3-butyric acid (IBA)
- Thidiazuron (TDZ)

1.2.3 สารประกอบอื่นๆ

- Phloroglucinol (PG)

### 1.3 สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ

- คลอรอกซ์ (clorox)
- น้ำยาล้างจาน
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$)

### 1.4 อุปกรณ์

1.4.1 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับใช้ในการเตรียมอาหารและสารฟอกฆ่าเชื้อ

- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า
- pH meter
- เตาไฟฟ้า
- ช้อนตักสารเคมี
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

- ปิเปตขนาดต่างๆ
- จุกยาง
- แท่งแก้ว
- กระบอกตวง
- ขวดใส่อาหารขนาด 4 ออนซ์พร้อมฝาปิด

1.4.2 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับย้ายเนื้อเยื่อ

- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Larmina air flow)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- แผ่นสเตนเลส
- ปากคีบ
- มีดผ่าตัด
- rack
- แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อใบสบู่ดำ

นำใบอ่อนของสบู่ดำจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาล้างด้วยน้ำยาล้างจานและล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาด จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการฟอกที่ศึกษา 4 วิธี คือ

1. จุ่มแอลกอฮอล์ 70 % จากนั้นฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 10 นาที
2. จุ่มแอลกอฮอล์ 70 % จากนั้นฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 15นาที
3. ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 10 นาที
4. ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 15 นาที

นำใบอ่อนสบู่ดำที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงบนสูตรอาหาร MS ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อและการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 35 วัน

### 2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงแผ่นใบสบู่ดำ

นำใบอ่อนของสบู่ดำจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาล้างด้วยน้ำยาล้างจานและล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วฟอกด้วยคลอรอกซ์ (clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 4 ระดับ ดังตารางที่ 1 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 15 วัน เป็นเวลา 60 วัน

ตารางที่ 1. ความเข้มข้นของ TDZ ในอาหารแข็งสูตร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงแผ่นใบสบู่ดำ

| สูตรอาหาร MS | ความเข้มข้นของ TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| 1 | 0 |
| 2 | 0.5 |
| 3 | 1.0 |
| 4 | 1.5 |

**2.3 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกสบู่ดำ**

นำก้านช่อดอกของสบู่ดำจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาล้างด้วยน้ำยาล้างจานและล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วฟอกด้วยคลอรอกซ์ (clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนก้านช่อดอกที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 4 ระดับ ดังตารางที่ 2 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

ตารางที่ 2. ความเข้มข้นของ TDZ ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกสบู่ดำ

| สูตรอาหาร MS | ความเข้มข้นของ TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| 1 | 0 |
| 2 | 0.5 |
| 3 | 1.0 |
| 4 | 1.5 |

**2.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของก้านช่อดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร Miller**

นำก้านช่อดอกของสบู่ดำจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาล้างด้วยน้ำยาล้างจานและล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วฟอกด้วยคลอรอกซ์ (clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นาน 5 นาที และจุ่มในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ความเข้มข้น 20 volume นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนก้านช่อดอกที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงในสูตรอาหาร Miller ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

**2.5 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร MS**

นำก้านช่อดอกของสบู่ดำจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาล้างด้วยน้ำยาล้างจานและล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วฟอกด้วยคลอรอกซ์ (clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นาน 5 นาที และจุ่มในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ความเข้มข้น 20 volume นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนก้านช่อดอกที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 3 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในอสูตราหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกของสบู่ดำ

| สูตรอาหาร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| 1 | 0 | 0.01 |
| 2 | 0 | 0.1 |
| 3 | 0 | 1.0 |
| 4 | 0.5 | 0.01 |
| 5 | 0.5 | 0.1 |
| 6 | 0.5 | 1.0 |
| 7 | 1.0 | 0.01 |
| 8 | 1.0 | 0.1 |
| 9 | 1.0 | 1.0 |

**2.6 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร WPM**

นำก้านช่อดอกของสบู่ดำจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาล้างด้วยน้ำยาล้างจานและล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วฟอกด้วยคลอรอกซ์ (clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นาน 5 นาที และจุ่มในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ความเข้มข้น 20 volume นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนก้านช่อดอกที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 4 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร WPM สำหรับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกของสบู่ดำ

| สูตรอาหาร WPM | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| 1 | 0 | 0.01 |
| 2 | 0 | 0.1 |
| 3 | 0 | 1.0 |
| 4 | 0.5 | 0.01 |
| 5 | 0.5 | 0.1 |
| 6 | 0.5 | 1.0 |
| 7 | 1.0 | 0.01 |
| 8 | 1.0 | 0.1 |
| 9 | 1.0 | 1.0 |

**2.7 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดของสบู่ดำในสูตรอาหาร MS และ WPM**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตกจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที แล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA และ NAA และสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA และ NAA ในความเข้มข้นระดับต่างๆ ดังตารางที่ 5 ทำการบันทึกผลการวันที่เริ่มงอกของปมรากหรือราก , ลักษณะของรากและต้น , ความสูงของต้น ,วันที่เริ่มแตกอิพิคอทิล และจำนวนใบอ่อน ทุกๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

ตารางที่ 5 การเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำในสูตรอาหาร MS และWPM ที่เติม BA และ NAA ระดับต่างๆ

| สูตรอาหาร | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | NAA |
| MS(T1) | 0 | 0 |
| MS(T2) | 0 | 0.1 |
| MS(T3) | 0 | 0.5 |
| MS(T4) | 0 | 1.0 |
| MS(T5) | 0.1 | 0 |
| MS(T6) | 0.5 | 0 |
| MS(T7) | 1.0 | 0 |
| WPM(T8) | 0 | 0 |
| WPM(T9) | 0 | 0.1 |
| WPM(T10) | 0 | 0.5 |
| WPM(T11) | 0 | 1.0 |
| WPM(T12) | 0.1 | 0 |
| WPM(T13) | 0.5 | 0 |
| WPM(T14) | 1.0 | 0 |

**2.8 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในสูตร อาหาร WPM ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตก จากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที แล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตัดเอาส่วนใบอ่อน มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ 9 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 6 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา ของเนื้อเยื่อทุกๆ 15 วัน

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร WPM สำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อน

| สูตรอาหาร WPM | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| T1 | 0 | 0 |
| T2 | 0 | 0.01 |
| T3 | 0 | 0.1 |
| T4 | 0.5 | 0 |
| T5 | 0.5 | 0.01 |
| T6 | 0.5 | 0.1 |
| T7 | 1.0 | 0 |
| T8 | 1.0 | 0.01 |
| T9 | 1.0 | 0.1 |

**2.8 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในสูตรอาหาร MS ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตก จากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที แล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้น ตัดเอาส่วนใบอ่อน มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ 9 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 7 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา ของเนื้อเยื่อทุกๆ 15 วัน

ตารางที่ 7. ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในอาหารแข็งสูตร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อน

| สูตรอาหาร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| T1 | 0 | 0 |
| T2 | 0 | 0.01 |
| T3 | 0 | 0.1 |
| T4 | 0.5 | 0 |
| T5 | 0.5 | 0.01 |
| T6 | 0.5 | 0.1 |
| T7 | 1.0 | 0 |
| T8 | 1.0 | 0.01 |
| T9 | 1.0 | 0.1 |

**2.10 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในสูตรอาหาร MS และ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงรากของสบู่ดำ**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตกจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที แล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตร อาหาร WPM เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตัดเอาส่วนราก มาเพาะเลี้ยงในสูตร อาหาร MS และ WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ 18 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 8 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา ของเนื้อเยื่อทุกๆ 15 วัน

ตารางที่ 8. ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตร อาหาร MS และ WPM สำหรับการเพาะเลี้ยงรากสบู่ดำ

| สูตรอาหาร | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| MS(T1) | 0 | 0 |
| MS(T2) | 0 | 0.01 |
| MS(T3) | 0 | 0.1 |
| MS(T4) | 0.5 | 0 |
| MS(T5) | 0.5 | 0.01 |
| MS(T6) | 0.5 | 0.1 |
| MS(T7) | 1.0 | 0 |
| MS(T8) | 1.0 | 0.01 |
| MS(T9) | 1.0 | 0.1 |
| WPM(T10) | 0 | 0 |
| WPM(T11) | 0 | 0.01 |
| WPM(T12) | 0 | 0.1 |
| WPM(T13) | 0.5 | 0 |
| WPM(T14) | 0.5 | 0.01 |
| WPM(T15) | 0.5 | 0.1 |

ตารางที่ 8. ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในอสูตราหาร MS และ WPM สำหรับการเพาะเลี้ยงรากสปู่ดำ(ต่อ)

| สูตรอาหาร | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| WPM(T16) | 1.0 | 0 |
| WPM(T17) | 1.0 | 0.01 |
| WPM(T18) | 1.0 | 0.1 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

**2.11 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล(ตัด ส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย)**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตกจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตัดเอาส่วนอิพิคอทิล (ตัดส่วนไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ 9 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 9 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา จำนวนยอด จำนวนใบ ลักษณะแคลลัส ทุกๆ 15 วัน

ตารางที่ 9. ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล (ตัดส่วนไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย)

| สูตรอาหาร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| T1 | 0 | 0 |
| T2 | 0 | 0.01 |
| T3 | 0 | 0.1 |
| T4 | 0.5 | 0 |
| T5 | 0.5 | 0.01 |
| T6 | 0.5 | 0.1 |
| T7 | 1.0 | 0 |
| T8 | 1.0 | 0.01 |
| T9 | 1.0 | 0.1 |

**2.12 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงไฮโพคอทิลของสบู่ดำ**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตกจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตัดเอาส่วนไฮโปคอทิล มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ 9 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 10 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา จำนวนยอด จำนวนใบ ลักษณะแคลลัส ทุกๆ 15 วัน

ตารางที่ 10. ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงไฮโพ คอทิล

| สูตรอาหาร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| T1 | 0 | 0 |
| T2 | 0 | 0.01 |
| T3 | 0 | 0.1 |
| T4 | 0.5 | 0 |
| T5 | 0.5 | 0.01 |
| T6 | 0.5 | 0.1 |
| T7 | 1.0 | 0 |
| T8 | 1.0 | 0.01 |
| T9 | 1.0 | 0.1 |

**2.13 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตกจากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตัดเอาส่วนอิพิคอทิล มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 11 ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา จำนวนยอด จำนวนใบ ลักษณะแคลลัส ทุกๆ 15 วัน

ตารางที่ 11. ความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล

| สูตรอาหาร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| T1 | 0.5 | 0 |
| T2 | 0.5 | 0.01 |
| T3 | 0.5 | 0.1 |
| T4 | 1 | 0.01 |
| T5 | 1 | 0.1 |

**2.14 การศึกษาความแตกต่างระหว่างอาหารสูตร MS และ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

นำผลสบู่ดำที่สุกเต็มที่และไม่แตก จากต้นสบู่ดำในแปลงสบู่ดำของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มาแกะเอาเมล็ดออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างด้วยน้ำไหลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการผ่าเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จนเหลือเมล็ดสีขาว ตามด้วยฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตัดเอาส่วนอิพิคอทิล มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และWPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 4 สูตรอาหาร ดังตาราง ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา จำนวนยอด จำนวนใบ ลักษณะแคลลัส ทุกๆ 15 วัน

ตารางที่ 12. ระดับความเข้มข้นของ BA และ IBA ในสูตรอาหาร MS และ WPM สำหรับการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล

| สูตรอาหาร | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | BA | IBA |
| MS(T1) | 0.5 | 0.01 |
| MS(T2) | 0.5 | 0.1 |
| WPM(T3) | 0.5 | 0.01 |
| WPM(T4) | 0.5 | 0.1 |

**2.15 การศึกษาการชักนำรากในสูตร อาหาร MS , 1/2MS และ WPM**

นำต้นสบู่ดำที่ได้เจริญและขยายจำนวนจากส่วนของอิพิคอทิลอายุ 60 วัน โดย ตัดส่วนของลำต้นมาชักนำให้เกิดราก ในอาหารแข็งสูตร MS , 1/2MS และWPM ที่เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร(นันท์นภัส,2549) และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก ความยาวรากและระยะเวลาที่เกิดราก

ตารางที่ 13. การชักนำราก ในสูตรอาหาร MS , 1/2MS และWPM

| สูตรอาหาร | การเติมสาร PG (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ผงถ่าน (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|
| MS(T1) | - | - |
| 1/2MS(T2) | - | - |
| WPM(T3) | - | - |
| MS(T4) | 100 | - |
| 1/2MS(T5) | 100 | - |
| WPM(T6) | 100 | - |
| MS(T7) | - | 2 |
| 1/2MS(T8) | - | 2 |
| WPM(T9) | - | 2 |

**2.16 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IBA และ NAA ต่อการชักนำรากในสูตรอาหาร 1/2MS**

นำต้นสบู่ดำที่ได้เจริญและขยายจำนวนจากส่วนของอิพิคอทิลอายุ 60 วัน โดย ตัดส่วนของลำต้นมาชักนำให้เกิดราก ในสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร(นันท์นภัส,2549)และเติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และNAA โดย เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ก่อนย้ายลงในอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร(นันท์นภัส,2549)และเติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ไม่เติม IBA และ NAA ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก ความยาวราก และระยะเวลาที่เกิดราก

ตารางที่ 14. การชักนำรากในสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม PG100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์

และเติม IBA และ NAA ในระดับต่างๆ

| สูตรอาหาร 1/2MS | ผงถ่าน (เปอร์เซ็นต์) 6 วันก่อนย้าย | ผงถ่าน (เปอร์เซ็นต์) หลังย้าย | IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร) | NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| T1 | 2 | 2 | 2.5 | - |
| T2 | 2 | 2 | 5.0 | - |
| T3 | 2 | 2 | 10.0 | - |
| T4 | - | 2 | 2.5 | - |
| T5 | - | 2 | 5.0 | - |
| T6 | - | 2 | 10.0 | - |
| T7 | - | - | - | 2.5 |
| T8 | - | - | - | 5.0 |
| T9 | - | - | - | 10.0 |

# ผลการทดลอง

**1. การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อใบสบู่ดำ**

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อและลักษณะชิ้นส่วนของการเพาะเลี้ยงใบสบู่ดำ

| วิธีการ | เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ/ลักษณะชิ้นส่วน | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 วัน | 7 วัน | 14 วัน | 21 วัน | 28 วัน | 35 วัน |
| 1. จุ่มแอลกอฮอล์ 70 % ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 15 นาที | 57.71/++++ | 48.74/++++ | 45.94/+++ | 38.40/++ | 31.94/+ | 25.77/- |
| 2. จุ่มแอลกอฮอล์ 70 % ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 10 นาที | 29.27/++++ | 20.63/++++ | 16.26/+++ | 12.93/++ | 9.60/++ | 5.32/+ |
| 3. ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 15 นาที | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. ฟอกคลอร็อคซ์ 10 % 10 นาที | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

หมายเหตุ : ++++ = ชิ้นส่วนมีสีเขียวสด +++ = ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเล็กน้อย
++ = ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลปานกลาง + = ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลมาก
- = ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น

จากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อใบที่เหมาะสมโดยใช้วิธีการฟอก 4 วิธี พบว่า การฟอกโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วฟอกด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน15 นาที เป็นวิธีการฟอกที่ดีที่สุด รองลงมาคือ วิธีที่ 2 จุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฟอกคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อในวันที่ 3 เท่ากับ 57.71 และ 29.27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน วิธีที่ 3 และ 4 ไม่มีการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ชิ้นส่วนไม่ปลอดเชื้อ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ ไปเป็นเวลา 35 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจะค่อยๆ ลดลง โดยชิ้นส่วนที่ฟอกโดยวิธีที่ 1 จะมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อในวันที่ 7, 14, 21 และสุดท้าย 35 วัน เท่ากับ 48.74, 45.94, 38.40 และ 25.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

สำหรับลักษณะของชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อจะมีสีเขียวสดในวันที่ 3 และ 7 แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในสูตรอาหาร MS ไปเป็นเวลา 35 วัน พบว่า ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาลมากขึ้นเรื่อยๆ โดยจะมีสีน้ำตาลปานกลางในวันที่ 21 และ 28 และมีสีน้ำตาลทั้งชิ้นในวันที่ 35 ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่ชิ้นส่วนไม่มีการตอบสนองต่อสูตรอาหาร MS หรือเกิดจากชิ้นส่วนมีความบอบช้ำจากการฆ่าเชื้อ ซึ่งการทดลองของนันท์นภัสและคณะ(2547) ใช้วิธีฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อคซ์ 3 % นาน 15 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ

**2. การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสบู่ดำ**

ตารางที่ 15. การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนใบอ่อนสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นของ TDZ (มก./ล.) | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วน |
|---|---|---|
| 0 | 15 | ชิ้นส่วนใบม้วนเข้าหากัน เริ่มมีจุดน้ำตาลเกิดขึ้น |
| | 30 | ส่วนที่สีเขียวนูนขึ้นเป็นจุดๆ จุดสีน้ำตาลขยายมากขึ้น |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลมากขึ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลคล้ำทั้งชิ้น |
| 0.5 | 15 | ชิ้นส่วนใบม้วนเข้าหากัน สีเขียวปนน้ำตาลเป็นจุดๆ |
| | 30 | ชิ้นส่วนม้วน ส่วนสีเขียวจะนูนขึ้น สีเขียวปนน้ำตาลมากขึ้น |
| | 45 | ชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ |
| | 60 | ชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาล |
| 1.0 | 15 | ชิ้นส่วนใบม้วนเข้าหากันมาก สีเขียวปนน้ำตาลเป็นจุดๆ |
| | 30 | ชิ้นส่วนม้วน ส่วนสีเขียวจะนูนขึ้น ส่วนที่มีสีน้ำตาลขยายมากขึ้น |
| | 45 | สีชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ |
| | 60 | ชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้น |
| 1.5 | 15 | ชิ้นส่วนใบม้วน สีน้ำตาลปนเขียว (น้ำตาลมากกว่าเขียว) |
| | 30 | ส่วนที่สีเขียวจะนูนขึ้นเล็กน้อย และมีสีน้ำตาลมากขึ้น |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล แต่ส่วนสีเขียวยังนูนอยู่ |
| | 60 | ชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |

จากการศึกษา ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ ในสูตรอาหาร MS ที่ใช้เลี้ยงแผ่นใบ พบว่า ชิ้นส่วนใบในทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกัน คือ ในช่วง 5 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนใบจะม้วนเข้าหากันและมีจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้นเล็กน้อย เมื่ออายุ 30 วันชิ้นส่วนจะนูนขึ้น คล้ายจะตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่ขณะเดียวกัน ชิ้นส่วนก็มีสีเขียวปนน้ำตาลมากขึ้น และสุดท้ายเมื่ออายุ 60 วัน ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งอาจมาจากสาเหตุ การฟอกฆ่าเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป

**3. การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thidiazuron (TDZ) ในอาหาร MS (Murashige and Skoog) ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกสบู่ดำ**

ตารางที่ 16. การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติมTDZ ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| ระดับฮอร์โมน (มก./ล.) | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| 0 | 7 | ชิ้นส่วนก้านช่อดอกมีสีน้ำตาลตรงปลายล่างเล็กน้อย ส่วนด้านบนมีสีเขียวปกติ |
| | 14 | ส่วนปลายของชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลมากขึ้น (น้ำตาลมากกว่าเขียว) |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น ตรงกลางมีสีเขียวเพียงเล็กน้อย |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น |
| 0.5 | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียวแต่ตรงปลายมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 14 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นและขยายพื้นที่มากขึ้น (ครึ่งหนึ่งของชิ้นส่วน) |
| | 21 | พื้นที่สีน้ำตาลบนชิ้นส่วนเข้มขึ้นและเพิ่มมากขึ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลจนเกือบทั้งชิ้น |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น |
| 1.0 | 7 | ชิ้นส่วนค่อนข้างมีสีน้ำตาล (ประมาณครึ่งหนึ่งของชิ้นส่วน) |
| | 14 | พื้นที่สีน้ำตาลขยายเพิ่มมากขึ้น ส่วนตรงกลางชิ้นส่วนมีสีเขียวเล็กน้อย |
| | 21 | พื้นที่สีน้ำตาลขยายเพิ่มมากขึ้น ส่วนตรงกลางชิ้นส่วนมีสีเขียวน้อยลง |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลจนเกือบทั้งชิ้น |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น |
| 1.5 | 7 | พื้นที่ส่วนใหญ่ของชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 14 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลจนเกือบทั้งชิ้น |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลทั้งชิ้น |

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ใช้เลี้ยงก้านช่อดอก พบว่า ชิ้นส่วนจะเริ่มมีสีน้ำตาลเล็กน้อยในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และสีน้ำตาลบนชิ้นส่วนจะค่อยๆ เพิ่มขนาดมากขึ้นจนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้นในวันที่ 28 และจะมีสีน้ำตาลทั้งชิ้นในที่สุด

**4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของก้านช่อดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Miller**

ตารางที่ 17. การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Miller

| ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|
| 7 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลที่ส่วนปลายเล็กน้อย |
| 14 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลมากขึ้น (ประมาณครึ่งหนึ่งของชิ้นส่วน) |
| 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นและเพิ่มพื้นที่มากขึ้นจนพื้นที่สีเขียวเหลือน้อยลง |
| 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น ตรงกลางชิ้นส่วนมีสีเขียวเล็กน้อย |
| 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนก้านช่อดอกในอาหารแข็งสูตร Miller ชิ้นส่วนก้านช่อดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงจะมีสีน้ำตาลเล็กน้อยใน 7 วันแรก และในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนจะมีสีเขียว เหลืออยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของชิ้นส่วน จนในวันที่ 28 ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้นและมีสีน้ำตาลทั้งชิ้นในที่สุด

**5. การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในสูตรอาหาร MS**

ตารางที่18. การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| สูตรอาหาร MS | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0 + IBA 0.01 (T1) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว แต่ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 14 | สีน้ำตาลตรงปลายชิ้นส่วนเพิ่มมากขึ้น แต่ตรงกลางชิ้นส่วนมีสีเขียวอยู่ |
| | 21 | สีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น ตรงกลางชิ้นส่วนมีสีเขียวปนน้ำตาล |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| BA 0 + IBA 0.1 (T2) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว แต่ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 14 | สีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แต่น้อยกว่าส่วนสีเขียว |
| | 21 | ชิ้นส่วนค่อนข้างมีสีน้ำตาล |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| BA 0 + IBA 1.0 (T3) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว แต่ส่วนปลายชิ้นส่วนตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 14 | ชิ้นส่วนมีสีเขียวปนน้ำตาล |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| BA 0.5 + IBA 0.01 (T4) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว แต่ส่วนปลายชิ้นส่วนตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 14 | สีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น (ครึ่งหนึ่งของชิ้นส่วน) |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0.5 + IBA 0.1 (T5) | 7 | ตรงรอยตัดของชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล เล็กน้อย แต่ชิ้นส่วนส่วนใหญ่มีสีเขียว |
| | 14 | สีน้ำตาลตรงปลายชิ้นส่วนเพิ่มมากขึ้น จนมากกว่าสีเขียว |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| BA 0.5 + IBA 1.0 (T6) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว แต่บางจุดมีสีน้ำตาลอ่อน |
| | 14 | สีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นจนสีเขียวเหลือน้อย |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| BA 1.0 + IBA 0.01 (T7) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว แต่ส่วนปลายชิ้นส่วนตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 14 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลมากขึ้นและเข้มขึ้น |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| BA 1.0 + IBA 0.1 (T8) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ตรงรอยแผลมีสีเขียวปนน้ำตาล |
| | 14 | ชิ้นส่วนเพิ่มพื้นที่สีน้ำตาลมากขึ้น จนเกือบเท่าครึ่งหนึ่งของชิ้นส่วน |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลมากกว่าสีเขียว |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| BA 1.0 + IBA 1.0 (T9) | 7 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว แต่ส่วนปลายชิ้นส่วนตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 14 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น จนพื้นที่สีเขียวเหลือน้อยลง |
| | 21 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น |
| | 28 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |
| | 35 | ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล |

ชิ้นส่วนก้านช่อดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงใน 9 สูตรอาหาร จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยชิ้นส่วนในทุกสูตรอาหารจะมีสีเขียวแต่ส่วนรอยตัดตรงปลายจะมีสีน้ำตาลเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น และในวันที่ 21 ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาลมากกว่าสีเขียว จนในวันที่ 28 ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาลเกือบทั้งชิ้น และมีสีน้ำตาลแบบไม่มีชีวิตในที่สุด

**6. การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกในอาหารสูตร WPM**

ตารางที่ 19. การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| สูตรอาหาร WPM(มก./ล.) | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0 + IBA 0 (T1) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลมากขึ้น |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำ |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| BA 0+ IBA 0.01 (T2) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำ |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| BA 0+ IBA 0.1 (T3) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำ |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| BA 0.5+ IBA 0 (T4) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดเริ่มมีสีน้ำตาล |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำ |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| BA 0.5+ IBA 0.01 (T5) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนเริ่มมีสีคล้ำ |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |

| สูตรอาหาร WPM | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0.5+ IBA 0.1 (T6) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำซีด |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| BA 1.0+ IBA 0 (T7) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำ |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| BA 1.0+ IBA 0.01 (T8) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำ |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| BA 1.0 + IBA 0.1 (T9) | 15 | ชิ้นส่วนมีสีเขียว ส่วนปลายตรงรอยตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย |
| | 30 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำ |
| | 45 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |
| | 60 | ชิ้นส่วนมีสีคล้ำทั้งชิ้น |

ชิ้นส่วนก้านช่อดอกของสบู่ดำที่เลี้ยงลงในอาหารแข็งสูตร WPM ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 0.01 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรอาหาร จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยชิ้นส่วนในทุกสูตรอาหารจะมีสีเขียวแต่ส่วนรอยตัดตรงปลายจะมีสีน้ำตาลเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน จะมีสีน้ำตาลมากกว่าสีเขียว จนในวันที่ 60 ชิ้นส่วนก้านช่อดอกมีสีคล้ำทั้งหมด แสดงว่าชิ้นส่วนมีการตอบสนองต่อการเจริญเติบโต กับสูตรอาหารที่ใช้น้อยมาก

**7. ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดของสบู่ดำในสูตรอาหาร MS และ WPM**

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA และ NAA ในอาหารแข็งสูตร MS และ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำ พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำ ในทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ เมล็ดสบู่ดำที่เลี้ยงบนสูตรอาหารต่างๆ เริ่มเกิดรากภายใน 3 วัน

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน15 วันในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เมล็ดสบู่ดำมีการเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งความสูงของต้นสบู่ดำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยความสูงของต้นสบู่ดำอยู่ระหว่าง 2.25 – 6.5 ซม. ( ตารางที่ 20.) ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยสบู่ดำที่เลี้ยงในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T14 )ให้ค่าเฉลี่ยความสูงสูงสุดเท่ากับ 6.5 ซม. ต้นสบู่ดำที่เลี้ยงในอาหาร MS และ WPM ที่เติม BA รากจะมีลักษณะที่ยาวแผ่กว้าง ส่วนต้นสบู่ดำที่เลี้ยงในอาหาร MS และ WPM ที่เติม NAA รากจะมีลักษณะอ้วนสั้นกุดและเริ่มมีการแตกของอิพิคอทิล

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 30 วันในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ความสูงของต้นสบู่ดำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยความสูงของต้นสบู่ดำ อยู่ระหว่าง 2.13 – 7.1 ซม. ( ตารางที่ 20. ) ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยสบู่ดำที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร ( T2 )ให้ค่าเฉลี่ย ความสูงสูงสุด เท่ากับ 7.1 ซม.

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน45 วันในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ความสูงของต้นสบู่ดำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยความสูงของต้นสบู่ดำ อยู่ระหว่าง 3 – 7.53 ซม. ( ตารางที่ 20 ) ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยสบู่ดำที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 )ให้ค่าเฉลี่ยความสูงสูงสุด เท่ากับ 7.53 ซม. และเริ่มมีใบอ่อนที่สมบูรณ์ ซึ่งจำนวนใบอ่อนของสบู่ดำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบอ่อนของสบู่ดำอยู่ระหว่าง 0 – 3 ใบ ( ตารางที่ 21 ) ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยสบู่ดำที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T5 )ให้ค่าเฉลี่ย ความสูงสูงสุด เท่ากับ 3 ใบ

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 60 วันในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ความสูงของต้นสบู่ดำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยความสูงของต้นสบู่ดำ อยู่ระหว่าง 6 – 8.03 ซม. ( ตารางที่ 20 ) ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยสบู่ดำที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T6 )ให้ค่าเฉลี่ยความสูงสูงสุดเท่ากับ 8.03 cm. และจำนวนใบอ่อนของสบู่ดำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบอ่อนของสบู่ดำอยู่ระหว่าง 0 – 5 ใบ ( ตารางที่ 21 ) ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยสบู่ดำที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T5 )ให้ค่าเฉลี่ย ความสูงสูงสุด เท่ากับ 5 ใบ

เนื่องจาก การเติมฮอร์โมนในอาหาร MS และWPM ไม่มีผลต่อความแตกต่างในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดสบู่ดำ ดั้งนั้น จึงเลือกใช้สูตรอาหาร WPM ที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน เพราะให้ค่าเฉลี่ย ของใบมากกว่าสูตรอาหาร MS ที่ระยะเวลาสั้นกว่า คือ 45 วัน มาใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 20. ค่าเฉลี่ยความสูงของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดสบู่ดำในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 และ 60 วัน

| สูตรอาหาร | ค่าเฉลี่ยความสูงของสบู่ดำ ( cm ) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 15 | 30 | 45 | 60 |
| T1 ( MS ) | 3.37 | 6.43 | 6.15 | 6.15 |
| T2 ( MS + NAA 0.1 มก./ล. ) | 2.66 | 7.1 | 7.53 | 7.87 |
| T3 ( MS + NAA 0.5 มก./ล.) | 4.33 | 6.5 | 5.25 | 6.0 |
| T4 (MS + NAA 1.0 มก./ล.) | 0 | 2.13 | 4.25 | 4.75 |
| T5 (MS + BA 0.1 มก./ล.) | 2.25 | 5.0 | 6.5 | 6.67 |
| T6 (MS + BA 0.5 มก./ล.) | 3.6 | 7.0 | 7.25 | 8.03 |
| T7 (MS + BA 1.0 มก./ล.) | 3.96 | 5.0 | 5.03 | 5.20 |
| T8 ( WPM ) | 4.5 | 5.03 | 5.03 | 5.7 |
| T9 (WPM + NAA 0.1 มก./ล.) | 4.9 | 5.20 | 5.20 | 6.38 |
| T10 ( WPM + NAA 0.5 มก./ล.) | 3.7 | 5.25 | 5.25 | 7.18 |
| T11 ( WPM + NAA 1.0 มก./ล.) | 3.13 | 4.37 | 4.9 | 5.05 |
| T12 ( WPM + BA 0.1 มก./ล.) | 3.27 | 5.44 | 5.38 | 7.32 |
| T13 ( WPM + BA 0.5 มก./ล.) | 3.25 | 3.0 | 3.0 | 6.1 |
| T14 ( WPM + BA 1.0 มก./ล.) | 6.5 | 6.0 | 6.0 | 8.0 |
| ความแตกต่างทางสถิติ | ns | ns | ns | ns |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ )

ตารางที่ 21. ค่าเฉลี่ยใบอ่อนของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดสบู่ดำในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 45 และ 60 วัน

| สูตรอาหาร | ค่าเฉลี่ยใบอ่อนของสบู่ดำ ( ใบ ) | |
|---|---|---|
| | 45 | 60 |
| T1 ( MS ) | 1.5 | 2.0 |
| T2 ( MS + NAA 0.1 มก./ล. ) | 2.3 | 4.0 |
| T3 ( MS + NAA 0.5 มก./ล. ) | 0 | 0 |
| T4 (MS + NAA 1.0 มก./ล. ) | 0 | 0 |
| T5 (MS + BA 0.1 มก./ล. ) | 3.0 | 5.0 |
| T6 (MS + BA 0.5 มก./ล. ) | 2.5 | 3.3 |
| T7 (MS + BA 1.0 มก./ล. ) | 1.5 | 2.0 |
| T8 ( WPM ) | 2.3 | 2.7 |
| T9 ( WPM + NAA 0.1 มก./ล. ) | 1.8 | 3.0 |
| T10 ( WPM + NAA 0.5 มก./ล. ) | 1.0 | 2.0 |
| T11 ( WPM + NAA 1.0 มก./ล. ) | 1.6 | 2.2 |
| T12 ( WPM + BA 0.1 มก./ล. ) | 1.7 | 3.6 |
| T13 ( WPM + BA 0.5 มก./ล. ) | 0 | 2.0 |
| T14 ( WPM + BA 1.0 มก./ล. ) | 1.0 | 1.0 |
| ความแตกต่างทางสถิติ | ns | ns |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ )

**ภาพที่1.** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดสบู่ดำ ที่อายุ 30 วัน

1 = MS + NAA 0 มก./ล. และ MS + BA 0 มก./ล.

2 = MS + NAA 0.1 มก./ล. 5 =MS + BA 0.1 มก./ล.

3 = MS + NAA 0.5 มก./ล. 6 =MS + BA 0.5 มก./ล.

4 = MS + NAA 1 มก./ล. 7 = MS + BA 1 มก./ล.

**ภาพที่2.** ผลของสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดสบู่ดำ ที่อายุ 30 วัน

1 = WPM + NAA 0 มก./ล. และ WPM + BA 0 มก./ล.

2 = WPM + NAA 0.1 มก./ล. 5 = WPM + BA 0.1 มก./ล.

3 = WPM + NAA 0.5 มก./ล. 6 = WPM + BA 0.5 มก./ล.

4 = WPM + NAA 1.0 มก./ล. 7 = WPM + BA 1.0 มก./ล.

**11. ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในอาหารแข็งสูตร WPM ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ**

ตารางที่ 22. การเปลี่ยนแปลงของใบอ่อนสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0 + IBA 0 (T1) | 15 | ใบเริ่มมวนและเหี่ยวเล็กน้อย |
| | 30 | ใบเริ่มเหี่ยว |
| | 45 | ใบเหี่ยวซีด |
| | 60 | ใบเหี่ยวซีด |
| BA 0 + IBA 0.01 (T2) | 15 | ปลายขอบใบเริ่มเหี่ยวเล็กน้อย |
| | 30 | ปลายขอบใบเริ่มเหี่ยวเล็กน้อย |
| | 45 | ใบเริ่มเหี่ยว |
| | 60 | ใบเหี่ยวซีด |
| BA 0 + IBA 0.1 (T3) | 15 | ก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดปานกลาง |
| | 45 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| BA 0.5 + IBA 0 (T4) | 15 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ |
| | 45 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| BA 0.5 + IBA 0.01 (T5) | 15 | ก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ |
| | 45 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0.5 + IBA 0.1 (T6) | 15 | ใบเหี่ยวซีด |
| | 30 | ใบเหี่ยวซีด |
| | 45 | ใบเหี่ยวซีด |
| | 60 | ใบเหี่ยวซีด |
| BA 1.0 + IBA 0 (T7) | 15 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ |
| | 45 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| BA 1.0 + IBA 0.01 (T8) | 15 | ก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดปานกลาง |
| | 30 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ |
| | 45 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ |
| | 60 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ |
| BA 1.0 + IBA 0.1 (T9) | 15 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ก้านใบและขอบใบตรงรอยตัดเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ |
| | 45 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ |

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแผ่นใบอ่อนใน 9 สูตรอาหารนาน60วัน พบว่า ใบอ่อนที่ตัดส่วนก้านใบและขอบใบบริเวณรอยตัดเกิดแคลลัส ขนาดเล็กถึงปานกลาง ในอาหารสูตร WPM ที่เติม BA 0 ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ),เกิดแคลลัส ขนาดปานกลางถึงใหญ่ในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 0.5 ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T4 ), WPM ที่เติม BA 0.5 ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T5 ), WPM ที่เติม BA 1.0 ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T7), WPM ที่เติม BA 1.0 ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T8) และ WPM ที่เติม BA 1.0 ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T9) ส่วน สูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 0 ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) , WPM ที่เติม BA 0 ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) และ WPM ที่เติม BA 0.5 ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T6 ) ใบเหี่ยวซีด

60 วันหลังจากการเพาะเลี้ยง พบว่า แผ่นใบอ่อนเกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบในอาหารสูตร WPM ที่เติม BA 0 ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ), WPM ที่เติม BA 0.5 ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T4 ), WPM ที่เติม BA 0.5 ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T5 ), WPM ที่เติม BA 1.0 ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T7), WPM ที่เติม BA 1.0 ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T8) และ WPM ที่เติม BA 1.0 ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T9) ส่วนสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 0 ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) , WPM ที่เติม BA 0 ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) และ WPM ที่เติม BA 0.5 ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T6 ) ใบเหี่ยวซีด ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

**T1** **T2** **T3**

**T4** **T5** **T6**

**T7** **T8** **T9**

**ภาพที่3.** ผลของสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการ เจริญเติบโตของใบอ่อนสบู่ดำ ที่อายุ 45 วัน

T1 = BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T2 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T3 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. T4 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.

T5 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล. T6 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

T7 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T8 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T9 = BA 1.0 มก./ล.+ IBA 0.1 มก./ล.

**9.ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในอาหารแข็งสูตร** MS **ต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของสบู่ดำ**

ตารางที่ 23. การเปลี่ยนแปลงของใบอ่อนสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| สูตรอาหาร MS | ระยะเวลา (วัน) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0 + IBA 0 (T1) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและคงมีสีเขียว |
| | 30 | ใบอ่อนไม่เกิดแคลลัสและเริ่มมีสีเหลืองปนสีเขียว |
| | 45 | ใบเหี่ยวเป็นสีน้ำตาลเข้ม และไม่เกิดแคลัส |
| | 60 | ใบเหี่ยวซีดเป็นสีน้ำตาลทั้งใบ |
| | 75 | ใบเหี่ยวซีดเป็นสีน้ำตาลทั้งใบ |
| BA 0 + IBA 0.01 (T2) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสเล็กน้อยตรงขอบใบ ใบเริ่มเกิดสีเหลืองและขอบใบเริ่มห่อม้วนเล็กน้อย |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ มีสีน้ำตาลตรงขอบใบ ขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสไม่เกิดยอดใหม่ |
| | 60 | แคลลัสมีขนาดเท่าเดิม ใบเป็นสีเหลือง |
| | 75 | ใบเหี่ยวซีดเป็นสีน้ำตาลทั้งใบ |
| BA 0 + IBA 0.1 (T3) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสเล็กน้อยตรงขอบใบกับก้านใบ ใบเกิดสีเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ มีสีน้ำตาลบางส่วนและขอบใบเริ่มห่อม้วนเล็กน้อย |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีน้ำตาล ตรงขอบใบขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสไม่เกิดยอดใหม่ |
| | 60 | แคลลัสมีขนาดเท่าเดิม ใบเป็นสีน้ำตาล เหี่ยวซีด |
| | 75 | ใบเหี่ยวซีดเป็นสีน้ำตาลทั้งใบ |

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (สัปดาห์) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 0.5 + IBA 0 (T4) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ และขอบใบเริ่มห่อม้วนเข้าหากัน |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดก้อนแคลลัสขนาดกลางตรงก้านใบติดขอบใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ และขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสไม่เกิดยอดใหม่ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ แต่ไม่เกิดยอดและใหม่ |
| | 75 | แคลลัสมีขนาดเท่าเดิม และไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดและใบ |
| BA 0.5 + IBA 0.01 (T5) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบเริ่มห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสเกิดการแตกหน่อให้ยอดและใบใหม่ |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดก้อนแคลลัสขนาดกลางตรงก้านใบติดขอบใบ ใบปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและเกิดยอดและใบใหม่เพิ่มขึ้น |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบและใบใหม่เริ่มเกิดเป็นสีน้ำตาลตรงขอบใบ |
| | 75 | แคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้น และพัฒนาให้เกิดการแตกหน่อเพิ่มขึ้นทำให้มีใบใหม่เพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว |
| BA 0.5 + IBA 0.1 (T6) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ และขอบใบเริ่มห่อม้วนเข้าหากัน |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดก้อนแคลลัสขนาดกลางตรงก้านใบติดขอบใบ ใบปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสไม่เกิดยอดใหม่ |
| | 60 | ก้อนแคลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ไม่ทั่วทั้งแผ่นใบ ใบที่ห่อม้วนเริ่มเป็นสีน้ำตาล |
| | 75 | แคลลัสไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดและใบใหม่ |
| BA 1.0 + IBA 0 | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (สัปดาห์) | การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อ |
|---|---|---|
| BA 1.0 + IBA 0 (T7) | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบเริ่มห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสเกิดการแตกหน่อให้ยอดและใบใหม่ |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดก้อนแคลลัสขนาดกลางตรงก้านใบติดขอบใบ ใบปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและเกิดยอดและใบใหม่เพิ่มขึ้นแต่ใบใหม่เริ่มเกิดเป็นสีน้ำตาลตรงขอบใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ มีใบใหม่เพิ่มขึ้นแต่ใบใหม่ที่เกิดก่อนเริ่มเหี่ยวมีสีน้ำตาลตรงขอบใบมีบางส่วนเริ่มร่วงหล่น |
| | 75 | แคลัสมีขนาดท่าเดิม มีใบเกิดเพิ่ม แต่ใบที่เกิดก่อนเหี่ยวมีสีน้ำตาลและร่วงหล่น |
| BA 1.0 + IBA 0.01 (T8) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบเริ่มห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสเกิดการแตกหน่อให้ยอดและใบใหม่ |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดก้อนแคลลัสขนาดกลางตรงก้านใบติดขอบใบ ใบปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและเกิดยอดและใบใหม่เพิ่มขึ้นแต่ใบใหม่เริ่มเกิดเป็นสีน้ำตาลตรงขอบใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ มีใบใหม่เพิ่มขึ้นแต่ใบใหม่ที่เกิดก่อนเริ่มเหี่ยวมีสีน้ำตาลตรงขอบใบมีบางส่วนเริ่มร่วงหล่น |
| | 75 | แคลัสมีการพัฒนาให้เกิดการแตกหน่อเพิ่มขึ้นทำให้มีใบใหม่เพิ่มขึ้นอีกแต่ใบที่เกิดก่อนเหี่ยวมีสีน้ำตาลและร่วงหล่น |
| BA 1.0 + IBA 0.1 (T9) | 15 | ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก |
| | 30 | ใบอ่อนเกิดแคลลัสมากขึ้นตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ และขอบใบเริ่มห่อม้วนเข้าหากัน |
| | 45 | ใบอ่อนเกิดก้อนแคลลัสขนาดกลางตรงก้านใบติดขอบใบ ใบปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบห่อม้วนเข้าหากันและเกิดยอดและใบใหม่เพิ่มขึ้นแต่ใบใหม่เริ่มเกิดเป็นสีน้ำตาลตรงขอบใบ |
| | 60 | เกิดแคลลัสทั่วทั้งแผ่นใบ มีใบใหม่เพิ่มขึ้นแต่ใบใหม่ที่เกิดก่อนเริ่มเหี่ยวมีสีน้ำตาลตรงขอบใบ มีบางส่วนเริ่มร่วงหล่น |
| | 75 | แคลัสมีขนาดท่าเดิม มีใบเกิดเพิ่ม แต่ใบที่เกิดก่อนเหี่ยวมีสีน้ำตาลและร่วงหล่น |

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแผ่นใบอ่อนใน สูตรอาหาร MSที่เติม BAและ IBA ความเข้มข้น 9 ระดับ พบว่า การนำใบอ่อนมาเพาะเลี้ยง นาน 15วัน ใบอ่อนขยายตัวและที่รอยตัดตรงก้านใบเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก

การนำใบอ่อนมาเพาะเลี้ยง นาน 30 วัน ใบอ่อนเกิดแคลลัสมาก ตรงขอบใบกับก้านใบ ใบมีสีเขียวอมเหลืองเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบเริ่มห่อม้วนเข้าหากันและตรงแคลลัสเกิดการแตกหน่อให้ยอดและใบใหม่ ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด( ตารางที่ 25) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$ ) โดย สูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01มิลลิกรัมต่อลิตร (T5)และ MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T8) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดจากใบอ่อน 0.75 ยอดและ0.25 ยอด ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรอื่นๆ ไม่มีการเกิดยอด และให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบ ( ตารางที่ 26 ) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดย สูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01มิลลิกรัมต่อลิตร (T5) , MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T7)และ MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T8) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบที่เกิดจากใบอ่อน 0.25 ใบ,1.0 ใบและ0.75 ใบ ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรอื่นๆ ไม่มีการเกิดใบ

การนำใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงนาน45วัน ใบอ่อนเกิดแคลลัสขนาดกลางใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งแผ่นใบ ขอบใบห่อม้วนเข้าหากัน

การเกิดยอดให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด 0.25 -0.75 ยอด (ตารางที่ 25) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดย สูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T7) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุด 0.75 ยอด ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T1), MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T3) , MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T6) และ MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T9) ไม่มีการเกิดยอด และให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบ 2.25-2.75 ใบ ( ตารางที่ 26) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดย สูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01มิลลิกรัมต่อลิตร (T5), MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T7)ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุด 2.75 ใบ ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T1), MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T2), MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T3) , MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T4) ,MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T6) และ MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T9) ไม่มีการเกิดใบ

หลังจากการนำใบอ่อนมาเพาะเลี้ยง นาน60 วัน ใบอ่อนเกิดแคลลัส ทั่วทั้งแผ่นใบ

การเกิดยอดให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด 0.33 -1.0 ยอด ( ตารางที่ 25) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$ ) โดย อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T7) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุด 1.0 ยอด รองลงมา คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T8) ให้ค่าเฉลี่ยยอดจำนวน 0.5 ยอด ส่วนอาหารสูตรอื่นๆ ไม่มีการเกิดยอด และให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบ 2.25-5.33 ใบ ( ตารางที่ 26) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดย อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T7) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุด 5.33 ใบ ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T1), MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T2), MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T3) ,MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T4) และMS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T6) ไม่มีการเกิดใบ

75 วันหลังจากการนำใบอ่อนมาเพาะเลี้ยง ให้ค่าเฉลี่ย จำนวนใบ 2.0- 8.5 ใบ ( ตารางที่ 26) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดย สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T7) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุด 8.5 ใบ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T1), MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T2), MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T3) ,MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T4) และMS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T6) ไม่มีการเกิดใบ

ตารางที่ 24. การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสใบอ่อนสบู่ดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่างๆ

| สูตรอาหาร | ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส (วัน) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| T1 (MS+ BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | - | - | - | × | × |
| T2 (MS+BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | + | + | ++ | ++ | × |
| T3 (MS+BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | - | + | + | + | × |
| T4 (MS+BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | + | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| T5 (MS+BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | + | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| T6 (MS+BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | + | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| T7 (MS+BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ |
| T8 (MS+BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | + | ++ | +++ | ++++ | ++++ |
| T9 (MS+BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | + | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |

หมายเหตุ : × = เนื้อเยื่อคล้ำดำไม่มีชีวิต

- = เนื้อเยื่อไม่เกิดแคลลัส

+ = เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสขนาดเล็ก ( 0.1 - 0.2 ซม. )

++ = เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสขนาดเล็ก ( 0.2 – 0.4 ซม. )

+++ = เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสขนาดปานกลาง ( 0.5 – 0.7 ซม. )

++++ = เนื้อเยื้อเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ ( 0.8 ซม. ขึ้นไป )

ตารางที่ 25. ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด จากใบอ่อนสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารMS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับต่างๆ ที่ อายุ 30 , 45 , 60 และ 75 วัน

| **สูตรอาหาร MS** | **ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดจากใบอ่อนของสบู่ดำ ( ยอด )** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **30** | **45** | **60** | **75** |
| T1 (BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T2 (BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล. ) | 0 | 0.33 | 0 | 0 |
| T3 (BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T4 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. ) | 0 | 0.25 | 0 | 0 |
| T5( BA 0.5 มก./ล.+ IBA0.01 มก./ล. ) | 0.75 | 0.5 | 0 | 0 |
| T6 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T7 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 0 | 0.75 | 1.0 | 0 |
| T8 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0.25 | 0.5 | 0.33 | 0 |
| T9 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ความแตกต่างทางสถิติ | ns | ns | ns | ns |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ )

ตารางที่ 26. ค่าเฉลี่ยจำนวนใบจากใบอ่อนของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ อายุ 30 , 45 , 60 และ 75 วัน

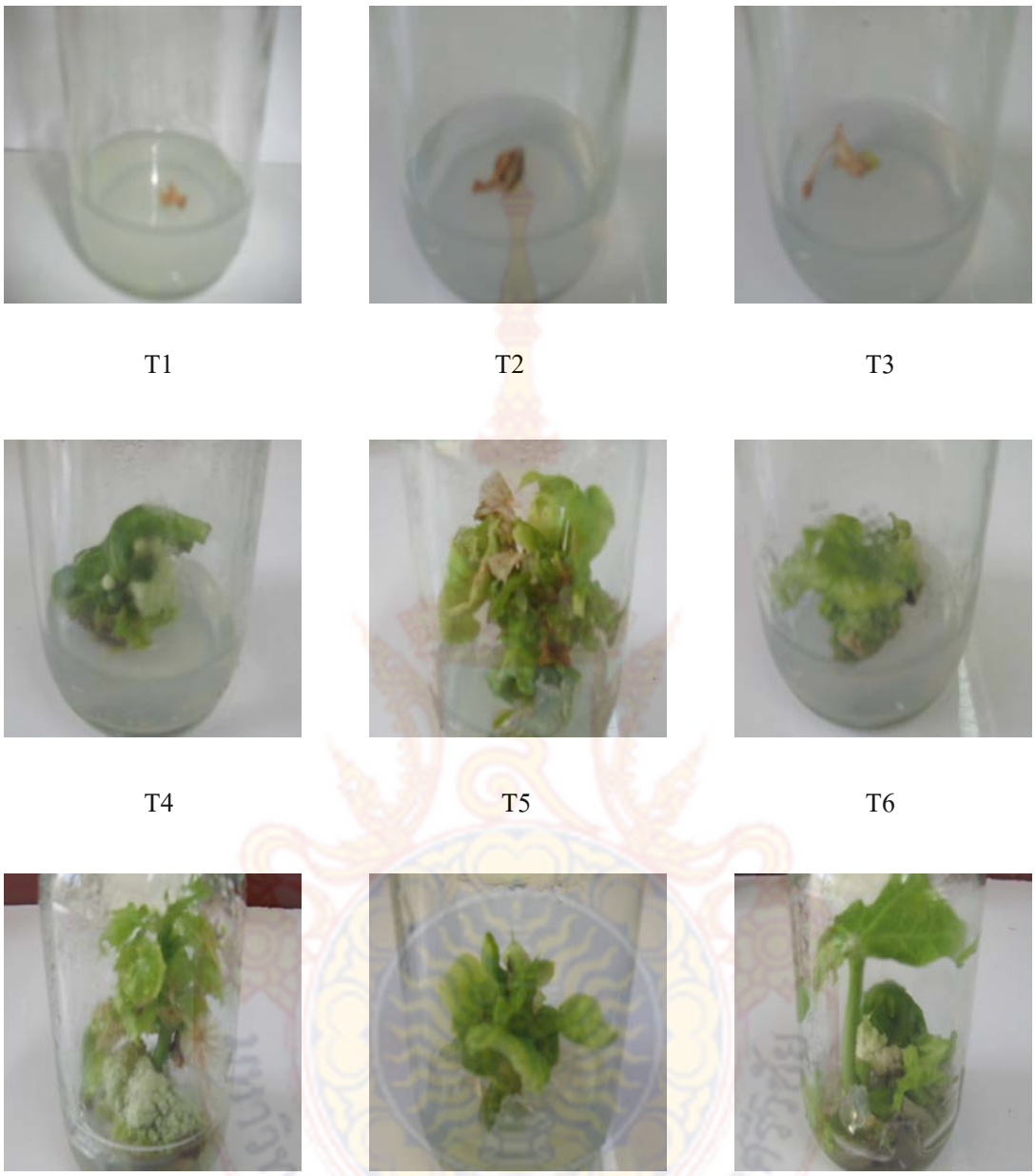
| สูตรอาหาร MS | ค่าเฉลี่ยจำนวนใบจากใบอ่อนของสบู่ดำ ( ใบ ) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 30 | 45 | 60 | 75 |
| T1 (BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T2 (BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T3 (BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T4 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T5( BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล. ) | 0.25 | 2.75 | 2.25 | 6.0 |
| T6 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T7 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. ) | 1.0 | 2.75 | 5.33 | 8.5 |
| T8 (BA 1.0 มก./ล.+ IBA 0.01 มก./ล. ) | 0.75 | 2.25 | 4.67 | 7.3 |
| T9 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 |
| ความแตกต่างทางสถิติ | NS | NS | NS | NS |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( P < 0.05 )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( P >0.05 )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( P > 0.01 )



T1 T2 T3

T4 T5 T6

T7 T8 T9

**ภาพที่ 4.** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนสบู่ดำ ที่อายุ 75 วัน

T1 = BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T2 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T3 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. T4 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.

T5 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01มก./ล. T6 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

T7 = BA 1.0 มก./ล.+ IBA 0 มก./ล. T8 = BA 1.0 มก./ล + IBA 0.01 มก./ล.

T9 = BA 1.0 มก./ล.+ IBA 0.1 มก./ล.

**10. ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ในอาหารแข็งสูตร MS และ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงรากของสบู่ดำ**

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรากสบู่ดำในอาหารแข็งสูตร MS และ WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่า

หลังการเพาะเลี้ยงรากสบู่ดำนาน15 วัน พบว่า รากสบู่ดำมีสีเขียวสด สูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T18 ) เกิดแคลลัสมากที่สุดถึง 40 % ที่บริเวณส่วนปลายราก ส่วนสูตรอาหาร MS ไม่ชักนำให้เกิดแคลลัส ( ตารางที่ 27 )

30 วันหลังทำการเพาะเลี้ยงรากสบู่ดำพบว่า รากสบู่ดำเริ่มเหลืองถึงสีดำเล็กน้อย สูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T18 ) เกิดแคลลัสมากที่สุดถึง 46.7 % ที่บริเวณส่วนปลายรากและบริเวณกลางราก ส่วนสูตรอาหาร MS ไม่ชักนำให้เกิดแคลลัสเลย ( ตารางที่ 27 )

45 วันหลังทำการเพาะเลี้ยงรากสบู่ดำพบว่า รากสบู่ดำเริ่มมีสีดำ สูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T18 ) เกิดแคลลัสมากที่สุดถึง 84.65 % ที่บริเวณส่วนปลายรากและบริเวณกลางราก ส่วนสูตรอาหาร MS ไม่ชักนำให้เกิดแคลลัส ( ตารางที่ 27 )

60 วันหลังทำการเพาะเลี้ยงรากสบู่ดำพบว่า รากสบู่ดำมีสีดำ สูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T18 ) เกิดแคลลัสมากที่สุดถึง 84.65 % ที่บริเวณ ส่วนปลายรากและบริเวณกลางราก ส่วนสูตรอาหาร MS ไม่ชักนำให้เกิดแคลลัส ( ตารางที่ 27 )

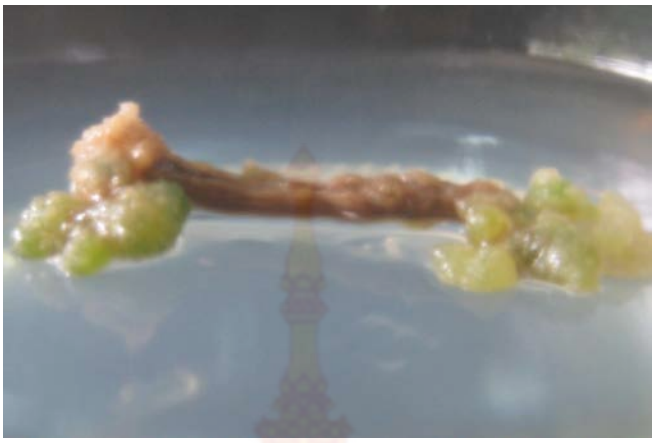
ตารางที่ 27. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

| สูตรอาหาร | ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 15 วัน | 30 วัน | 45 วัน | 60 วัน |
| T1 (MS + BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | +++/0 | -/0 | -/0 | -/0 |
| T2 (MS + BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | +++/0 | -/0 | -/0 | -/0 |
| T3 ( MS + BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | ++++/0 | +++/0 | ++/0 | -/0 |
| T4 ( MS + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | ++++/0 | -/0 | -/0 | -/0 |
| T5 (MS + BA 0.5 มก./ล.+ IBA 0.01 มก./ล.) | ++++/0 | ++/0 | -/0 | -/0 |
| T6 (MS + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | ++++/0 | +++/0 | -/0 | -/0 |
| T7 (MS + BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | ++++/0 | -/0 | -/0 | -/0 |
| T8 (MS + BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01มก./ล.) | ++/0 | ++/0 | -/0 | -/0 |
| T9 (MS + BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | ++++/0 | ++/0 | -/0 | -/0 |
| T10 (WPM + BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | ++++/0 | ++/0 | ++/0 | -/0 |
| T11 (WPM + BA 0 มก./ล.+ IBA0.01มก./ล.) | ++++/0 | ++/0 | -/0 | -/0 |
| T12 ( WPM + BA 0 มก./ล.+ IBA 0.1มก./ล.) | ++++/0 | +++/7.14 | -/0 | -/0 |
| T13 ( WPM + BA 0.5 มก./ล.+ IBA 0 มก./ล.) | ++++/0 | ++/0 | -/0 | -/7.14 |
| T14(WPM + BA0.5 มก./ล.+ IBA0.01มก./ล.) | ++++/6.7 | ++/7.7 | -/7.7 | -/46.15 |
| T15 (WPM + BA 0.5 มก./ล.+ IBA0.1มก./ล.) | ++++/14.3 | ++/21.42 | -/30.8 | -/15.4 |
| T16 (WPM + BA 1.0 มก./ล.+ IB 0 มก./ล.) | ++++/0 | ++/20 | -/6.7 | -/0 |
| T17 (WP + BA 1.0มก./ล.+IBA 0.01มก./ล.) | ++++/0 | ++/20 | -/6.7 | -/0 |
| T18 (WPM + BA 1.0 มก./ล.+ IBA0.1มก./ล.) | ++++/40 | +++/46.7 | ++/84.65 | ++/84.65 |

หมายเหตุ : ++++ = ชิ้นส่วนมีสีเขียวสด +++ = ชิ้นส่วนมีสีเหลืองเล็กน้อย

++ = ชิ้นส่วนมีสีดำเล็กน้อย + = ชิ้นส่วนมีสีดำมาก

- = ชิ้นส่วนมีสีดำทั้งชิ้น



T18

**ภาพที่ 5.** สูตรอาหาร WPM ที่เติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อ การเจริญเติบโตของรากสบู่ดำ ที่อายุ 45 วัน

T18 = WPM + BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

**10. ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) ในสูตรอาหาร MS**

ตารางที่ 28. การให้คะแนนการพัฒนาของแคลลัสและค่าเฉลี่ยจำนวนยอดและใบของอิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย)

| สูตรอาหาร MS | การพัฒนาของแคลลัสและค่าเฉลี่ยการเกิดยอดและใบ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 15 วัน | 30 วัน | 45 วัน | 60 วัน |
| T1 (BA 0 มก./ล.+A 0 มก./ล.) | - / 0 / 0 | - / 1 / 0 | × | × |
| T2 (BA 0 มก./ล. + IBA 0.01มก./ล.) | - / 1 / 0.67 | - / 1 / 1 | - / 1 / 1 | - / 1 / 1 |
| T3 (BA 0 มก./ล.+ IBA 0.1 มก./ล.) | - / 1 / 0.75 | - / 1 / 0.75 | - / 1 / 0.75 | - / 1 / 0.75 |
| T4 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | +++/1/1.6 | +++/1/3.2 | +++/1/4.8 | +++/1/5 |
| T5 (BA 0.5 มก./ล + IBA 0.01มก./ล.) | +++/1/1 | +++/1.33/3.33 | +++/1.33/5 | +++/1.33/5 |
| T6 (BA 0.5 มก./ล.+ IBA 0.1มก./ล.) | +/1/0.67 | +++/1 /1.67 | +++/1 /1.67 | +++/1 /1.4 |
| T7 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | +/1/0 | +++/1/1 | +++/1/1.5 | × |
| T8 (BA 1.0 มก./ล.+IBA 0.01มก./ล.) | +/1/1 | +++/1/1 | +++/1/1 | +++/1/1 |
| T9 (BA 1.0 มก./ล.+ IBA 0.1 มก./ล. ) | +/1/1.5 | +++/1 /1.2 | +++/1 /1.2 | +++/1 /1.2 |

หมายเหตุ : × = เนื้อเยื่อคล้ำดำไม่มีชีวิต
- = เนื้อเยื่อไม่เกิดแคลลัส
++ = เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสขนาดเล็ก ( 0.2 – 0.4 cm. )
+++ = เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสขนาดปานกลาง ( 0.5 – 0.7 cm. )
++++ = เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ ( 0.8 ขึ้นไป )

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนอิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้น0.01- 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60วัน พบว่า การเปลี่ยนแปลงทางลักษณะภายนอกของเนื้อเยื่อ( ตารางที่ 28 )ไม่มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดคือ

15 วัน หลังจากนำอิพิคอทิลมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ต่างกัน ( ตารางที่ 28) อิพิคอทิลเริ่มเกิดแคลลัสขนาดเล็ก และมียอดและใบเล็กๆ ซึ่งค่าเฉลี่ยของยอดเท่ากันคือ 1 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนค่าเฉลี่ยของใบอยู่ระหว่าง 0 – 1.6 ใบ ต่อชิ้นส่วน โดยอิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร( T4 )ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 1.6 ใบ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) , MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T 2 ) และ MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ) ไม่มีเลยการชักนำให้เกิดแคลลัสและมีการเพิ่มจำนวนของยอดและใบที่น้อยมากและไม่มีเลย

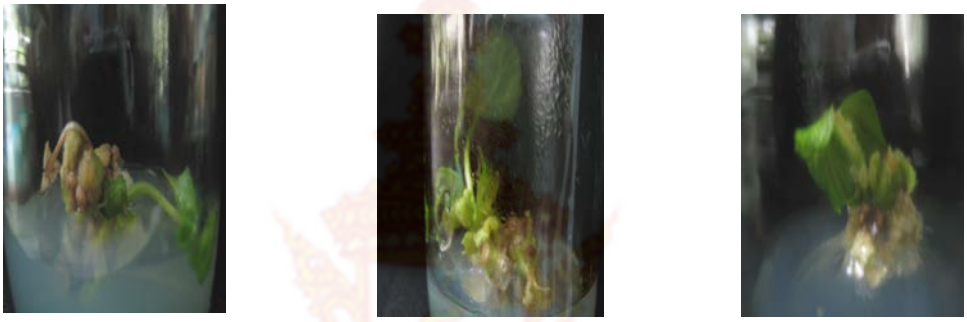
30 วัน หลังจากนำอิพิคอทิลมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ต่างกัน ( ตารางที่ 28 ) พบว่าแคลลัสมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีการเพิ่มจำนวนยอดและใบเพิ่มขึ้น โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอยู่ระหว่าง 1 – 1.33 ยอด โดยอิพิที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T5 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 1.33 ยอด ค่าเฉลี่ยจำนวนของใบอยู่ระหว่าง 0 – 3.33 ใบ โดยโดยอิพิที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T 5 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 3.33 ใบ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) , MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T 2 ) และ MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ) ไม่มีเลยการชักนำให้เกิดแคลลัสและมีการเพิ่มจำนวนของยอดและใบที่น้อยมากและไม่มีเลย

45 วัน หลังจากนำอิพิคอทิลมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ต่างกัน ( ตารางที่ 28 ) พบว่าแคลลัสมีขนาดเท่าเดิม ใบเริ่มมีสีซีดจาง จำนวนของค่าเฉลี่ยของยอดคงที่ อยู่ระหว่าง 1 – 1.33 ยอด โดยอิพิที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T 5 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 1.33 ยอด ค่าเฉลี่ยจำนวนของใบอยู่ระหว่าง 0 – 5 ใบ โดยโดยอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T 5 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 5 ใบ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T 1) , MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T2 ) และ MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA

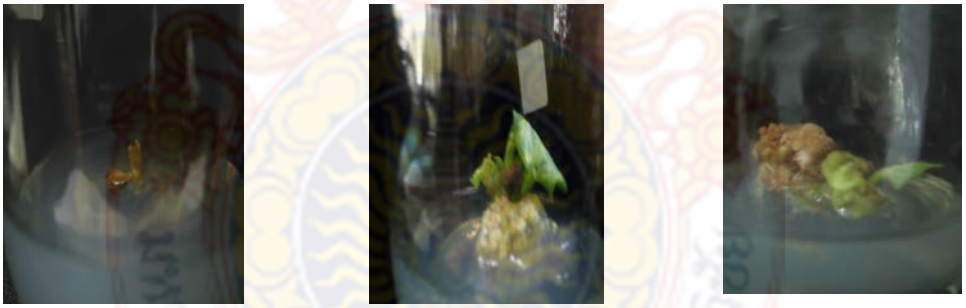
0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ) ไม่มีเลยการชักนำให้เกิดแคลลัสและมีการเพิ่มจำนวนของยอดและใบที่น้อยมากและไม่มีเลย

60 วัน หลังจากนำอิพิคอทิลมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ต่างกัน (ตารางที่ 28 ) พบว่าแคลลัสมีขนาดเท่าเดิม ใบเริ่มมีสีซีดจาง จำนวนของค่าเฉลี่ยของยอดคงที่อยู่ระหว่าง 1 – 1.33 ยอด โดยอิพิคอทิล ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T5 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 1.33 ยอด ค่าเฉลี่ยจำนวนของใบอยู่ระหว่าง 0 – 5 ใบ โดย อิพิที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร(T5 ) ซึ่งไม่แตกต่างกับ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (T4 )ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 5 ใบ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร( T1 ) , MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T 2 ) และ MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ) ไม่มีเลยการชักนำให้เกิดแคลลัสและมีการเพิ่มจำนวนของยอดและใบที่น้อยมาก

T1 T2 T3



T4 T5 T6



T7 T8 T9

**ภาพที่ 6** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของของอิพิคอทิล (ตัดส่วนของไฮโพคอทิลติดมาด้วยเล็กน้อย) ที่อายุ 60 วัน

T1 = BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T2 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T3 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. T4 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.

T5 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01มก./ล. T6 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

T7 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T8 = BA 1.0 มก./ล.+ IBA 0.01 มก./ล.

T9 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

**12. ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BAร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงไฮโพคอทิลของสบู่ดำในสูตรอาหารMS**

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงไฮโพคอทิลของสบู่ดำพบว่าไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 75 วัน ไฮโพคอทิลมีการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นยอดและใบหรือตุ้มสีเขียวคล้ายยอดและใบที่อายุเฉลี่ย 45 วัน

**จำนวนยอดของไฮโปคอทิลของสบู่ดำ**

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 6 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 29 ) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ ) โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 0.625 ไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T8 ) และ MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T7 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 0.625 ยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 8 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 29 ) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 1.857 ยอด ซึ่งค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใกล้เคียงกันโดยไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T8 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 1.857 ยอด เนื่องจากตุ้มสีเขียวคล้ายยอดและใบที่พัฒนาจากแคลลัสได้เจริญเติบโตเป็นยอดอย่างเห็นได้ชัด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 10 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 29 ) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 4.142 ยอด ไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T8 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 4.142 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับโดยไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร +ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T9) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดเท่ากับ 3.5 ยอด ส่วนไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1) ,MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2) และMS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ) ไม่มีการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นยอดและใบ

**จำนวนใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำ**

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุเฉลี่ย 6 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 30 ) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของไฮโพคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 0.875 ใบ ซึ่งค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T8 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 0.875 ใบ

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 8 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 30 ) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของไฮโพคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 1.285 ใบ ซึ่งค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T8 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 1.285 ใบ

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 10 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 30 ) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยไฮโพคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 3.8 ใบ ไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T4 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 3.8 ใบ เนื่องจากยอดมีการพัฒนาไปเป็นใบมากขึ้น ส่วนไฮโพคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1) ,MS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2) และMS ที่เติม BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T3 ) ไม่มีการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นยอดและใบ

ตารางที่ 29. ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 45 , 60 และ 75 วัน

| สูตรอาหาร MS | ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของไฮโพคอทิลของสบู่ดำ (ยอด) | | |
|---|---|---|---|
| | 45 | 60 | 75 |
| T1 ( BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. ) | 0 | 0 | 0 |
| T2 ( BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0 | 0 | 0 |
| T3 ( BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0 | 0 | 0 |
| T4 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 0 | 1.4 | $1.4^{c}$ |
| T5 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0 | 1.166 | $2.66^{b}$ |
| T6 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | $0.125^{b}$ | 0.571 | $0.857^{d}$ |
| T7 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | $0.625^{a}$ | 1.625 | $1.75^{c}$ |
| T8 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | $0.625^{a}$ | 1.857 | $4.142^{a}$ |
| T9 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | 0 | 0.5 | $3.5^{ab}$ |
| ความแตกต่างทางสถิติ | ** | ns | ** |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ )

ตารางที่ 30. ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 45 , 60 และ 75 วัน

| **สูตรอาหาร MS** | **ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำ (ใบ )** | | |
|---|---|---|---|
| | **45** | **60** | **75** |
| T1 (BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 0 | 0 | 0 |
| T2 (BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0 | 0 | 0 |
| T3 ( BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0 | 0 | 0 |
| T4 ( BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 0 | 1.0 | 3.8[a] |
| T5 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0 | 0 | 1.66[c] |
| T6 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0.571 | 0.571 | 0.85[d] |
| T7 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 0.5 | 1.0 | 1.0[c] |
| T8 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0.875 | 1.285 | 2.0[b] |
| T9 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. ) | 0 | 0.5 | 2.5[b] |
| ความแตกต่างทางสถิติ | ns | ns | * |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( P < 0.05 )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( P >0.05 )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( P > 0.01 )

T 1 T2 T3

T4 T5 T6

T7 T8 T9

**ภาพที่ 7** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของไฮโพคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 10 สัปดาห์

T1 = BA 0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T2 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T3 = BA 0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล. T4 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.

T5 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล. T6 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

T7 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T8 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T9 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

**13 การศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอด ( epicotyl ) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 ระดับ และ IBA ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ**

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำพบว่าอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 – 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน พบว่า อิพิคอทิลมีการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นยอดและใบใหม่หรือตุ้มสีเขียวคล้ายยอดและใบที่อายุเฉลี่ย 15-30 วัน

**จำนวนยอดอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 2 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 31 ) มีความแตกต่างทางสถิติ ( P > 0.05 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.2 – 1.2 ยอด โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 ppm ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) และ MS ที่เติม BA 0.5 ppmมิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 1.2 ยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 30 วันหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 31 ) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ( P > 0.05 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.33 – 1.8 ยอด ซึ่งอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 1.8 ยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 45 วันหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 31 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 2 ยอด ซึ่งอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 2 ยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 60 วันหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน( ตารางที่ 31 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 2.09 ยอด โดยอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 )ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 2.0 ยอด ส่วนอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T5) ไม่มีการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นยอดและใบ

**จำนวนใบอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 15 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 32 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.2 – 0.6 ใบ โดยอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 )ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 0.6 ใบ

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 30 วันหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 32 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 )โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 4.2 ใบ ซึ่งอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 4.2 ใบ

ค่าฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 45 วันหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ( ตารางที่ 32 ) ไม่มีความแตกต่างอย่างทางสถิติ ( P < 0.05 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 12 ใบ โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลใกล้เคียงกันซึ่งอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 12 ใบ

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 60 วันหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน( ตารางที่ 32 )ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( P < 0.05 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 18.5 ใบ โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลใกล้เคียงกันซึ่งอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 18.5 ใบ ส่วนอิพิคอทิลที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T5) ไม่มีการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นยอดและใบ

ตารางที่ 31. ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 และ 60 วัน

| สูตรอาหาร MS | ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำ (ยอด) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **15** | **30** | **45** | **60** |
| T1 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 1.2[a] | 1.2[b] | 1.25[b] | 1.25 |
| T2 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 1.2[a] | 1.8[a] | 2.0[a] | 0 |
| T3 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0.2[b] | 0.8[c] | 1.25[b] | 1.0 |
| T4 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0.2[b] | 1.25[ab] | 0 | 0 |
| T5 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0.2[b] | 0.3[c] | 0 | 0 |
| ความแตกต่างทางสถิติ | * | * | ** | ns |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( P < 0.05 )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( P >0.05 )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( P > 0.01 )

ตารางที่ 32. ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 และ 60 วัน

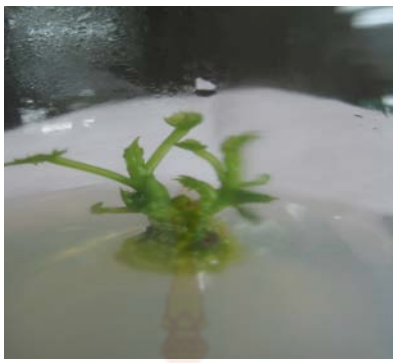
| สูตรอาหาร MS | ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำ (ใบ ) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **15** | **30** | **45** | **60** |
| T1 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล.) | 0.2[c] | 1.4[bc] | 2.75 | 4.5 |
| T2 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0.6[a] | 4.2[a] | 12.0 | 18.5 |
| T3 (BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0.4[b] | 2.6[b] | 4.75 | 10.0 |
| T4 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 0.2[c] | 0.75[c] | 5.5 | 5.0 |
| T5 (BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | 0.4[b] | 0 | 0 | 0 |
| ความแตกต่างทางสถิติ | ** | ** | ns | ns |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( P < 0.05 )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( P >0.05 )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( P > 0.01 )



**T1**

**T2**

**T3**

**T4**

**T5**

**ภาพที่ 8.** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 60 วัน

T1 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0 มก./ล. T2 = BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T3 = BA 0.5 มก./ล.+ IBA 0.1 มก./ล. T4 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T5 = BA 1.0 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

**14. ศึกษาความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร MS และ WPM ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA ร่วมกับ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำพบว่าอิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ IBA ที่ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดและใบได้ดีไม่แตกต่างกัน จากการทดลองที่ 13 เป็นเวลา 75 วัน พบว่า อิพิคอทิล มีการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นยอดและใบใหม่แตกต่างกันดังนี้

**จำนวนยอดจากการเพาะเลี้ยงอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 15 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 33 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( P > 0.05 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 0.58 ยอด โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 0.58 ยอด ส่วน อาหารสูตร WPM ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร(T4) ไม่มีการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 30 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 33 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.36 – 2.63 ยอด โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 2.63 ยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 45 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 31 ) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.82 – 2.37 ยอด โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 2.37 ยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 60 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 31 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( P > 0.05 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.64 – 2.53 ยอด โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 2.53 ยอด

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 75 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 31 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ( P > 0.05 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนยอดอิพิ

คอทิลอยู่ระหว่าง 0.44 – 1.93 ยอด โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T2 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 1.93 ยอด

**จำนวนใบอิพิคอทิลของสบู่ดำ**

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 30 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 34 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0 – 3.06 ใบ โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 3.06 ใบ ส่วน อาหารสูตร WPM ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (T4) ไม่มีการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นใบ

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 45 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 34 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.36 – 5.75 ใบ โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 5.75 ใบ

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 60 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 34 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 0.91 – 9.53 ใบ โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 9.53 ใบ

ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 75 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( ตารางที่ 34 ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( P > 0.01 ) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลอยู่ระหว่าง 1.33 – 13.55 ใบ โดย อิพิคอทิลที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ( T1 ) ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงสุดเท่ากับ 13.55 ใบ

ตารางที่ 33. ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 15 , 30 , 45 , 60 และ 75 วัน

| สูตรอาหาร | ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของอิพิคอทิลของสบู่ดำ (ยอด) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **15** | **30** | **45** | **60** | **75** |
| T1(MS + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | $0.17^{ab}$ | $2.41^{a}$ | $2.18^{a}$ | $1.73^{ab}$ | $1.36^{ab}$ |
| T2(MS + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | $0.58^{a}$ | $2.63^{a}$ | $2.37^{a}$ | $2.53^{a}$ | $1.93^{a}$ |
| T3(WPM+ BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | $0.39^{ab}$ | $1.44^{b}$ | $1.06^{b}$ | $1.25^{b}$ | $0.25^{b}$ |
| T4(WPM+ BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.) | $0^{b}$ | $0.36^{c}$ | $0.82^{b}$ | $0.64^{b}$ | $0.44^{b}$ |
| ความแตกต่างทางสถิติ | * | ** | ** | * | * |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ )

ตารางที่ 34. ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่าง ที่อายุ 30 , 45 , 60 และ 75 วัน

| สูตรอาหาร | ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำ (ใบ ) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **30** | **45** | **60** | **75** |
| T1( MS + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.) | 3.06[a] | 5.75[a] | 9.53[a] | 13.55[a] |
| T2( MS + BA 0.5 มก./ล. +IBA 0.1 มก./ล.) | 2.42[ab] | 5.26[a] | 7.24[ab] | 10.79[a] |
| T3( WPM + BA 0.5 มก./ล. +IBA 0.01 มก./ล.) | 1.06[bc] | 2.13[b] | 3.75[bc] | 4.25[b] |
| T4( WPM + BA 0.5 มก./ล. +IBA 0.1 มก./ล.) | 0[c] | 0.36[b] | 0.91[c] | 1.33[b] |
| ความแตกต่างทางสถิติ | ** | ** | ** | ** |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( P < 0.05 )

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( P >0.05 )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( P > 0.01 )

T1

T2

T3

T4

**ภาพที่ 9** ผลของสูตรอาหาร MS และ WPM ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ต่อการชักนำให้เกิดยอดและใบของอิพิคอทิลของสบู่ดำที่อายุ 60 วัน

T1 = MS + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T2 = MS + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

T3 = WPM + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.01 มก./ล.

T4 = WPM + BA 0.5 มก./ล. + IBA 0.1 มก./ล.

**15.การศึกษาการชักนำรากในอาหารสูตร MS ½ MS และ WPM**

นำต้นสบู่ดำที่ได้เจริญและขยายจำนวนจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ของอิพิคอทิล อายุ 60 วัน ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก ความยาวรากและระยะเวลาที่เกิดราก

หลังจากชักนำรากต้นสบู่ดำเป็นเวลา 30-45 วัน พบว่า มีการเกิดรากในอาหารสูตร ½ MS (T2) , ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) (T5) และ ½ MS ที่เติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ (T8) โดย มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 25-75 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนราก (ตารางที่ 35)ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( P > 0.01 )โดย ค่าเฉลี่ยจำนวนรากอยู่ระหว่าง 0 – 1.0 รากต่อต้น และให้ค่าเฉลี่ยความยาวราก (ตารางที่ 35)ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( P > 0.01 ) โดย ค่าเฉลี่ยความยาวรากรากอยู่ระหว่าง 0 – 4.6 เซนติเมตร ส่วนการทดลองอื่นไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

อาหารสูตร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) (T5) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 75 เปอร์เซ็นต์ เกิดจำนวนรากเฉลี่ย 1 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ย 4.6 เซนติเมตร ส่วน อาหารสูตร ½ MS (T2) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 50 เปอร์เซ็นต์ เกิดจำนวนรากเฉลี่ย 0.5 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ย 2.38 เซนติเมตร และ ½ MS ที่เติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ (T8) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 25 เปอร์เซ็นต์ เกิดจำนวนรากเฉลี่ย 0.5 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ย 2.45 เซนติเมตร

การชักนำรากในอาหารสูตรที่มีการเกิดราก พบว่า ลักษณะของรากที่เกิดขึ้น มีลักษณะเรียวยาว

ตารางที่ 35. เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ค่าเฉลี่ยจำนวนรากและค่าเฉลี่ยความยาวราก จากการชักนำราก ในสูตรอาหารต่างๆ

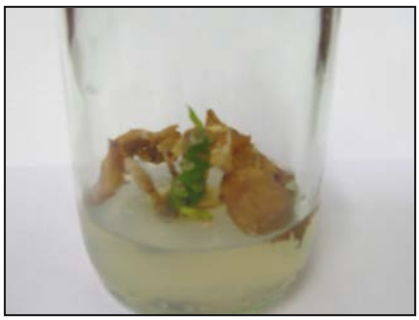
| สูตรอาหาร | เปอร์เซ็นต์การเกิดราก | จำนวนราก เฉลี่ย (ราก/ต้น) | ความยาวราก เฉลี่ย(เซนติเมตร) |
|---|---|---|---|
| MS(T1) | 0 | $0^{b}$ | $0^{b}$ |
| ½ MS(T2) | 50 | $0.5^{ab}$ | $2.38^{ab}$ |
| WPM(T3) | 0 | $0^{b}$ | $0^{b}$ |
| MS+PG 100 มก./ล.(T4) | 0 | $0^{b}$ | $0^{b}$ |
| ½ MS+PG 100 มก./ล. (T5) | 75 | $1.0^{a}$ | $4.6^{a}$ |
| WPM+PG 100 มก./ล. (T6) | 0 | $0^{b}$ | $0^{b}$ |
| MS+ผงถ่าน 2%(T7) | 0 | $0^{b}$ | $0^{b}$ |
| ½ MS+ผงถ่าน 2%( (T8) | 25 | $0.5^{ab}$ | $2.45^{ab}$ |
| WPM+ผงถ่าน 2%( (T9) | 0 | $0^{b}$ | $0^{b}$ |
| ความแตกต่างทางสถิติ | | ** | ** |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

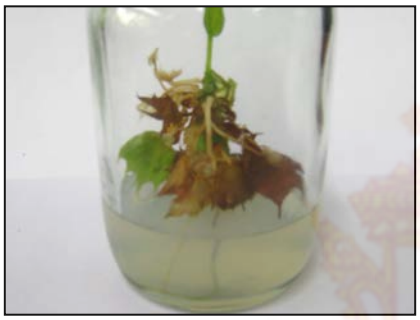
* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ )

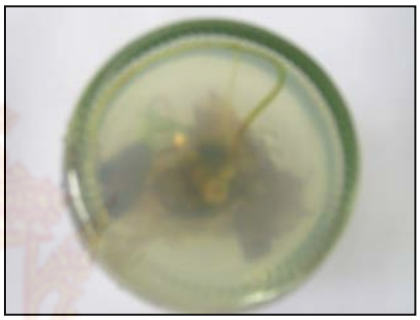


T1(1)

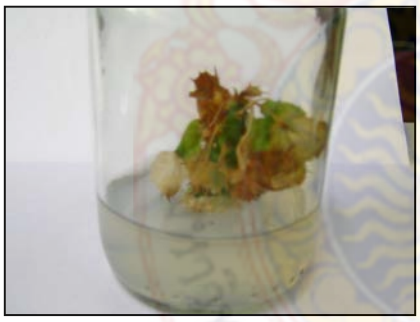
T1(2)



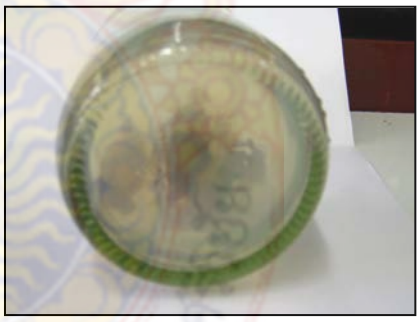
T2(1)



T2(2)



T3(1)



T3(2)

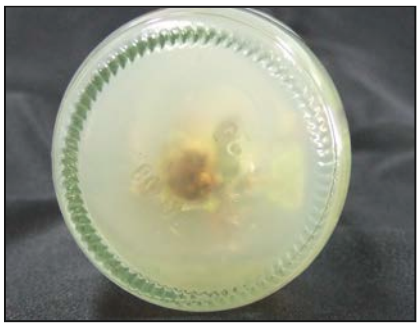
**ภาพที่ 10** การชักนำรากในสูตรอาหาร MS , ½ MS และ WPM

T1 = MS

T2 = ½ MS

T3 = WPM

T4(1)

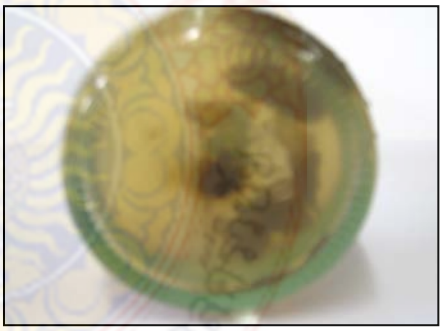


T4(2)

T5(1)

T5(2)

T6(1)



T6(2)

**ภาพที่ 11** การชักนำรากในสูตรอาหาร MS , ½ MS และ WPM ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549)

T4 = MS + PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

T5 = ½ MS + PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

T6 = WPM + PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

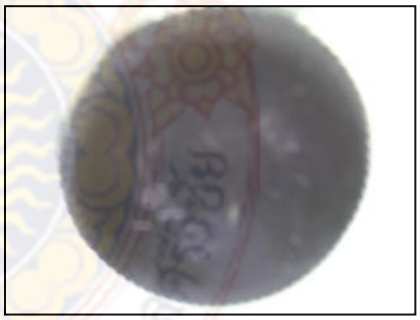
T7(1)

T7(2)

T8(1)

T8(2)

T9(1)



T9(2)

**ภาพที่ 12** การชักนำรากในสูตรอาหาร MS, 1/2MS และ WPM ที่เติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์

T7 = MS + ผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์

T8 = ½ MS + ผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์

T9 = WPM + ผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์

**16.การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IBA และ NAA ต่อการชักนำรากในสูตรอาหาร 1/2MS**

นำต้นสบู่ดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ของอิพิคอทิล อายุ 60 วัน นำมาชักนำราก โดย ทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และ NAA ในระดับ 2.5 , 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 วัน ก่อน แล้วจึงย้ายลงในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) และผงถ่าน 2เปอร์เซ็นต์ ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก ความยาวรากและระยะเวลาที่เกิดราก

หลังจากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร พบว่า เกิดรากในระยะเวลา 30 วัน ซึ่งต้นสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) ร่วมกับ IBA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงย้ายลงในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส ,2549) และเติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ (T4) , ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส ,2549) ร่วมกับ IBA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้วจึงย้ายลงในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) และเติมผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ (T5) , ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) ร่วมกับ NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงย้ายลงในสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) (T7) และ 1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) ร่วมกับ NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้วจึงย้ายลงในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) (T8) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 20-80 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนราก (ตารางที่ 36)ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ )โดยค่าเฉลี่ยจำนวนรากอยู่ระหว่าง 0 - 3.6 รากต่อต้น และให้ค่าเฉลี่ยความยาวราก (ตารางที่ 36)ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ )โดย ค่าเฉลี่ยความยาวรากรากอยู่ระหว่าง 0 – 5.52 เซนติเมตร ส่วนการทดลองอื่นไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

สูตรอาหาร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส,2549) ร่วมกับ NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงย้ายลงในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันท์นภัส ,2549) (T7) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 80 เปอร์เซ็นต์ เกิดจำนวนรากเฉลี่ย 3.6 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ย 5.52 เซนติเมตร

ตารางที่ 36. เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ค่าเฉลี่ยจำนวนรากและค่าเฉลี่ยความยาวราก จากการชักนำราก ในสูตรอาหารต่างๆ

| สูตรอาหาร 1/2MS | การเกิดราก (เปอร์เซ็นต์) | จำนวนราก เฉลี่ย (ราก/ต้น) | ความยาว รากเฉลี่ย( เซนติเมตร) |
|---|---|---|---|
| T1= PG 100 มก./ล.+ผงถ่าน 2 %+IBA 2.5 มก./ล. | 0 | 0 | 0 |
| T2= PG 100 มก./ล.+ผงถ่าน 2 %+IBA 5.0 มก./ล. | 50 | 0 | 0 |
| T3= PG 100 มก./ล.+ผงถ่าน 2 %+IBA 10.0 มก./ล. | 0 | 0 | 0 |
| T4= PG 100 มก./ล.+IBA 2.5 มก./ล. | 0 | 1.0 | 1.26 |
| T5= PG 100 มก./ล.+IBA 5.0 มก./ล. | 75 | 1.0 | 4.76 |
| T6= PG 100 มก./ล.+IBA 10.0 มก./ล. | 0 | 0 | 0 |
| T7= PG 100 มก./ล.+NAA 2.5 มก./ล. | 80 | 3.6 | 5.52 |
| T8= PG 100 มก./ล.+NAA 5.0 มก./ล. | 25 | 1.4 | 3.48 |
| T9= PG 100 มก./ล.+NAA 10.0 มก./ล. | 0 | 0 | 0 |
| ความแตกต่างทางสถิติ | - | **ns** | **ns** |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

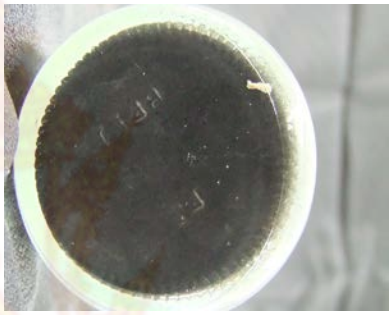
* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P > 0.01$ )

T1(1)

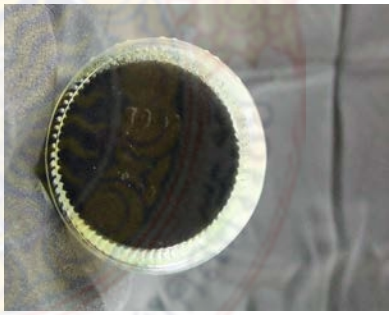
T1(2)

T2(1)



T2(2)

T3(1)



T3(2)

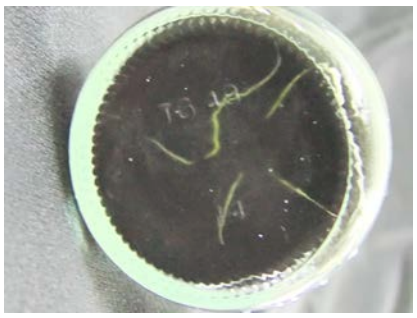
**ภาพที่ 13** การชักนำรากในสูตรอาหาร1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และ NAA

T1= PG 100 มก./ล.+ผงถ่าน 2 %+IBA 2.5 มก./ล.

T2= PG 100 มก./ล.+ผงถ่าน 2 %+IBA 5.0 มก./ล.

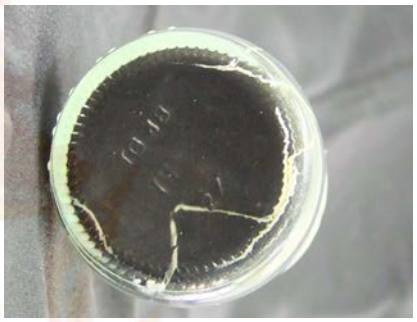
T3= PG 100 มก./ล.+ผงถ่าน 2 %+IBA 10.0 มก./ล.

T4(1)



T4(2)

T5(1)



T5(2)

T6(1)

T6(2)

**ภาพที่ 14** การชักนำรากในสูตรอาหาร1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และ NAA

T4= PG 100 มก./ล.+IBA 2.5 มก./ล.

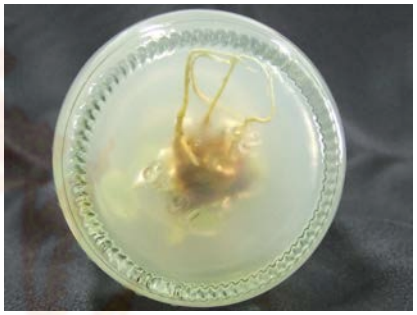
T5= PG 100 มก./ล.+IBA 5.0 มก./ล.

T6= PG 100 มก./ล.+IBA 10.0 มก./ล.

T7(1)

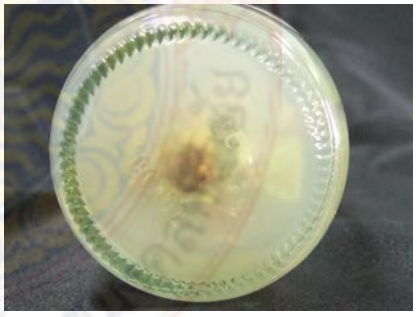
T7(2)

T8(1)



T8(2)

T9(1)



T9(2)

**ภาพที่ 15** การชักนำรากในสูตรอาหาร1/2MS ที่เติมสาร PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA และ NAA

T7= PG 100 มก./ล.+NAA 2.5 มก./ล.

T8= PG 100 มก./ล.+NAA 5.0 มก./ล.

T9= PG 100 มก./ล.+NAA 10.0 มก./ล.

# สรุปผลการทดลอง

**การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำจากแปลงทดลอง**

1. การฟอกฆ่าเชื้อใบสบู่ดำ โดย การจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และฟอกคลอร็อคซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ปลอดเชื้อ 25.77 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื้อเยื่อมีสีน้ำตาล รองลงมาคือ การจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และฟอกคลอร็อคซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ปลอดเชื้อ 5.32 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อมีสีน้ำตาลมากกว่าสีเขียว

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อน ก้านช่อดอก ในสูตรอาหาร MS ,Miller และWPM เนื้อเยื่อมีลักษณะสีคล้ำ ไม่มีการเจริญและพัฒนา

**การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ โดยใช้เนื้อเยื่อจากการเพาะเมล็ด**

1. การเพาะเมล็ดในขวดทดลอง ควรเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร WPM ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มากกว่า การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพราะให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบมากกว่า ที่เวลาเพาะเลี้ยง 45 วัน

2. การชักนำแคลลัสจากใบอ่อน สามารถเจริญและพัฒนาเป็นแคลลัสขนาดกลางถึงใหญ่ในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร,เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร,เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร,เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน

3. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญและพัฒนาเป็นยอดและใบ โดย เกิดยอดเฉลี่ย 1 ยอดและเกิดใบเฉลี่ย 8.5 ใบ

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากราก ในสูตรอาหาร WPM ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ 84.66 เปอร์เซ็นต์

5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไฮโพคอทิล ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญและพัฒนาเป็นยอดและใบ โดย เกิดยอดเฉลี่ย 4.14 ยอดและเกิดใบเฉลี่ย 2.0 ใบ

6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออิพิคอทิล ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญและพัฒนาเป็นยอดและใบ โดย เกิดยอดเฉลี่ย 2.0 ยอดและเกิดใบเฉลี่ย 18.5 ใบ

7. การชักนำราก ในสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน แล้วย้ายลงในสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม PG 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 80 เปอร์เซ็นต์ เกิดจำนวนรากเฉลี่ย 3.6 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ย 5.52 เซนติเมตร

# ข้อเสนอแนะ

1. การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อจากใบ ควรศึกษาลดระดับความเข้มข้นของคลอร็อคซ์ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เวลาควรน้อยกว่า 10 นาที และควรศึกษาการฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

2. การชักนำให้เกิดยอดของสบู่ดำ โดย ใช้เนื้อเยื่อจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด น่าจะมีการศึกษาในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ Adenine sulphate หรือเติม Kinetin ร่วมกับ IBA และเติม Adenine sulphate ความเข้มข้นระดับต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

# เอกสารอ้างอิง


คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ 162 น.

นพมณี โทปุญญานนท์ และคณะ.2545. การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. โรงพิมพ์ iBeam Press studio, กรุงเทพฯ 163 น.

นันท์นภัส เทพสำราญ.2549.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.).สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร.72 หน้า

รงรอง วิเศษสุวรรณ.2542.เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.เอกสารประกอบการฝึกอบรมทาง-วิชาการ งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน,117 หน้า

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ.2541.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ 219 น.

ศิริวรรณ บุรีคำและรุ่งทิพย์ กาวิตา. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ. เข้าถึงได้จาก http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/plant/20_plant/20_plant.html,15 พฤษภาคม 2551

ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดชัยนาท (จักรกลเกษตร).สบู่ดำ.เข้าถึงได้จาก http://sakonnakhon.doae.go.th/muang/htm/soap/soap.htm ,23.05.51

Datta, M. M., Mukherjee, P., Ghosh, B. and Jha, T. B. “In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.)” Current Science 93(2007) : 1438-1442.

Qin, W., Wei-Da, L., Yi, L., Shu-Lin, P., Ying, X., Lin, T., and Fang, C. “Plant Regeneration from Epicotyl Explant of Jatropha curvas.” Journal of Plant Physiology and Molecular Biology 30(2004) : 475-478. อ้างโดย นันท์นภัส,2549

# ภาคผนวก

**ตาราง แสดง การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของอาหารสูตร MS (Murashige&Skook.1962)**

| Stock | สารเคมี | ปริมาณสารในอาหาร 1 ลิตร (มก. / ลิตร) | ความเข้มข้น (เท่า) | ปริมาณสารที่ใช้เป็นสารละลายต้นตอ (มก./ลิตร) | ปริมาณที่ใช้ มิลลิลิตร/ลิตร |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $NH_4NO_3$ | 1,650 | 100 | 165,000 | 10 |
| 2 | $KNO_3$ | 1,900 | 100 | 190,000 | 10 |
| 3 | $H_3BO_3$ | 6.2 | 200 | 1,240 | 5 |
| | $KH_3PO_4$ | 170 | 200 | 34,000 | |
| | KI | 0.83 | 200 | 166 | |
| | $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.25 | 200 | 50 | |
| | $CoCl_2.2H_2O$ | 0.025 | 200 | 5 | |
| 4 | $CaCL_2.2H_2O$ | 440 | 200 | 88,000 | 5 |
| 5 | $MgSO_4.7H_2O$ | 370 | 200 | 74,000 | |
| | $MnSO_4.4H_2O$ | 6.9 | 200 | 1,780 | |
| | $ZnSO_4.7H_2O$ | 6.14 | 200 | 1,228 | |
| | $CuSO_4.7H_2O$ | 0.025 | 200 | 5 | |
| 6 | $Na_2EDTA$ | 37.25 | 200 | 7,450 | 5 |
| | $FeSO_4.7H_2O$ | 27.85 | 200 | 5,570 | |
| 7 | Glycine | 2.0 | 200 | 400 | 5 |
| | Nicotinic acid | 0.5 | 200 | 100 | |
| | Pyridoxine -HCl | 0.5 | 200 | 100 | |
| | Thiamine-HCL | 0.1 | 200 | 20 | |
| | Myo-Inositol | 100 | 200 | 20,000 | |
| | น้ำตาล(Sucrose) | | | | 30 g/l |
| | วุ้น (Agar) | | | | 7 g/l |
| | pH | | | | 5.6 |

**ตาราง แสดง การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของอาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium,1981)**

| Stock | สารเคมี | ปริมาณสารในอาหาร 1 ลิตร (มก. / ลิตร) | ความเข้มข้น (เท่า) | ปริมาณสารที่ใช้เป็นสารละลายต้นตอ (มก./ลิตร) | ปริมาณที่ใช้ มิลลิลิตร/ลิตร |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $NH_4NO_3$ | 20.0 | 100 | 400 | 20 |
| | $Ca(NO_3)_2$ ,4HOH | 27.8 | 100 | 556 | |
| 2 | $K_2SO_4$ | 49.5 | 200 | 990 | 20 |
| 3 | $CaCl_2$ , 2HOH | 19.2 | 200 | 96 | 5 |
| 4 | $KH_3PO_4$ | 34.0 | 200 | 170 | 5 |
| | $H_3BO_3$ | 1.24 | 200 | 6.2 | |
| | $Na_2MoO_4$. $2H_2O$ | 0.05 | 200 | 0.25 | |
| 5 | $MgSO_4.7H_2O$ | 74.0 | 200 | 370 | 5 |
| | $MnSO_4.H_2O$ | 4.46 | 200 | 22.3 | |
| | $ZnSO_4.7H_2O$ | 1.72 | 200 | 8.6 | |
| | $CuSO_4.7H_2O$ | 0.05 | 200 | 0.25 | |
| 6 | $FeSO_4.7H_2O$ | 5.56 | 200 | 27.8 | 5 |
| | $Na_2EDTA$ | 7.46 | 200 | 37.3 | |
| 7 | Thiamine-HCL | 0.2 | 200 | 1.0 | 5 |
| | Nicotinic acid | 0.1 | 200 | 0.5 | |
| | Pyridoxine -HCl | 0.1 | 200 | 0.5 | |
| | Glycine | 0.5 | 200 | 0.2 | |
| 8 | Myo-Inositol | 0.4 | 200 | 100 | 5 |
| | น้ำตาล(Sucrose) | | | | 20 g/l |
| | วุ้น (Agar) | | | | 6 g/l |
| | pH | | | | 5.2 |

**ตาราง แสดง การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของอาหารสูตร Miller**

| Stock | สารเคมี | ปริมาณสารในอาหาร 1 ลิตร (มก./ลิตร) | ความเข้มข้น (เท่า) | ปริมาณสารที่ใช้เป็นสารละลายต้นต่อ (มก./ลิตร) | ปริมาณที่ใช้ (มิลลิลิตร/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $NH_4NO_3$ | 1,000 | 100 | 100,000 | 10 |
| 2 | $KNO_3$ | 1,000 | 100 | 100,000 | 10 |
| 3 | $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ | 347 | 200 | 69,400 | 5 |
| 4 | $KH_2PO_4$ | 300 | 200 | 60,000 | 5 |
| | $H_3BO_3$ | 1.6 | 200 | 320 | |
| | KI | 0.8 | 200 | 160 | |
| 5 | $MgSO_4.7H_2O$ | 35 | 200 | 7000 | 5 |
| | $MnSO_4.4H_2O$ | 4.4 | 200 | 880 | |
| | $ZnSO_4.7H_2O$ | 1.5 | 200 | 300 | |
| 6 | Na-Fe EDTA | 32 | 200 | 6,400 | 5 |
| 7 | Nicotinic acid | 0.5 | 200 | 100 | 5 |
| | Pyridoxine- HCl | 0.5 | 200 | 100 | |
| | Thiamine-HCl | 0.1 | 200 | 20 | |
| 8 | KCl | 65 | 200 | 13000 | 5 |
| | น้ำตาล(Sucrose) | | | | 30 g/l |
| | วุ้น (Agar) | | | | 7 g/l |
| | pH | | | | 6.0 |