



การประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง  
(*Nepenthes mirabilis*) ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง  
โดยใช้เทคนิคโมเลกุล และสัณฐานวิทยา  
Genetic Stability Evaluation of Micropropagation in  
*Nepenthes mirabilis* by Molecular Technique  
and Morphological Characteristics

จันทร์เพ็ญ ใจซื่อ  
Chanpen Jaisue

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology  
Prince of Songkla University

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง  
(*Nepenthes mirabilis*) ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง  
โดยใช้เทคนิคโมเลกุล และลักษณะวิทยา  
Genetic Stability Evaluation of Micropropagation in  
*Nepenthes mirabilis* by Molecular Technique  
and Morphological Characteristics

จันทร์เพ็ญ ใจซื่อ

Chanpen Jaisue

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology  
Prince of Songkla University

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes mirabilis*) ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคโมเลกุล และสัณฐานวิทยา

**ชื่อผู้เขียน** นางสาวจันทร์เพ็ญ ใจชื่อ

**สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

**คณะกรรมการสอบ**

.....

.....ประธานกรรมการ

(ดร.เยาวพรรณ สนธิกุล)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพล จิตินากุล)

.....กรรมการ

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม**

(ดร.เยาวพรรณ สนธิกุล)

.....

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้างู่งสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.เยาวพรรณ สนธิกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นางสาวจันทร์เพ็ญ ใจชื่อ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวจันทร์เพ็ญ ใจชื่อ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง ( <i>Nepenthes mirabilis</i> ) ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคโมเลกุล และสัณฐานวิทยา
ชื่อผู้เขียน	นางสาวจันทร์เพ็ญ ใจชื่อ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
ปีการศึกษา	2562

### บทคัดย่อ

หม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* เป็นพืชกินแมลง ที่มีการพัฒนาของใบเป็นหม้อที่สวยงาม จึงมีการนำออกมาจากป่าเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้หม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติมีจำนวนลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอีกวิธีการที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วหรือการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน อาจส่งผลต่อการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม งานวิจัยนี้จึงประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน 3 รุ่น ด้วยเทคนิค อาร์เอฟดี ไอเอสเอสอาร์ และ เอสเอสอาร์ จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 16 ไพรเมอร์ พบ 3 ไพรเมอร์ แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในรุ่นที่ 2 และ 3 การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 15 ไพรเมอร์ พบ 4 ไพรเมอร์ แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุกรุ่น ส่วนการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ไพรเมอร์ พบ 4 ไพรเมอร์ แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุกรุ่น ยืนยันความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ตรวจพบโดยเครื่องหมายโมเลกุลด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ต้นอ่อนมีความแตกต่างของลักษณะใบ และ ปากใบ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นแม่ แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคทางโมเลกุลร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ชักนำได้ในสภาพปลอดเชื้อ

คำสำคัญ: ไอเอสเอสอาร์ อาร์เอฟดี เอสเอสอาร์ การฟอกฆ่าเชื้อ

**Thesis Title** Genetic Stability Evaluation of Micropropagation in *Nepenthes mirabilis* by Molecular Technique and Morphological Characteristics  
**Author** Miss Chanpen Jaisue  
**Major Program** Agricultural Science and Technology  
**Academic Year** 2019

### Abstract

*Nepenthes mirabilis* is dioecious carnivorous plants, which has evolved beautiful pitcher. It has been taken from the forest resulted in a lost of a large number. Therefore, propagation for conservation is nesesary. Plant tissue culture is a proper way for mass propagation. However, the rapid multiplication or long-term cultures may affect for somaclonal variation induction. Thus, this research was aimed to assessment of somaclonal variation among micropropagation of *N. mirabilis* in three regenerations by using RAPD, ISSR and SSR technique. The result revealed that 3 out of 16 RAPD primers screening showed distinctly different banding DNA patterns in 2 and 3 regenerations. In the case of ISSR, 4 out of 15 primers screening showed different banding DNA patterns in all regenerations. Similarity to SSR marker that 4 out of 5 SSR primers screening, revealed distinctly different banding DNA patterns in all regenerations. The result of molecular marker was confirmed with morphological characteristics that showed their differences among somaclones on leave and stomata characteristics compared with mother plant. The present study demonstrates molecular techniques together with morphological characteristics are an efficient tool for the assessment of somaclonal variation of *in vitro* plants.

**Keywords:** ISSR, RAPD, SSR, Sterilization

## กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ดร.เยาวพรรณ สนธิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย การศึกษาข้อมูล เก็บรวบรวมข้อมูล การเขียนงานวิจัย การจัดทำรูปแบบนำเสนอผลงาน รูปแบบการเขียนรูปเล่มรายงาน ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหา ด้วยความเอาใจใส่ ทำให้การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพล ฐิติธนากุล และ ดร.สรายุทธ อ่อนสนิท ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย และ รองศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำ ตรวจสอบเนื้อหา และแก้ไขงานวิจัยให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ศูนย์วิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ ครุภัณฑ์ สารเคมี หอบรรณสารสนเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสืบค้นข้อมูล ส่งผลให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจทุกครั้งที่เกิดปัญหาในการดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ คุณประโยชน์ใดๆ อันพึงเกิดจากงานวิจัย ฉบับนี้ขอเป็นเครื่องบูชา พระคุณบิดา มารดา และคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตลอดมา

จันทร์เพ็ญ ใจชื่อ

27 กรกฎาคม 2563



## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ (Introduction)	1
บทที่ 2 วิธีการวิจัย (Research Methodology)	29
2.1 วิธีดำเนินการ (Method)	29
2.2 วัสดุและอุปกรณ์ (Material and Equipment)	43
บทที่ 3 ผลการวิจัย (Result)	45
บทที่ 4 บทวิจารณ์ (Discussion)	105
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusion)	110
บรรณานุกรม	112
ภาคผนวก	122
ประวัติผู้เขียน	126

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ	30
2	วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ	31
3	วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ	32
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	36
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	38
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์	40
7	เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์	46
8	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS	48
9	จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS	49
10	เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์	51
11	เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	54
12	ความเข้มข้นและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific)	62
13	การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 14 ไพรเมอร์ แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่าง	66

### รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ จำนวน 15 ไพรเมอร์ แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่าง	72
15	การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่าง	78
16	ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล	84
17	ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล	85
18	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	90
19	ความหนาแน่นปากใบ และขนาดปากใบ ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	98
20	ค่าความเขียวใบของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	103

## รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การกระจายพันธุ์ของหม้อข้าวหม้อแกงลิง <i>N. mirabilis</i> (Lour.) Druce var. <i>mirabilis</i> ในประเทศไทย	3
2	ลักษณะของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง <i>N. mirabilis</i>	5
3	ส่วนประกอบภายในหม้อของหม้อข้าวหม้อแกงลิง	6
4	พัฒนาการของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เป็นเวลาต่างๆ	47
5	ลักษณะขึ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เป็นเวลาต่างๆ	52
6	การเจริญเติบโตขึ้นส่วนข้อหม้อข้าวหม้อแกงลิงสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เป็นเวลาต่างๆ	55
7	ลักษณะยอดของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เป็นเวลาต่างๆ	56
8	การเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์	57
9	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	67
10	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	68
11	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	69
12	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	70
13	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	73
14	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	74

### รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	75
16	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	76
17	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	79
18	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	80
19	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	81
20	รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	82
21	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม	88
22	ลักษณะทางสรีรวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม	89
23	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 1	92
24	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 2	93
25	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 3	94
26	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 4	95

## บทที่ 1

### บทนำ (Introduction)

#### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes spp.*) เป็นพืชกินแมลงที่มีการเจริญเติบโตในบริเวณที่ขาดธาตุอาหาร จึงมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างใบเป็นหม้อกับดักแมลง (pitcher) เพื่อเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารจากแมลงที่ตายภายในกับดัก แล้วลำเลียงธาตุอาหารไปเลี้ยงยังส่วนต่างๆ เพื่อการเจริญเติบโต หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีการสร้างหม้อที่มีลักษณะโดดเด่น และสีอันสวยงาม ทำให้ได้รับความสนใจจากตลาดไม้ประดับทั่วโลก หม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติจึงถูกนำออกจากพื้นที่ป่ามาจำหน่าย และปรับปรุงพันธุ์ให้มีความหลากหลายมากขึ้น อีกทั้งพื้นที่ยังถูกทำลายไปเป็นพื้นที่อยู่อาศัยและทำการเกษตร ส่งผลให้หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีจำนวนลดลงอย่างมาก และพบได้น้อยในพื้นที่ป่าเฉพาะถิ่น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีที่จะต้องขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงให้ได้จำนวนมากเพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการ

การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีหลายวิธี เช่น การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด การปักชำ การแยกหน่อ การตอนกิ่งในอากาศ การตอนกิ่งแบบฝังกิ่ง และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดมีข้อจำกัดในการผสมเกสร เนื่องจากเกสรเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน อายุในการบานของดอกไม้พร้อมกัน ทำให้มีการผสมพันธุ์ติดเมล็ดยากและมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ ส่วนการปักชำ การแยกหน่อ การตอนกิ่งในอากาศ และ การตอนกิ่งแบบฝังกิ่ง เป็นการขยายพันธุ์ที่ใช้ระยะเวลาและได้ต้นพืชจำนวนน้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากอย่างรวดเร็ว โดยมีการนำมาใช้ในการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงหลายสายพันธุ์ เช่น *N. albomarginata* (Sukanto *et al.*, 2011) *N. mirabilis* (Jala, 2012) และ *N. ampullaria* (Sweat and Bodri, 2014)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมาก แต่ยังคงพบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนพืช ซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การปนเปื้อนจึง

เป็นปัญหาในการนำต้นพืชจากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในพืชบางชนิด เช่น หม้อข้าวหม้อแกงลิง การทำให้ปราศจากจุลินทรีย์เป็นอุปสรรคอย่างมาก เนื่องจากหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* มีการเจริญเติบโตตามแหล่งน้ำขังทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ อีกทั้งลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ทำให้ยากต่อการฟอกฆ่าเชื้อ จึงมีการนำสารเคมีมาช่วยในการฟอกฆ่าเชื้ออย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามสารเคมีแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพและคุณลักษณะต่างกัน จึงต้องมีการทดสอบเพื่อให้สามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช

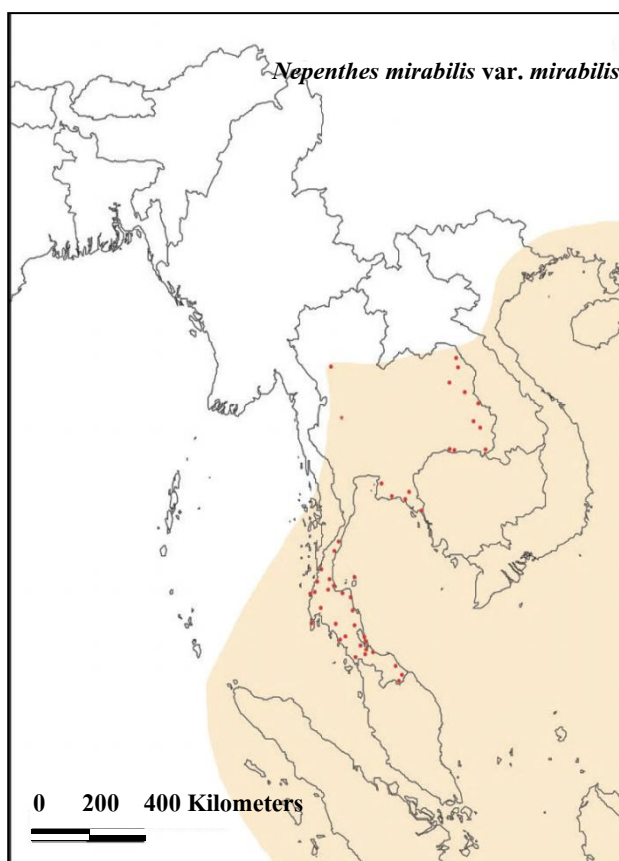
แม้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากและระยะเวลารวดเร็ว แต่อาจชักนำเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการเพาะเลี้ยงเซลล์ สามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การเพิ่มจำนวนโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม การเพิ่มและการลดจำนวนของยีน โดยความแปรปรวนทางพันธุกรรมสามารถเกิดได้ทั้งในยีนเด่นและยีนด้อย ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แหล่งของเนื้อเยื่อ จีโนมไทป์ของต้นพ่อแม่ สภาพแวดล้อมระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหาร และการคัดเลือกต้นในสภาพปลอดเชื้อที่แสดงออกหรือไม่แสดงออกถึงความผิดปกติมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีรายงานการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ยางพารา (ยุภาภรณ์ และ สมปอง, 2556; วุฒิชัย และ สมปอง 2558) ปาล์มน้ำมัน (อัญชลี และ สมปอง, 2555; วราภรณ์ และ สมปอง, 2556) ชิง (Rout *et al.*, 1998) กล้วย (Lakshmanan *et al.*, 2007) ชิงเฮา (Khan *et al.*, 2013) บัวหิมะ (Viehmanna, 2013) ตะไคร้หอม (Dey *et al.*, 2015) และหม้อข้าวหม้อแกงลิง (Devi *et al.*, 2013; 2014) ความแปรปรวนทางพันธุกรรมจึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากลักษณะที่เกิดขึ้นเป็นแบบสุ่มและไม่สามารถควบคุมลักษณะการเกิดได้ ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นจึงอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนมไทป์ ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบชั่วคราว แบบถาวร หรือระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ การยืนยันความเสถียรทางพันธุกรรมกับต้นพ่อแม่จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง จึงจำเป็นต้องมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอขณะที่ต้นพืชมีขนาดเล็กได้

การศึกษาในครั้งนี้จึงประเมินความเสถียรภาพทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เพื่อให้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงต่อไป

## 1.2 การตรวจเอกสาร (Review of Literature)

### 1.2.1 หม้อข้าวหม้อแกงลิง

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes* spp.) มีชื่อสามัญว่า tropical pitcher plant หรือ monkey cup จัดอยู่ในวงศ์ Nepenthaceae เป็นพืชกินแมลงที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีการกระจายพันธุ์ไปไกลทางตะวันออกเฉียงถึงทวีปออสเตรเลีย ส่วนทางตะวันตกมีการกระจายพันธุ์ไปไกลถึงเกาะมาดากัสการ์ (พัชญ์สิตา และคณะ, 2554) ในประเทศไทยพบกระจายพันธุ์ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือค่อนข้างน้อย ในขณะที่พบการกระจายพันธุ์จำนวนมากในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงใต้ (สายสุดใจ และคณะ, 2559) โดยหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* (Lour.) Druce var. *mirabilis* พบการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยและพบมากที่สุดบริเวณภาคใต้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การกระจายพันธุ์ของหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* (Lour.) Druce var. *mirabilis* ในประเทศไทย

ที่มา : สายสุดใจ และคณะ (2559)



หม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. mirabilis* (Lour.) Druce var. *mirabilis* มีชื่อท้องถิ่นว่า กระบองน้ำนายพราน หม้อข้าวหม้อแกงลิง หรือเขนงนายพราน มีลักษณะเป็นไม้เถาขนาดเล็ก มีลำต้นสูง 1.0-6.0 เมตร (ภาพที่ 2ก) บริเวณผิวของยอดและเถาอ่อน มีขนสีขาวยาว 1.0-3.0 มิลลิเมตร เถาแก่มีสีเขียวหรือสีแดงอมม่วงเข้ม ลักษณะของผิวเกลี้ยง ไม่มีขน มีต่อมขนาดเล็กสีแดงเข้มกระจายทั่วทั้งต้น และมีส่วนของตาข้างอยู่บริเวณก้านใบติดกับลำต้น (ภาพที่ 2ข) เมื่อต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงเจริญเติบโตเต็มที่ จะเริ่มออกดอกบริเวณปลายยอด

ลักษณะดอกเป็นดอกแยกเพศอยู่ต่างต้นกัน (dioecious) ช่อดอกเป็นช่อกระจุก (raceme) หรือช่อแยกแขนง (panicle) สำหรับช่อดอกเพศผู้มีขนาดใหญ่ และมีจำนวนดอกมากกว่าช่อดอกเพศเมีย อับเรณูอยู่ส่วนปลาย เมื่อพร้อมผสมพันธุ์จะแตกออก ภายในมีละอองเรณูสีเหลือง (ภาพที่ 2ค) ส่วนช่อดอกเพศเมีย ยอดเกสรเพศเมียอยู่บนรังไข่ (ภาพที่ 2ง) เมื่อดอกเพศเมียได้รับการผสมเกสรแล้วจะพัฒนาจนมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นฝักรูปรีเรียวยาว ฝักแก่มีสีน้ำตาล ซึ่งเมื่อแก่จัดจะแตกออกเป็น 4 พู ภายในมีเมล็ดเล็กๆ คล้ายเส้นด้ายประมาณ 50-500 เมล็ด (พัชญ์สิตา และคณะ, 2554; เกียรติชัย และคณะ, 2557)

ลักษณะของใบ มีปลายใบแหลมหรือมน ขอบใบเรียบเป็นคลื่นเล็กน้อย มีขนขนาดเล็กบริเวณผิวใบ เส้นใบมี 2 ลักษณะ เป็นเส้นใบแนวยาวและเส้นใบย่อย เส้นใบแนวยาวจะเป็นเส้นตรงตามแนวจากโคนใบไปยังปลายใบ ส่วนเส้นใบย่อยจะมีลักษณะเป็นโครงตาข่ายเส้นใบมีการกระจายไปหลายทิศทาง (สุวรรณ, 2552; เอี่ยมพร, 2554) (ภาพที่ 2จ) เส้นกลางใบมีลักษณะนูนเป็นสันแข็งใต้ท้องใบ และยืดยาวออกเป็นสาย เรียกว่า มือพัน (tendril) หรือ สายดึง ส่วนของปลายสายดึงมีลักษณะเป็นตุ่มแบนที่จะพัฒนาไปเป็นหม้อ (ภาพที่ 2ฉ) สามารถแบ่งได้ 2 ลักษณะตามอายุของพืช ได้แก่

หม้อล่าง (lower pitcher หรือ terrestrial pitcher) เกิดบริเวณปลายใบที่อยู่ใกล้กับพื้นดินมีทั้งทรงกลมและทรงกระบอก มักมีสีส้มหรือลวดลายสวยงามสะดุดตาไว้ล่อเหยื่อ ส่วนใหญ่ปากหม้อหันเข้าหาสายดึง (ภาพที่ 2ช)

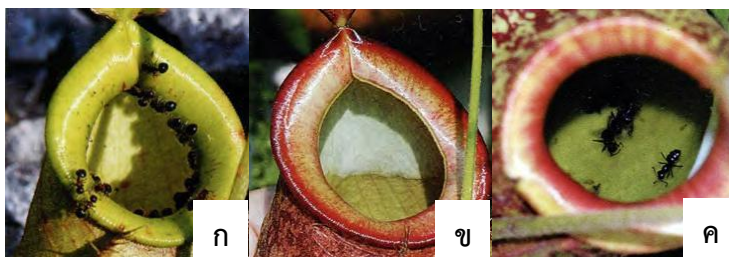
หม้อบน (upper pitcher หรือ aerial pitcher) เกิดเมื่อพืชเติบโตขึ้นจนเป็นเถาเลื้อยยาว สายดึงจะม้วนเป็นมือเกาะเพื่อหาหลักยึดพยุงลำต้น ส่วนหม้อยึดออกเป็นรูปกรวยก้นแหลม ปากหม้อหันออกจากสายดึง และมักเปลี่ยนเป็นสีเขียวเรียบๆ (ภาพที่ 2ซ)



ภาพที่ 2 ลักษณะของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis*

(ก) ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติ (ข) ลำต้น (ค) ช่อดอกตัวผู้ (ง) ช่อดอกตัวเมีย  
(จ) ใบ (ฉ) สายดึง (ช) หม้อล่าง (ซ) หม้อบน

ส่วนของหม้อ เมื่อหม้อมีการเจริญเติบโตเต็มที่ฝักจะเปิดออก ส่วนหน้าของหม้อล่างมีปีก (wing หรือ ladder) สองอันเป็นชายครุยช่วยให้แมลงไต่ขึ้นไปยังปากหม้อได้สะดวก ส่วนของปากหม้อ (peristome หรือ lip) มีผิวเรียบลื่นเป็นมันหรือเป็นซีฟีน มักมีสีส้มและลวดลายสวยงาม ทำให้เหยื่อตกลงไปในหม้อได้ง่าย (ภาพที่ 3ก) ด้านในเคลือบด้วยขี้ผึ้ง (waxy zone) อยู่บริเวณปากลงไปประมาณหนึ่งในสามของหม้อ ทำให้เหยื่อไม่สามารถปีนกลับขึ้นมาได้ (ภาพที่ 3ข) ส่วนล่อเหยื่อ (attractive zone) ภายในมีต่อมน้ำหวานล่อเหยื่อจำพวกมด และมีส่วนที่ย่อยซากเหยื่อ (digestive zone) บริเวณก้นหม้อเป็นส่วนที่อยู่ลึกที่สุดมีต่อมเล็กๆ ทำหน้าที่ผลิตน้ำย่อยตั้งแต่อ่อนฝักเปิด มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนๆ สามารถย่อยสลายซากเหยื่อ เพื่อดูดซึมธาตุอาหาร (ภาพที่ 3ค)



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบภายในหม้อของหม้อข้าวหม้อแกงลิง

(ก) ส่วนล่อเหยื่อ (ข) ส่วนที่เคลือบขี้ผึ้ง (ค) ส่วนย่อยซากเหยื่อ

ที่มา: พิชญ์สิตา และคณะ (2554)

หม้อข้าวหม้อแกงลิงแต่ละชนิดจะมีวิธีการล่อเหยื่อให้มาติดกับดักด้วยวิธีต่างกัน เช่น สร้างน้ำหวานจากต่อมที่อยู่บริเวณถัดจากขอบของปากกับดักทางด้านในหรืออาจจะผลิตกลิ่นของแมลงตัวเมียเพื่อล่อแมลงตัวผู้ให้มาผสมพันธุ์ หรือมีการสร้างกับดักที่มีสีส้มสะดุดตา ด้วยสาเหตุนี้หม้อข้าวหม้อแกงลิงจึงมีการผลิตหม้อที่มีลักษณะสวยงาม ทำให้ได้รับความสนใจจากตลาดไม้ประดับทั่วโลก หม้อข้าวหม้อแกงลิงจึงถูกนำออกจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ ส่งผลให้หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีจำนวนลดลงอย่างมาก (Chaveerach *et al.*, 2006) สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ หรือ ไอยูซีเอ็น (International Union for Conservation of Nature: IUCN) ของประเทศไทย กำหนดให้หม้อข้าวหม้อแกงลิงเป็นพืชที่ถูกคุกคามทำให้ประชากรลดน้อยลงจนอยู่ในขั้นที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ ปัจจุบันหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* ในธรรมชาติได้สูญพันธุ์ไปจากถิ่นเดิมในหลายพื้นที่ เนื่องจากเป็นพืชที่พบได้ง่าย เมื่อเทียบกับหม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิดอื่นๆ ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และทนทานต่อสภาพอากาศที่ร้อนหรือแห้งแล้งได้ดี (สายสุดใจ และคณะ, 2559) หม้อข้าวหม้อแกงลิงจึงถูกจัดให้อยู่ในบัญชีที่ 2 ของอนุสัญญาไซเตสที่สามารถส่งออกนอกประเทศได้ ไม่ว่าจะเพาะขยายพันธุ์ในเรือนเพาะชำ หรือมาจากถิ่นอาศัยธรรมชาติ แต่ต้องไม่ผิดกฎหมายภายในประเทศ สำหรับประเทศที่ส่งออกต้องมีหนังสือรับรองว่าไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการดำรงชีวิตในแหล่งธรรมชาติ ยกเว้น *N. khasiana* และ *N. rajah* ซึ่งอยู่ในบัญชีที่ 1 ชนิดพันธุ์ที่ได้มาจากถิ่นอาศัยตามธรรมชาติและใกล้จะสูญพันธุ์ ห้ามทำการค้าขายโดยเด็ดขาด ยกเว้นการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือนำเข้าส่งออกเพื่อการศึกษาวิจัย การนำเข้าส่งออกจะต้องได้รับอนุญาตจากประเทศผู้นำเข้าก่อน

ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงให้ได้จำนวนมากเพื่อการอนุรักษ์ หม้อข้าวหม้อแกงลิงสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด การปักชำ การแยกหน่อ การตอนกิ่งในอากาศ การตอนกิ่งแบบฝังกิ่ง และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Pietropaolo and Pietropaolo, 1986) อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์ในธรรมชาติมีข้อจำกัดเนื่องจากการขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศมีปัญหาในการผสมเกสร เพราะช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียเกิดขึ้นต่างต้นกัน ทำให้มีการผสมพันธุ์ติดเมล็ดได้ยาก และเมล็ดที่ได้มักจะเป็นหมัน ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ ส่วนการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศด้วยการปักชำ และการฝังราก ใช้ระยะเวลานานและได้ต้นจำนวนน้อย ในขณะที่การขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากอย่างรวดเร็วในระยะเวลาค่อนข้างสั้น (Sukamto *et al.*, 2011)

### 1.2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการขยายพันธุ์พืชที่สามารถนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นส่วนของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ เช่น ปลายยอด ตาข้าง ก้านช่อดอก ใบ ก้านใบ ลำต้น อับละอองเกสร และ เมล็ด เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อที่มีการควบคุมธาตุอาหารและสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และ แสง ทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ (Thorpe, 2007) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีความสำคัญในการสร้างพืชต้นใหม่ที่มีลักษณะดีเหมือนต้นแม่ทุกประการ โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะอาศัยหลักการโททิโพเทนซี (totipotency) ของเซลล์พืช คือ เซลล์หนึ่งเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ อวัยวะ และต้นสมบูรณ์ได้ ซึ่งต้นที่เจริญเติบโตจากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นต้นที่มีจีโนมไทป์ตรงตามพันธุกรรม เนื่องจากมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยงนำไปสู่การเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนต้นพืช โดยมีการควบคุมธาตุอาหาร กรด-ต่าง อุณหภูมิ และความชื้น เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีการนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง ทั้งด้านงานวิจัย ด้านอุตสาหกรรม การผลิตพืชปลอดเชื้อ และการผลิตพืชสร้างสารทุติยภูมิ นอกจากนี้ยังใช้กับพืชที่ใกล้จะสูญพันธุ์จากการถูกรบกวนและพืชสายพันธุ์หายาก เพื่อรักษาพันธุกรรม เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้อย่างทวีคูณ ใช้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นหนึ่งชิ้นสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้หลายพันต้นในระยะเวลาค่อนข้างสั้น โดยไม่ต้องคำนึงถึงฤดูกาล และสภาพแวดล้อม

ทั้งนี้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีส่วนประกอบของ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน สารอินทรีย์อื่นๆ สารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งคาร์บอน และ สารทำเจลสำหรับอาหารแข็ง สูตรอาหารมาตรฐานที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น MS (Murashige and

Skoog, 1962) GB5 (Gamborg's B5 Basal Medium with Minimal Organics 1968) และ VW (Vacin and Went, 1949) เป็นต้น อาหารแต่ละสูตรจะมีชนิดและปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน ส่วนการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ การแบ่งเซลล์และการขยายเซลล์ นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตยังเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ ได้แก่ ออกซิน ไซโทไคนิน และ จิบเบอเรลลิน หากระดับของไซโทไคนินสูงกว่าระดับออกซินจะมีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดต้น ในทางตรงข้ามหากระดับออกซินสูงกว่าระดับไซโทไคนินจะมีผลในการชักนำให้เกิดราก กลุ่มของไซโตไคนินที่นิยมใช้คือ 6-benzylaminopurine (BAP) และ 6-furfurylaminopurine (kinetin) เป็นต้น ส่วนกลุ่มของออกซิน เช่น Indole-3-acetic acid (IAA) Indole-3-bcetic acid (IBA) และ Naphthaleneacetic acid (NAA) นอกจากนี้สารอินทรีย์จากธรรมชาติที่ได้มาจากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ กลัวยมันฝรั่ง และ สารสกัดจากยีสต์ สามารถช่วยส่งเสริมให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ รวมถึงชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเลือกชิ้นส่วนพืชมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ขึ้นอยู่กับอายุของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น ปลายยอด ตาข้าง และ ใบอ่อน เป็นต้น การเลือกชนิดของเนื้อเยื่อควรเลือกให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เพื่อการขยายพันธุ์ ควรใช้เนื้อเยื่อที่มีลักษณะปกติ ได้แก่ ส่วนตา ใบ ยอด ลำต้น และเพื่อการผลิตพืชปลอดโรค ควรใช้เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย ขนาด 0.1-0.2 มิลลิเมตร (รังสฤษดิ์, 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคโนโลยีการผลิตที่สามารถนำมาประยุกต์ประโยชน์ทางการเกษตรได้หลายประการ มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เช่น รายงานของ Rahman และคณะ (2013) ที่ขยายพันธุ์กล้วยด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP KN และ 2iP (N6-(2-Isopentenyl) adenine) ที่ความเข้มข้น 1.0-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะ 4 สัปดาห์ เมื่อเพิ่มปริมาณยอด พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดสูงสุด 95.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.9 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสูงสุด 4.9 เซนติเมตร จากนั้นเมื่อนำมาชักนำยอดบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดรากสูงสุด 96.00 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาของ Patel และ Patel (2015) ที่ขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนข้อมาชักนำแคลัสบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA BAP KN และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ที่ความเข้มข้น 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลัสสูงสุด 93.33 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อนำมาชักนำยอดบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP NAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดสูงสุด 87.50 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้รายงานของ Dinesh และคณะ (2015) ที่ขยายพันธุ์อ้อยด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำแคลัสสูงสุด 90.00 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อนำมาชักนำยอดด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP KN และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 13.4 ยอดต่อชิ้นส่วน

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งของเทคโนโลยีด้านการเกษตรที่มีความสำคัญในการขยายพันธุ์พืชได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณมากในเชิงพาณิชย์ และการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช

### 1.2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่มีการนำมาใช้ในการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิงหลายสายพันธุ์ เช่น จากรายงานของ Chua (1999) ได้ขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. macfarlanei* โดยการพอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยสารฟอกขาวคลอรีนซ์ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ½ MS GB5 ½ GB5 NN SH VW และ AS พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงบนอาหารสูตร ½ MS มีจำนวนยอดสูงสุด 1.0-3.0 ยอดต่อชิ้นส่วน มีการรอดชีวิต 25-75 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sani *et al.* (2000) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. mirabilis* บนอาหารสูตร ½ MS ที่พอกฆ่าเมล็ดด้วยสารฟอกขาวคลอรีนซ์ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา

3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS พบว่า เมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงมีการปนเปื้อน 12.5-48.4 เปอร์เซ็นต์ และมีการงอก 0-66.0 เปอร์เซ็นต์

Jala (2012) พบว่า การนำปลายยอดของหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. mirabilis* มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนออกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยคลอรีนออกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที แล้วตัดชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 1.0 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ่อนหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสูงสุด 1.3 เซนติเมตร โดยมีจำนวนใบ ความกว้างใบ และความยาวใบเฉลี่ยต่อต้นสูงสุด

อัจฉรา (2558) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิด *N. lowii* Hook.f. ในหลอดทดลอง โดยนำยอดอ่อนปลอดเชื้อขนาด 1.0 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP เข้มข้น 0-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่า ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. lowii* เกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 34 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายใน 32 สัปดาห์

Sukanto และคณะ (2011) นำยอดอ่อนหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. albomarginata* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ พิโคลอแรมความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงปลายยอดหม้อข้าวหม้อแกงลิงบนอาหารสูตร ½MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสูงสุด 4.08 มิลลิเมตร การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีจำนวนใบสูงสุด 5.58 ใบต่อชิ้นส่วน การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีจำนวนยอดสูงสุด 1.58 ยอดต่อชิ้นส่วน และจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัสสูงสุด 41.67 เปอร์เซ็นต์

Siriwardana และคณะ (2013) ขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาล้างน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 5 สูตร คือ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร ½MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อาหารสูตร ½MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA<sub>3</sub> ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่ไม่มีการเติมธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงบนอาหารแข็งที่ไม่มีการเติมธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการงอกสูงสุด 87.23 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA<sub>3</sub> (Gibberellic Acid) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอก 60 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร ½MS มีการงอก 41.03 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอก 19.51 เปอร์เซ็นต์ และบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการงอก 10 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีจำนวนมาก แต่พบว่าการปนเปื้อนจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชให้ปราศจากจุลินทรีย์จึงเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในการขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

#### 1.2.4 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัญหาสำคัญในการขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการปนเปื้อนมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ทั้งจากลักษณะสัณฐานของชิ้นส่วนพืช แหล่งที่อาศัยของพืช และจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในต้นพืช (endophytic) นอกจากนี้หากห้องปฏิบัติการหรือเครื่องมือในห้องปฏิบัติการไม่ปลอดเชื้อ อาจทำให้ชิ้นส่วนพืชกลับมาปนเปื้อนได้ (Webster *et al.*, 2003) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนพืชเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตาย หรือมีการเจริญเติบโตช้า (Oyebanji *et al.*, 2009) การปนเปื้อนจึงเป็นปัญหาในการนำต้นพืชจากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Odutayo *et al.*, 2007)

เพื่อให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นจึงมีการนำสารฟอกฆ่าเชื้อ (sterilizing agent) มาใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนให้ปราศจากจุลินทรีย์ โดยสารเคมีที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) เอทานอล (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)



ซิลเวอร์ไนเตรท ( $\text{AgNO}_3$ ) เมอร์คิวริกคลอไรด์ ( $\text{HgCl}_2$ ) และ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ( $\text{NaOCl}$ ) มีคุณสมบัติเป็นสารฟอกขาว (จักรกริช และคณะ, 2554)

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยไปทำให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (peroxidation) ของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ เสียไป ซึ่งไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะมีผลกับแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีผลกับเชื้อรา โดยจะทำให้เกิด oxidizing effect ภายในเซลล์ และจะไปทำลายโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนภายในเซลล์

เอทานอล เป็นทั้งสารระงับเชื้อและฆ่าเชื้อ มีการออกฤทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนและละลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเร็วประมาณ 1-2 นาที สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่เอทานอลมีการระเหยซ้ำทำให้เนื้อเยื่อพืชแห้ง ความเข้มข้นที่นิยมใช้ คือ 70.0 เปอร์เซ็นต์ เพราะมีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยที่สุดที่จะได้ผลดีที่สุดและมีปริมาณน้ำที่พอเหมาะสม ช่วยให้แอลกอฮอล์แทรกซึมได้ดีและระเหยซ้ำไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช

ซิลเวอร์ไนเตรท เป็นสารประกอบประเภทอนินทรีย์ เมื่อนำมาละลายน้ำจะได้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถเข้าทำลายได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังสามารถหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อรา และยีสต์ได้อีกด้วย โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท จะตกตะกอนสารโปรตีนของแบคทีเรีย ทำให้วงจรการดำรงชีวิตของแบคทีเรียถูกยับยั้งจนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แบคทีเรียจึงหยุดกระจายพันธุ์และตายในที่สุด ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 5-30 นาที จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดี

เมอร์คิวริกคลอไรด์ มีผลต่อโปรตีนในเซลล์ โดยสารเคมีจะไปจับกับโปรตีนแล้วทำให้โปรตีนแข็งตัว หรือทำให้เอนไซม์หมดฤทธิ์ไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมหยุดชะงัก หรือขบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติ ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 2-10 นาที จะมีประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อที่ดีพอควร (Elbasheer and Osman, 2017)

โซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นสารประกอบประเภทเกลือ โดยเมื่อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ละลายน้ำจะมีคุณสมบัติเป็นสารฟอกขาว (Bleach หรือ Liquid bleach) และมีการปลดปล่อยสารคลอรีนที่เป็นสารฆ่าเชื้อ โซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นสารเคมีที่ใช้อย่างแพร่หลาย มีคุณสมบัติต่างๆ เหมือนกับคลอรีนแต่ใช้ง่ายกว่า การออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจากการละลายน้ำทำให้เกิดกรดไฮโปคลอรัส (Hypochlorous acid-HOCl) ที่เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ หรืออาจเกิดการออกซิไดซ์ โดยการใส่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 11 จะส่งผล

ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้หลายชนิด ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.25-2.63 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 5-30 นาที จะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีมาก (ยิ่งลักษณ์, 2555)

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหม้อข้าวหม้อแกงลิงให้ปราศจากจุลินทรีย์เป็นอุปสรรคอย่างมาก เนื่องจากหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* มีการเจริญเติบโตตามแหล่งน้ำขังทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ (จุฑารัตน์ และคณะ, 2559) นอกจากนี้สามารถพบได้บนซากพืชที่ทับถมเป็นชั้นหนาตลอดอยู่ในบึงน้ำจืด เรียกว่า “แพชีสนุ่นหรือแพชีสนม” ทำให้มีจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและแบคทีเรียจำนวนมากบริเวณผิวของชิ้นส่วน อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เป็นอุปสรรคในการฟอกฆ่าเชื้อ เนื่องจากชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการนำมาฟอกฆ่าเชื้อเป็นชิ้นส่วนที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป แต่พบว่าหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* มีขนอ่อนจำนวนมากบริเวณนี้ ทั้งชิ้นส่วนใบ เมล็ด และตาข้าง นอกจากนี้ชิ้นส่วนตาข้างอยู่ระหว่างกาบใบที่เป็นรูปถ้วยติดกับลำต้นที่ยากต่อการฟอกฆ่าเชื้ออีกด้วย (สายสุดใจ และคณะ, 2559)

จากหลายรายงานมีการนำสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารฟอกขาวมาใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนพืช เพื่อให้การขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เนื่องจากสารฟอกขาวมีส่วนประกอบของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ได้แก่ บลีสซ์ (bleach<sup>®</sup>) ประกอบด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 8.25 เปอร์เซ็นต์ คลอโร็กซ์ (Clorox<sup>®</sup>) ประกอบด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 8.25 เปอร์เซ็นต์ และไฮเตอร์ (Haite<sup>®</sup>) ประกอบด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 6.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรายงานการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชโดยใช้สารเคมีในพืชหลายชนิด ดังนี้

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดและข้อของสตอเบอรี่ในธรรมชาติเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้สารเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 3 และ 4 นาที ตามลำดับ และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 15 และ 20 นาที ตามลำดับ และใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับแอลกอฮอล์ 70.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดและข้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ร่วมกับ แอลกอฮอล์ 70.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงสุด คือ 80.00 และ 76.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ชิ้นส่วนปลายยอดและข้อ มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด คือ 22.22 และ 21.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อของปลายยอดและข้อต่ำสุด คือ 43.33 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ 37.77 และ 31.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Jan et al., 2013)

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ ข้อ และเมล็ด ของต้นกฤษณาจากธรรมชาติในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้คลอโร็กซ์ความเข้มข้น 10.0 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 เปอร์เซ็นต์เป็น

เวลา 15 นาที และเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบใช้เวลา 5 15 และ 35 วินาที ส่วนชิ้นส่วนข้อใช้เวลา 30 60 และ 90 วินาที และชิ้นส่วนเมล็ดใช้เวลา 3 6 และ 12 นาที พบว่า การใช้คลอรีนออกซ์ความเข้มข้นสูง 50.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างเดียว ไม่สามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียได้ ส่วนการพอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ พบว่า การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบที่ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงสุด 83.30 เปอร์เซ็นต์ และการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อที่ใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงสุด 85.60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่พอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงสุด 90.00 เปอร์เซ็นต์ (Daud *et al.*, 2012)

การพอกฆ่าเชื้อเมล็ดแตงกวาเพื่อขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 3 4 5 6 และ 8 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 10.0 15.0 และ 20.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 12 12 10 10 และ 8 นาที ตามลำดับ และ บาวิสติน ความเข้มข้น 1.0 1.0 3.0 3.0 5.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 15 10 12 10 และ 8 นาที ตามลำดับ จากการพอกฆ่าเชื้อ พบว่า การพอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำสุด และมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 84.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 นาที ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 15.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และ บาวิสติน ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 นาที ตามลำดับ (Alam *et al.*, 2016)

การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ ลำต้น และปลายยอดของชบา ด้วยคลอรีนออกซ์ความเข้มข้น 5.0 10.0 15.0 20.0 25.0 30.0 35.0 40.0 45.0 และ 50.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที พบว่า การใช้คลอรีนออกซ์ความเข้มข้น 40.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที มีการปนเปื้อน 2.00 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการรอดชีวิต 94.50 เปอร์เซ็นต์ การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อด้วยคลอรีนออกซ์ความเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และมีอัตราการรอดชีวิต 97.00 เปอร์เซ็นต์ และการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดด้วยคลอรีนออกซ์ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 นาที ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และมีอัตราการรอดชีวิต 60.00 เปอร์เซ็นต์ (Dar *et al.*, 2012)

งานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้คลอรีนออกซ์ในการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช เนื่องจากเป็นสารพอกฆ่าที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นส่วนประกอบ แต่ในประเทศไทยไม่มีการวางขายคลอรีนออกซ์ตามห้างสรรพสินค้าทั่วไป การสั่งซื้อค่อนข้างยาก และมีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการนำสารพอกฆ่าที่มีชื่อทาง

การค้า คือ ไฮเตอร์ (Haiter®) มาใช้ในการวิจัย เนื่องจากเป็นสารฟอกขาวที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 6.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถหาซื้อได้ง่าย และมีราคาถูก จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช เพื่อประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### 1.2.5 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation) สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ หรืออาจเกิดจากการชักนำด้วยปัจจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในปี ค.ศ. 1958 มีรายงานเกี่ยวกับการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในสภาพปลอดเชื้อเป็นครั้งแรก โดยมีการแสดงลักษณะการเกิดความแปรปรวนในเซลล์ใหม่ (Braun, 1959) จากนั้นการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ในสภาพปลอดเชื้อจึงได้รับความสนใจอย่างมาก ต่อมาได้มีการใช้คำว่า “somaclone” ในการอ้างถึงพืชที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพปลอดเชื้อ และคำว่า “somaclonal variation” ในการอ้างถึงการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มนั้น (Larkin and Scowcroft, 1981)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจึงเกิดในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ปัจจัยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชที่มีการเจริญเติบโตจากการเพาะเลี้ยงอวัยวะ แคลลัส โพรโท-พลาสต์ และ โซมาติกเอ็มบริโอได้ จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่อาจเกิดขึ้นไม่สามารถควบคุมได้และเกิดขึ้นแบบสุ่ม (Karp, A., 1994) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ (Orbovic *et al.*, 2008) สามารถเกิดได้แบบชั่วคราว หรือถาวร หรือระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมแบบชั่วคราวเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบอีพิเจเนติก (epigenetic) ไม่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ และสามารถย้อนกลับได้ (Kaepler *et al.*, 2000) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงถาวรเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบเจเนติก (genetic) สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ และอาจจะเป็นความแปรปรวนที่มีอยู่ก่อนแล้วในเซลล์พืช (Larkin and Scowcroft, 1981)

การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชเพาะเลี้ยงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด เพื่อชักนำให้เกิดเป็นส่วนของต้นพืช โดยไม่ผ่านการเป็นแคลลัสมาก่อนจะมีโอกาสเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย แต่ถ้าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัส หรือผ่านสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอยหรือการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ จะชักนำให้พืชที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง สำหรับระยะเวลาการย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนพืชยิ่งนานจะยิ่งเพิ่มอัตราการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ซึ่งเป็นความแปรปรวนที่มี

อยู่แล้วในเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง แม้ว่าเซลล์ร่างกายของพืชจะมีถิ่นเหมือนกันก็ตาม แต่เซลล์ที่มาจากแหล่งต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ตายอด ตาข้าง หรือ ราก จะมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจมีส่วนทำให้มีความถี่ของการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงขึ้น ซึ่งเป็นการตอบสนองของจีโนมพืชที่มีต่อความเครียดต่างๆ ที่ถูกชักนำให้เกิดในสภาพของการเพาะเลี้ยง (อรุณี, 2550)

การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นอาจแสดงออกถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระเจี๊ยบเขียวบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และ IBA เป็นเวลา 5 เดือน พบว่ากระเจี๊ยบเขียวมีการสร้างยอดและรากในสัปดาห์ที่ 2 โดยกระเจี๊ยบเขียวที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ไม่เกิดความผิดปกติหลังจากการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นเมื่อย้ายเลี้ยงขึ้นส่วนยอดลงบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากระเจี๊ยบเขียวมีลักษณะของใบที่เปลี่ยนแปลงไป ส่วนของใบหงิกงอ และมีการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ จากนั้นเมื่อนำต้นที่ผิดปกติมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD พบว่า กระเจี๊ยบเขียวที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 5 เดือน เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ โดยปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น (Govinden-Soulange *et al.*, 2012)

การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเป็นปัญหาสำคัญในการขยายพันธุ์พืชทางเศรษฐกิจที่ต้องการสร้างพืชต้นใหม่ที่มีพันธุกรรมเหมือนเดิมทุกประการ หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรที่มีการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในหลอดทดลองอาจส่งผลให้เกิดการผลิตสารทุติยภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ไปลดประสิทธิภาพของสารหรืออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสาร ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความแปรปรวนที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และมีการนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือพืชที่ต้องการตรวจสอบได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

#### 1.2.5.1 ปัจจัยที่สามารถชักนำให้พืชเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

##### 1) ต้นแม่พันธุ์ไม่มีความเสถียรทางพันธุกรรม

โดยทั่วไปเซลล์พืชจะมีสภาพทางพันธุกรรมที่ต่างกันในตัวเดียวกัน ซึ่งเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ว่า ไคเมรา (chimera) ประกอบด้วยเซลล์ที่ต่างกัน เซลล์เหล่านี้มีความแตกต่างของโครงสร้างโครโมโซม หรือจำนวนโครโมโซมแบบอะนิพลอยดี สภาพไคเมราเกิดขึ้นเฉพาะ

ในพืชที่มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น โดยสภาพเพอริคลินอล ไคเมอรา (periclinal chimera) จะรักษาสภาพได้ภายหลังจากการขยายพันธุ์ เนื่องจากเซลล์ที่เกิดกลายพันธุ์อยู่ในชั้นของเนื้อเยื่อเจริญรอบลำต้น เมื่อนำขึ้นส่วนที่เป็นไคเมอราขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เซลล์พืชทุกเซลล์สามารถพัฒนาเจริญเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ได้ จึงทำให้พืชที่ได้มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นแม่พันธุ์ (Prina *et al.*, 2012)

## 2) ขึ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับชนิดของขึ้นส่วนพืช โดยทั่วไปพืชที่มีการเจริญเติบโตของยอดผ่านขึ้นส่วนตาข้าง ปลายยอด และเนื้อเยื่อเจริญ พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยกว่าขึ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเติบโตผ่านขึ้นส่วนใบ ราก โปรโตพลาสต์ แคลลัส (Skirvin *et al.*, 1994) และการใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เช่น เพอริไซเคิล (pericycle) โพรแคมเบียม (procambium) และ แคมเบียม (cambium) (Sahijram *et al.*, 2003)

## 3) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการเร่งให้พืชมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จะชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ และความไม่สมดุลระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินอาจชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ การใช้สารกลุ่มออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสที่ยังไม่เจริญเป็นอวัยวะ หรือเซลล์แขวนลอย สามารถเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม จากกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เช่นเดียวกับรายงานการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์กลุ่มออกซิน ที่พบได้บ่อยเกี่ยวกับการเกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม ที่ทำให้พืชมีชุดโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ไม่มีผลโดยตรงในการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม แต่มีผลในการเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ทำให้เกิดการผิดพลาดในการแบ่งนิวเคลียส (Nehra *et al.*, 1992) ส่วนพืชที่ขาดสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินพืชจะไม่มี การแบ่งนิวเคลียส ในขณะที่มีการเพิ่มปริมาณ DNA ขึ้นแล้วก็ตาม ดังนั้นจึงทำให้พืชที่ขาดไซโตไคนิน เกิดสภาพโพลีพลอยด์ขึ้น และจากรายงานของ Roels และคณะ (2005) พบว่า ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงไม่มีผลโดยตรงต่อการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยสายพันธุ์ Nanjanagudu Rasabale และ Cavendish แต่มีผลต่อจำนวนโครโมโซมในกล้วยสายพันธุ์ Williams

#### 4) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลาบนบนสูตรอาหารที่มีการเติมธาตุอาหารสังเคราะห์

ระยะเวลาและจำนวนครั้งในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการแบ่งนิวเคลียส เนื่องจากการกลายพันธุ์จะมีอัตราสูงขึ้นตามจำนวนครั้งที่มีการแบ่งนิวเคลียส ดังนั้นความถี่ในการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมอาจเกิดจากจำนวนครั้ง และระยะเวลาการย้ายเลี้ยง โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและแคลลัส นอกจากนี้เนื้อเยื่อที่มีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว และการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานอาจส่งผลกระทบต่อความเสถียรทางพันธุกรรม และนำไปสู่การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สูงขึ้น จากสถิติแล้วอัตราการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณ (Cote *et al.*, 2001)

#### 5) การเจริญเติบโตผ่านแคลลัส

พืชที่มีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยจะชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง รองลงมาคือการเจริญเติบโตผ่านตาข้าง และการเจริญเติบโตผ่านตายอด ดังนั้นการเจริญเติบโตผ่านตาข้างและตายอด จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณต้นพืช เพื่อขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากโดยไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม แม้ว่าการขยายพันธุ์ดังกล่าวจะมีอัตราการเพิ่มปริมาณไม่สูงนัก แต่ยังคงมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น โดยแคลลัสที่เกิดจากเนื้อเยื่อต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ต่างกัน เช่น พืชสกุลส้ม แคลลัสที่เกิดจาก integument ไม่สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริอยด์ได้ แต่แคลลัสที่เกิดจากนิวเคลลัส (nucellus) สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริอยด์ได้ง่าย และความสามารถในการเกิดเอ็มบริอยด์นั้นจะลดลงเมื่อแคลลัสมีอายุมากขึ้น โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานานมักทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นพืชลดลง ดังนั้นการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชเพาะเลี้ยงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด โดยไม่ผ่านการเป็นแคลลัสมาก่อนจะมีโอกาสเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย แต่ถ้าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัส หรือผ่านสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอยหรือโพรโตพลาสต์ จะชักนำให้พืชที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นการขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบอุตสาหกรรม การเกษตรจึงได้รับผลกระทบมาก ในขณะที่มีผลดีต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนั้นการเลือกควบคุมให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจึงขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อรุณี, 2550)

### 6) ความเครียดที่เกิดจากสภาพการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของพืชอาจไม่เหมาะสมกับความคงตัวของสารพันธุกรรม เนื่องจากอุณหภูมิอาจมีผลต่อการกระจายตัวของโครโมโซมขณะแบ่งนิวเคลียส สำหรับแสงนั้นอาจมีผลต่อการกลายพันธุ์ในคลอโรพลาสต์ได้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ในสภาวะความเครียด เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาวะที่มีความเค็มและสภาวะความเป็นกรดสูง หรือองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีปริมาณเกลือแร่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องเพียงพอต่อการเจริญเติบโตในช่วงระยะการย้ายอาหาร ส่วนการขาดธาตุอาหารบางชนิด เช่น การขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะทำให้การแบ่งนิวเคลียสผิดปกติได้ ดังนั้นการย้ายอาหารบ่อยๆ จึงสามารถช่วยควบคุมการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้บางส่วน (Khan and Ahmad, 2014)

#### 1.2.5.2 กระบวนการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

กลุ่มเซลล์พืชที่ไม่มีความผิดปกติของโครโมโซมภายในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อเดียวกัน จะมีการสร้างแคลลัสที่มีสภาพโครโมโซมปกติในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเท่านั้น แต่เมื่อเพาะเลี้ยงนานยิ่งขึ้นจะเกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นผลจากกระบวนการต่างๆ (Scowcroft and Larkin, 1982) ได้แก่

##### 1) Cryptic chromosomal rearrangement

ส่วนใหญ่กระบวนการนี้มีผลในการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซมที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ การแตกและเชื่อมกันใหม่ของโครโมโซม การเกิด translocation deletion inversion acentric และ centric fragmentation การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซมนี้จะทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดของสารพันธุกรรม และอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน ทั้งยีนบริเวณที่โครโมโซมแตกและยีนที่อยู่ข้างเคียง

##### 2) Somatic crossing over

กระบวนการนี้เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เนื่องจากสภาวะของพืชเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแตกต่างจากพืชที่มีการเจริญเติบโตในธรรมชาติจึงอาจทำให้โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) มาจับคู่กันในระยะโพรเฟส (prophase) ของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส คล้ายกับในระยะโพรเฟสของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส จึงทำให้



เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมหรือโครมาติด จึงทำให้เซลล์ใหม่ที่ได้จากการแบ่งนิวเคลียสมีลักษณะแตกต่างจากเดิม

### 3) Sister chromatid exchange

กระบวนการนี้เป็นอีกปรากฏการณ์หนึ่งที่เกิดขึ้นได้บ่อยครั้งในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่าง 2 โครมาติด ที่เกิดจากโครโมโซมเดียวกันจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เกิดขึ้นเมื่อมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนที่ขนาดต่างกันเท่านั้น เนื่องจากจะทำให้เกิดการขาด (deletion) และจำลอง (duplication) จำนวนยีนในเซลล์ลูก โดยปกติปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นได้บ่อยครั้งในเซลล์พืช เช่น พบในข้าวบาร์เลย์เฉลี่ย 20.6 เซลล์ต่อการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส 1 ครั้ง

### 4) Transposon movement

กระบวนการนี้เป็นปรากฏการณ์ที่ชิ้น DNA เคลื่อนที่จากตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมไปสู่อีกตำแหน่งหนึ่ง ชิ้น DNA ที่ชื่อทรานสโพซอน (transposon) นี้สามารถเคลื่อนตัวไปมาได้อย่างอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งขณะที่พืชอยู่ในสภาพเครียดเช่น ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืชส่วนใหญ่มีทรานสโพซอน ทั้งในนิวเคลียส และไซโตพลาสซึม การเคลื่อนตัวของทรานสโพซอนออกจากตำแหน่งหนึ่งๆ นั้น อาจเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ทำให้ยื่นข้างเคียงทำงานผิดปกติได้ และเมื่อทรานสโพซอนเคลื่อนเข้าสู่อีกตำแหน่งหนึ่ง อาจทำให้ยีนที่ถูกทรานสโพซอนเข้าไปแทรก ทำงานผิดปกติ โดยลักษณะที่เปลี่ยนไปนี้อาจถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้ นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของทรานสโพซอนอาจทำให้โครโมโซมหักได้

### 5) Gene amplification และ Diminution

กระบวนการนี้พบได้ในยีนที่ควบคุมการสร้างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ของพืชชั้นสูง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารหรือสภาพเดียวกันนานๆ จะทำให้พืชมีความต้องการสารบางอย่างมากหรือน้อยผิดปกติ ดังนั้นเซลล์พืชจึงมีการดัดแปลงโครงสร้างของ DNA ใหม่ เพื่อให้มีการสร้างสารนั้นในปริมาณที่เหมาะสม โดยการเพิ่มจำนวน (amplification) หรือลดจำนวน (diminution) ยีนบางตัว กลไกนี้เป็นกระบวนการที่ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานต่อสารพิษบางชนิดได้

## 1.2.6 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)

### 1.2.6.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) คือ เครื่องหมายหรือตัวชี้วัดที่สามารถระบุความแตกต่าง หรือจำแนกลักษณะลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถนำมาใช้ตรวจสอบฟีโนไทป์หรือพื้นฐานทางพันธุกรรมสำหรับการประเมินความแปรผันทางพันธุกรรมได้ (Singh *et al.*, 2014) เครื่องหมายทางพันธุกรรมมีการนำมาใช้มาอย่างยาวนาน โดยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชคือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological markers)

เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายชนิดแรกที่ใช้การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต การศึกษาความแตกต่างของลักษณะภายนอกทางสัณฐานหรือทางสรีรวิทยา เช่น รูปร่าง น้ำหนัก สี ผิว ลักษณะของใบ ลักษณะหนาม และอื่นๆ (Khanam *et al.*, 2012) โดยการแสดงออกของยีนที่ไม่ได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมจะทำให้ผลการศึกษามีความแม่นยำมากขึ้น แม้ว่าเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาสามารถใช้คัดเลือกได้ง่ายและทำได้รวดเร็ว แต่การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมหรือมีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะที่สิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโต (Khanam *et al.*, 2012) นอกจากนี้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดการในแสดงออก เนื่องจากลักษณะที่แสดงออกขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม จึงทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แท้ (homozygous) และพันธุ์ทาง (heterozygous) ได้ และมีการแสดงออกเฉพาะในบางระยะของการพัฒนาหรือบางเนื้อเยื่อ ทำให้การตรวจสอบผลผลิตปลาได้ (สุรินทร์, 2552; กมล, 2555)

การใช้ประโยชน์เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม เช่น การแยกความแปรปรวนทางพันธุกรรมในขมิ้นชันด้วยเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา จากการชักนำแคลลัสของขมิ้นชันบนอาหาร Linsmaier and Skoog's Basal Medium (LSBM) ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำมาชักนำต้นบนอาหาร LSBM ที่มี BAP ความเข้มข้น 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นคัดเลือกต้นที่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันมาย้ายปลูกในโรงเรือน แล้วตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนหน่อต่อกอ จำนวนใบต่อกอ ขนาดใบ และการสร้างเหง้าต่อกอ พบว่า สามารถแยกความแปรปรวนจากแคลลัสขมิ้นชันได้ 5 ลักษณะ 105 ต้น พบการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระดับที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับต้นปกติ (Roopadarshini and Gayatri, 2012)



อยู่ที่วจีโนม และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งบนโครโมโซม ดังนั้น อาร์เอฟแอลพีจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีลักษณะเด่นกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม อาร์เอฟแอลพีไม่เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย เพราะมีขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน และค่าใช้จ่ายสูง ดีเอ็นเอที่ใช้มีต้องปริมาณและความบริสุทธิ์สูง และดีเอ็นเอตรวจสอบที่ใช้จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสเพื่อการสังเคราะห์ (วาริน, 2545; มะลิวัลย์, 2546)

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP) เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ ลักษณะสำคัญของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี สามารถใช้เป็นตัวแทนจีโนมได้ เนื่องจากพัฒนามาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการกระจายอยู่ที่วจีโนม แลกดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค เอเอฟแอลพี มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบสุ่ม ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชที่ตรวจสอบหรือ โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ขนาด ข้างกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ตรงส่วนที่มีการเพิ่มของเบสเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้ สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ลักษณะเด่นของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คือเป็น เครื่องหมายที่ครอบคลุมทั้งจีโนม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน ใช้ดีเอ็นเอ เริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อย การตรวจสอบซ้ำได้ผลเหมือนเดิม ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบส ดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ (Matthes *et al.*, 2001)

เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (RAPD) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดย Williams และคณะ (1990) เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวประมาณ 10 คู่เบส แลกดีเอ็นเอแต่ละแถบได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งของจีโนม การเกิด โพลีมอร์ฟิซึมของเทคนิคอาร์เอฟพีดีเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของเบสในดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือ การขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของเบสในดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณที่เป็นที่เกาะหรือเข้าสู่ของไพรเมอร์ ซึ่ง แสดงออกในลักษณะของการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งหนึ่งๆ แม้ว่าเทคนิค อาร์เอฟพีดีจะทำได้ง่าย และรวดเร็วและให้ข้อมูลจำนวนมาก แต่ในการทำซ้ำ อาจได้ผลแตกต่างไปจาก เดิม นอกจากนี้เทคนิคอาร์เอฟพีดีมีลักษณะการข่มแบบสมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่าง ระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ การปรากฏแถบดีเอ็นเอมาจากแอลลีนด้อยที่เป็นโฮโมไซโกต ซึ่งเป็นผลจากการไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแอลลีนดังกล่าวได้ เทคนิคอาร์เอฟพีดีสามารถเข้าสู่ กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสม จะทำให้เกิด การจำลองตัวของดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ ดังนั้นถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่าง ของสารพันธุกรรมหรือต่างชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกันทำให้ได้ จำนวนและชิ้นของดีเอ็นเอมีขนาดแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการบ่งบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ (Morimoto *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003)

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ISSR) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลต์สองบริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกันในทิศทางตรงกันข้ามกัน ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์คือ ชั้นดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันในจีโนม แต่ละเบสซ้ำประกอบด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 1-6 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งความผันแปรจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในจีโนมสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (สุรินทร์, 2552) เทคนิคไอเอสเอสอาร์ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลลำดับเบสในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีโพลิเมอร์ฟิซิมสูง แต่มีข้อจำกัดเช่นเดียวกับอาร์เอฟดี คือ การตรวจสอบซ้ำให้ผลไม่เหมือนเดิม มีการถ่ายทอดลักษณะแบบข่มสมบูรณ์ และแถบดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากันจะเคลื่อนที่ไปด้วยกันทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอเดียวกัน

เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR) เป็นเครื่องหมายที่มีเบสซ้ำเรียงต่อกันในจีโนม 1-6 เบส มีการกระจายตัวอยู่บริเวณต่างๆ ของจีโนมประมาณ 104-105 โลกัส ไมโครแซทเทลไลต์เป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร มีการกลายพันธุ์สูงกว่าลำดับเบสทั่วไป การกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์มักเกิดจากการหายไปของลำดับเบสซ้ำ หรือการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสซ้ำ ต่างจากลำดับเบสทั่วไปที่มักเกิดการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบส โดยทั่วไปไมโครแซทเทลไลต์หรือเบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่ขนานข้างเบสซ้ำเหล่านี้ สามารถนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ การออกแบบไพรเมอร์คู่สมกับเบสจำเพาะ เรียกว่า ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์หรือไพรเมอร์เอสเอสอาร์ ไพรเมอร์เหล่านี้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างลำดับเบสที่จำเพาะ ดังนั้นความแตกต่างของแอลลีลไมโครแซทเทลไลต์จึงเป็นผลมาจากความผันแปรของจำนวนชุดเบสซ้ำเหล่านี้ แม้ว่าการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จะเป็นวิธีที่ยุงยากและมีค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากพัฒนาเครื่องหมายแล้ว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายเนื่องจากเป็น PCR-based markers จึงต้องการดีเอ็นเอปริมาณน้อยและชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กจึงใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างคุณภาพไม่สูงมากนัก นอกจากนี้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ถือว่าเป็นเครื่องหมายที่มีความแม่นยำ เพราะเป็นเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งในแต่ละโลกัส มีหลายแอลลีล (multiallelic) ทำให้มีโพลิเมอร์ฟิซิมสูง และมีการถ่ายทอดลักษณะแบบข่มร่วมกันจึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ (Thawaro and Techato, 2009)

เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟดี ไอเอสเอสอาร์ และเอสเอสอาร์ เนื่องจากเครื่องหมายอาร์เอฟดีเป็นเครื่องหมายที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลจำนวนมาก เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเบสซ้ำ สะดวก รวดเร็ว และ ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอ ส่วนเครื่องหมายเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่มีความแม่นยำ และมีโพลิเมอร์ฟิซิมสูง ซึ่งทั้ง 3 เทคนิคนี้

ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย มีรายงานการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี ไอเอสเอสอาร์ และ เอสเอสอาร์ ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด ดังนี้

อัญชลี และ สมปอง (2555) ความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงแคลัสบนอาหารแข็ง และอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมไคโตแคมบาความเข้มข้นต่างกัน ย้ายเลี้ยงทุกๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า แคลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดที่เติมไคโตแคมบาเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD และ SSR จากการใช้ไพรเมอร์ RAPD ทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์ SSR ทั้ง 9 ไพรเมอร์ ก็ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และไม่มีความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ

ยุพารักษ์ และ สมปอง (2556) นำอับละอองเกสรของยางพารา โคลน 2-NR มาชักนำโซมาติกเอ็มบริโอผ่านแคลัส บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร KN ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลัสอายุ 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร KN ความเข้มข้น 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบจำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพาราผ่านแคลัส นอกจากนี้มีรายงานการใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น กระบองเพชร (Zoghiami *et al.*, 2012) กล้วยไม้ฟ้าแลนนอปซิส (Khoddamzadeh *et al.*, 2010)

วารารักษ์ และ สมปอง (2556) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมเทเนอร์่า เบอร์ 77 ที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่ดูร่า (D366) และต้นพ่อพิสิเฟอร์่า (P172) ที่ไม่ออกดอกและออกดอกในหลอดทดลอง โดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 9 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 7 คู่ ที่ให้รูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันในปาล์มน้ำมันทั้งสองชนิด คือ EgCIR0008 EgCIR0337 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR00781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 จากการศึกษาข้างต้นสามารถใช้เทคนิคดังกล่าวนี้เพื่อคัดเลือกความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลงได้ ซึ่งจะช่วยลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นต่อไป

วุฒิชัย และสมปอง (2558) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพาราบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร KN ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร GA3 ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำมาตรวจสอบความ

แปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย RAPD จำนวน 4 ไพรเมอร์ ในแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกับใบที่มาจากต้นแม่ พบว่า เกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่สกัดมาจากชิ้นส่วน แคลลัส ซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงผ่านแคลลัสจากอับละอองเกสรอย่างพารา แต่ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในโซมาติกเอ็มบริโอ

Rout และคณะ (1998) ตรวจสอบพันธุกรรมของขิง (*Zingiber officinale*) ที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการนำชิ้นส่วนเหง้าที่มีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัสมา ชักนำยอดบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำรากบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ 3 ไพรเมอร์ในการตรวจสอบ พบว่า ขิงที่มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD สามารถนำไปใช้ในการยืนยันการจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชวงศ์ขิงอีกหลายสกุล เช่น กลุ่มขิง (*Zingiber spp.*) (Rout *et al.*, 1998) กลุ่มข่า (*Alpinia spp.*) (Dasuki *et al.*, 2000) และ กลุ่มขมิ้น (*Curcuma spp.*) ในกลุ่มของพืชสกุลกระชาย (Zou *et al.*, 2011)

Lakshmanan และคณะ (2007) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยที่มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 ปี จากนั้นนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาย้ายลงปลูกในแปลง แล้วนำมาตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอก จึงนำเอาเครื่องหมาย RAPD และ ISSR มาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อเป็นยืนยันการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 50 ไพรเมอร์ และ ISSR จำนวน 25 ไพรเมอร์ พบว่า มีไพรเมอร์ RAPD เพียง 30 ไพรเมอร์ และ ISSR เพียง 5 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย ดังนั้นเครื่องหมาย RAPD และ ISSR สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลานานได้

Khan และคณะ (2013) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของขิงเฮาที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP ความเข้มข้น 10.0 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 10.0 ไมโครโมลาร์ เมื่อนำต้นที่ได้มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 2 ไพรเมอร์ พบว่า เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้นในขิงเฮา ซึ่งเกิดจากการเจริญเติบโตบนอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูง จึงส่งผลต่อการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของขิงเฮาโดยตรง

Viehmanna และคณะ (2013) ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของบัวหิมะที่มีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงก้านใบบนอาหารสูตร MS ที่มี Thiamine ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Myo-inositol ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า บัวหิมะมีการเจริญเติบโตเป็นแคลลัส 70.00-100.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นที่มีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัสมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 20 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 8 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และบัวหิมะที่มีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัสมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Dey และคณะ (2015) ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมในตะไคร้หอมด้วยเทคนิค RAPD โดยกระบวนการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอผ่านแคลลัส จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมาย RAPD พบว่า ตะไคร้หอมเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้สารควบคุมเจริญเติบโต 2,4-D ในการชักนำแคลลัส และจากการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอผ่านแคลลัส

นอกจากนี้ยังมีรายงาน การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. khasiana* ที่เพาะเลี้ยงขึ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 5 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ไพรเมอร์ พบว่ามี 14 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPH-01 OPH-05 OPH-06 OPH-11 OPK-10 OPK-11 OPK-12 OPK-13 OPK-14 OPK-17 OPK-18 OPK-19 OPC 07 และ OPA-11 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และจากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ และหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม แต่เมื่อนำหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลา 6 เดือน รุ่นที่ 1-3 มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่า เกิดความแปรปรวน 4.1-9.4 เปอร์เซ็นต์ ในรุ่นที่ 3 และจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค ISSR จำนวน 36 ไพรเมอร์ พบว่า มี 12 ไพรเมอร์ ได้แก่ N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9 N10 N11 และ N12 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และจากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงรุ่นที่ 1-3 พบว่า เกิดความแปรปรวน 4.3-10.0 เปอร์เซ็นต์ ในรุ่นที่ 3 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเครื่องหมาย RAPD และ ISSR มาใช้ในการยืนยันความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในระดับดีเอ็นเอได้ (Devi et al., 2013; 2014)

จากรายงานการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. mirabilis* ในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจาก



ธรรมชาติด้วยไพรเมอร์ RAPD จำนวน 6 ไพรเมอร์ พบว่า มีจำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ OPA-11 OPH-05 OPH-13 และ OPK-19 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น (นิรันดร, 2557)

จากผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายโมเลกุลสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำเอาเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis*

### 1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย (Objective)

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคโมเลกุล และสัณฐานวิทยา

## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย (Research Methodology)

#### 2.1 วิธีดำเนินการ (Method)

##### 2.1.1 การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ

###### 2.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนเมล็ด ใบ และ ช่อ ของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* ในพื้นที่ ต.ขุนทะเล อ.เมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยการคัดเลือกเมล็ดจากฝักของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่มีเปลือกหุ้มเป็นสีน้ำตาล และมีความสมบูรณ์ ไม่มีร่องรอยการกัดกินของแมลง และไม่มีการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ คัดเลือกใบอ่อนที่คลี่แล้วของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่มีความสมบูรณ์ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนใบอ่อนใบที่ 2-3 นับจากปลายยอด ชิ้นส่วนช่อที่ 2-4 นับจากยอด และไม่มีร่องรอยการกัดกินของแมลง

###### 2.1.1.2 การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด

นำฝักหม้อข้าวหม้อแกงลิง มาล้างน้ำประปาแบบไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นพอกฆ่าเชื้อเมล็ดโดยนำชิ้นส่วนฝัก มาพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 5.0 10.0 15.0 20.0 หรือ 25.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หรือการพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 5.0 10.0 15.0 และ 20.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการพอกฆ่าเชื้อครั้งที่สอง โดยใช้สารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5.0 10.0 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเป็นเวลา 5 นาที (ตารางที่ 1) โดยทุกวิธีทเมนตมีการหยด Tween 20 ในสารละลาย 1-2 หยด เขย่า แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

**ตารางที่ 1** วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ดของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ

การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1			การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2		
ความเข้มข้น ไฮเตอร์ (%v/v)	ความเข้มข้น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (%v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น ไฮเตอร์ (%v/v)	ความเข้มข้น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (%w/w)	เวลา (นาที)
5	0.3	10	-	-	-
10	0.6	10	-	-	-
15	0.9	10	-	-	-
20	1.2	10	-	-	-
25	1.5	10	-	-	-
5	0.3	10	5	0.3	5
10	0.6	10	5	0.3	5
15	0.9	10	10	0.6	5
20	1.2	10	15	0.9	5

### 2.1.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ

นำใบหม้อข้าวหม้อแกงลิง มาล้างน้ำประปาแบบไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ ด้วยสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 5.0 10.0 15.0 20.0 หรือ 25.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที หรือการฟอกฆ่าเชื้อด้วย สารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5.0 10.0 15.0 และ 20.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีรวมกับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่สอง โดยใช้สารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5.0 10.0 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นเวลา 5 นาที (ตารางที่ 2) โดยทุกวิธีทเมนต์มีการหยด Tween 20 ในสารละลาย 1-2 หยด เขย่า แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ตารางที่ 2 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ

การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1			การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2		
ความเข้มข้น ไฮเตอร์ (%v/v)	ความเข้มข้น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (%v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น ไฮเตอร์ (%v/v)	ความเข้มข้น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (%w/w)	เวลา (นาที)
5	0.3	5	-	-	-
10	0.6	5	-	-	-
15	0.9	5	-	-	-
20	1.2	5	-	-	-
25	1.5	5	-	-	-
5	0.3	5	5	0.3	5
10	0.6	5	5	0.3	5
15	0.9	5	10	0.6	5
20	1.2	5	15	0.9	5

#### 2.1.1.4 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ

นำชิ้นส่วนข้อของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง มาล้างให้น้ำประปาแบบไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 15.0 20.0 30.0 40.0 หรือ 50.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หรือการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 15.0 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่สอง โดยใช้สารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 10.0 15.0 25.0 35.0 และ 45.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที (ตารางที่ 3) โดยทุกวิธีทรมานต์มีการหยด Tween 20 ในสารละลาย 1-2 หยด เขย่า แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ตารางที่ 3 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ

การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1			การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2		
ความเข้มข้น ไฮเตอร์ (%v/v)	ความเข้มข้น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (%v/v)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น ไฮเตอร์ (%v/v)	ความเข้มข้น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (%w/w)	เวลา (นาที)
15	0.9	10	-	-	-
20	1.2	10	-	-	-
30	1.8	10	-	-	-
40	2.4	10	-	-	-
50	3.0	10	-	-	-
15	0.9	10	10	0.6	5
20	1.2	10	15	0.9	5
30	1.8	10	25	1.6	5
40	2.4	10	35	2.1	5
50	3.0	10	45	2.7	5

#### 2.1.1.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง

นำชิ้นส่วนเมล็ด ใบ และ ช่อ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ มาเพาะเลี้ยงตั้งนี้ การเพาะเลี้ยงเมล็ด นำฝักหม้อข้าวหม้อแกงลิงมาตัดปลายทั้งสองด้านออก แล้วนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยง ขวดละ 5 เมล็ด ส่วนชิ้นส่วนใบและช่อ ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาด 1.0×1.0 เซนติเมตร และตัดชิ้นส่วน ช่อให้มีขนาด 1.0-2.0 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงใบขวดละ 2 ชิ้นส่วน และเพาะเลี้ยงช่อขวดละ 1 ชิ้นส่วน ทริทเมนต์ละ 4 ชั่วโมง ชั่วละ 5 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนทั้งหมดบนอาหารแข็งสูตร ½MS วางเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 ปี แล้วจึงนำต้นอ่อนที่ได้มา ชักนำยอดจากชิ้นส่วนช่อ โดยมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ และย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ทุก 3 เดือน เพื่อเพิ่มปริมาณยอดจำนวน 3 รุ่น เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

### 2.1.1.6 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการฟอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยการบันทึกเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การงอก และ จำนวนใบเฉลี่ย

บันทึกผลการฟอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยการบันทึกผล เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

บันทึกผลการฟอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนข้อหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยการบันทึกผล เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และ จำนวนการเกิดยอดเฉลี่ยต่อขึ้นส่วน

บันทึกผลการปลอดเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และบันทึกผลการรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การงอก จำนวนยอดเฉลี่ยต่อขึ้นส่วน และจำนวนใบเฉลี่ย ทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

#### สูตรคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนขึ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ}}{\text{จำนวนขึ้นส่วนทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนขึ้นส่วนที่รอด}}{\text{จำนวนขึ้นส่วนที่ปลอดเชื้อทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่รอดทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{จำนวนใบเฉลี่ยต่อขึ้นส่วน} = \frac{\text{จำนวนใบทั้งหมด}}{\text{จำนวนขึ้นส่วนที่เกิดใบทั้งหมด}}$$

### 2.1.1.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของการปลอดเชื้อ การรอดชีวิต การงอก และจำนวนใบต่อขึ้นส่วน ด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11

## 2.1.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สันฐานวิทยา และสรีรวิทยา

### 2.1.2.1 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เทคนิค RAPD ISSR และ SSR

#### 2.1.2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 1 ปี และย้ายเลี้ยงจำนวน 3 รุ่นมาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงตามวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) โดยนำตัวอย่างใบอ่อนหม้อข้าวหม้อแกงลิง 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติม CTAB บัฟเฟอร์ (2% CTAB 2% PVP 1.4 M NaCl 20 mM EDTA pH 8.0 100 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 700.0 ไมโครลิตร บดให้ใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงละเอียด แล้วนำไปบ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดทุกๆ 15 นาที จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 500.0 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ประมาณ 500.0 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 500.0 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 70.0 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนใสออกอีกครั้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNaseA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 2.1.2.1.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ ด้วยวิธีอเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง

UV-Transilluminator จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA) บันทึกผลปริมาณดีเอ็นเอที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และบันทึกสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (Optical Density; OD 260/280 nm)

### 2.1.2.1.3 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ หม้อข้าวหม้อแกงลิงโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) ด้วย ไพรเมอร์จำนวน 14 ไพรเมอร์ คือ OPA-11 OPH-05 OPH-13 OPK-19 OPP-04 OPP-07 OPP-08 OPP-09 OPP-15 OPP-19 OPBH-08 OPBH-16 OPBH-20 และ Primer Sex (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้จากการตรวจสอบแล้วว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในหลอดทดลองได้ (นิรันดร์, 2557)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีปฏิกิริยารวมปริมาตร 10.0 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 50 นาโนกรัม ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10X buffer ความเข้มข้น 1X ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร ร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร ดิออกซินิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (dNTP) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.1 ยูนิต ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 3.8 ไมโครลิตร

สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และทำซ้ำ 40 รอบใน 3 ขั้นตอนนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอนสุดท้าย ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างไลบรารีจีโนมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-3')	อ้างอิง
OPA-11	CAATCGCCGT	Devi <i>et al.</i> (2014)
OPC-07	GTCCCGACGA	Devi <i>et al.</i> (2014)
OPH-05	AGTCGTCCCC	Devi <i>et al.</i> (2014)
OPH-13	GACGCCACAC	Nongrum <i>et al.</i> (2012)
OPK-13	GGTTGTACCC	Devi <i>et al.</i> (2014)
OPK-19	CACAGGCGGA	Devi <i>et al.</i> (2014)
OPP-04	GTGTCTCAGG	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPP-07	GTCCATGCCA	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPP-08	ACATCGCCCA	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPP-09	GTGGTCCGCA	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPP-15	GGAAGCCAAC	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPP-19	GGGAAGGACA	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPBH-08	ACGGAGGCAG	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPBH-16	CTGCGGGTTC	Bhau <i>et al.</i> (2009)
OPBH-20	CACCGACATC	Bhau <i>et al.</i> (2009)
Primer Sex	TTCCGAACCC	Mokkamul <i>et al.</i> (2007)

#### 2.1.2.1.4 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ หม้อข้าวหม้อแกงลิงโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ใช้เทคนิคพีซีอาร์ ด้วย โพรเมอร์จำนวน 15 โพรเมอร์ คือ Primer-1 Primer-2 Primer-3 Primer-4 Primer-5 Primer-6 Primer-7 Primer-8 Primer-9 Primer-10 Primer-11 Primer-12 Primer-13 Primer-14 และ Primer-15 (ตารางที่ 5)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีปฏิกริยารวมปริมาตร 15.0 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 50.0 นาโนกรัม ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร โพรเมอร์ ความเข้มข้น 0.67 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA.) ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร (Taq buffer ความเข้มข้น 2X dNTP ความเข้มข้นชนิดละ 0.4 ไมโครโมลาร์ และ  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร

สำหรับปฏิกริยาพีซีอาร์ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ต่อมาขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ทำซ้ำทั้งสิ้น 35 รอบ ในขั้นตอนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-3')	อ้างอิง
Primer-1	CACACACACACAGC	
Primer-2	CACACACACACAAC	Chaveerach <i>et al.</i> (2006)
Primer-3	ACACACACACACACACC	Yulita and Mansur (2012)
Primer-4	AGAGAGAGAGAGAGAGT	
Primer-5	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	Yulita and Mansur (2012)
Primer-6	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	
Primer-7	CACCACCACGA	
Primer-8	GAGGAGGAGGC	Devi <i>et al.</i> (2014)
Primer-9	CTCTCTCTCTCTCTAC	Chaveerach <i>et al.</i> (2006)
Primer-10	CCCCGTGTGTGTGTGT	Chaveerach <i>et al.</i> (2006)
Primer-11	CACACACACACAAG	Chaveerach <i>et al.</i> (2006)
Primer-12	GACAGACAGACAGACA	Chaveerach <i>et al.</i> (2006)
Primer-13	CACCACCACGC	Devi <i>et al.</i> (2014)
Primer-14	CTCCTCCTCGC	Chaveerach <i>et al.</i> (2006)
Primer-15	CACACACACACAGG	Devi <i>et al.</i> (2014)

### 2.1.2.1.5 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงโดยใช้เทคนิคเอสเอสอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ใช้เทคนิคพีซีอาร์ ด้วย โพรเมอร์จำนวน 5 โพรเมอร์ คือ Nep\_SSR1 Nep\_SSR3 Nep\_SSR6 Nep\_SSR12 และ Nep\_SSR18 (ตารางที่ 6) ซึ่งเป็นโพรเมอร์ที่ได้จากการตรวจสอบแล้วว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในหลอดทดลองได้ (เบญจมาศ, 2560)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีปฏิกิริยารวมปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอตัวอย่าง ความเข้มข้น 50.0 นาโนกรัม ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร โพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด ความเข้มข้น 0.67 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร โพรเมอร์รีเวิร์ด ความเข้มข้น 0.67 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA.) ความเข้มข้น 2X ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร (Taq buffer ความเข้มข้น 2X, dNTP ความเข้มข้นชนิดละ 0.4 ไมโครโมลาร์, MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร

สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ต่อมาขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ทำซ้ำทั้งสิ้น 35 รอบ ในขั้นตอนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-3')
Nep_SSR1	F – GTTCTAACAAATGGGGTTGACT R – CTATCTTCATTCTCGTCCGATT
Nep_SSR3	F – ATATTTCTATCGCATTGGCCCT R – TATATGGCGCAACCCTTGTT
Nep_SSR6	F – CTACGAGGCATTTCTGTGAGT R – TACCTACAGCTTCTCCCAATTC
Nep_SSR12	F – GCATTCGATTTCTGTTGGTA R – TAGATGGGAAAATATGCGGA
Nep_SSR18	F – TTCTAACAAATGGGGTTGACTG R – GACTCTATCTTCATTCTCGTCCG

ที่มา: เภยจมาศ (2560)

#### 2.1.2.1.6 การตรวจสอบผลผลิตจากเทคนิคพีซีอาร์

การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ด้วย วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาณ 5.0 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer (Tris Base Boric acid Na<sub>2</sub>EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง UV-Transilluminator

การตรวจสอบผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเทคนิคเอสเอสอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลโพลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide gel) ความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE Buffer ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 วัตต์ เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย silver staining เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากใบอ่อนหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ และหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

### 2.1.2.1.7 การวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* ที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการบันทึกผลแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RAPD ISSR และ SSR โดยอ่านแถบที่ปรากฏเป็น 1 แถบที่ไม่ปรากฏเป็น 0 และบันทึกผลด้วยโปรแกรม Microsoft Office Excel 2013 จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมของไพรเมอร์ และค่า PIC (Polymorphism Information Content)

#### คำนวณสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมของไพรเมอร์} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏความแตกต่าง}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{PIC} = 1 - \sum P_i^2$$

โดย Pi คือ ความถี่ของแอลลีลเฉลี่ยของไพรเมอร์

### 2.1.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง

#### *N. mirabilis*

#### 2.1.2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างของใบ

นำต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล มาบันทึกลักษณะรูปร่าง โดยศึกษาลักษณะของปลายใบและโคนใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 1.5 เท่า และศึกษาลักษณะของหม้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 3 เท่า จากนั้นเปรียบเทียบลักษณะปลายใบ โคนใบ และหม้อ กับต้นแม่

#### 2.1.2.2.2 ความหนาแน่นและขนาดของปากใบ

นำใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงใบที่ 2-3 ที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ มาทาน้ำยาทาเล็บบางๆ ที่ผิวใบด้านบนและด้านล่างบริเวณที่จะศึกษา เพื่อลอกกลายเนื้อเยื่อผิวใบ ทิ้งให้แห้งแล้วใช้เทปใสทาบบริเวณที่ทำน้ำยาทาเล็บ จากนั้นลอกเทปใสออก แล้วนำไปวางบนสไลด์ ศึกษาภายใต้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ ทำการศึกษาความหนาแน่นของปากใบจำนวน 3 ตำแหน่งต่อชิ้นส่วนใบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า และศึกษาขนาดของปากใบด้วยการวัด

ความกว้างและความยาวปากใบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า จำนวน 10 เซลล์ต่อตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบลักษณะกับต้นแม่

### 2.1.2.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล ความหนาแน่น และขนาดปากใบ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design : CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่าง จำนวนปากใบ ความกว้างปากใบ และความยาวปากใบ ด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11

### 2.1.2.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis*

#### 2.1.2.3.1 การวัดค่าความเขียวใบ

นำชิ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งตรวจสอบด้วยเครื่องมือเลกุลแล้วพบว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรม มาวัดค่าความเขียวของใบด้วยเครื่อง Soil Plant Analysis Development (SPAD) chlorophyll meter โดยสุ่มวัดจำนวน 3 ตำแหน่ง วัดค่า SPAD ที่ด้านบนระหว่างขอบใบและเส้นกลางใบ อ่านค่าความเขียวของใบที่มีหน่วยเป็น SPAD unit จากนั้นเปรียบเทียบลักษณะกับต้นแม่

#### 2.1.2.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลค่าความเขียวใบ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design : CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยความเขียว ด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11

## 2.2 วัสดุและอุปกรณ์ (Material and Equipment)

### 2.2.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง

- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง
- ตู้บลมร้อน
- ตู้ย่ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ปากคืบ
- มีดผ่าตัด
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- กระจกบอทวง
- ปีกเกอร์
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### 2.2.2 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
- เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (Compound microscope)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereoscopic microscope)
- ตู้เย็น
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซ็นทริฟิวจ์
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- หลอดเอฟเฟนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต และทิป
- แท่งแก้วสำหรับบดตัวอย่าง เครื่องแก้ว กระจกบอทวง และขวดต่าง ๆ



- แผ่นสไลด์
- เทปใส

### 2.2.3 สารเคมีในการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง

- ธาตุอาหารองค์ประกอบของอาหารสูตร MS
- วัุ้น
- ผงถ่าน
- Haiter<sup>®</sup>
- Tween 20
- เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

### 2.2.4 สารเคมีในการทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

- CTAB buffer (2% CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 20.0 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH8)
- Absolute Ethanol
- chloroform: isoamyl alcohol
- DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, USA.)
- dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl<sub>2</sub>)
- 10X *Taq* buffer
- *Taq* DNA Polymerase
- TBE buffer (Tris Base, Boric acid, Na<sub>2</sub>EDTA 0.5 M, pH 8.0)
- เจลอะกาโรส
- ไพรเมอร์ สำหรับ RAPD มีไพรเมอร์ จำนวน 16 ไพรเมอร์ ดังในตารางที่ 4
- ไพรเมอร์ สำหรับ ISSR มีไพรเมอร์ จำนวน 15 ไพรเมอร์ ดังในตารางที่ 5
- ไพรเมอร์ สำหรับ SSR มีไพรเมอร์ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ดังในตารางที่ 6

## บทที่ 3

### ผลการวิจัย (Results)

#### 3.1 การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหม้อข้าวหม้อแกงลิง

##### 3.1.1 การปลอดเชื้อจุลินทรีย์และการรอดชีวิตของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการพอกฆ่าเชื้อเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยสารละลายไฮเตอร์ พบว่า การพอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ และการพอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจุลินทรีย์ของเมล็ดสูงสุด  $100 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการพอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ การพอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจุลินทรีย์ของเมล็ด  $86.00 \pm 30.51$   $95.00 \pm 22.36$   $87.00 \pm 29.93$   $95.00 \pm 22.36$   $88.00 \pm 30.02$  และ  $95.00 \pm 22.36$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจุลินทรีย์ของเมล็ดต่ำสุด  $49.00 \pm 50.46$  เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

การพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เมล็ดมีการรอดชีวิตสูงสุด  $88.89 \pm 26.67$  เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติกับการพอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 15 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ การพอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $73.68 \pm 30.59$   $76.25 \pm 34.42$   $80.00 \pm 33.09$  และ  $74.74 \pm 34.54$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) รองลงมาคือ การพอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ การพอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $52.50 \pm 37.85$   $58.82 \pm 37.73$   $43.16 \pm 43.34$  และ  $32.00 \pm 39.68$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

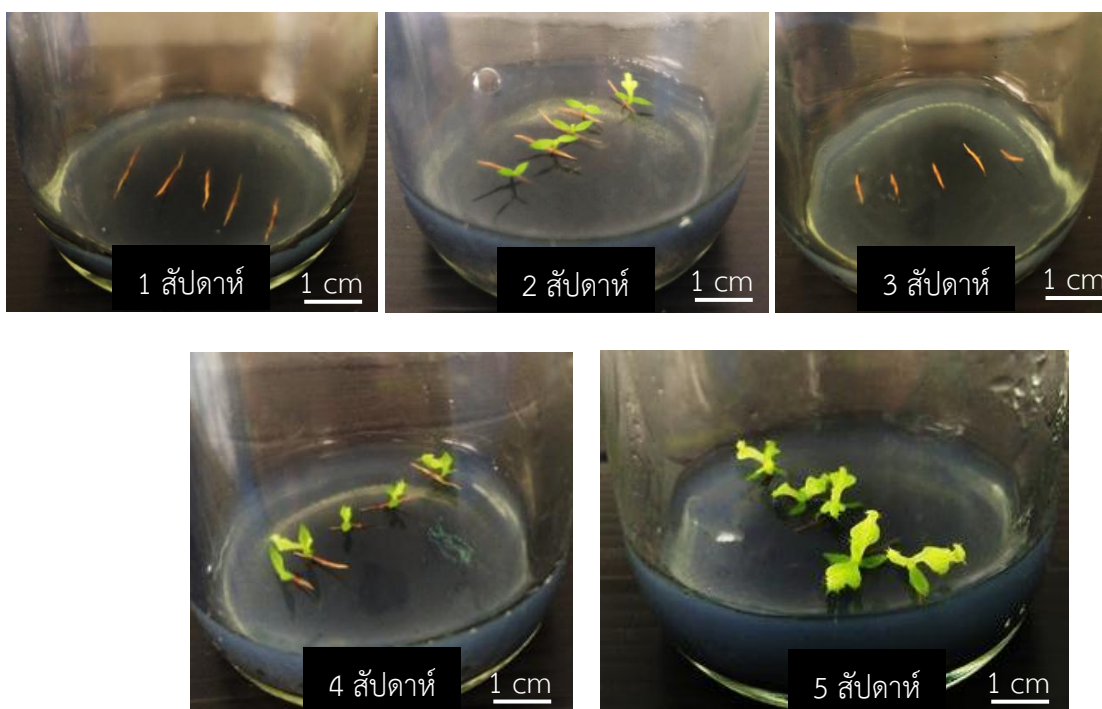
**ตารางที่ 7** เปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ความเข้มข้นของไฮเตอร์ (%v/v)		เปอร์เซ็นต์ปลดเชื้อ (mean±SD)	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต (mean±SD)
การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1	การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2		
5 (0.3)	-	49.00±50.46 <sup>b</sup>	88.89±26.67 <sup>a</sup>
10 (0.6)	-	86.00±30.51 <sup>a</sup>	52.50±37.85 <sup>bc</sup>
15 (0.9)	-	95.00±22.36 <sup>a</sup>	73.68±30.59 <sup>ab</sup>
20 (1.2)	-	87.00±29.93 <sup>a</sup>	76.25±34.42 <sup>ab</sup>
25 (1.5)	-	100.00±0.00 <sup>a</sup>	80.00±33.09 <sup>ab</sup>
5 (0.3)	5 (0.3)	95.00±22.36 <sup>a</sup>	74.74±34.54 <sup>ab</sup>
10 (0.6)	5 (0.3)	88.00±30.02 <sup>a</sup>	58.82±37.73 <sup>bc</sup>
15 (0.9)	10 (0.6)	95.00±22.36 <sup>a</sup>	43.16±43.34 <sup>c</sup>
20 (1.2)	15 (0.9)	100.00±0.00 <sup>a</sup>	32.00±39.68 <sup>c</sup>
CV (%)		30.84	62.77
P-value		**	**

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์  
\* และ \*\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ  
ns (non-significant) แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ  
( ) ตัวเลขภายในวงเล็บแสดงความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์

### 3.1.2 การงอกและการเกิดใบของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการนำเมล็ดที่ปลอดเชื้อและรอดชีวิตจากการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร  $\frac{1}{2}$ MS เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมล็ดมีการพัฒนาโดยมีลักษณะพองตรงกลางของเมล็ด จากนั้นเริ่มงอกมีใบเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และมีการสร้างใบจริงและสร้างหม้อในสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 4) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกสูงสุด  $78.00 \pm 32.38$  เปอร์เซ็นต์ และมีการเกิดใบสูงสุด  $3.21 \pm 0.44$  ใบต่อต้นไม่แตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 15 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการงอกของเมล็ด  $73.33 \pm 33.17$   $54.74 \pm 31.86$  และ  $76.25 \pm 34.42$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการเกิดใบ  $2.94 \pm 0.48$   $2.81 \pm 0.72$  และ  $3.11 \pm 0.35$  ตามลำดับ ส่วนเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การงอก  $49.47 \pm 42.36$   $32.63 \pm 39.56$  และ  $22.00 \pm 31.72$  เปอร์เซ็นต์ และมีการเกิดใบ  $2.96 \pm 0.73$   $2.97 \pm 0.87$  และ  $2.74 \pm 0.69$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8 และ ตารางที่ 9)



ภาพที่ 4 พัฒนาการของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร  $\frac{1}{2}$ MS เป็นเวลาต่างๆ

**ตารางที่ 8** เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS

ความเข้มข้นของไฮเตอร์ (%v/v)		เปอร์เซ็นต์การงอก		
การพอกฆ่าเชื้อ		3 สัปดาห์	4 สัปดาห์	5 สัปดาห์
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	(mean±SD)	(mean±SD)	(mean±SD)
5 (0.3)	-	57.78±35.28 <sup>a</sup>	73.33±33.17 <sup>a</sup>	75.37±11.87 <sup>ab</sup>
10 (0.6)	-	7.50±17.70 <sup>b</sup>	23.75±28.49 <sup>c</sup>	23.77±8.83 <sup>de</sup>
15 (0.9)	-	28.24±33.54 <sup>b</sup>	53.68±31.31 <sup>ab</sup>	54.91±8.07 <sup>abc</sup>
20 (1.2)	-	70.00±32.66 <sup>a</sup>	75.00±34.64 <sup>a</sup>	76.79±8.83 <sup>a</sup>
25 (1.5)	-	71.00±31.44 <sup>a</sup>	78.00±32.38 <sup>a</sup>	78.00±7.86 <sup>a</sup>
5 (0.3)	5 (0.3)	32.63±38.99 <sup>b</sup>	44.21±44.51 <sup>bc</sup>	49.47±42.36 <sup>bcd</sup>
10 (0.6)	5 (0.3)	20.00±28.28 <sup>b</sup>	30.59±34.73 <sup>bc</sup>	31.76±36.78 <sup>cde</sup>
15 (0.9)	10 (0.6)	27.37±37.83 <sup>b</sup>	29.47±37.93 <sup>bc</sup>	32.63±39.56 <sup>cde</sup>
20 (1.2)	15 (0.9)	16.00±28.73 <sup>b</sup>	21.00±30.07 <sup>c</sup>	22.00±31.72 <sup>e</sup>
CV (%)		120.60	88.59	61.78
P-value		**	**	**

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์  
 \* และ \*\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ  
 ns (non-significant) แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ  
 ( ) ตัวเลขภายในวงเล็บแสดงความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์

**ตารางที่ 9** จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS

ความเข้มข้นของไฮเตอร์ (%v/v)		จำนวนใบต่อต้น		
การฟอกฆ่าเชื้อ		3 สัปดาห์	4 สัปดาห์	5 สัปดาห์
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	(mean±SD)	(mean±SD)	(mean±SD)
5 (0.3)	-	2.00±0.00	2.85±0.55 <sup>a</sup>	2.94±0.48 <sup>ab</sup>
10 (0.6)	-	2.00±0.00	2.16±0.23 <sup>b</sup>	2.30±0.34 <sup>c</sup>
15 (0.9)	-	2.00±0.00	2.51±0.65 <sup>ab</sup>	2.81±0.72 <sup>abc</sup>
20 (1.2)	-	2.00±0.00	2.95±0.36 <sup>a</sup>	3.11±0.35 <sup>ab</sup>
25 (1.5)	-	2.00±0.00	2.99±0.36 <sup>a</sup>	3.21±0.44 <sup>a</sup>
5 (0.3)	5 (0.3)	2.00±0.00	2.59±0.40 <sup>ab</sup>	2.96±0.73 <sup>ab</sup>
10 (0.6)	5 (0.3)	2.00±0.00	2.51±0.43 <sup>ab</sup>	2.54±0.44 <sup>bc</sup>
15 (0.9)	10 (0.6)	2.00±0.00	2.90±0.75 <sup>ab</sup>	2.97±0.87 <sup>ab</sup>
20 (1.2)	15 (0.9)	2.00±0.00	2.55±0.71 <sup>ab</sup>	2.74±0.69 <sup>abc</sup>
CV (%)		0.00	18.49	19.79
P-value		ns	*	*

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

\* และ \*\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ

ns (non-significant) แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

( ) ตัวเลขภายในวงเล็บแสดงความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์

### 3.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการนำชิ้นส่วนใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 9 วิธี มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร  $\frac{1}{2}$ MS เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงสุด  $82.50 \pm 37.26$  เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $43.75 \pm 40.31$  เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติกับชิ้นส่วนใบที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 เปอร์เซ็นต์ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ  $52.50 \pm 41.28$   $55.00 \pm 42.61$   $55.00 \pm 42.61$   $52.50 \pm 47.23$  และ  $47.50 \pm 47.23$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $78.57 \pm 39.34$   $81.25 \pm 37.20$   $43.75 \pm 49.55$   $72.22 \pm 26.35$  และ  $43.75 \pm 41.73$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนใบที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ  $10.00 \pm 30.78$   $10.00 \pm 30.78$  และ  $25.00 \pm 34.41$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $50.00 \pm 0.00$   $25.00 \pm 35.36$  และไม่มีการรอดชีวิต ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

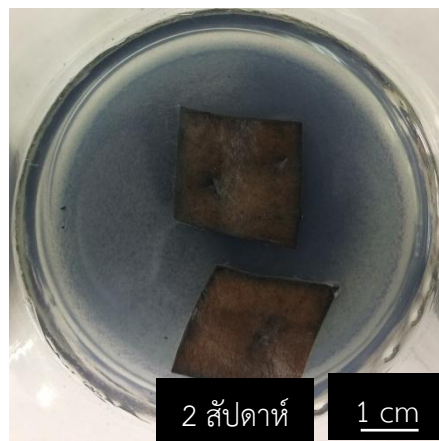
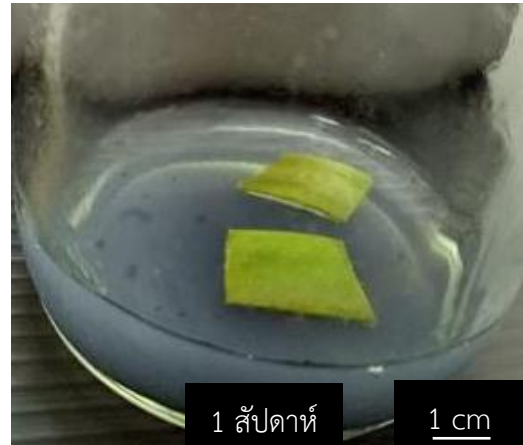
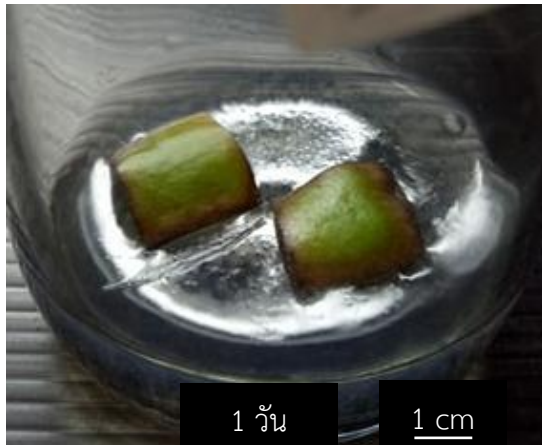
จากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยไฮเตอร์ แล้วเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ขอบใบเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีการพัฒนาของชิ้นส่วนใบ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ชิ้นส่วนใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั่วทั้งแผ่นใบและตายในที่สุด (ภาพที่ 5)

**ตารางที่ 10** เปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

ความเข้มข้นของไฮเตอร์ (%v/v)		เปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อ (mean±SD)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (mean±SD)
การพอกฆ่าเชื้อ			
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2		
5 (0.3)	-	52.50±41.28 <sup>b</sup>	78.57±39.34 <sup>a</sup>
10 (0.6)	-	55.00±42.61 <sup>b</sup>	81.25±37.20 <sup>a</sup>
15 (0.9)	-	55.00±42.61 <sup>b</sup>	43.75±49.55 <sup>ab</sup>
20 (1.2)	-	52.50±47.23 <sup>b</sup>	72.22±26.35 <sup>a</sup>
25 (1.5)	-	47.50±47.23 <sup>bc</sup>	43.75±41.73 <sup>ab</sup>
5 (0.3)	5 (0.3)	10.00±30.78 <sup>d</sup>	50.00±0.00 <sup>ab</sup>
10 (0.6)	5 (0.3)	10.00±30.78 <sup>d</sup>	25.00±35.36 <sup>ab</sup>
15 (0.9)	10 (0.6)	25.00±34.41 <sup>cd</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>
20 (1.2)	15 (0.9)	82.50±37.26 <sup>a</sup>	43.75±40.81 <sup>ab</sup>
CV (%)		135.71	63.97
P-value		Ns	*

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์  
\* และ \*\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ  
ns (non-significant) แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ  
( ) ตัวเลขภายในวงเล็บแสดงความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์





ภาพที่ 5 ลักษณะชิ้นส่วนใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS

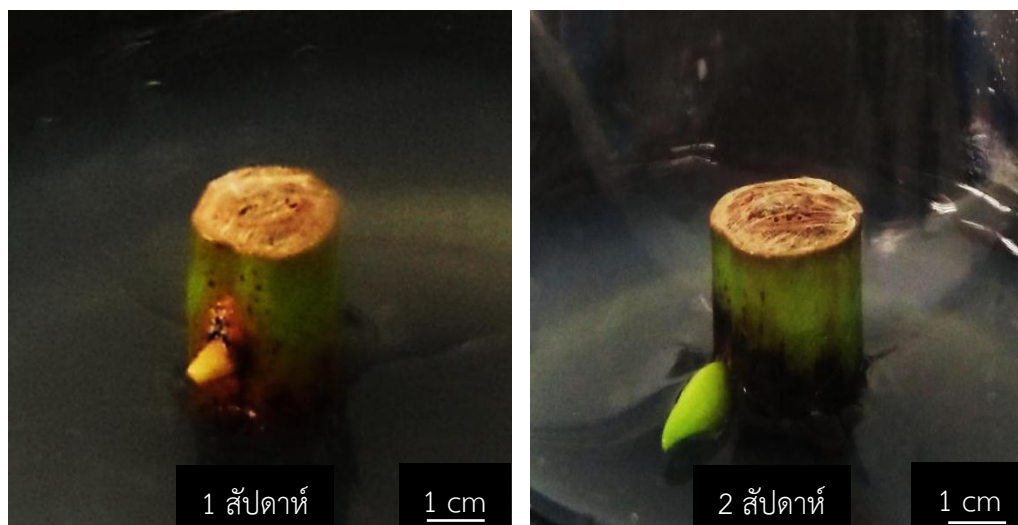
### 3.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยสารละลายไฮเตอร์ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีการปลดเชื้อสูงสุด  $60.00 \pm 50.26$  เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ การฟอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ด้วยไฮเตอร์ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ การฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยไฮเตอร์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 35 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 45 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อ  $30.00 \pm 47.02$   $40.00 \pm 50.26$   $40.00 \pm 50.26$   $30.00 \pm 47.02$   $40.00 \pm 50.26$   $40.00 \pm 50.26$  และ  $50.00 \pm 51.30$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วนที่ปลดเชื้อเริ่มมีการงอกของตาข้างเป็นลักษณะแหลมแทงออกมา และตาข้างมีสีเขียวอ่อน มีการเจริญเติบโตขยายขนาดเพิ่มขึ้น ในขณะที่บางชิ้นส่วนมีลักษณะดำเป็นสีดำเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนไม่มีการเจริญเติบโตและตายทั้งหมด จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 6)

**ตารางที่ 11** เเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ความเข้มข้นของไฮเตอร์ (%v/v)		เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย (mean±SD)
การฟอกฆ่าเชื้อ		
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
15 (0.9)	-	15.00±36.64 <sup>c</sup>
20 (1.2)	-	30.00±47.02 <sup>abc</sup>
30 (1.8)	-	20.00±41.04 <sup>bc</sup>
40 (2.4)	-	40.00±50.26 <sup>abc</sup>
50 (3.0)	-	60.00±50.26 <sup>a</sup>
15 (0.9)	10 (0.6)	40.00±50.26 <sup>abc</sup>
20 (1.2)	15 (0.9)	30.00±47.02 <sup>abc</sup>
30 (1.8)	25 (1.6)	40.00±50.26 <sup>abc</sup>
40 (2.4)	35 (2.1)	40.00±50.26 <sup>abc</sup>
50 (3.0)	45 (2.7)	50.00±51.30 <sup>ab</sup>
CV (%)		145.19
P-value		*

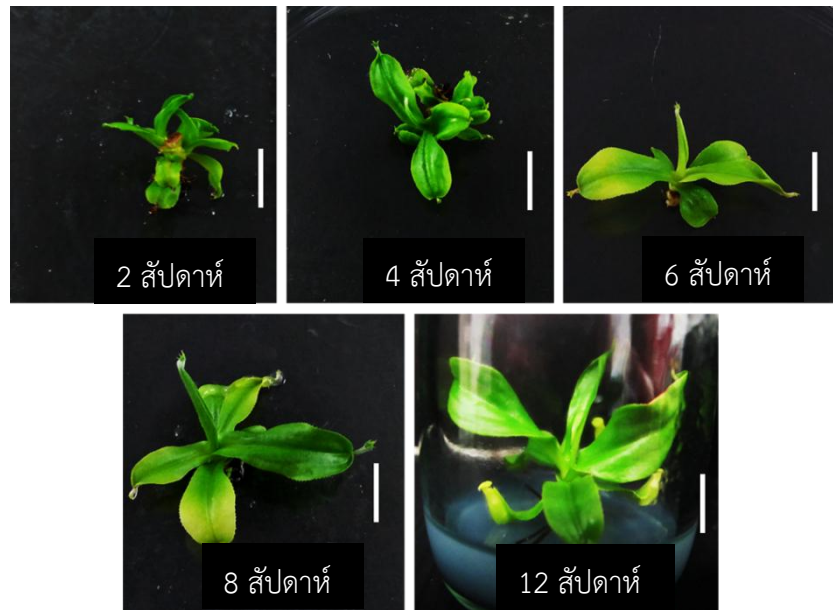
**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เเปอร์เซ็นต์  
\* และ \*\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ  
ns (non-significant) แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ  
( ) ตัวเลขภายในวงเล็บแสดงความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์



ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตขึ้นส่วนข้อหม้อข้าวหม้อแกงลิงสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS

### 3.1.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง

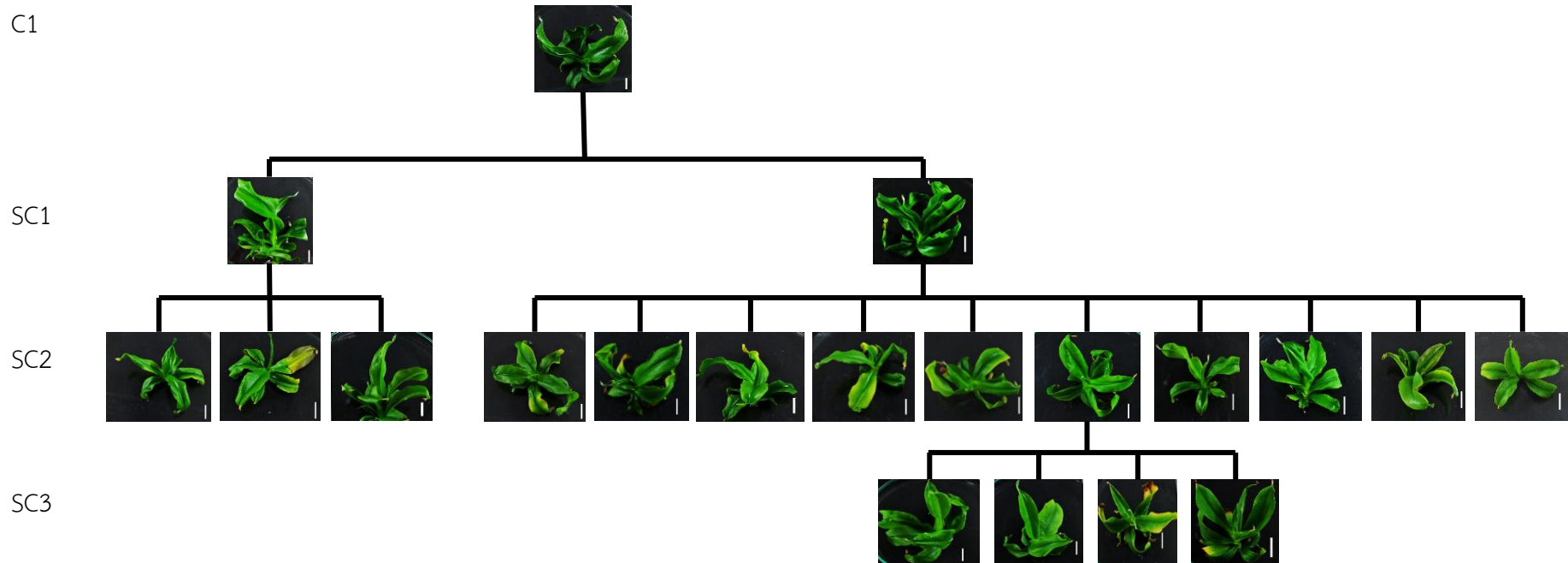
จากการนำต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 1 ปี มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ทุกๆ 2 สัปดาห์ พบว่า ตาข้างมีการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีการสร้างใบสมบูรณ์ 2-3 ใบ ใบขยายใหญ่ขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 และ 6 สัปดาห์ และในสัปดาห์ที่ 8 ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงมีการสร้างใบสมบูรณ์เพิ่มขึ้น 5-6 ใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงมีการเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ มีการสร้างใบและรากเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 7) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการย้ายเลี้ยงจำนวน 50 สายต้น พบว่า มีเพียง 4 สายต้น ที่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ จำนวน 3 รุ่น โดยสายต้นที่ 1 มีต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่สามารถเจริญเติบโตในรุ่นที่ 1 จำนวน 2 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 13 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 4 ต้น สายต้นที่ 2 สามารถเจริญเติบโตในรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 3 ต้น ส่วนสายต้นที่ 3 สามารถเจริญเติบโตในรุ่นที่ 1 จำนวน 2 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 6 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 4 ต้น และสายต้นที่ 4 สามารถเจริญเติบโตในรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 5 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 ลักษณะยอดของหน่อข้าวหน่อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร  $\frac{1}{2}$ MS เป็นเวลาต่างๆ

— = 1 เซนติเมตร

ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

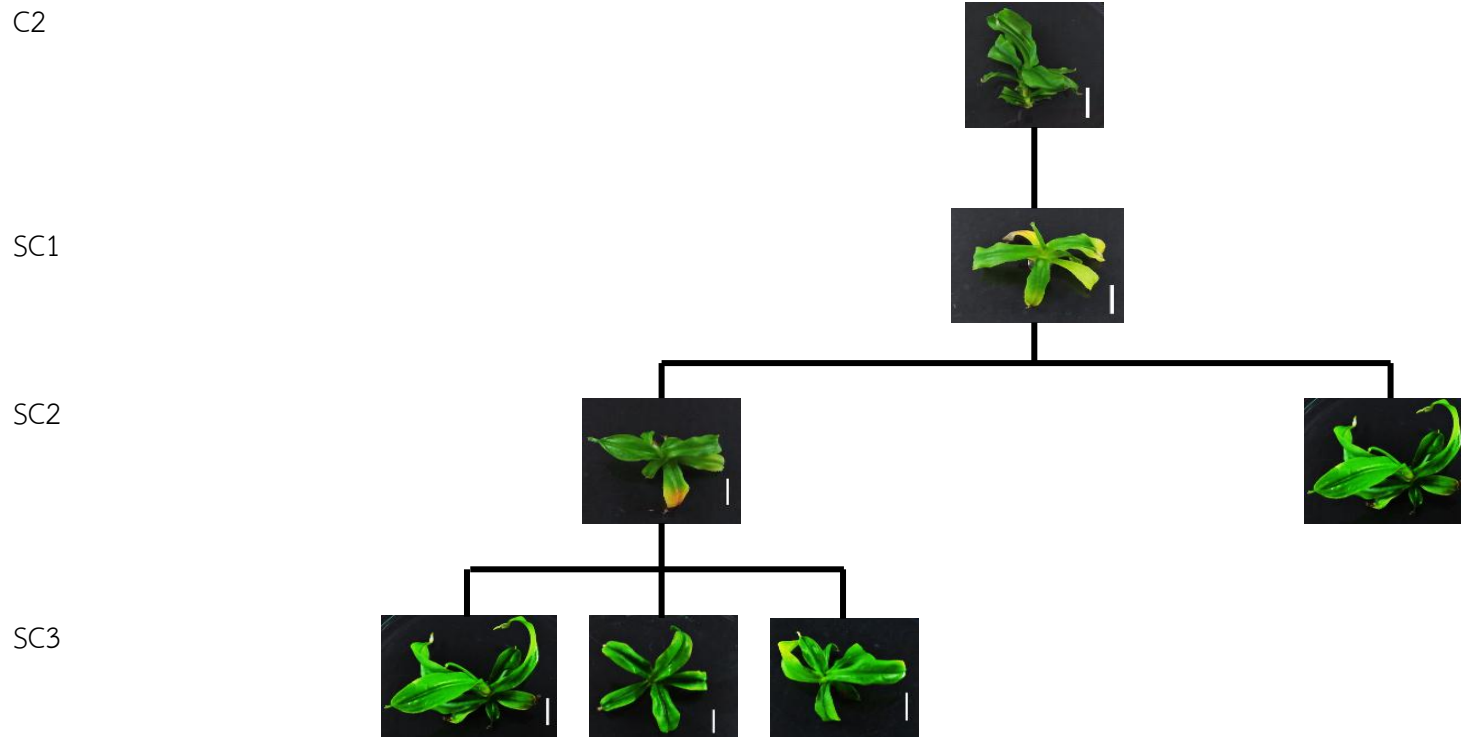


หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

— = 1 เซนติเมตร

ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ต่อ)

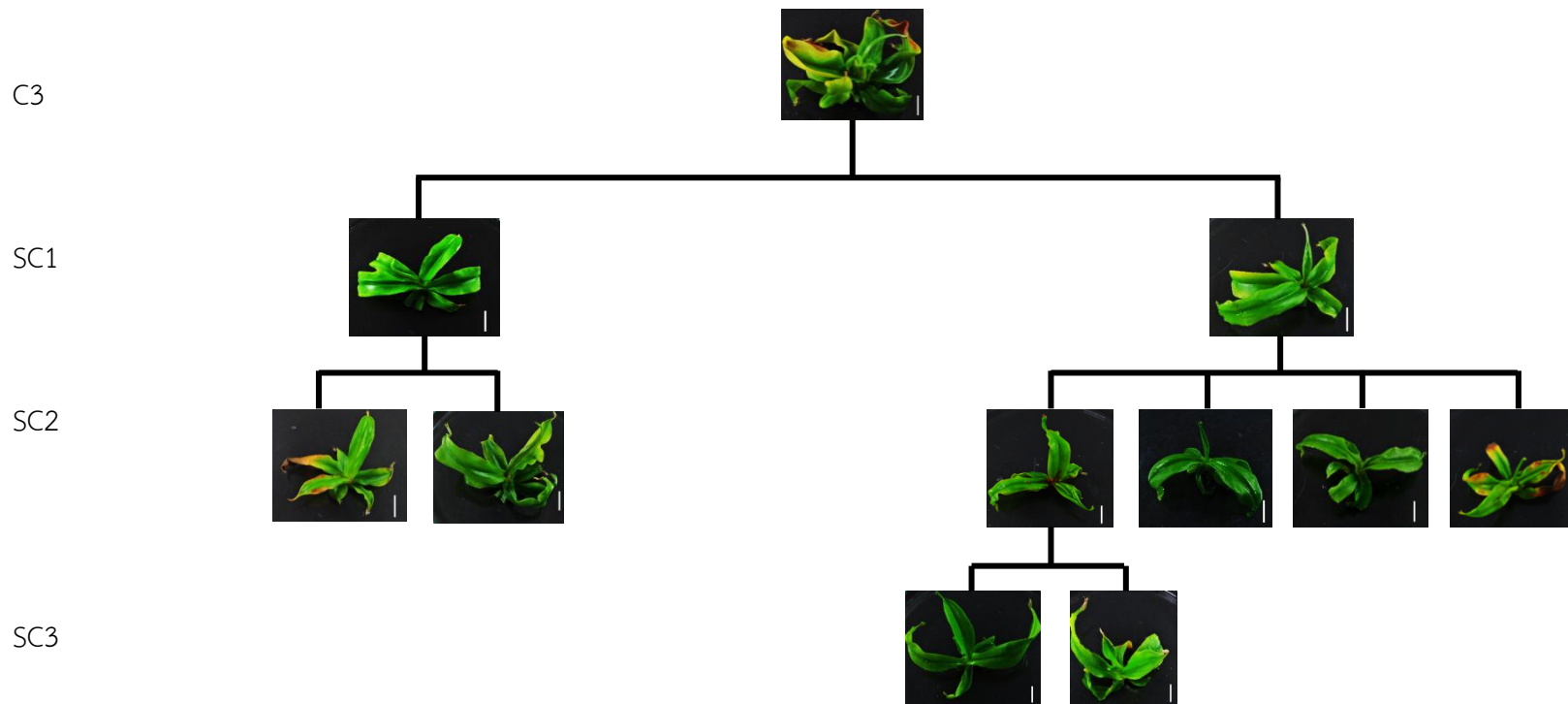


หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

— = 1 เซนติเมตร

ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ต่อ)



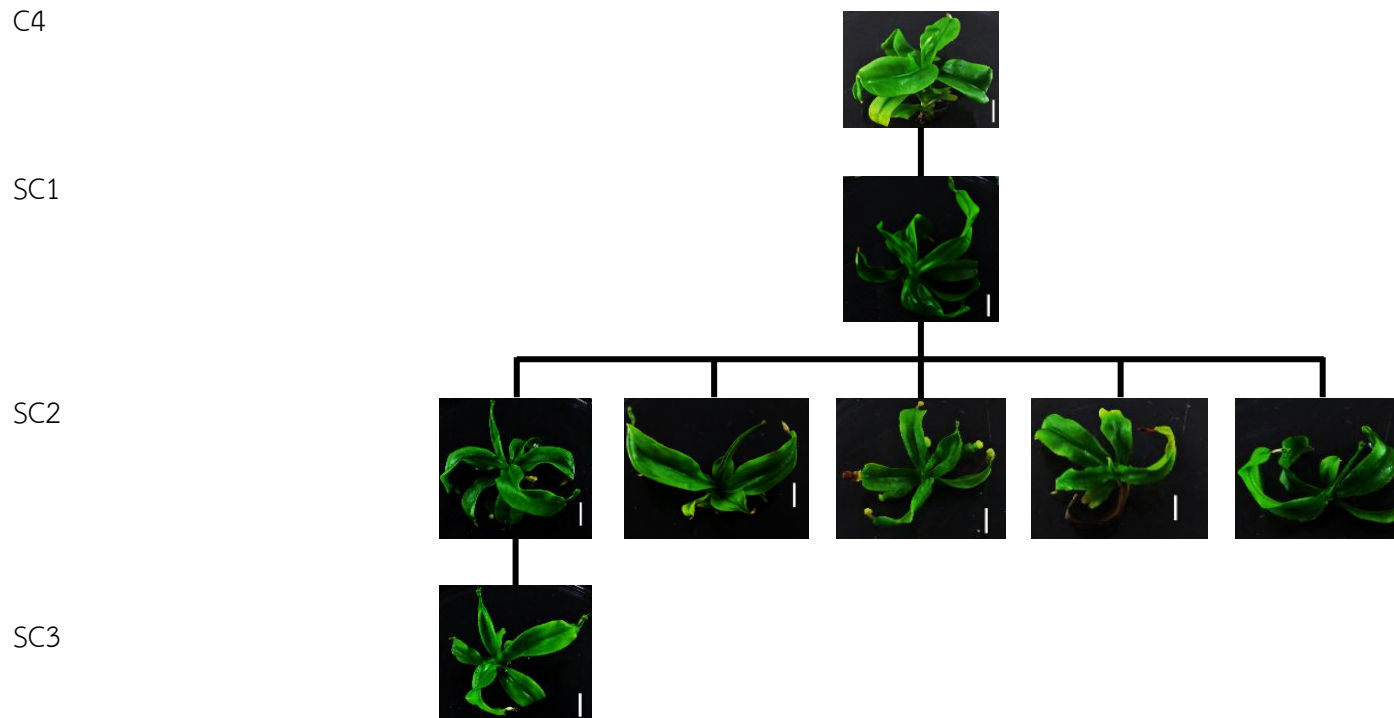
หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

— = 1 เซนติเมตร



ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ต่อ)



หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

— = 1 เซนติเมตร

### 3.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สันฐานวิทยา และสรีรวิทยา

#### 3.2.1 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ไอเอสเอสอาร์ และเอสเอสอาร์

##### 3.2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการดัดแปลงของ Doyle และ Doyle (1987) เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อที่ได้เพิ่มปริมาณจำนวน 3 รุ่น และต้นแม่มาวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ทุกตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และเมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific) พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ในสายต้นที่ 1 มีสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร ในช่วง 1.42 ถึง 1.85 และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเออยู่ในช่วง 209.9 ถึง 1553.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สายต้นที่ 2 มีคุณภาพดีเอ็นเอในช่วง 1.60 ถึง 1.80 และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเออยู่ในช่วง 399.4 ถึง 1366.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สายต้นที่ 3 มีคุณภาพดีเอ็นเอในช่วง 1.64 ถึง 1.91 และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเออยู่ในช่วง 469.1 ถึง 1735.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และสายต้นที่ 4 มีคุณภาพดีเอ็นเอในช่วง 1.62 ถึง 2.22 และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเออยู่ในช่วง 679.4 ถึง 1140.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 12) จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเจือจางให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป (ตารางที่ 13)

**ตารางที่ 12** ความเข้มข้นและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific)

ตัวอย่าง	คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ (OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> )	ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ng/μl)
C1	1.61	313.1
SC1_1	1.49	354.7
SC1_2	1.56	302.7
SC2_1-1	1.75	381.9
SC2_1-2	1.64	409.6
SC2_1-3	1.60	276.0
SC2_2-1	1.47	226.7
SC2_2-2	1.85	632.9
SC2_2-3	1.68	1058.9
SC2_2-4	1.57	564.7
SC2_2-5	1.49	766.5
SC2_2-6	1.60	273.1
SC2_2-7	1.47	209.9
SC2_2-8	1.42	516.4
SC2_2-9	1.81	570.1
SC2_2-10	1.78	1089.6
SC3_2-6-1	1.77	1383.8
SC3_2-6-2	1.55	404.8
SC3_2-6-3	1.78	1553.2
SC3_2-6-4	1.81	1460.1

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิง ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific) (ต่อ)

ตัวอย่าง	คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ (OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> )	ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ng/μl)
C2	1.60	399.4
SC1_1	1.68	570.1
SC2_1-1	1.73	1366.8
SC2_1-2	1.67	646.1
SC3_1-1-1	1.77	800.6
SC3_1-1-2	1.60	430.8
SC3_1-2-1	1.80	1047.2
C3	1.69	959.2
SC1_1	1.71	648.2
SC1_2	1.74	814.7
SC2_1.1	1.77	869.2
SC2_1.2	1.64	594.3
SC2_2.1	1.68	469.1
SC2_2.2	1.77	826.9
SC2_2.3	1.76	715.6
SC2_2.4	1.74	1359.7
SC3_1-2-1	1.79	1735.2
SC3_1-2-2	1.91	1422.5
SC3_2-1-1	1.77	845.1
F3SC3.2.1.2	1.80	970.3

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิง ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific) (ต่อ)

ตัวอย่าง	คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ (OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> )	ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ng/μl)
C4	1.62	893.4
SC1_1	1.79	935.2
SC2_1-1	1.81	909.7
SC2_1-2	2.22	679.4
SC2_1-3	1.84	1104.5
SC2_1-4	1.79	567.6
SC2_1-5	1.82	1140.8
SC3_1-1	1.64	1029.9

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

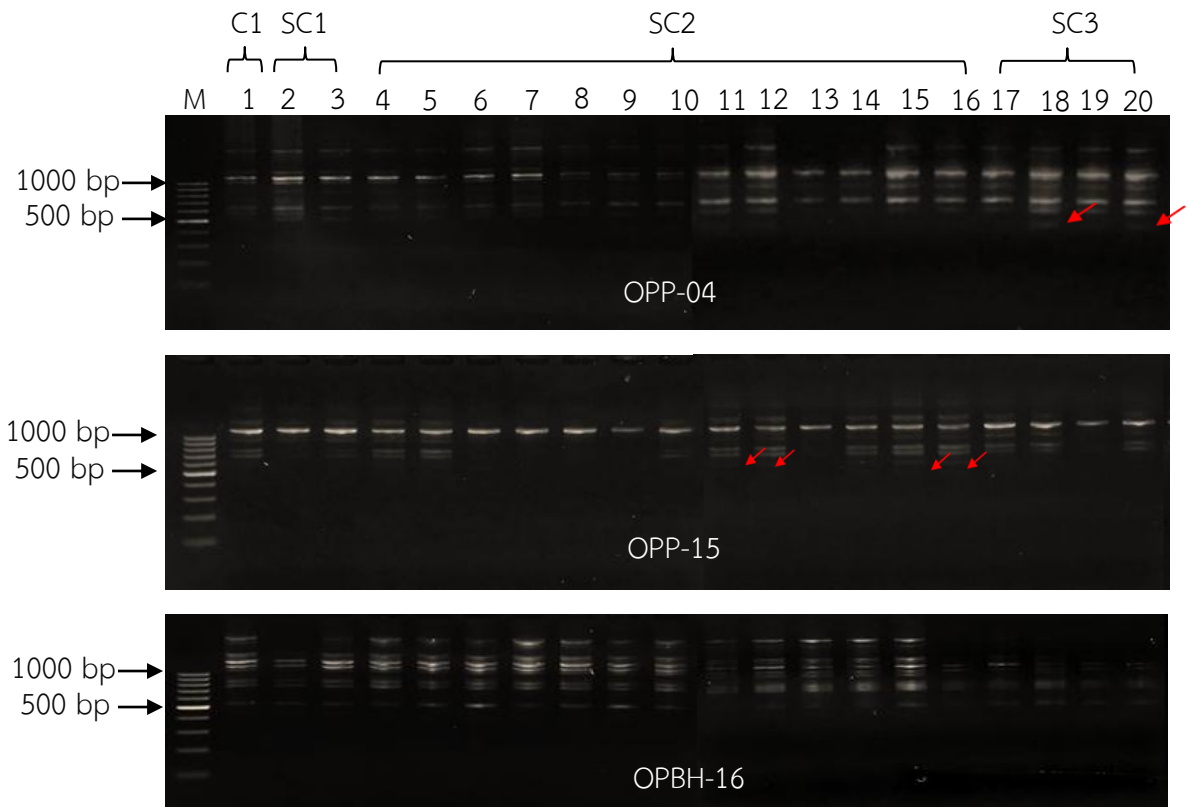
### 3.2.1.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ หม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

จากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 16 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 14 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิงได้ ได้แก่ OPA-11 OPH-05 OPH-13 OPK-19 OPP-04 OPP-07 OPP-08 OPP-09 OPP-15 OPP-19 OPBH-08 OPBH-16 OPBH-20 และ Primer Sex ซึ่งไพรเมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลิมอร์ฟิซึมสูงสุด 60.00 เปอร์เซ็นต์ คือ ไพรเมอร์ OPH-13 รองลงมาคือ ไพรเมอร์ OPBH-08 OPP-09 OPBH-16 OPP-08 OPA-11 OPP-04 OPP-19 OPP-15 OPP-07 Primer-sex OPBH-20 และ OPH-05 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่ 50.00 44.44 42.86 37.50 33.33 33.33 30.00 28.57 25.00 25.00 20.00 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไพรเมอร์ OPK-19 ไม่เกิดโพลิมอร์ฟิซึม เมื่อนำผลการตรวจสอบสายพิมพ์ดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงจำนวน 48 ตัวอย่าง ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจำนวน 14 ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ค่า PIC พบว่า มีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.00-0.47 โดยมีค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.22 โดยไพรเมอร์ OPH-13 ให้ค่า PIC สูงสุด เท่ากับ 0.47 และไพรเมอร์ OPK-19 ให้ค่า PIC ต่ำสุด เท่ากับ 0.00 (ตารางที่ 13)

เมื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออยู่กับต้นแม่ พบว่า มีเพียง 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถตรวจพบความแตกต่างของลำดับเบสได้ใน 2 สายต้น หม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ OPP-04 พบลำดับเบสดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 3 จำนวน 2 ต้น ไพรเมอร์ OPP-09 พบลำดับเบสดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 4 ต้น (ภาพที่ 9) ส่วนสายต้นที่ 2 และ 3 ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม (ภาพที่ 10 และ 11) และเมื่อตรวจสอบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ด้วยไพรเมอร์ OPBH-16 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 12)

**ตารางที่ 13** การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พะเยาเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 14 ไพรเมอร์ แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่าง

Primer Name	Amplified fragment	Polymorphic fragments	Polymorphic (%)	polymorphic information content (PIC)
OPA-11	6	2	33.33	0.31
OPH-05	6	1	16.67	0.05
OPH-13	10	6	60.00	0.47
OPK-19	7	0	0.00	0.00
OPP-04	9	3	33.33	0.31
OPP-07	8	2	25.00	0.22
OPP-08	8	3	37.50	0.25
OPP-09	9	4	44.44	0.35
OPP-15	7	2	28.57	0.25
OPP-19	10	3	30.00	0.23
OPBH-08	8	4	50.00	0.16
OPBH-16	7	3	42.86	0.22
OPBH-20	10	2	20.00	0.17
Primer-sex	8	2	25.00	0.07
Average	8.07	2.64	31.91	0.22



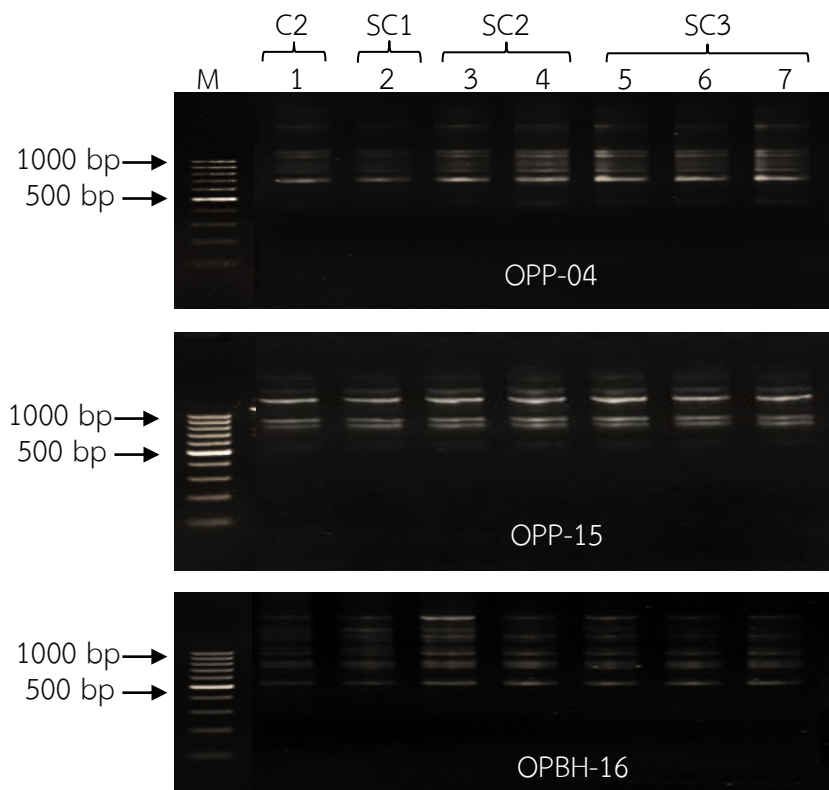
ภาพที่ 9 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
 รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น

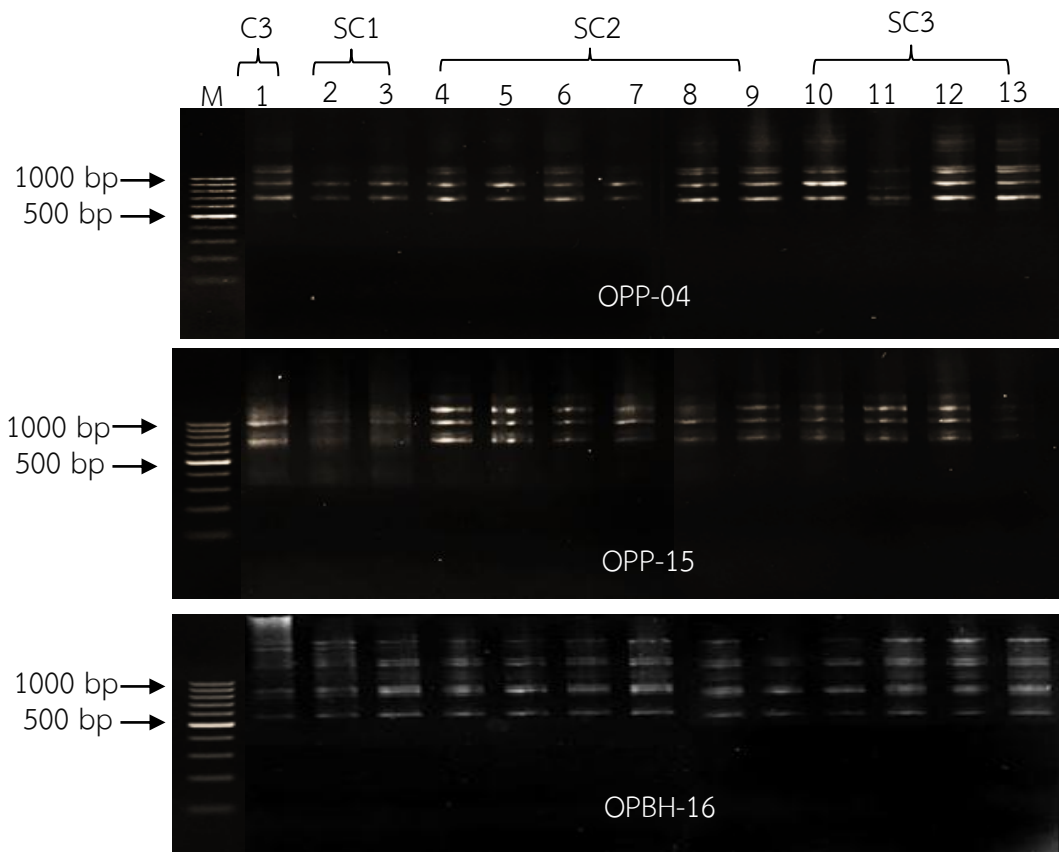




ภาพที่ 10 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

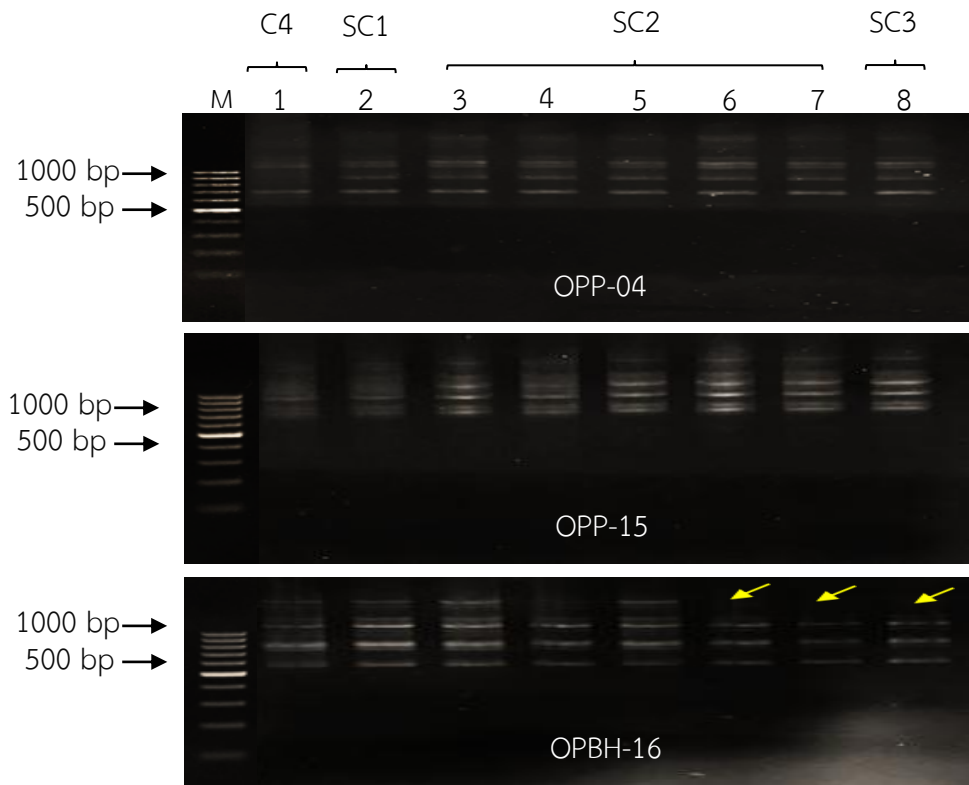
SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)



ภาพที่ 11 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)



ภาพที่ 12 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
 รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย

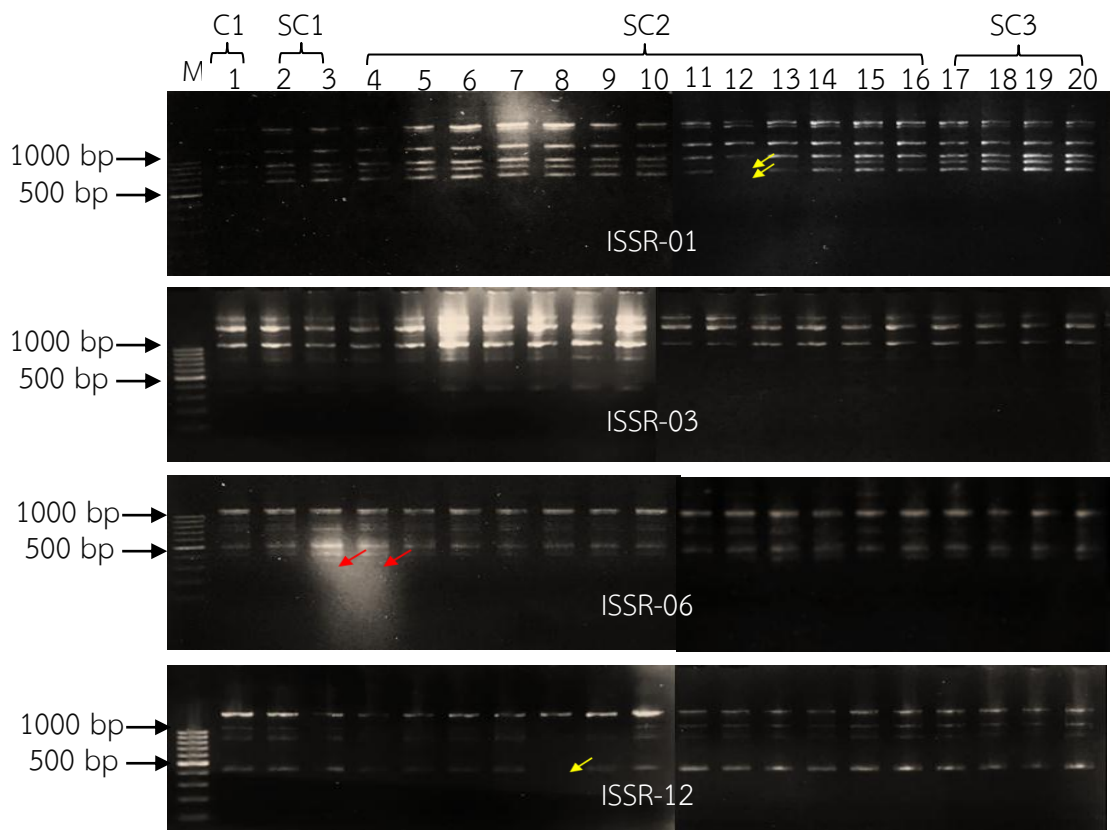
### 3.2.1.3 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ หม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 15 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ทั้ง 15 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งไพรเมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลิมอร์ฟิซึมสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ คือ ไพรเมอร์ ISSR-12 ส่วนไพรเมอร์ ISSR-01 ISSR-02 ISSR-03 ISSR-04 ISSR-05 ISSR-06 ISSR-07 ISSR-08 ISSR-10 ISSR-13 และ ISSR-15 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่ 33.33 50.00 50.00 16.67 50.00 36.36 25.00 11.11 12.50 25.00 และ 20.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไพรเมอร์ ISSR-09 ISSR-11 และ ISSR-14 ไม่เกิดโพลิมอร์ฟิซึม เมื่อนำผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิง 48 ตัวอย่าง ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์จำนวน 15 ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ค่า PIC พบว่า มีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.00-0.39 โดยมีค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.18 โดยไพรเมอร์ ISSR-12 ให้ค่า PIC สูงสุด เท่ากับ 0.39 และไพรเมอร์ ISSR-09 ISSR-11 และ ISSR-14 ให้ค่า PIC ต่ำสุด เท่ากับ 0.00 (ตารางที่ 14)

เมื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้นแม่ พบว่า มีเพียง 4 ไพรเมอร์ ที่สามารถตรวจพบความแตกต่างของลำดับเบสได้ใน 3 สายต้น หม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ ISSR-01 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 2 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น ไพรเมอร์ ISSR-06 พบลำดับเบสดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และ รุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น และไพรเมอร์ ISSR-12 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 13) เมื่อตรวจสอบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ ISSR-01 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และ ISSR-03 พบลำดับเบสดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 3 ต้น (ภาพที่ 14) เมื่อตรวจสอบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม (ภาพที่ 15) และเมื่อตรวจสอบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ด้วยไพรเมอร์ ISSR-12 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 16)

**ตารางที่ 14** การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พะาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ จำนวน 15 ไพรเมอร์ แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่าง

Primer Name	Amplified fragment	Polymorphic fragments	Polymorphic (%)	polymorphic information content (PIC)
ISSR-01	6	2	33.33	0.13
ISSR-02	8	4	50.00	0.28
ISSR-03	6	3	50.00	0.35
ISSR-04	6	1	16.67	0.05
ISSR-05	8	4	50.00	0.41
ISSR-06	11	4	36.36	0.18
ISSR-07	4	1	25.00	0.24
ISSR-08	9	1	11.11	0.09
ISSR-09	4	0	0.00	0.00
ISSR-10	8	1	12.50	0.10
ISSR-11	4	0	0.00	0.00
ISSR-12	9	7	77.78	0.39
ISSR-13	4	1	25.00	0.24
ISSR-14	4	0	0.00	0.00
ISSR-15	5	1	20.00	0.16
Average	6.4	2	27.18	0.18



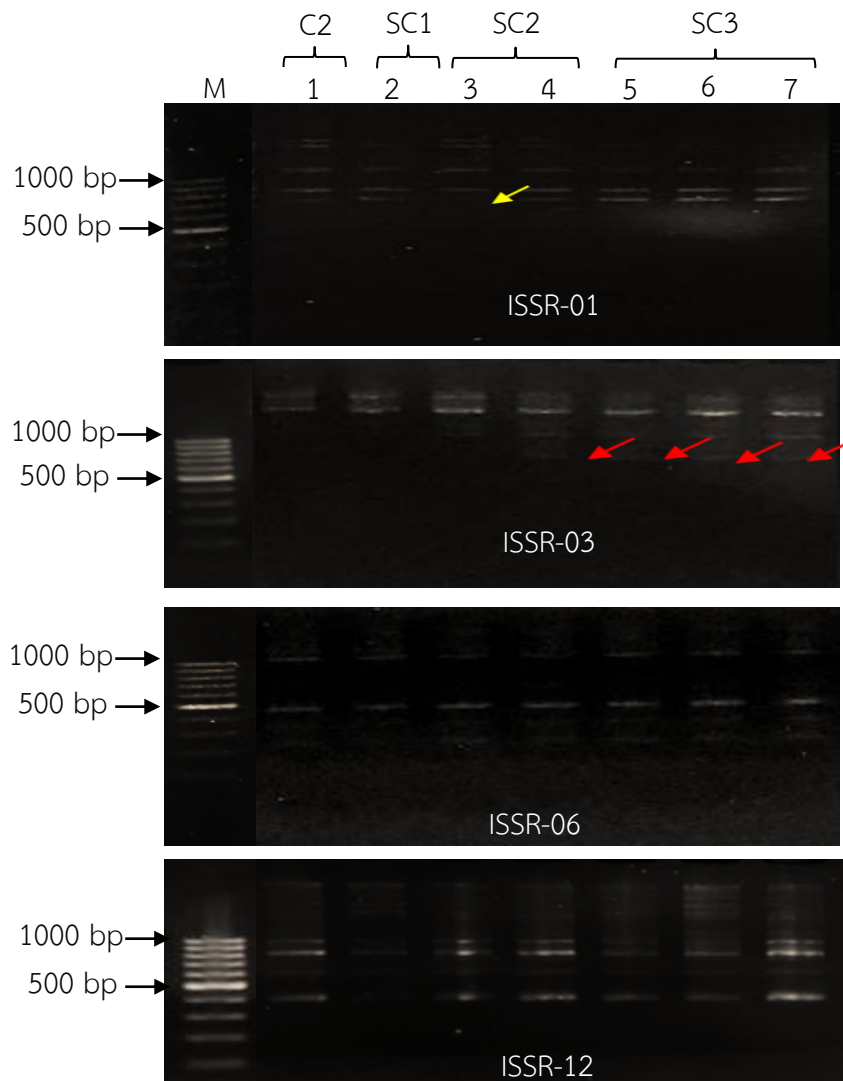
ภาพที่ 13 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย



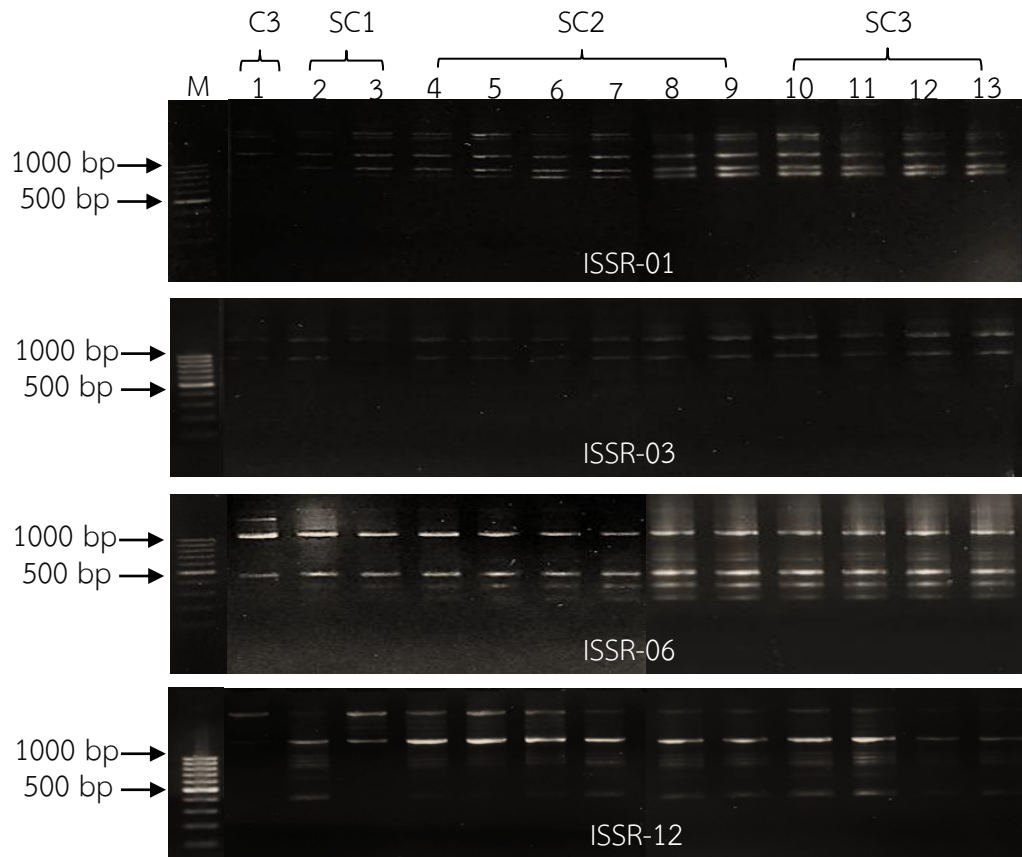
ภาพที่ 14 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย

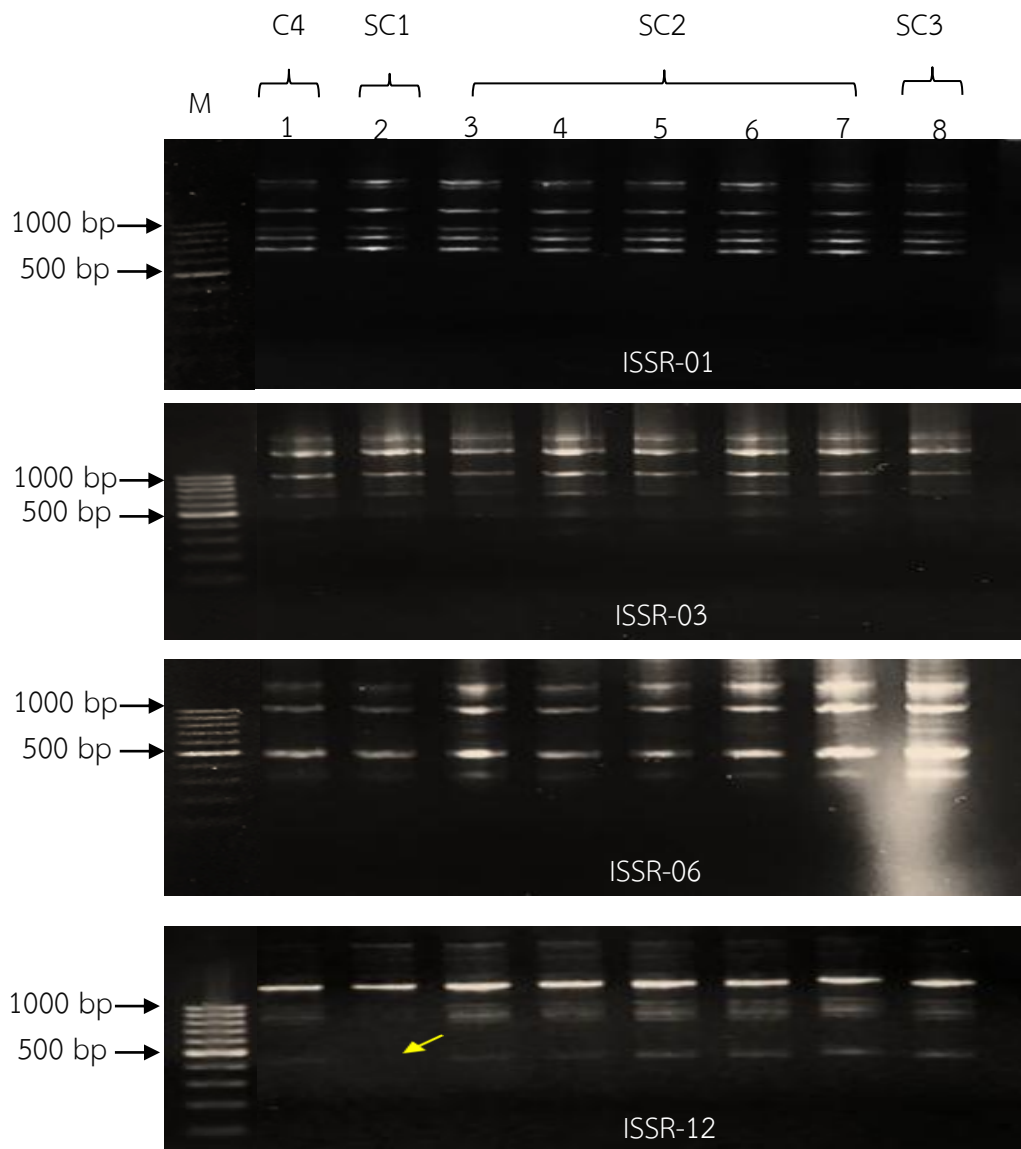


ภาพที่ 15 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)





**ภาพที่ 16** รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

**หมายเหตุ** C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย

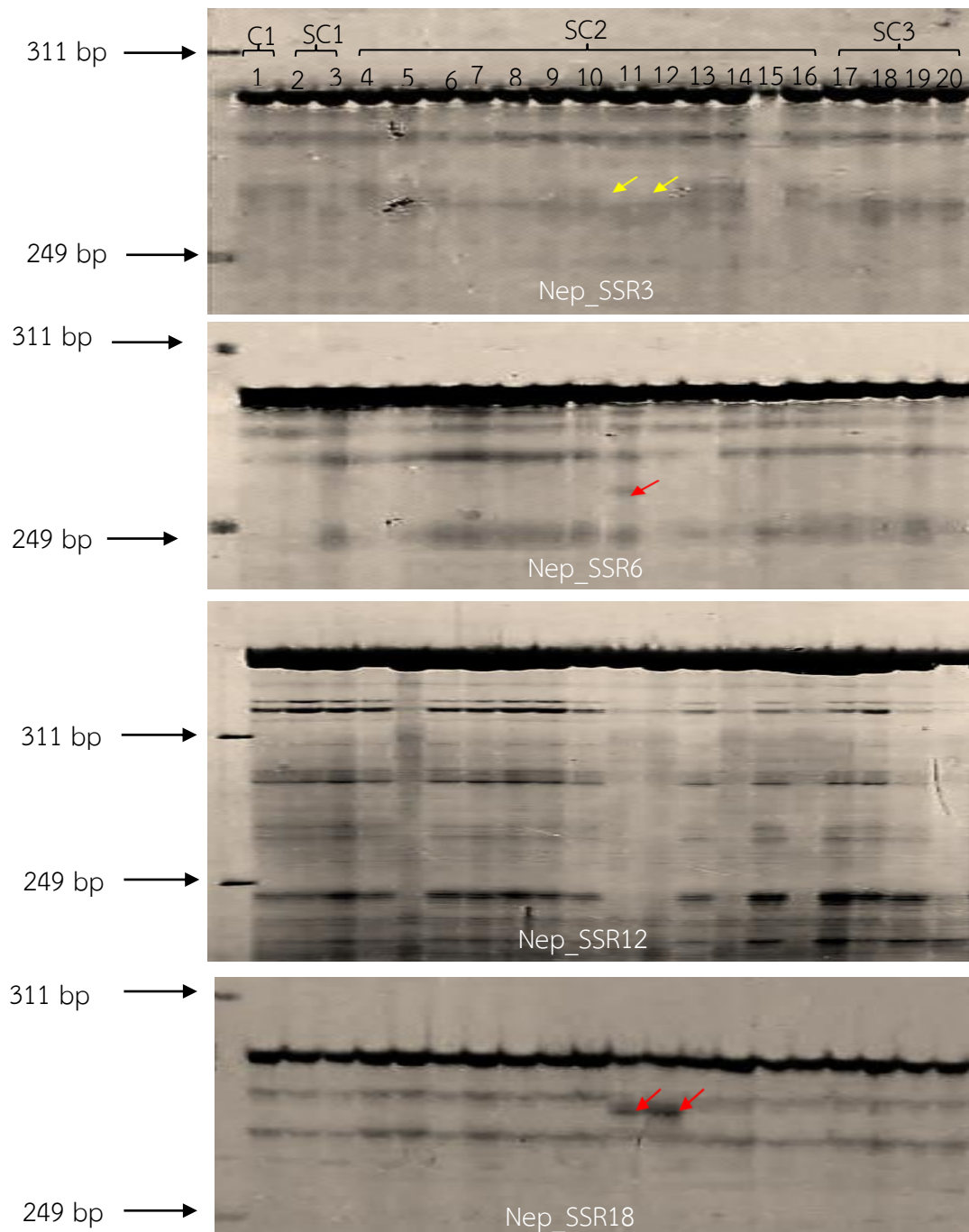
### 3.2.1.4 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ หม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เทคนิคเอสเอสอาร์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์ จำนวน 5 ไพโรมอร์ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 5 ไพโรมอร์ ซึ่งไพโรมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด โพลิมอร์ฟิซึมสูงสุด 42.86 เปอร์เซ็นต์ คือ ไพโรมอร์ Nep\_SSR18 รองลงมาคือ ไพโรมอร์ Nep\_SSR3 Nep\_SSR6 และ Nep\_SSR12 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่ 33.33 16.67 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไพโรมอร์ Nep\_SSR1 ไม่เกิดโพลิมอร์ฟิซึม เมื่อนำผลการตรวจสอบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิง 48 ตัวอย่าง ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคเอสเอสอาร์จำนวน 5 ไพโรมอร์ มาวิเคราะห์ค่า PIC พบว่า มีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.00-0.41 โดยมีค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.14 โดยไพโรมอร์ Nep\_SSR18 ให้ค่า PIC สูงสุด เท่ากับ 0.41 และไพโรมอร์ Nep\_SSR1 ให้ค่า PIC ต่ำสุด เท่ากับ 0.00 (ตารางที่ 15)

เมื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นแม่ พบว่า มีเพียง 4 ไพโรมอร์ สามารถตรวจพบความแตกต่าง ของลำดับเบสได้ใน 3 สายต้น หม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 เมื่อตรวจสอบด้วยไพโรมอร์ Nep\_SSR พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น ไพโรมอร์ Nep\_SSR6 พบ ลำดับเบสดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และไพโรมอร์ Nep\_SSR18 พบ ลำดับเบสดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น (ภาพที่ 17) เมื่อตรวจสอบ หม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ด้วยไพโรมอร์ Nep\_SSR18 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 18) เมื่อตรวจสอบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ด้วย ไพโรมอร์ Nep\_SSR3 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 2 จำนวน 3 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 19) และเมื่อตรวจสอบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ด้วยไพโรมอร์ Nep\_SSR3 พบลำดับเบสดีเอ็นเอขาดหายและเพิ่มขึ้นจำนวน 1 แถบ ในรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น และ รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น และไพโรมอร์ Nep\_SSR12 พบลำดับเบสดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวน 2 แถบ ในรุ่น ที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 20)

**ตารางที่ 15** การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พะเยาเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิค SSR จำนวน 5 ไพรเมอร์ แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่าง

Primer Name	Amplified fragment	Polymorphic fragments	Polymorphic (%)	polymorphic information content (PIC)
Nep_SSR1	9	0	0	0
Nep_SSR3	6	2	33.33	0.09
Nep_SSR6	6	1	16.67	0.17
Nep_SSR12	31	1	16.67	0.01
Nep_SSR18	7	3	42.86	0.41
Average	11.8	1.4	21.90	0.14



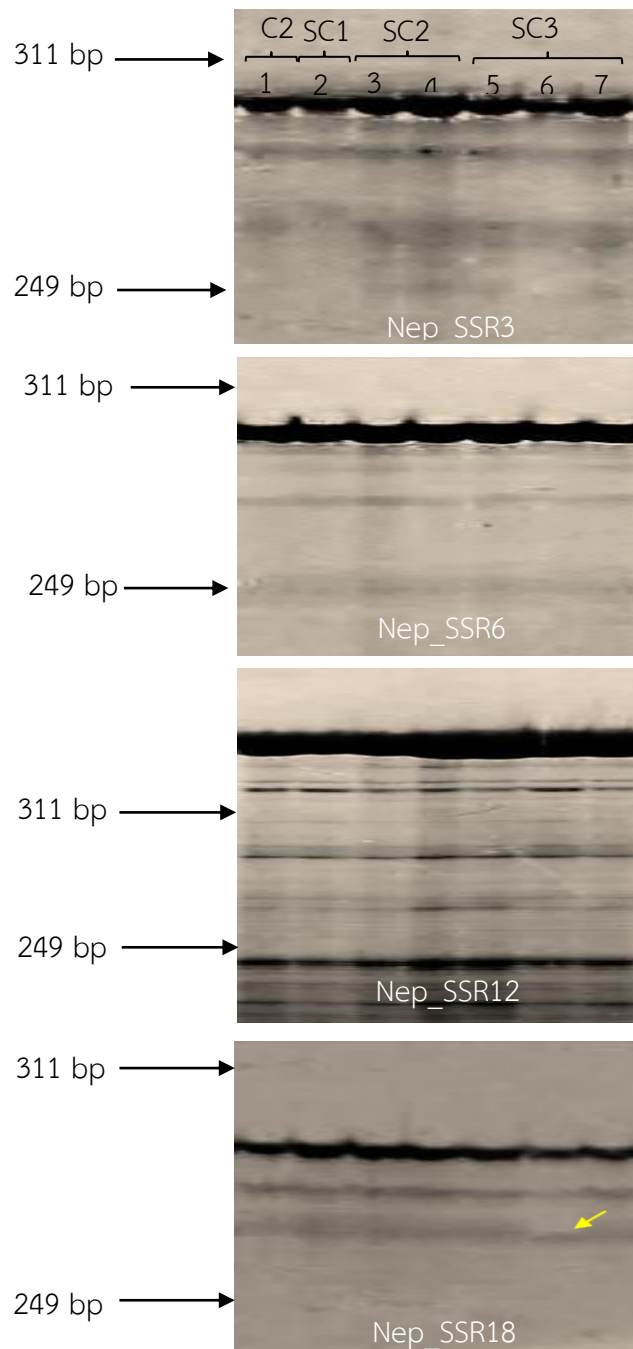
ภาพที่ 17 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค ไอเอสเอสอาร์

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย

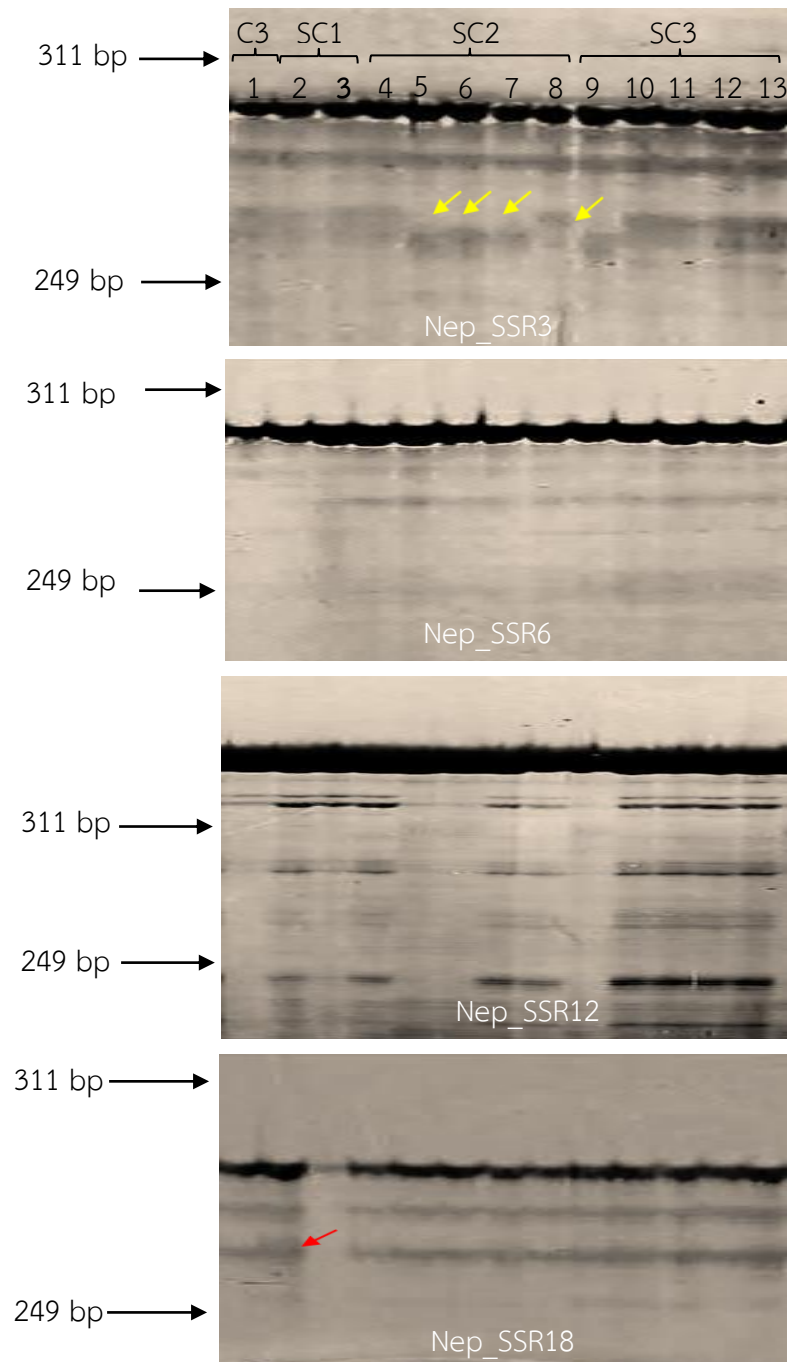


ภาพที่ 18 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 2 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย



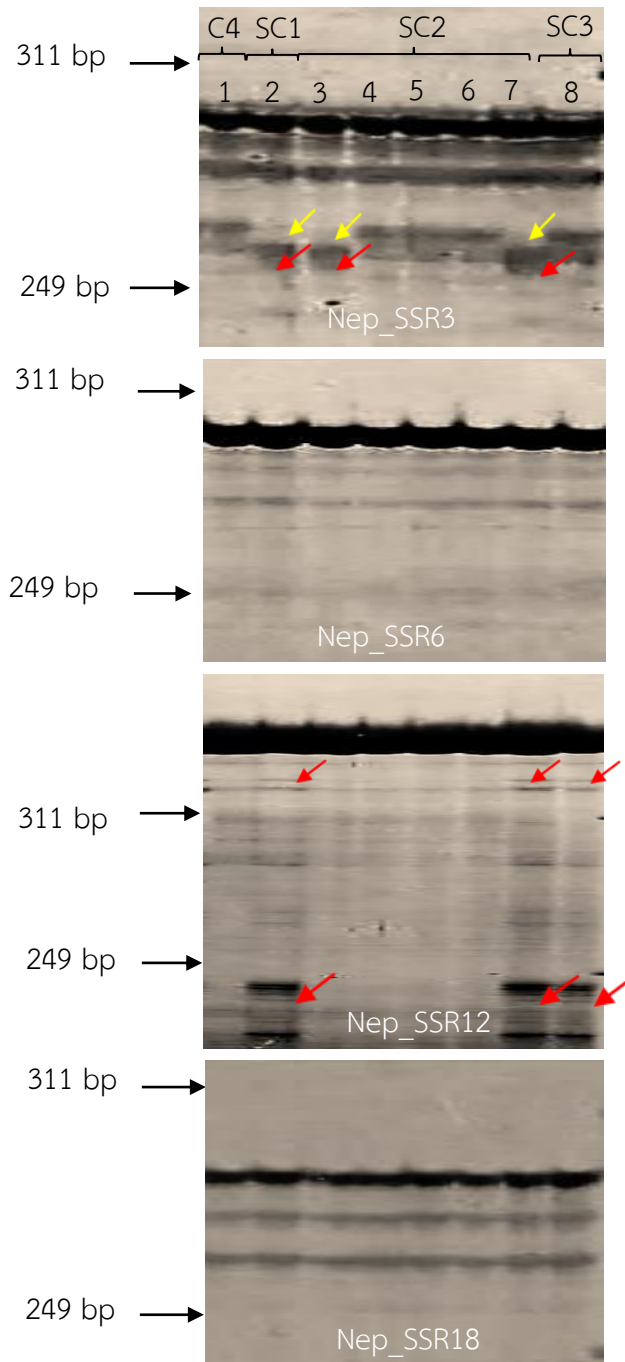
ภาพที่ 19 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 3 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค ไอเอสเอสอาร์

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย



ภาพที่ 20 รูปแบบดีเอ็นเอจากใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายต้นที่ 4 ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค ไอเอสเอสอาร์

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น

→ = ลูกศรชี้ตำแหน่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ขาดหาย

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี ไอเอสเอสอาร์ และ เอสเอสอาร์ พบว่า การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 1 รุ่นที่ 2 จำนวน 4 ต้น รุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น และสายต้นที่ 4 รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น รุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น ส่วนการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 1 รุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 3 ต้น สายต้นที่ 2 รุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น รุ่นที่ 3 จำนวน 3 และสายต้นที่ 4 รุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น และการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 1 รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น สายต้นที่ 2 รุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น สายต้นที่ 3 รุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 4 ต้น และสายต้นที่ 4 รุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น (ตารางที่ 16)

การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี รุ่นที่ 2 และ รุ่นที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม  $5.90 \pm 5.24$  และ  $12.50 \pm 12.50$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ตรวจสอบพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมรุ่นที่ 1-3 มีเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม  $9.38 \pm 11.97$   $7.69 \pm 6.71$  และ  $6.25 \pm 12.50$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ตรวจสอบพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมรุ่นที่ 1-3 มีเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม  $9.38 \pm 11.97$   $12.61 \pm 15.11$  และ  $8.33 \pm 11.79$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 17)



ตารางที่ 16 ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม เมื่อตรวจสอบพบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

สายต้น	ตัวอย่าง	เครื่องหมายที่ตรวจสอบ		
		RAPD	ISSR	SSR
C1	SC1_2		✓	
	SC2_1-1		✓	
	SC2_2-2		✓	
	SC2_2-5	✓		✓
	SC2_2-6	✓	✓	✓
	SC2_2-9	✓		
	SC2_2-10	✓		
	SC3_2-6-2	✓		
C2	SC1_1		✓	
	SC2_1-1		✓	
	SC2_1-2		✓	
	SC3_1-1-1		✓	
	SC3_1-1-2		✓	✓
	SC3_1-2-1		✓	
C3	SC1_1			✓
	SC2_1-2			✓
	SC2_2-1			✓
	SC2_2-2			✓
	SC2_2-4			✓

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

**ตารางที่ 16** ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม เมื่อตรวจสอบพบด้วย เครื่องหมายโมเลกุล (ต่อ)

สายต้น	ตัวอย่าง	เครื่องหมายที่ตรวจสอบ		
		RAPD	ISSR	SSR
C4	SC1_1		✓	✓
	SC2_1-1			✓
	SC2_1-4	✓		
	SC2_1-5	✓		✓
	SC3_1-1	✓		✓

**หมายเหตุ** C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

**ตารางที่ 17** ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย โมเลกุล

เครื่องหมาย	ความแปรปรวน (%)		
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3
RAPD	0.00±0.00	5.90±5.24	12.50±12.50
ISSR	9.38±11.97	7.69±6.71	6.25±12.50
SSR	9.38±11.97	12.61±15.11	8.33±11.79

### 3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง

#### *N. mirabilis*

#### 3.2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ

จากการนำต้นที่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 1 จำนวน 8 ต้น สายที่ 2 จำนวน 6 ต้น สายต้นที่ 3 จำนวน 5 ต้น และ สายต้นที่ 4 จำนวน 5 ต้น (ภาพที่ 21) เมื่อนำต้นที่ตรวจสอบพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปทรงหม้อ ปลายใบ โคนใบ รูปร่างใบ และ ปากใบ ของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อกับในธรรมชาติ พบว่า หม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อมีลักษณะของหม้อเป็นรูปเหยือก มีปลายใบ 3 ลักษณะ ได้แก่ ปลายใบยาวคล้ายหาง ปลายใบเรียวแหลม และ ปลายใบมน มีโคนใบเป็นรูปลิ้มและโคนใบสอบเรียว ส่วนปากใบพบได้ทั้งปากใบด้านบนและด้านล่าง ขณะที่ต้นในธรรมชาติมีลักษณะหม้อรูปเหยือก ปลายใบเรียวแหลม โคนใบรูปลิ้ม และพบเพียงปากใบด้านล่าง (ภาพที่ 22) สายต้นที่ 1 ต้นแม่มีลักษณะใบปกติ ปลายใบยาวคล้ายหาง โคนใบแบบลิ้มลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม ขณะที่รุ่นที่ 1 ลักษณะใบปกติ ปลายใบเรียวแหลม โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม รุ่นที่ 2 ลักษณะใบหจิก ปลายใบมีทั้งแบบเรียวแหลม แบบยาวคล้ายหาง และแบบมน ส่วนโคนใบมีลักษณะแบบลิ้มและสอบเรียว ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม รุ่นที่ 3 ลักษณะใบหจิก ปลายใบมน โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม (ภาพที่ 23) (ตารางที่ 18)

ในสายต้นที่ 2 ต้นแม่มีลักษณะใบหจิก ปลายใบเรียวแหลม โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม ขณะที่รุ่นที่ 1 มีลักษณะใบหจิก ปลายใบยาวคล้ายหาง โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม รุ่นที่ 2 ลักษณะใบหจิก ปลายใบแบบเรียวแหลมและแบบยาวคล้ายหาง โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม ตรวจ รุ่นที่ 3 มีทั้งลักษณะใบหจิกและใบปกติ ปลายใบแบบเรียวแหลมและแบบยาวคล้ายหาง โคนใบแบบลิ้มลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม (ภาพที่ 24) (ตารางที่ 18)

ส่วนสายต้นที่ 3 ต้นแม่มีลักษณะใบหจิก ปลายใบเรียวแหลม โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะรี ขณะที่ลูกทั้ง 3 รุ่น มีลักษณะใบหจิก โคนใบรูปลิ้ม และลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก โดยรุ่นที่ 1 มีปลายใบเรียวแหลม และปากใบมีลักษณะกลม รุ่นที่ 2 มี

ปลายใบแบบเรียวแหลมและแบบยาวคล้ายหาง และปากใบมีทั้งลักษณะกลมและรี ทั้ง 3 รุ่น (ภาพที่ 25) (ตารางที่ 18)

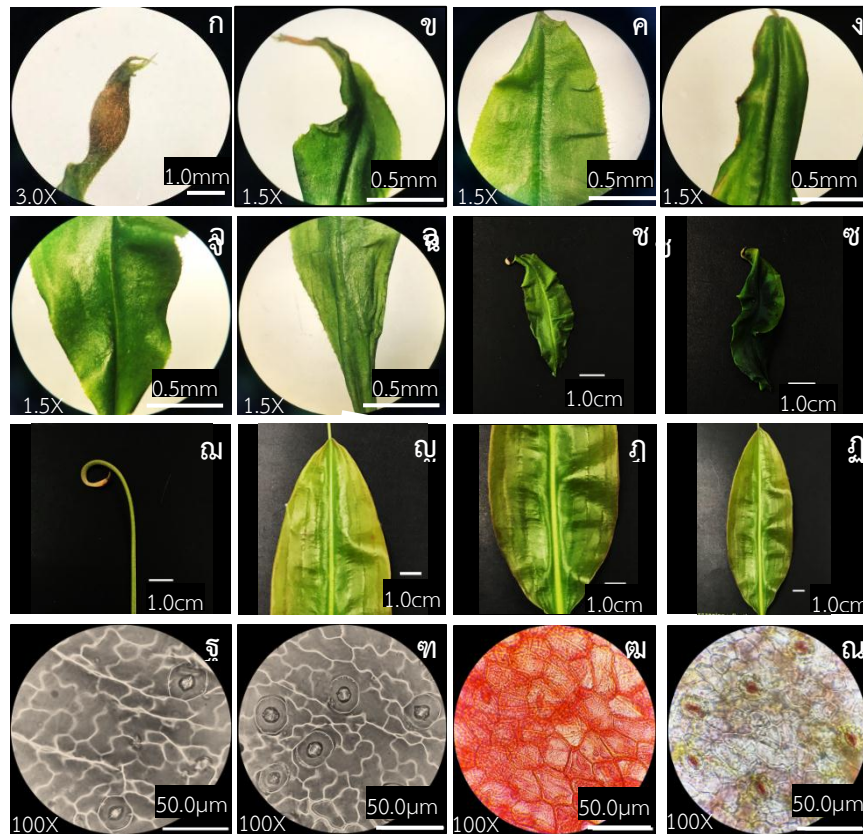
และสายต้นที่ 4 ต้นแม่มีลักษณะใบหงิก ปลายใบมน โคนใบสอบเรียว ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม ขณะที่รุ่นที่ 1 มีลักษณะใบหงิก ปลายใบเรียวแหลม โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม รุ่นที่ 2 มีลักษณะใบหงิก ปลายใบแบบเรียวแหลมและแบบยาวคล้ายหาง โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม ส่วนรุ่นที่ 3 มีลักษณะใบปกติ ปลายใบเรียวแหลม โคนใบแบบลิ้ม ลักษณะหม้อเป็นรูปเหยือก และปากใบมีลักษณะกลม (ภาพที่ 26) (ตารางที่ 18)



ภาพที่ 21 ลักษณะทางสรีรวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)



ภาพที่ 22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม  
 (ก) หม้อ (ข) ปลายใบยาวคล้ายหาง (ค) ปลายใบเรียวแหลม (ง) ปลายใบมน (จ) โคนใบรูปลิ้ม (ฉ) โคนใบสอบเรียว (ช) ใบปกติ (ซ) ใบหงิก (ณ) หม้อในธรรมชาติ (ญ) ปลายใบในธรรมชาติ (ฎ) โคนใบในธรรมชาติ (ฏ) ลักษณะใบในธรรมชาติ (ฐ) ผิวใบด้านบนในสภาพปลอดเชื้อ (ฑ) ผิวใบด้านล่างในสภาพปลอดเชื้อ (ฒ) ผิวใบด้านบนในธรรมชาติ (ณ) ผิวใบด้านล่างในธรรมชาติเชื้อ

**ตารางที่ 18** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สายต้น	ลักษณะ				
	รูปร่างใบ	ปลายใบ	โคนใบ	รูปทรงหม้อ	ปากใบ
C1	ปกติ	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC1_2	ปกติ	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_1-1	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_2-2	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_2-5	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_2-6	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_2-9	หึงก	มน	ลิ่ม	เหยือก	รี
SC2_2-10	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC3_2-6-2	หึงก	มน	ลิ่ม	เหยือก	กลม
C2	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC1_1	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_1-1	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_1-2	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC3_1-1-1	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC3_1-1-2	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC3_1-2-1	ปกติ	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
C3	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	รี
SC1_1	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_1-2	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	รี
SC2_2-1	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_2-2	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	รี
SC2_2-4	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	รี

**หมายเหตุ** C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้ไปเปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

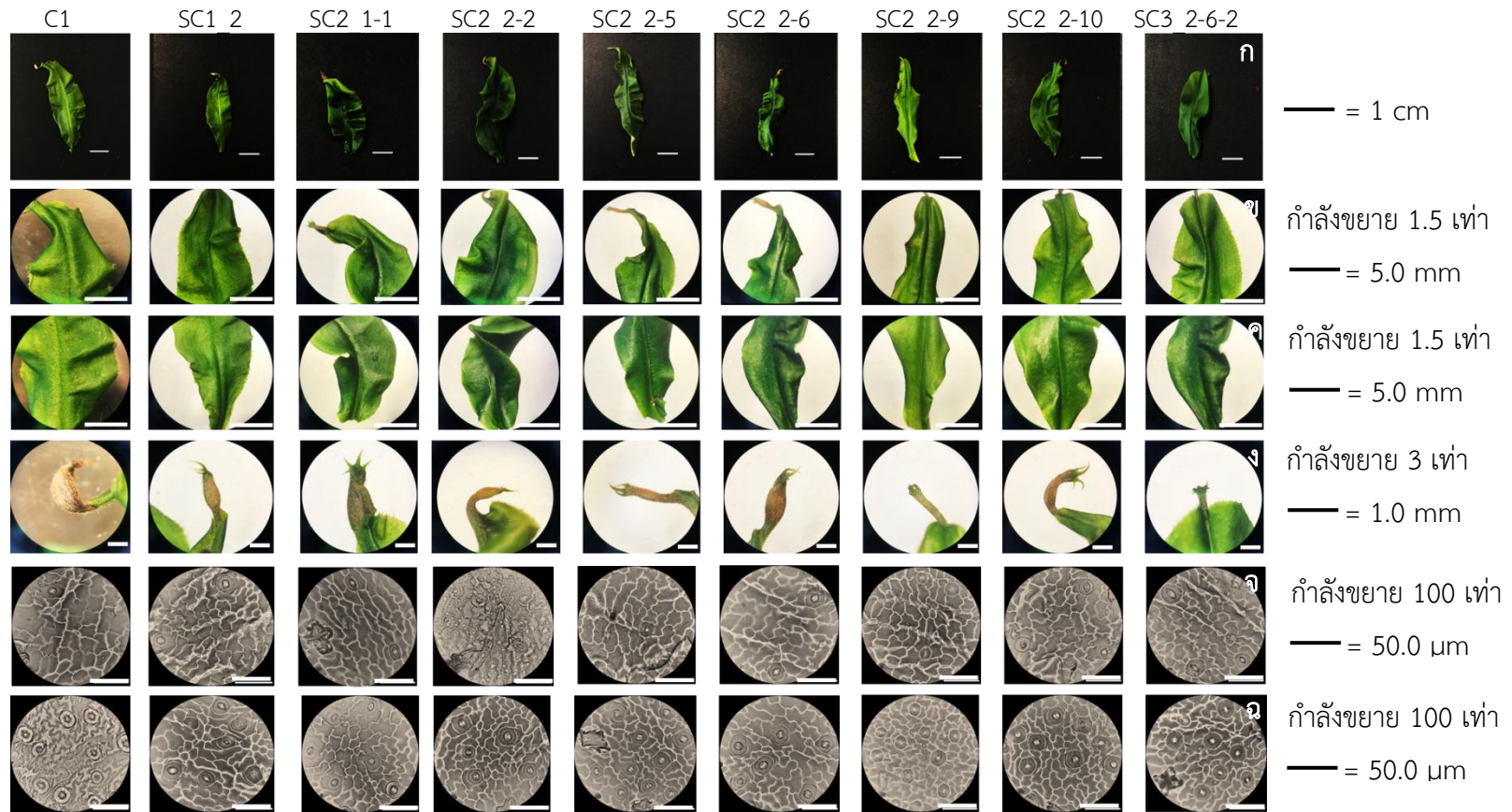
**ตารางที่ 18** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ต่อ)

สายต้น	ลักษณะ				
	รูปร่างใบ	ปลายใบ	โคนใบ	รูปทรงหม้อ	ปากใบ
C4	หึงก	มน	สอบเรียว	เหยือก	กลม
SC1_1	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_1-1	หึงก	คล้ายหาง	ลิ่ม	เหยือก	รี
SC2_1-4	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC2_1-5	หึงก	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม
SC3_1-1	ปกติ	เรียวแหลม	ลิ่ม	เหยือก	กลม

**หมายเหตุ** C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)



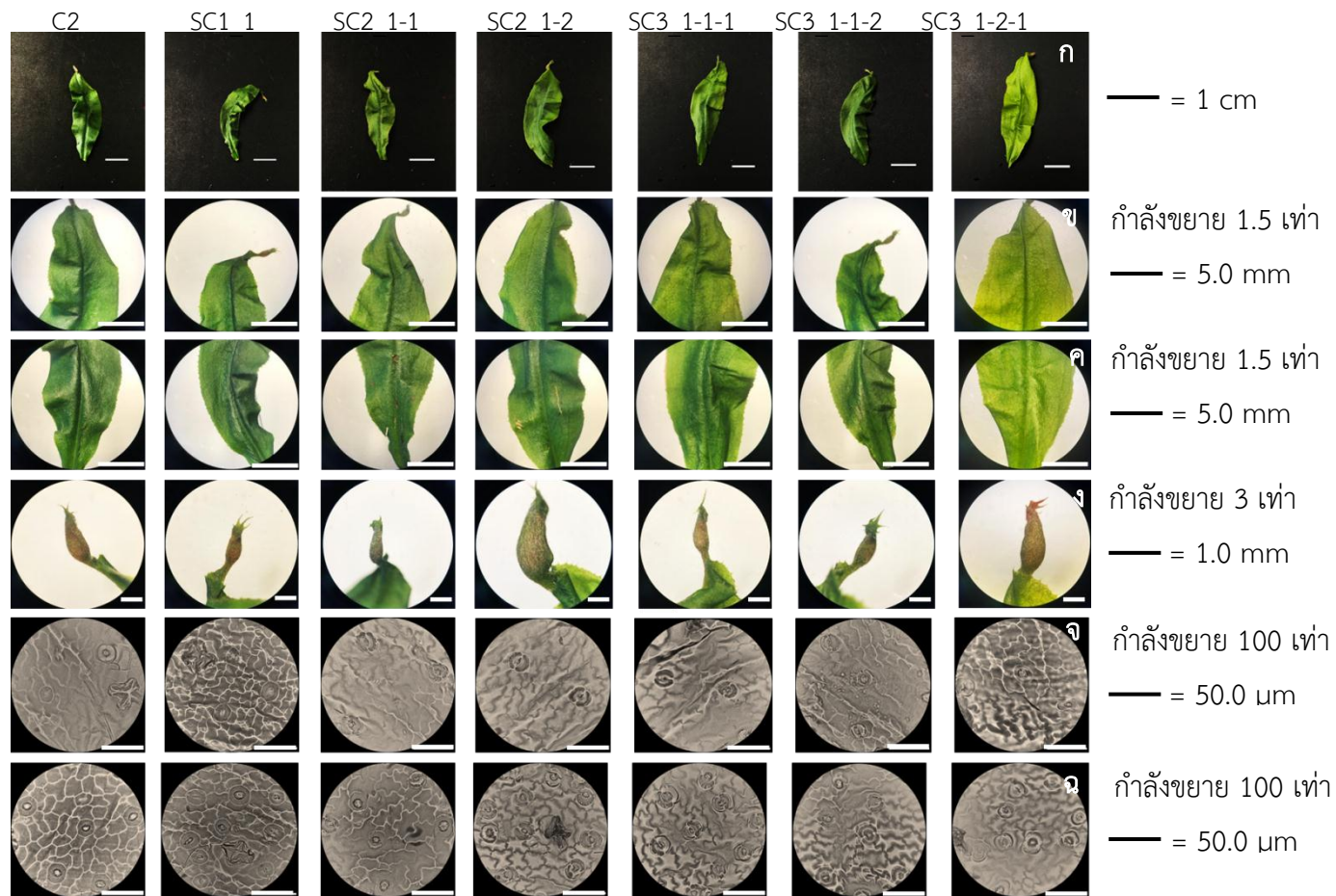


ภาพที่ 23 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 1

(ก) ลักษณะของรูปร่างใบ (ข) ปลายใบ (ค) โคนใบ (ง) หม้อ (จ) ปากใบด้านบน (ฉ) ปากใบด้านล่าง

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

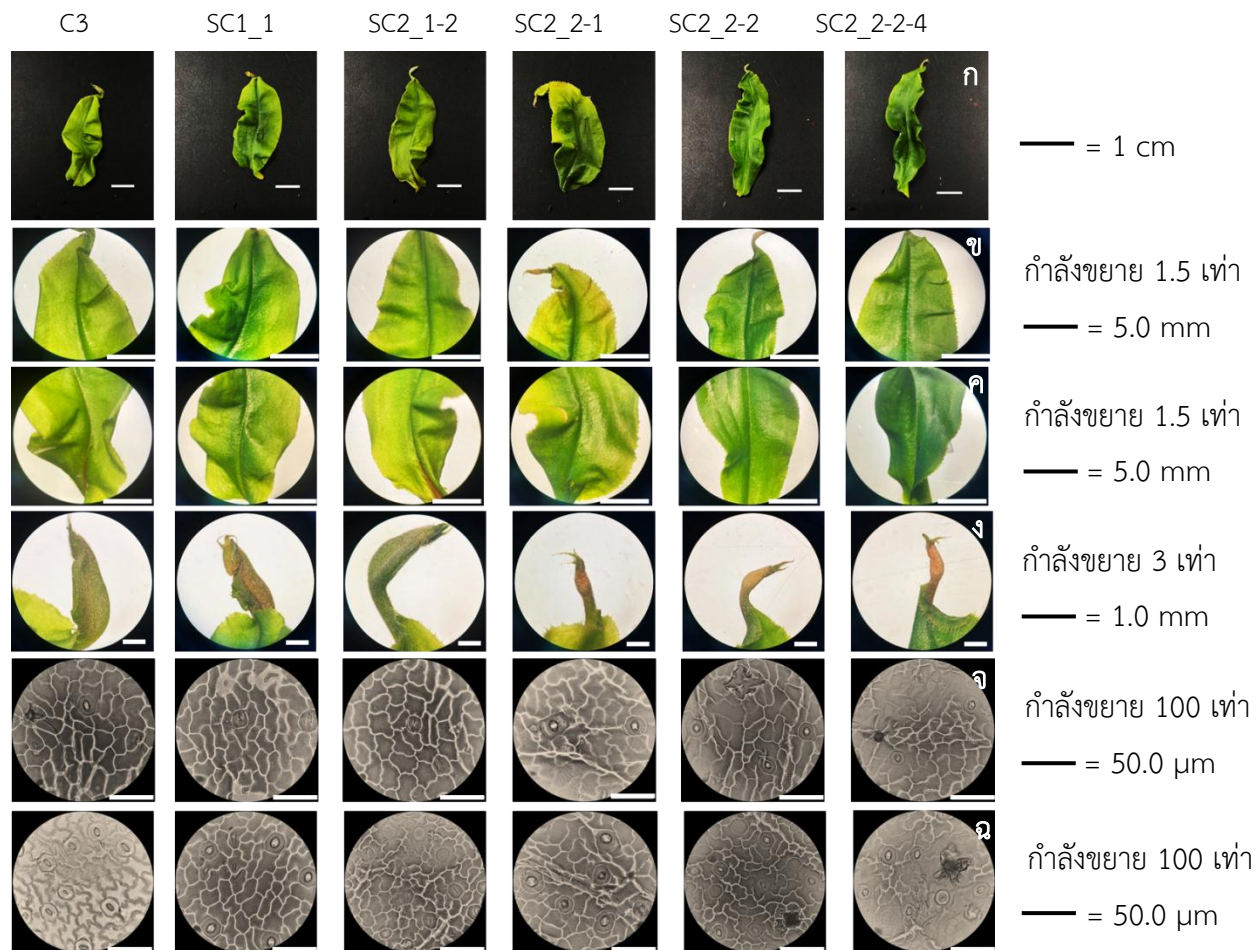


ภาพที่ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 2

(ก) ลักษณะของรูปร่างใบ (ข) ปลายใบ (ค) โคนใบ (ง) หม้อ (จ) ปากใบด้านบน (ฉ) ปากใบด้านล่าง

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

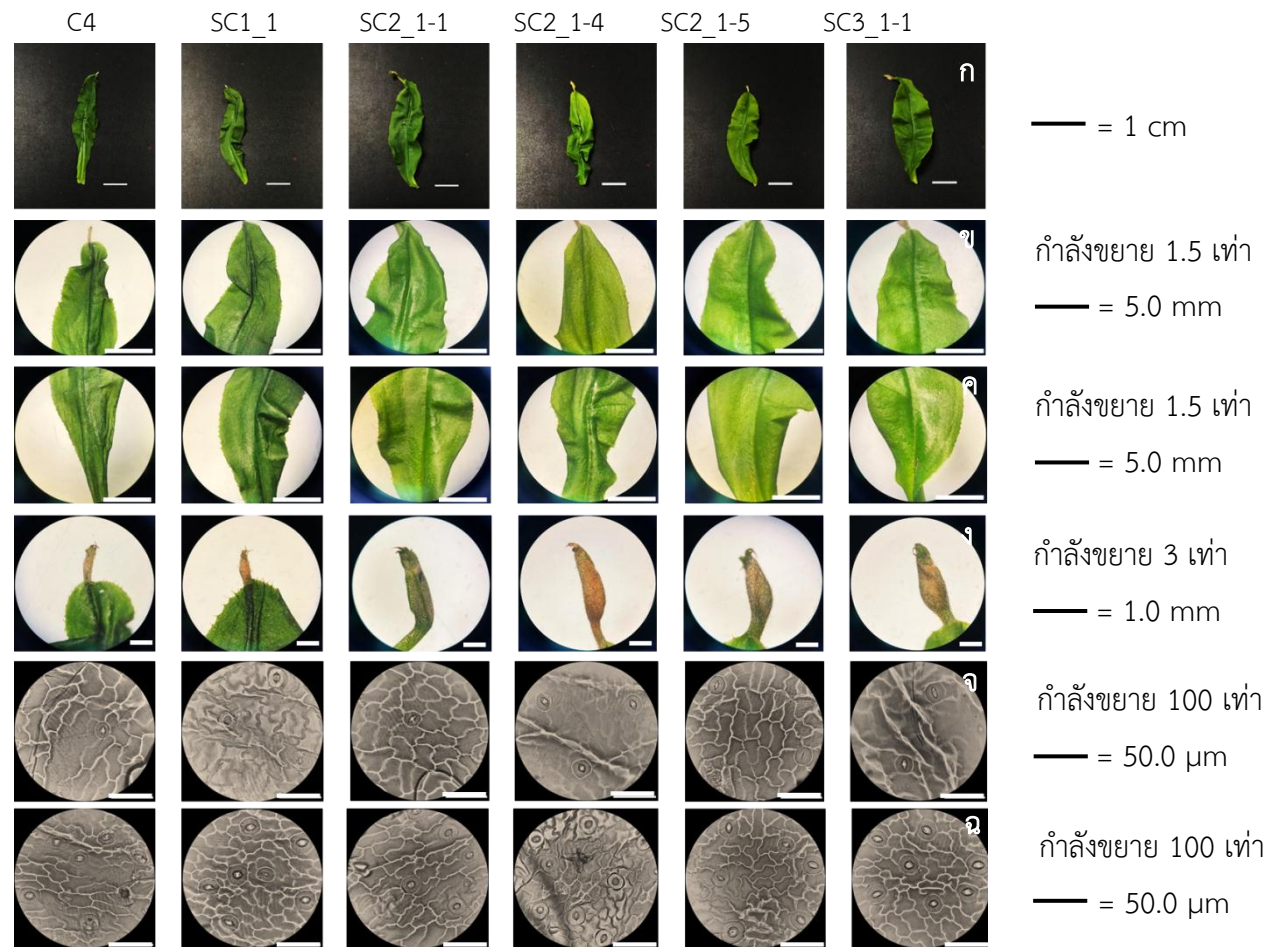


ภาพที่ 25 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 3

(ก) ลักษณะของรูปร่างใบ (ข) ปลายใบ (ค) โคนใบ (ง) หม้อ (จ) ปากใบด้านบน (ฉ) ปากใบด้านล่าง

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)



ภาพที่ 26 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสายต้นที่ 4

(ก) ลักษณะของรูปร่างใบ (ข) ปลายใบ (ค) โคนใบ (ง) หม้อ (จ) ปากใบด้านบน (ฉ) ปากใบด้านล่าง

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

### 3.2.2.2 ความหนาแน่นปากใบ และขนาดปากใบ

จากการตรวจสอบความหนาแน่นปากใบ และขนาดปากใบ พบว่า สายต้นที่ 1 ต้นแม่มีความหนาแน่นของปากใบด้านบน  $9.33 \pm 1.53$  และด้านล่าง  $48.33 \pm 1.53$  ซึ่งมีค่าความหนาแน่นปากใบแตกต่างทางสถิติกับทั้ง 3 รุ่น ส่วนขนาดปากใบด้านบน ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $24.42 \pm 4.93$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น และมีความกว้างปากใบ  $30.02 \pm 3.00$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับทั้ง 3 รุ่น และขนาดปากใบด้านล่าง ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $24.76 \pm 3.07$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น และต้นแม่มีความกว้างปากใบ  $27.96 \pm 2.57$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 จำนวน 5 ต้น (ตารางที่ 19)

สายต้นที่ 2 ต้นแม่มีความหนาแน่นของปากใบด้านบน  $8.00 \pm 3.00$  และด้านล่าง  $25.33 \pm 2.52$  ซึ่งมีความหนาแน่นปากใบน้อยกว่าทั้ง 3 รุ่น ส่วนขนาดปากใบด้านบน ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $21.88 \pm 1.61$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น และต้นแม่มีความกว้างปากใบ  $21.68 \pm 2.46$  ไมโครเมตร ซึ่งมีความกว้างปากใบความแตกต่างทางสถิติกับทั้ง 3 รุ่น และขนาดปากใบด้านล่าง ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $26.56 \pm 2.09$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 3 ต้น และต้นแม่มีความกว้างปากใบ  $25.27 \pm 3.54$  ไมโครเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น (ตารางที่ 19)

สายต้นที่ 3 ต้นแม่มีความหนาแน่นของปากใบด้านบน  $4.67 \pm 0.58$  มีความแตกต่างกับรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และด้านล่าง  $40.67 \pm 4.04$  ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 3 ต้น ส่วนขนาดปากใบด้านบน ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $23.74 \pm 3.02$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น และต้นแม่มีความกว้างปากใบ  $20.73 \pm 1.96$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และขนาดปากใบด้านล่าง ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $21.42 \pm 0.83$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น และ รุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น และต้นแม่มีความกว้างปากใบ  $22.97 \pm 0.91$  ไมโครเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 จำนวน 5 ต้น (ตารางที่ 19)

สายต้นที่ 4 ต้นแม่มีความหนาแน่นของปากใบด้านบน  $6.67 \pm 1.53$  มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น และด้านล่าง  $27.67 \pm 1.15$  รุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น และรุ่นที่ 2 จำนวน 1 ต้น ส่วนขนาดปากใบด้านบน ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $21.53 \pm 3.11$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 จำนวน 1 ต้น รุ่นที่ 2 จำนวน 2 ต้น และรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น และต้นแม่

มีความกว้างปากใบ  $20.17 \pm 2.62$  ไมโครเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 3 จำนวน 1 ต้น และขนาดปากใบด้านล่าง ต้นแม่มีความยาวปากใบ  $20.14 \pm 1.71$  ไมโครเมตร และความกว้างปากใบ  $19.61 \pm 1.86$  ไมโครเมตร ซึ่งมีค่าความยาวและความกว้างปากใบน้อยกว่าทั้ง 3 รุ่น (ตารางที่ 19)

**ตารางที่ 19** ความหนาแน่นปากใบ และขนาดปากใบ ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตัวอย่าง	ความหนาแน่นของปากใบ	ความหนาแน่นของ	ขนาดปากใบด้านบน		ขนาดปากใบด้านล่าง	
	ด้านบน (ปากใบ/ตร.มม.)	ปากใบด้านล่าง (ปากใบ/ตร.มม.)	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )
C1	9.33±1.53 <sup>b</sup>	48.33±1.53 <sup>bc</sup>	24.42±4.93 <sup>ab</sup>	30.02±3.00 <sup>a</sup>	24.76±3.07 <sup>bc</sup>	27.96±2.57 <sup>b</sup>
SC1_2	6.67±1.53 <sup>cd</sup>	30.67±2.52 <sup>de</sup>	23.92±2.21 <sup>b</sup>	24.79±2.01 <sup>cd</sup>	26.95±2.43 <sup>ab</sup>	26.45±3.18 <sup>bc</sup>
SC2_1-1	3.67±1.16 <sup>e</sup>	34.00±2.00 <sup>d</sup>	25.31±2.94 <sup>ab</sup>	22.16±2.64 <sup>e</sup>	25.77±1.68 <sup>abc</sup>	24.72±2.28 <sup>c</sup>
SC2_2-2	6.33±1.53 <sup>cd</sup>	31.33±2.08 <sup>de</sup>	20.75±1.75 <sup>c</sup>	22.01±2.31 <sup>e</sup>	24.62±2.77 <sup>bc</sup>	24.29±1.96 <sup>c</sup>
SC2_2-5	5.33±1.53 <sup>de</sup>	49.67±1.53 <sup>b</sup>	23.19±1.52 <sup>bc</sup>	22.63±1.93 <sup>de</sup>	23.80±2.09 <sup>c</sup>	25.21±1.85 <sup>c</sup>
SC2_2-6	3.67±0.58 <sup>e</sup>	29.00±2.00 <sup>e</sup>	25.78±2.33 <sup>ab</sup>	26.78±2.80 <sup>bc</sup>	26.45±1.84 <sup>ab</sup>	30.59±3.30 <sup>a</sup>
SC2_2-9	5.67±0.58 <sup>de</sup>	55.33±3.51 <sup>a</sup>	20.84±2.00 <sup>c</sup>	19.75±1.57 <sup>f</sup>	20.79±3.07 <sup>d</sup>	18.45±3.12 <sup>d</sup>
SC2_2-10	8.00±1.00 <sup>bc</sup>	45.33±2.52 <sup>c</sup>	24.41±2.11 <sup>ab</sup>	23.9±2.16 <sup>de</sup>	26.93±2.56 <sup>ab</sup>	26.66±2.11 <sup>bc</sup>
SC3_2-6-2	13.67±0.58 <sup>a</sup>	44.67±2.89 <sup>c</sup>	26.84±3.07 <sup>a</sup>	28.32±2.87 <sup>ab</sup>	27.66±2.29 <sup>a</sup>	25.48±2.30 <sup>bc</sup>

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

ตารางที่ 19 ความหนาแน่นปากใบ และขนาดปากใบ ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความหนาแน่นของ	ความหนาแน่นของ	ขนาดปากใบด้านบน		ขนาดปากใบด้านล่าง	
	ปากใบด้านบน (ปากใบ/ตร.มม.)	ปากใบด้านล่าง (ปากใบ/ตร.มม.)	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )
C2	8.00±3.00 <sup>cd</sup>	25.33±2.52 <sup>c</sup>	21.88±1.61 <sup>c</sup>	21.68±2.46 <sup>d</sup>	26.56±2.09 <sup>a</sup>	25.27±3.54 <sup>cd</sup>
SC1_1	15.33±1.53 <sup>a</sup>	44.00±2.65 <sup>b</sup>	25.49±2.07 <sup>a</sup>	24.46±3.76 <sup>c</sup>	25.40±2.05 <sup>ab</sup>	23.66±3.11 <sup>d</sup>
SC2_1-1	7.67±0.58 <sup>cd</sup>	25.00±3.00 <sup>c</sup>	25.22±1.78 <sup>a</sup>	28.63±3.12 <sup>ab</sup>	26.95±1.83 <sup>a</sup>	29.52±1.94 <sup>a</sup>
SC2_1-2	11.33±0.58 <sup>b</sup>	49.67±1.53 <sup>a</sup>	25.5±1.84 <sup>a</sup>	29.62±3.00 <sup>a</sup>	23.31±1.68 <sup>c</sup>	28.25±2.92 <sup>ab</sup>
SC3_1-1-1	10.00±1.00 <sup>bc</sup>	41.67±3.06 <sup>b</sup>	23.01±2.67 <sup>c</sup>	24.84±2.40 <sup>c</sup>	22.67±1.88 <sup>c</sup>	27.11±1.39 <sup>abc</sup>
SC3_1-1-2	6.33±0.58 <sup>d</sup>	26.00±2.00 <sup>c</sup>	23.11±1.65 <sup>c</sup>	26.35±2.85 <sup>bc</sup>	24.46±2.53 <sup>bc</sup>	27.07±2.65 <sup>abc</sup>
SC3_1-2-1	7.00±1.00 <sup>d</sup>	44.33±3.06 <sup>b</sup>	23.54±2.74 <sup>ab</sup>	25.27±3.57 <sup>c</sup>	23.22±1.78 <sup>c</sup>	25.79±3.32 <sup>bcd</sup>

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)



ตารางที่ 19 ความหนาแน่นปากใบ และขนาดปากใบ ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความหนาแน่นของ	ความหนาแน่นของ	ขนาดปากใบด้านบน		ขนาดปากใบด้านล่าง	
	ปากใบด้านบน (ปากใบ/ตร.มม.)	ปากใบด้านล่าง (ปากใบ/ตร.มม.)	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )
C3	4.67±0.58 <sup>b</sup>	40.67±4.04 <sup>bc</sup>	23.74±3.02 <sup>a</sup>	20.73±1.96 <sup>b</sup>	21.42±0.83 <sup>c</sup>	22.97±0.91 <sup>b</sup>
SC1_1	4.67±1.53 <sup>b</sup>	23.33±4.73 <sup>e</sup>	22.06±3.52 <sup>a</sup>	21.53±2.71 <sup>b</sup>	23.93±2.23 <sup>b</sup>	22.79±1.69 <sup>b</sup>
SC2_1-2	6.00±1.73 <sup>ab</sup>	36.33±1.53 <sup>cd</sup>	18.54±3.60 <sup>b</sup>	19.67±2.44 <sup>b</sup>	18.23±1.45 <sup>d</sup>	17.83±1.43 <sup>d</sup>
SC2_2-1	6.00±1.00 <sup>ab</sup>	34.33±3.21 <sup>d</sup>	23.51±2.53 <sup>a</sup>	26.93±3.48 <sup>a</sup>	26.02±2.75 <sup>a</sup>	26.65±2.65 <sup>a</sup>
SC2_2-2	6.33±0.58 <sup>ab</sup>	52.67±1.53 <sup>a</sup>	21.80±2.22 <sup>a</sup>	21.36±2.63 <sup>b</sup>	21.53±2.40 <sup>c</sup>	20.95±1.16 <sup>c</sup>
SC2_2-4	7.33±0.58 <sup>a</sup>	53.67±2.51 <sup>a</sup>	21.70±2.03 <sup>a</sup>	21.92±1.39 <sup>b</sup>	21.93±2.14 <sup>c</sup>	20.03±1.79 <sup>c</sup>

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

ตารางที่ 19 ความหนาแน่นปากใบ และขนาดปากใบ ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความหนาแน่นของ	ความหนาแน่นของ	ขนาดปากใบด้านบน		ขนาดปากใบด้านล่าง	
	ปากใบด้านบน (ปากใบ/ตร.มม.)	ปากใบด้านล่าง (ปากใบ/ตร.มม.)	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )
C4	6.67±1.53 <sup>b</sup>	27.67±1.15 <sup>cd</sup>	21.53±3.11 <sup>bc</sup>	20.17±2.62 <sup>b</sup>	20.14±1.71 <sup>d</sup>	19.61±1.86 <sup>b</sup>
SC1_1	11.33±1.15 <sup>a</sup>	32.00±2.65 <sup>b</sup>	23.97±2.38 <sup>a</sup>	22.32±2.56 <sup>ab</sup>	26.01±2.27 <sup>ab</sup>	23.41±1.32 <sup>a</sup>
SC2_1-1	6.67±0.58 <sup>b</sup>	25.67±2.31 <sup>d</sup>	20.50±1.49 <sup>c</sup>	20.92±1.89 <sup>b</sup>	23.87±1.96 <sup>c</sup>	23.49±1.36 <sup>a</sup>
SC2_1-4	7.67±1.15 <sup>b</sup>	37.00±2.00 <sup>a</sup>	22.67±2.44 <sup>ab</sup>	22.39±1.92 <sup>ab</sup>	23.73±1.31 <sup>c</sup>	23.10±1.85 <sup>a</sup>
SC2_1-5	7.33±0.58 <sup>b</sup>	30.00±1.00 <sup>bc</sup>	24.57±1.05 <sup>a</sup>	21.69±1.76 <sup>ab</sup>	24.75±3.20 <sup>bc</sup>	24.36±2.64 <sup>a</sup>
SC3_1-1-1	8.67±1.53 <sup>b</sup>	30.67±1.15 <sup>bc</sup>	24.19±1.71 <sup>a</sup>	23.27±2.74 <sup>a</sup>	26.90±1.36 <sup>a</sup>	23.85±2.41 <sup>a</sup>

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1) รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

### 3.2.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง

#### *N. mirabilis*

#### 3.2.3.1 ค่าความเขียวใบ

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการวัดค่าความเขียวใบ พบว่า สายต้นที่ 1 มีค่าความเขียวใบของต้นแม่  $44.60 \pm 10.06$  SPAD-unit ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 ต้น SC1\_2 มีค่าความเขียว  $41.13 \pm 5.90$  SPAD-unit รุ่นที่ 2 ต้น SC2\_1-1 SC2\_2-2 SC2\_2-9 และ SC2\_2-10 มีค่าความเขียว  $41.20 \pm 2.00$   $47.97 \pm 0.42$   $44.67 \pm 3.34$  และ  $46.47 \pm 3.57$  SPAD-unit ตามลำดับ รุ่นที่ 3 ต้น SC3\_2-6-2 มีค่าความเขียว  $35.67 \pm 2.82$  SPAD-unit ขณะที่มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 ต้น SC2\_2-5 และ SC2\_2-6 มีค่าความเขียว  $57.73 \pm 5.00$  และ  $58.10 \pm 5.02$  SPAD-unit ตามลำดับ โดยรุ่นที่ 1 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR รุ่นที่ 2 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย RAPD ISSR และ SSR และรุ่นที่ 3 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย RAPD (ตารางที่ 20)

การวัดค่าความเขียวใบในสายต้นที่ 2 พบว่า ต้นแม่มีค่าความเขียวใบ  $55.83 \pm 9.86$  SPAD-unit ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 ต้น SC1\_1 มีค่าความเขียวใบ  $58.87 \pm 3.17$  SPAD-unit รุ่นที่ 2 ต้น SC2\_1-1 และ SC2\_1-2 มีค่าความเขียวใบ  $56.57 \pm 4.01$  และ  $58.37 \pm 6.90$  SPAD-unit ตามลำดับ รุ่นที่ 3 ต้น SC3\_1-1-1 และ SC3\_1-1-2 มีค่าความเขียวใบ  $46.77 \pm 7.96$  และ  $49.30 \pm 2.00$  SPAD-unit ตามลำดับ ขณะที่มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 3 ต้น SC3\_1-2-1 มีค่าความเขียวใบ  $37.63 \pm 4.68$  SPAD-unit โดยรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR และรุ่นที่ 3 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR และ SSR (ตารางที่ 20)

ส่วนในสายต้นที่ 3 พบว่า ต้นแม่มีค่าความเขียวใบ  $49.33 \pm 2.16$  SPAD-unit ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 2 ต้น SC2\_2-1 SC2\_2-2 และ SC2\_2-4 มีค่าความเขียวใบ  $39.60 \pm 13.18$   $47.27 \pm 0.95$  และ  $57.60 \pm 3.39$  SPAD-unit ตามลำดับ ขณะที่มีความแตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 ต้น SC1\_1 มีค่าความเขียวใบ  $35.60 \pm 6.74$  SPAD-unit รุ่นที่ 2 ต้น SC2\_1-2 มีค่าความเขียวใบ  $28.90 \pm 1.49$  SPAD-unit โดยทั้ง 3 รุ่น ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR (ตารางที่ 20)

และสายต้นที่ 4 พบว่า ต้นแม่มีค่าความเขียวใบ  $41.77 \pm 5.28$  SPAD-unit ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับรุ่นที่ 1 ต้น SC1\_1 มีค่าความเขียวใบ  $38.17 \pm 5.78$  SPAD-unit รุ่นที่ 2 ต้น

SC2\_1-1 SC2\_1-4 และ SC2\_1-5 มีค่าความเขียวใบ  $49.80 \pm 2.15$   $36.63 \pm 6.25$  และ  $37.57 \pm 1.37$  SPAD-unit ตามลำดับ รุ่นที่ 3 ต้น SC3\_1-1-1 มีค่าความเขียวใบ  $47.50 \pm 2.80$  SPAD-unit โดยรุ่นที่ 1 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR และ SSR รุ่นที่ 2 และ 3 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย RAPD และ SSR (ตารางที่ 20)

**ตารางที่ 20** ค่าความเขียวใบของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตัวอย่าง	ความเขียวใบ (SPAD unit)
C1	$44.60 \pm 10.06^{bc}$
SC1_2	$41.13 \pm 5.90^{bc}$
SC2_1-1	$41.20 \pm 2.00^{bc}$
SC2_2-2	$47.97 \pm 0.42^b$
SC2_2-5	$57.73 \pm 5.00^a$
SC2_2-6	$58.10 \pm 5.02^a$
SC2_2-9	$44.67 \pm 3.34^{bc}$
SC2_2-10	$46.47 \pm 3.57^b$
SC3_2-6-2	$35.67 \pm 2.82^c$
C2	$55.83 \pm 9.86^{ab}$
SC1_1	$58.87 \pm 3.17^a$
SC2_1-1	$56.57 \pm 4.01^{ab}$
SC2_1-2	$58.37 \pm 6.90^{ab}$
SC3_1-1-1	$46.77 \pm 7.96^{bc}$
SC3_1-1-2	$49.30 \pm 2.00^{ab}$
SC3_1-2-1	$37.63 \pm 4.68^c$

**หมายเหตุ** C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

ตารางที่ 20 ค่าความเขียวใบของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ  
(ต่อ)

ตัวอย่าง	ความเขียวใบ (SPAD unit)
C3	49.33±2.16 <sup>ab</sup>
SC1_1	35.60±6.74 <sup>cd</sup>
SC2_1-2	28.90±1.49 <sup>d</sup>
SC2_2-1	39.60±13.18 <sup>bcd</sup>
SC2_2-2	47.27±0.95 <sup>abc</sup>
SC2_2-4	57.60±3.39 <sup>a</sup>
C4	41.77±5.28 <sup>ab</sup>
SC1_1	38.17±5.78 <sup>b</sup>
SC2_1-1	49.80±2.15 <sup>a</sup>
SC2_1-4	36.63±6.25 <sup>b</sup>
SC2_1-5	37.57±1.37 <sup>b</sup>
SC3_1-1-1	47.50±2.80 <sup>a</sup>

หมายเหตุ C (Clone) = ต้นแม่ที่ใช้เปรียบเทียบกับยอดใหม่แต่ละสายต้น

SC (Subculture) = สายต้นที่มีการชักนำยอดใหม่จากชิ้นส่วนตาข้าง รุ่นที่ 1 (SC1)  
รุ่นที่ 2 (SC2) รุ่นที่ 3 (SC3)

## บทที่ 4

### บทวิจารณ์ (Discussion)

จากการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเมล็ด ใบ และข้อ หม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยสารละลายไฮเตอร์ แสดงให้เห็นว่า ชิ้นส่วนที่แตกต่างกันมีการใช้ไฮเตอร์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเพื่อให้ชิ้นส่วนปราศจากจุลินทรีย์และมีการรอดชีวิตสูง ชิ้นส่วนข้อมีเนื้อเยื่อหนา มีชอกยากต่อการพอกฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ชิ้นส่วนอาจมีเชื้อราเอนโดไฟต์ภายในพืช ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ (Gong and Guo, 2009; Mohamed *et al.*, 2010) จึงต้องใช้สารพอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นสูง 50 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ชิ้นส่วนมีการปลอดเชื้อ แต่พบว่า ชิ้นส่วนข้อเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้น และตายทั้งหมด เช่นเดียวกับชิ้นส่วนใบ เนื่องจากการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนมีการสัมผัสกับสารพอกฆ่าเชื้อที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นองค์ประกอบ เมื่อเกิดน้ำออกซิไดซ์จะแตกตัวให้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เนื้อเยื่อเกิดความเสียหาย และไม่สามารถพัฒนาได้ (มณฑล และคณะ, 2554) เช่นเดียวกับรายงานของ ภพแก้ว และคณะ (2554) ที่รายงานว่า การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้นสูง 30 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2.48 เปอร์เซ็นต์ มีการปนเปื้อนลดลงขณะที่ชิ้นส่วนถูกทำลายมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล ข้ำ และตาย จากรายงานของ นฤพร (2541) กล่าวว่า การใช้คลอโรกซ์ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.65 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปจะไม่สามารถทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตได้ ส่วนการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝัก เนื่องจากส่วนของฝักมีขนอ่อนปกคลุม ทำให้ยากต่อการพอกฆ่าเชื้อ จึงต้องใช้สารพอกฆ่าเชื้อความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตามหากฝักมีรอยแตกในขั้นตอนการพอกฆ่าเชื้อ เมล็ดอาจสัมผัสกับสารพอกฆ่าเชื้อโดยตรง ทำให้ส่งผลต่อการรอดชีวิต การงอก และ จำนวนใบ ที่ลดลงเมื่อใช้สารพอกฆ่าเชื้อความเข้มข้นสูงขึ้น จากรายงานของ Racoppi ในปี 1990 ได้กล่าวว่า การใช้สารพอกฆ่าเชื้อที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลาสั้นมีผลเสียต่อการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตของต้น และการเกิดยอด (Allan, 1991; Pierik, 1987)

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า ชนิดของเนื้อเยื่อพืชมีความสำคัญในการพอกฆ่าเชื้อ ชิ้นส่วนพืชที่หนาและแข็งอาจต้องใช้สารพอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นสูงและเวลาในการพอกนาน ส่วนชิ้นส่วนพืชที่

บางและอ่อนอาจใช้สารฆ่าเชื้อความเข้มข้นน้อยและลดเวลาในการฟอก (บุญยืน, 2547) นอกจากนี้ ต้นพันธุ์แต่ละชนิดมีความทนต่อสารฟอกฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน การฟอกฆ่าเชื้อพืชจากธรรมชาติจึง จำเป็นต้องศึกษาความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชนิดของชิ้นส่วนพืชและต้นพันธุ์ (ทิพวรรณ และคณะ, 2555) ประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อจึงขึ้นอยู่กับชนิดของสารฟอกฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารละลายไฮเตอร์สามารถ นำมาใช้ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด หม้อข้าวหม้อแกงลิงให้ปราศจากจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การสกัดดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยวิธีดัดแปลงของ Dolye and Dolye พบว่า ดีเอ็นเอมีคุณภาพอยู่ในช่วง 1.42 ถึง 2.22 และมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 209.9 ถึง 1553.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่ในบางตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพและปริมาณค่อนข้างต่ำ เนื่องจากหม้อข้าวหม้อแกงลิงมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) แทนนิน (tannins) แอลคาลอยด์ (alkaloids) และสารทุติยภูมิอื่นๆ (Sanusi *et al.*, 2017) ที่ส่งผล ให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนสารเหล่านี้ในปริมาณสูง ส่งผลให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์น้อย (เบญจมาศ และคณะ, 2559) ดังนั้นอาจเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้โพลีไวนิล ไพโรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone) ร่วมกับซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) เพื่อลด สารทุติยภูมิ เช่น สารประกอบฟีนอล และโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารที่รบกวนปฏิกิริยาการทำงานของ เอนไซม์ในเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Mathew *et al.*, 2014)

ส่วนผลการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อจำนวน 3 รุ่น เปรียบเทียบกับต้นแม่ พบว่า เทคนิคอาร์เอฟดีพบความ แปรปรวนทางพันธุกรรมในรุ่นที่ 2 และ 3 เทคนิคไอเอสเอสอาร์และเอสเอสอาร์พบความแปรปรวน ทางพันธุกรรมในทุกรุ่น โดยความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นอาจถูกชักนำจากการย้ายเลี้ยงเป็น ระยะเวลาาน (Rani and Raina, 2000) จำนวนครั้งจากการย้ายเลี้ยง (Borse *et al.*, 2011) และ การย้ายเลี้ยงอย่างต่อเนื่องมีผลต่อความเสถียรทางพันธุกรรม (Zayova *et al.*, 2010) ซึ่งมีหลาย รายงานที่แสดงให้เห็นว่า จำนวนครั้งที่ย้ายเลี้ยงมีผลต่อการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เช่น จากรายงานของ Khan *et al.* (2011) ที่ขยายพันธุ์กล้วยด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า หลังจากการย้ายเลี้ยงจำนวน 8 รุ่น มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ส่วนรายงานของ Farahani และคณะ (2011) เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะกอกจากชิ้นส่วนข้อปล้อง โดยมีการย้ายเลี้ยง เนื้อเยื่อจำนวน 7 รุ่น พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะกอกมีความแตกต่างจากต้นพ่อแม่อย่าง

มีนัยสำคัญ เมื่อยืนยันผลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ ทั้งนี้ Rival *et al.* (2013) พบว่า การขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชักนำให้เกิด DNA hypermethylation ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation ที่เป็นการเปลี่ยนแปลงทางอีพิเจเนติก ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลงหรือเพิ่มขึ้น ส่วนปัจจัยจากสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจมีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์ภายในพืช จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Nwauzoma and Juja, 2013)

จากการศึกษาพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมตั้งแต่รุ่นที่ 1 เช่นเดียวกับรายงานของ Devi และคณะ (2014) ที่ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. khasiana* ด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงในรุ่นที่ 1-3 ที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของวนิลาในสภาพปลอดเชื้อที่มีการย้ายเลี้ยงจำนวน 10 รุ่น พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในการย้ายเลี้ยงตั้งแต่ครั้งที่ 1 โดยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น เมื่อย้ายเลี้ยงจำนวน 6-10 ครั้ง แสดงให้เห็นว่าจำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น ชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น (Solano *et al.*, 2019) ซึ่งในบางสายต้นที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในรุ่นเดียวกัน อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกายที่เรียกว่า ไคเมอรา (chimera) เนื่องจากมียอดเพียงบางชิ้นส่วนที่มีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป จากการศึกษาค้นพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นมีการเปลี่ยนกลับในรุ่นที่ 3 ในขณะที่บางต้นไม่มีการเปลี่ยนกลับ แสดงให้เห็นว่าลักษณะที่เกิดขึ้นเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบอีพิเจเนติก เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงแบบอีพิเจเนติกที่เกิดจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของยีนที่เคลื่อนที่ได้ (transposon) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จึงไม่เสถียรและสามารถย้อนกลับได้ (Kaeppler *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.00 ถึง 0.47 มีค่าเฉลี่ย 0.22 ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.00 ถึง 0.39 มีค่าเฉลี่ย 0.18 และเทคนิคเอสเอสอาร์มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.00 ถึง 0.41 มีค่าเฉลี่ย 0.14 โดยค่า PIC จากไพรมอร์ที่ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูงจะมีค่า PIC มากกว่า 0.50 ไพรมอร์ที่ให้ความสามารถในการจำแนกความ



แตกต่างกันในระดับกลางจะมีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.25 ถึง 0.50 และไพรมอร์ที่ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับน้อยจะมีค่า PIC น้อยกว่า 0.25 (Yu *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า PIC น้อยกว่า 0.25 มีรายงานการใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ เช่น การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของตะไคร้หอมที่มีการเจริญเติบโตผ่านแคลลัส เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจำนวน 18 ไพรมอร์ มีจำนวน 10 ไพรมอร์ที่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยมีค่า PIC เฉลี่ย 0.20 (Dey *et al.*, 2014) นอกจากนี้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสาลีด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์จำนวน 60 ไพรมอร์ มีจำนวน 18 ไพรมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยมีค่า PIC เฉลี่ย 0.10 และเทคนิคอาร์เอพีดีจำนวน 20 ไพรมอร์ มีจำนวน 12 ไพรมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยมีค่า PIC เฉลี่ย 0.15 (Khaled *et al.*, 2015) โดยค่า PIC เป็นค่าที่สามารถบ่งบอกถึงการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม จากการศึกษา พบว่า ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม มีค่า PIC น้อยกว่า 0.25 แสดงให้เห็นว่าเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่น้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงได้

เมื่อนำต้นที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อมีลักษณะใบหงิก ปลายใบและโคนใบแตกต่างจากหม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติที่มีขอบใบเป็นคลื่น ปลายใบแบบเรียวยแหลม และโคนใบแบบลิ้ม อีกทั้งลักษณะของปากใบต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติมีลักษณะของเซลล์คุมที่ชัด และไม่พบปากใบด้านบน ในขณะที่ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อพบปากใบทั้งด้านบนและด้านล่าง นอกจากนี้พบว่า พืชที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อมีจำนวนปากใบมากกว่าพืชที่มีการเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นผลมาจากสภาวะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความชื้นสัมพัทธ์สูงและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้พืชมีการสังเคราะห์แสงได้น้อย (Rodrigues *et al.*, 2014) อีกทั้งพืชที่มีการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ จะมีชั้นไขผึ้ง (cuticle layer) บริเวณผิวใบด้านบนน้อยกว่าพืชที่ขึ้นในสภาพธรรมชาติซึ่งมีชั้นไขผึ้งที่หนา จึงทำให้ผิวใบด้านบนมีจำนวนปากใบน้อย หรือไม่พบปากใบด้านบนในพืชบางชนิด (กาญจนรี และคณะ, 2559) อย่างไรก็ตามต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแล้วพบความแปรปรวนมีลักษณะของรูปร่างใบ ปลายใบ และ

ปากใบที่แตกต่างจากต้นแม่ในสภาพปลอดเชื้อ ในขณะที่ลักษณะโคนใบและลักษณะหม้อรูปเหยือกไม่แตกต่างจากต้นแม่ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นปากใบ ความกว้างปากใบ และความยาวปากใบ พบความแตกต่างจากต้นแม่อย่างมีนัยสำคัญ และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปากใบและขนาดปากใบเพิ่มขึ้นในสายต้นที่ 1 และ 3 ส่วนสายต้นที่ 2 และ 4 มีปากใบและขนาดปากใบลดลง โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นจะบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับจีโนมไทป์และพีโนมไทป์ เช่นเดียวกับรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสตอเบอร์รี่ที่ชักนำยอดด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้นสูง พบว่า สตอเบอร์รี่ที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อมีความแตกต่างทางพีโนมไทป์หลายลักษณะ เช่น รูปร่าง ก้านใบ แผ่นใบ ทรงพุ่ม และจำนวนไหล ที่มีขนาดและจำนวนมากกว่าต้นแม่ ขณะที่มีความเขียวใบและจำนวนใบที่น้อยกว่าต้นแม่ เมื่อนำต้นที่เปลี่ยนแปลงทางพีโนมไทป์มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ (Biswas *et al.*, 2009) นอกจากนี้รายงานของตะไคร้หอมที่ชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้า พบว่า องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยมีความแตกต่างจากต้นแม่ เมื่อนำต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพีโนมไทป์มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (Dey *et al.*, 2015) โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากต้นแม่ไม่ได้พบในทุกต้นที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ทั้งนี้การเกิดโคเมอราเป็นการเกิดการกลายพันธุ์ที่ไม่คงตัว ปรากฏอยู่ระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ทำให้ลักษณะที่เกิดขึ้นไม่แสดงออกทางสัณฐานวิทยา (คมกฤษณ์ และสุชาติ, 2559)การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการตรวจสอบลักษณะทางพีโนมไทป์ของพืชที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลสำคัญในการอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชได้

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusion)

จากการศึกษาเทคนิคการพอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การพอกฆ่าเชื้อฝักด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ หนึ่งครั้ง มีการปลอดเชื้อสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดมีการงอกสูงสุด 78 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างใบ 3.21 ใบต่อต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ส่วนการพอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนใบ พบว่า การใช้สารพอกฆ่าเชื้อความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ 55 เปอร์เซ็นต์ และการพอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนข้อ พบว่า การใช้สารพอกฆ่าเชื้อความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการพอกฆ่าเชื้อสูงสุด โดยมีขึ้นส่วนปลอดเชื้อ 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ขึ้นส่วนใบและข้อไม่สามารถพัฒนาได้ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการพอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนฝักหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมเพียงหนึ่งครั้งมีประสิทธิภาพในการพอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนหม้อข้าวหม้อแกงลิงได้

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 3 รุ่น โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 16 ไพรเมอร์ พบว่ามี 14 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-11 OPH-05 OPH-13 OPK-19 OPP-04 OPP-07 OPP-08 OPP-09 OPP-15 OPP-19 OPBH-08 OPBH-16 OPBH-20 และ Primer Sex ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิงได้ และพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในรุ่นที่ 2 และ 3 ของ 2 สายต้น ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ จำนวน 16 ไพรเมอร์ พบว่า ทั้ง 16 ไพรเมอร์ ได้แก่ Primer-1 Primer-2 Primer-3 Primer-4 Primer-5 Primer-6 Primer-7 Primer-8 Primer-9 Primer-10 Primer-11 Primer-12 Primer-13 Primer-14 และ Primer-15 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิงได้ และพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในรุ่นที่ 1 2 และ 3 ของ 3 สายต้น และไพรเมอร์เอสเอสอาร์ จำนวน 5 ไพรเมอร์ พบว่า ทั้ง 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ Nep\_SSR1 Nep\_SSR3 Nep\_SSR6 Nep\_SSR12 และ Nep\_SSR18 พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในรุ่นที่ 1, 2 และ 3 ของ 4 สายต้น

เมื่อนำต้นที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พบความแปรปรวน มีลักษณะของรูปร่างใบ ปลายใบ และปากใบที่แตกต่างจากต้นแม่ เมื่อวิเคราะห์ความเขียวใบ ความหนาแน่นปากใบ ความกว้างปากใบ และความยาวปากใบ พบว่า มีความแตกต่างจากต้นแม่ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การใช้เครื่องหมาย อาร์เอฟดีดี ไอเอสเอสอาร์ และ เอสเอสอาร์ สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ทั้งนี้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีการเดียวกับการศึกษานี้จึงสามารถใช้ในการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงได้ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถใช้ในการยืนยันความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อได้ โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชด้วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อไม่ให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่อไป

### บรรณานุกรม

- กมล ทิพโชติ. 2555. การคัดเลือกถั่วลิ้นเต่าเพื่อต้านทานโรคราแป้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กฤติยา จุระนนท์, จันทนา ไพรบูรณ์, ศุภพร เปรมปรีดี และ ชัชวีร์ แก้วสุริลิขิต. 2557. การพอกฆ่าเชื้อที่ผิวของผลหญ้าชะเงาเต่า *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascheron. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 52: 114-121.
- กาญจนา นริพงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2559. การถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยี การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.). 101 น.
- คมกฤษณ์ แสงเงิน และ สุชาดา พัฒนกกนก. 2559. ผลขององค์ประกอบอาหารต่อการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกลัยไม์สกุลหวายต่างโดยเทคนิค TCLs. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3(2): 70-75.
- จักรกริช อนันตศรีณย์, รีย๊ะ ปังเตะ และ อัครา อิหม่าหมาด. 2554. ผลของเทคนิคการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอื้องพร้าว. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา 4(1): 1-9.
- จุฑารัตน์ สาและ, อนุชา จุลกะเสวี และ ปราโมทย์ พรสุริยา. 2559. การกระจายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาในลูกผสมข้ามชนิดของหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes globosa* x *Nepenthes mirabilis*). วารสารวิจัย 9: 10-19.
- ทิพวรรณ มหาวรรณ, ชัชวีร์ แก้วสุริลิขิต และ กาญจนา นริพงษ์ฉวี. 2555. ผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ที่มีผลต่อการพอกฆ่าเชื้อดาวน์อย *Pogostemon helferi* Hook f. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50: 375-383.
- นฤพร ทรราชคุณาฒย์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกาในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ขุนปักษ์ และ ชีระชัย ธนानันต์. 2557. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2: 238-241.

- นิรันดร ภูวน. 2557. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในหลอดทดลองด้วยเครื่องหมาย RAPD. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี. หน้า 19-23.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา. ขอนแก่น.
- เบญจมาศ สมวงศ์, ดวงแชติตา กาญจนโสภา, ปารีชาต นิลวิเชียร, สุรพล ฐิติธนากุล, สราวุธ อ่อนสนิท และเยาวพรรณ สนธิกุล. 2559. การสกัดดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *Nepenthes mirabilis*. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3(2): 28-33.
- พัชญ์สิตา ฐิตะเลิศวงศ์, สิริภรณ์ ครวญหา, รักษา สุรินทร์บุรณ์ และอุฐู เขาวรรณทวี. 2554. การศึกษาชนิดพันธุ์ไม้ “หม้อข้าวหม้อแกงลิง” (*Nepenthes*). ศูนย์ศึกษาและพัฒนาวนศาสตร์ ชุมชนที่ 9 สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 9 กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- ภพเก้า พุทธิรักษ์, วารุต อยู่คง และ มณฑล สงวนเสริมศรี. 2554. การขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารนเรศวรพะเยา 4(3): 3-8.
- มะลิวัลย์ กอสกุล. 2546. ความผันแปรของสัณฐานวิทยากายวิภาควิทยาและรูปแบบดีเอ็นเอของหม้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ยิ่งลักษณ์ การะวิโก. 2555. เปรียบเทียบผลของการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์กับกรดอ่อนในการลดปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในปลาหมึกสดแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร. 97 น.
- ยุพภรณ์ ศิริโสม และ สมปอง เตชะโต. 2556. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัดตั้งด้วยเครื่องหมาย RAPD. กรุงเทพฯ.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการคิดและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรมหาวิทยาเกษตรศาสตร์. 219 น.
- วาริน วรรณประไพ. 2545. การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจสอบยางกราด ยางพลวงและยางที่คาดว่า เป็นลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วุฒิชัย ศรีช่วย และ สมปอง เตชะโต. 2558. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโสมมาติกเอ็มบริโออย่างพาราจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในหลอดทดลองโดยเครื่องหมาย RAPD. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2(2): 27-31.
- สายสุดใจ ชุนชาวฤทธิ์, มานพ ผู้พัฒน์, วิโรจน์ พวงภาคีศิริ, นิรัตน์ จินตนา และขวัญใจ คำมงคล. 2559. นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ในประเทศไทย. กองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญา กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 31-42 น.

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 63-65 น.
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเองานปรับปรุงพันธุ์พืช. ครั้งที่พิมพ์ 5. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 37-59 น.
- สุวรรณ ศุภวุฒิ. 2552. ร้อยพันพฤษา ไม้กินแมลง หม้อข้าวหม้อแกงลิง. กรุงเทพฯ: บริษัท พิมพ์เนศ ฟรินตติ้งเซ็นเตอร์ จำกัด.
- อรุณี วงศปิยะสถิต. 2550. การกลายพันธุ์: เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 279 น.
- อัจฉรา เมืองครุฑ. 2558. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิดโลเวีย ( *Nepenthes lowii* Hook.f.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. Mahidol R2R E-Journal 2(1): 27-34.
- อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2555. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอ เจนิก แคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR. วารสารแก่นเกษตร 40: 157-166.
- เอื้อมพร วิสมหมาย. 2544. พฤษาพัน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ เอช เอน กรุป จำกัด. 639 น.
- Alam, F.M., Uddin, E.M., Amin, R., Abdur, M.R., Manik, M.A. and Khatun, M.M. 2016. Studies on the effect of various sterilization procedure for *in vitro* seed germination and successful micropropagation of *Cucumis sativus*. International journal of pure and applied bioscience 4(1): 75-81.
- Ahloowalia, B.S. 1986. Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. In: Semal J (ed) Somaclonal variations and crop improvement. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht 14–27 p.
- Allan A 1991. Plant cell culture In: Stafford A, Warren G (eds) Plant cell and tissue culture. Open University Press, Milton Keynes, UK
- Bello, J.J., Andreu, L.G.I. Susana, A., Eunice, G., Flick, A.C. and Buzzy, N.S. 2014. Somaclonal Variation in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as Assessed ISSR Molecular Markers. Hortscience 49(4): 481-485.
- Biswas, M.K., Dutt, M., Roy, U.K. Islam, R. and Hossain, M. 2009. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. Scientia Horticulturae 409-416 p.

- Borse, N., Chimote, V.P. and Jadhav, A.S. 2011. Stability of micropropagated *Musa acuminata* cv. Grand Naine over clonal generations: a molecular assessment. *Scientia Horticulturae* 129: 390-395 p.
- Braun, A.C. 1959. A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 45: 932-938.
- Broertjes, C. and Harten, V.A.M. 1988. Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. *Developments in Crop Science* 345 p.
- Chaveerach, A., Tanomtong, A., Sudmoon, R. and Tanee, T., 2006. Genetic diversity among geographically separated populations of *Nepenthes mirabilis*. *Cellular and Molecular Biology* 61(3): 295-298.
- Chua, L. S. L. 1999. *In vitro* propagation of *Nepenthes macfarlanei*. *Journal of Tropical Forest Science* 11(3): 631-638.
- Cote, F., Teisson, C. and Perrier, X. 2001. Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: contribution to understanding through a statistical approach. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 37: 539-542.
- Dar, C.T., Abdullah, J.O., Namasivayam, P. and Roowi, S.H. 2012. Sterilization of *Hibiscus rosa-sinensis* L. vegetative explants sourced from plants grown in open environment and influences of organic ingredients on *in vitro* direct regeneration. *American Journal of Plant Sciences* 3(6): 791-798.
- Dasuki, S.M., Kamaruzaman, M. and Sulaiman, S.F. 2000. Genetic variation and relationships among the species of *Zingiberaceae* by using random amplified polymorphic DNA marker (RAPD-PCR). Universitas Sumatera Utara, Indonesia 52 p.
- Daud, H.N., Jayaraman, S. and Mohamed, R. 2012. An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 20(2): 55-58.
- Devi, S.P., Kumaria, S., Rao, S.R. and Tandon, P. 2013. *In vitro* propagation and assessment of clonal fidelity of *Nepenthes khasiana* Hook. f.; a medicinal insectivorous plant of India. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 2813-2820.



- Devi, S.P., Kumaria, S., Rao, S.R. and Tandon, P. 2014. Single primer amplification reaction (SPAR) methods reveal subsequent increase in genetic variations in micropropagated plants of *Nepenthes khasiana* Hook. f. maintained for three consecutive regenerations. *Gene* 23-29 p.
- Dey, T., Saha, S. and Ghosh, P.D. 2015. Somaclonal variation among somatic embryo derived plants — Evaluation of agronomically important somaclones and detection of genetic changes by RAPD in *Cymbopogon winterianus*. *South African Journal of Botany* 96: 112–121.
- Dinesh, P., Thirunavukkarasu, P., Saraniya, A.R. and Ramanathan, T. 2015. *In Vitro* studies of sugarcane variety co-91017 through micropopagation of shoot tip culture. *Advances in Plants and Agriculture Research* 2(6): 263-268.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Elbasheer, Y.H. and Osman, E. E. 2017. Effective and economical explants surface sterilization protocol for microbial contamination of field grown explants *in vitro* cultures of some forest trees; *Acacia senegal* as a model. *Basic Research Journal of Microbiology* 4(2): 12-17.
- Farahani, F., Yari, R. and Masoud, S. 2011. Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*). *Gene Conserve* 10: 216–221
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968 Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells . *Experimental Cell Research* 50: 151–158.
- Gong, L.J. and Guo, S.Y. 2009. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology* 8(5): 731–736.
- Govinden-soulange, J., Somanah, D., Ranghoo-sanmukhiya, M., Boodia, N. and Rajkomar, B. 2010. Detection of somaclonal variation in micropropagated *Hibiscus sabdariffa* L. using RAPD markers. *University of Mauritius Research Journal* 16: 435-447.
- Jala, A. 2012. Types of Media for Seeds Germination and Effect of BA on Mass Propagation of *Nepenthes mirabilis* Druce. *American Transactions on Engineering and Applied Sciences* 1(2): 2229-1652.

- Jan, A., Bhat, K.M., Bhat, S.J.A., Mir, M.A., MA Bhat, Imtiyaz, A. and Rather, J.A. 2013. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture. *African Journal of Biotechnology* 12(39): 5749-5753.
- Kaeppeler, S. M., Kaeppeler, H. F. and Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43:179 -188.
- Karp, A. 1994 Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds) *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 139–152 p.
- Khaled, A.G.A., Motawea, M.H. and Said, A.A. 2015. Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. *Genetic Engineering and Biotechnology* 13: 243–252 p.
- Khan, S., Saeed, B. and Kauser, N. (2011) Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. *Pakistan journal of Botany* 43: 233–242.
- Khanam, S., Sham, A. Bennetzen, J.L. and Aly, M.A.M. 2012. Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Australian Journal of Crop Science* 6(8): 1236-1244.
- Khoddamzadeh, A., Sinniah, U.R., Kadir, M.A., Kadzimin, S.B., Mahmood, M. and Sreeramanan, S. 2010. Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.). *African Journal of Biotechnology* 9: 6632-6639.
- Lakshmanan, V., Venkataramareddy, S.R. and Neelwarne, B. 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 0717-3458.
- Maliga, P. 1984. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Annual Review of Plant Biology* 35: 519–542
- Mathew, M.K., Jose, S., Rao, Y.S., Gupta, U. and Thomas, J. 2014. Optimization of genomic DNA extraction from fresh and dry leaves of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) for diversity analysis. *Indian Journal of Biotechnology* 13: 221-224.
- Matthes, M., Singh, R., Cheah, S.C. and Karp, A. 2001. Variation in *oil palm* (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLP with

- methylation-sensitive enzymes. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 971-979.
- Mohamed, R., Jong, P.L., and Zali, M.S. 2010. Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Diversity* 43: 67-74.
- Morimoto, Y., Maundu, P., Kawase, M., Fujimaki, H., Morishima, H. 2006. RAPD polymorphism of the white-flowered gourd (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) landraces and its. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 963-974.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nehra, N.S. Kartha, K.K., Stushnoff, C. and Giles, K.L. 1992. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Tissue and Organ Culture* 29: 257-268.
- Nwauzoma, A.B. and Jaja, E.T. 2013. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications. *Journal of Applied Biosciences* 67: 5252–5260.
- Odutayo, O.I., Amusa, N.A., Okutade, O.O. and Ogunsanwo, Y.R. 2007. Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. *African Journal of Agricultural Research* 2(3): 67-72.
- Oyebanji, O.B., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N.B., Idris, M.S., Nnodi, U.N., Afolabi, A.S. and Ogbadu, G.H. 2009. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology* 8(20): 5395-5399.
- Orbovic, V., M. Calovic, Z. Vilorja, B. Nielsen, F.G. Gmitter Jr., W.S. Castle and J.W. Grosser, 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161: 329-335.
- Patel, L. S. and Patel, R. S. 2015. Rapid *In vitro* micro propagation of *Asparagus racemosus* Willd. from nodal explants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4(5): 607-617.

- Pietropaolo, J. and P. Pietropaolo. 1986. Carnivorous plants of the world. Timber Press. Oregon 206 p.
- Racoppi, F.1990. Domestic bleaches containing sodium hypochlorite. Procter and Gamble, Italia SPA, Product Development Department, Rome
- Rahman, M.H., Patwary, M.M.A., Barua, H., Hossain, M. and Hasan, M.M. 2013. Screening of salt tolerant CIP potato germplasm for saline areas. *The Agriculturists* 11(1): 95-102.
- Rani, V., Singh, K. P., Shiran, M., Nandy, S., Goel, S., Sreenath, H. L. and Raina, S. N. 2000. Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high frequency somatic embryogenesis-derived plants of allotetraploid *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell Reports* 19(10): 1013-1020.
- Rival, A., Ilbert, P., Labeyrie, A., Torres, E., Doubeau, S., Personne, A., Dussert, S., Beule, T., Durand-Gasselin, T., Tregear, J.W. and Jaligot, E. 2013. Variations in genomic DNA methylation during the longterm *in vitro* proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 32: 359–368.
- Rodrigues, S.P., Picoli, E.A.T., Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S. and Isaias, R.M.S. 2014. The effects of in vitro culture on the leaf anatomy of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Journal of Biosciences* 30(6): 1933-1941.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Sandoval, J. and Debergh, P. 2005. Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell* 82: 57–66.
- Rout, G.R., Das, P., Goel, S. and Raina, S.N. 1998. Determination of genetic stability of micropropagated plants of *ginger* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Botanical Bulletin Academia Sinica Journal* 39: 23-27.
- Sanusi, S.B., Bakar, M.F., Mohamed, M., Sabran, S.F. And Mainasara, M.M. 2017. Southeast Asian medicinal plants as a potential source of anti-tuberculosis agent. *Evid Based Complement Altern Med* 39 1.
- Scowcroft, W.R. and P.J. Larkin. 1982. Somaclonal variation : A new option for plant improvement. Academic Press 159-178 p.

- Singh, R., Narzary, D., Bhardwaj, J., Singh, A.K., Kumar, S., and Kumar, A., 2014. Molecular diversity and SSR transferability studies in Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L.Nash). *Industrial Crops and Products* 53: 187–198.
- Siriwardana, N.S.B., Zuhry, A.L.M. and Weerakkody, W.J.S.K. 2013. Micro-Propagation of *Nepenthes* Species through Seed Culture. *Agricultural Research Symposium* 218-221 p.
- Skirvin, R.M., McPheeters, K.D. and Norton, M. 1994. Source and frequency of somaclonal variation. *Hortscience* 29: 1232-1237.
- Smith, R.H., Duncan, R.R. and Bhaskaran, S. 1993. *In Vitro* Selection and Somaclonal Variation for Crop Improvement. *International Crop Science I* 629-632 p.
- Solano, M.C.P., Ruiz, J.S., Arnao, M.T.G, Castro, O.C., Tovar, M.E.G. and Bello, J.J. 2019. Evaluation of *in vitro* shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25(2): 561-567.
- Sukanto L. A., Mujiono, Djukri and Henuhili V. 2011. Shoot Tip Culture of *Nepenthes albomarginata* Lobb ex Lindl. *In Vitro*. *Biologi Indonesia* 7(2): 251-261.
- Sweat, J. and Bodri, M.S. 2014. Isolation of Protoplasts from *Nepenthes* - A Plant Carnivore wild relatives in Kenya. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 963-974.
- Thawaro, S. and Te-chato, S. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from *oil palm* propagated *in vitro*. *Science Asia* 35(2): 142-149.
- Thorpe, T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology* 37: 169-180.
- Vacin, E. and Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110: 605-613
- Viehmannova, I., Cusimamani, E.F., Bechyne. M., Vyvadilova, M. and Greplova, M. 2009. *In vitro* induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 97: 21-25.
- Yu, J. Z., Fang, D. D., Kohel, R. J., Ulloa, M., Hinze, L. L., Percy, R. G., and Jones, D. C. 2012. Development of a core set of SSR markers for the characterization of *Gossypium germplasm*. *Euphytica* 187: 203-213.

- Zayova, E., Vassilevska, I.R., Kraptchev B. and Stoeva, D. 2010. Somaclonal variations through indirect organogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biodiversity and Conservation* 3: 1–5
- Zhang, G.Q., Zhou, W.J., Gu, H.H., Song, W.J. and Momoh, E.J. 2003. Plant regeneration from the hybridization of *Brassica juncea* and *B. napus* through embryo culture. *Journal of Agronomy and Crop Science* 189: 347-350.
- Zoghlami, N., Bouamama, B., Khammassi, M. and Ghorbel, A. 2012. Genetic stability long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. *Industrial Crops and Products* 36: 59-64.
- Zou, X., Dai, Z., Ding, C., Zhang, L., Zhou, Y. and Yang, R. 2011. Relationships among six medicinal species of *Curcuma* assessed by RAPD markers. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 1349-1354.

ภาคผนวก

## ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ CTAB Buffer

### 1.1 การเตรียมสารละลาย Tris-HCl

การเตรียมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่ง Tris-HCl ปริมาณ 60.57 กรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 480 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย Conc. HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 500 มิลลิลิตร นำสารละลายบรรจุใส่ขวดดูเรน จากนั้นห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาโดยการวางที่อุณหภูมิห้อง

### 1.2 การเตรียมสารละลาย NaCl

การเตรียมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ โดยชั่ง NaCl ปริมาณ 29.22 กรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร นำสารละลายบรรจุใส่ขวดดูเรน จากนั้นห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

### 1.3 การเตรียม สารละลาย EDTA

การเตรียมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยชั่ง EDTA ปริมาณ 18.61 กรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร นำสารละลายบรรจุใส่ขวดดูเรน จากนั้นห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาโดยการวางที่อุณหภูมิห้อง

### 1.4 การเตรียม Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) Buffer

การเตรียมสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมสาร CTAB ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ชั่ง CTAB 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้สารละลายใส่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ให้ เติมสารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร เพื่อให้



ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.4 โมลาร์ เติมสารละลาย Tris-HCl ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์ และเติม  $\beta$ -mercaptoethanol ที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายในขวดห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาไว้โดยวางที่อุณหภูมิห้อง

## ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

### 2.1 การเตรียมสารละลาย Chloroforme : Isoamyl alcohol (24:1)

การเตรียมสารละลาย Chloroforme : Isoamyl alcohol ความเข้มข้น 24:1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ตวงสารละลาย Chloroforme ปริมาตร 240 มิลลิลิตร ภายใต้ตู้ดูดควัน (Hood) และตวงสารละลาย Isoamyl alcohol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ภายใต้ตู้ดูดควัน (Hood) ผสมให้เข้ากัน นำบรรจุสารละลายในขวดห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาไว้โดยวางที่อุณหภูมิห้อง

### 2.2 การเตรียมสารละลาย Ethanol

การเตรียมสารละลาย Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมสารละลาย Ethanol ให้อยู่ในรูปของสารละลายเข้มข้น ด้วยการตวง Ethanol ปริมาตร 70 มิลลิลิตร จากนั้นตวงน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายในขวดห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาไว้โดยวางที่อุณหภูมิห้อง

### 2.3 การเตรียมสารละลาย TE Buffer

การเตรียมสารละลาย TE Buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตวงน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ และเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายใส่ขวดห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาไว้โดยวางที่อุณหภูมิห้อง

### ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลายสำหรับวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

#### 3.1 การเตรียมสารละลาย 10X TBE Buffer

การเตรียมสารละลาย TBE Buffer ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชั่ง Tris-base 108 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมสาร Boric acid 55 กรัม ละลายจนเข้ากัน และเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และนำปรับค่า PH เท่ากับ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายบรรจุใส่ขวดห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาไว้โดยวางที่อุณหภูมิห้อง

#### 3.2 การเตรียม Agarose Gel

การเตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตรวจสอบคุณภาพ ดีเอ็นเอ ชั่ง Agarose 0.7 กรัม ละลายด้วย TBE Buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสี Loading dye (MaestroSafe™) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตรของสารละลาย Agarose และเทสารละลาย Agarose ใน Gel box แล้วเสียบหวี (Comb) ขนาดตามจำนวนตัวอย่าง จากนั้นวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-30 นาที ก่อนย้ายลง Gel chamber แล้วโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอ

การเตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตรวจสอบ PCR Product ชั่ง Agarose 1.5 กรัม ละลายด้วย TBE Buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสี Loading dye (MaestroSafe™) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตรของสารละลาย Agarose และเทสารละลาย Agarose ใน Gel box แล้วเสียบหวี (Comb) ขนาดตามจำนวนตัวอย่าง จากนั้นวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-30 นาที ก่อนย้ายลง Gel chamber แล้วโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอ

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวจันทร์เพ็ญ ใจชื่อ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6040320101

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2559

## ทุนการศึกษา

ทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่เน้นการศึกษาวิจัย  
ประจำปีการศึกษา 2561 จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้วิทยาเขตสุราษฎร์ธานีประจำปีการศึกษา 2561

## การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

จันทร์เพ็ญ ใจชื่อ, สุรพล ฐิติธนากุล, สรายุทธ อ่อนสนธิ และ ยาวพรรณ สนธิกุล. 2562. เทคนิคการ  
ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากธรรมชาติ เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ  
(Explants sterilization techniques of *Nepenthes* spp. for tissue  
Culture). วารสารแก่นเกษตร. 47(1): 1515-1520.

จันทร์เพ็ญ ใจชื่อ, นิรันดร ภูวัน, ดวงชาติตา กาญจนโสภา, อีร์ ศรีสวัสดิ์, สุรพล ฐิติธนากุล, สรายุทธ  
อ่อนสนธิ และ ยาวพรรณ สนธิกุล. 2562. การใช้เทคนิค Random Amplified  
Polymorphic DNA (RAPD) ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้น  
หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes mirabilis*) ในหลอดทดลอง (Random  
Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of somaclonal variation  
among *in vitro* *Nepenthes mirabilis*). วารสารแก่นเกษตร. 47(1): 515-522.