สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสอ่อน

นางสาวชุติมา แก้วพิบูลย์
นางสาวมณีรัตน์ เป็นเกตุ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 61826
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549

11603653
b.....
1.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of plant growth regulators to the differentiation and development of grape callus

Miss Chutima Kaewpiboon

Miss Maneerat Pankate

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสองุ่น
นักศึกษา	นางสาวชุติมา แก้วพิบูลย์
	นางสาวมณีรัตน์ แป้นเกตุ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2547
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ดร.กนกพร สมพรไพลิน	.....
กรรมการ	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	.....
กรรมการ	ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	.....

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาแคลลัสองุ่น

นักศึกษา นางสาวชุติมา แก้วพิบูลย์

นางสาวมณีรัตน์ แป้นเกตุ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2547

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

นำเนื้อเยื่อจากส่วนใบองุ่นมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ napthaleneacetic acid (NAA) ในระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ N^6-benzyladenine (BA) ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเริ่มเกิดแคลลัสขึ้นจากส่วนของใบ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ของการทดลอง

หลังจากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัส โดยนำแคลลัสที่ได้ย้ายลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด สามารถแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ตอน การทดลองแรกใช้ BA ความเข้มข้น 0 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด การทดลองที่ 2 ใช้ NAA และ BA ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA เท่ากับ 0.1 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงและมีการเจริญเติบโตมากที่สุด และการทดลองที่ 3 ใช้ NAA และ thidiazuron (TDZ) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NAA และ TDZ เท่ากับ 0 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงและมีการเจริญเติบโตมากที่สุด หลังจากนั้นทำการย้ายแคลลัสจากการทดลองที่ 3 ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลง แต่ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในทุกการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Effect of plant growth regulators to the differentiation and development of grape callus
Name	Miss Chutima Kaewpiboon Miss Maneerat Pankate
Department	Applied Biotechnology
Program	Biotechnology
Academic Year	2004
Special project Advisor	Dr. Pana Lohasupthawee

Abstract

Leaf explants from grapevine were cultured in Murashige and Skoog medium supplemented with napthaleneacetic acid (NAA) 0.5 mg/l and N^6-benzyladenine (BA) 1 mg/l. The results showed that callus was induced within 4 weeks of the experiment.

After callus induction, three experiments were studied for the differentiation and development of grape callus. The first experiment was to study the effect of different concentrations of BA in MS medium on callus growth. The result showed that BA at 1.5 mg/l showed the highest callus growth index. The second experiment was to study the effect of different combinations of NAA and BA in MS medium. The result showed the highest callus growth index was found in the medium containing NAA 0.1 mg/l and BA 0.1 mg/l. The third experiment was to study the effect of NAA and TDZ on growth and differentiation of callus. The result showed that in the medium containing TDZ 3 mg/l showed the highest callus growth index. Transferring the callus from the third experiment to MS medium without plant growth regulators in order to differentiate the callus but the result showed that there were no differentiation in every experiment.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสอ่อน โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งให้คำแนะนำ แนวความคิด แนวทางการแก้ไขปัญหาในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ รวมถึง ดร.กนกพร สมพรไพลิน และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ซึ่งได้กรุณาเป็นคณะกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัต ทองจันทร์ คุณประสิทธิ์ แผ้วบาง และคุณวิทยา เขียวเขิน เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องของอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณพี่นักศึกษาปริญญาโทและเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ ทำให้การทำโครงงานพิเศษเป็นไปได้ด้วยดี

สุดท้ายที่ควรระลึกถึงอย่างยิ่ง บิดาและมารดาที่เป็นผู้ให้ความสนับสนุนด้านการศึกษา และเป็นผู้ที่ให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานที่จัดทำขึ้นฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษฉบับนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัย ณ ที่นี้ด้วย

ชุติมา แก้วพิบูลย์
มณีรัตน์ แป้นเกตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 องุ่น	3
2.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการปลูกองุ่น	4
2.3 การขยายพันธุ์องุ่น	5
2.4โรคที่เกิดขึ้นในองุ่น	7
2.5 ประวัติและวิวัฒนาการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	10
2.6 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	11
2.7 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	13
2.8 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	18
2.9 การเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	23
2.10 การเพาะเลี้ยงแคลลัส	32
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	39
3.1 อุปกรณ์	39
3.2 วิธีการทดลอง	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	46
4.1 ผลการทดลอง	47
4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง	64
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	67
5.1 สรุปผลการทดลอง	67
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	
ก. สูตรอาหาร Murshige และ Skoog	71
ข. วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงตัวทำละลายและการเก็บรักษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด	16
2	แสดงอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	44
3	แสดงอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	45
4	แสดงผลของอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแคลลัสอายุ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง	47
5	แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง	48
6	แสดงลักษณะของแคลลัสในอาหารสูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแคลลัสอายุ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง	52
7	แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAAในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง	53
8	แสดงลักษณะของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแคลลัสในระยะเวลา 8 สัปดาห์	55
9	แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง	58
10	แสดงลักษณะของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตรของ MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต	60
11	แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตรของ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ 4 สัปดาห์ของการทดลอง	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	องุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา	3
2	องุ่นพันธุ์คาร์ดินัล	4
3	การตอนกิ่งองุ่น	6
4	การเสริมรากองุ่น	7
5	แคลลัสจากใบองุ่นในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	46
6	เปรียบเทียบแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (a) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตกับ (b) แคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 8 สัปดาห์	48
7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส กับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์	49
8	แคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญ (A) NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 8 สัปดาห์	51
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส กับ BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์	54
10	แคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติม (A) NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	57
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส กับ NAA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์	59
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ย้ายจากการทดลองตอนที่ 4 มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ในสมัยรัชกาลที่ 5 องุ่นได้ถูกนำมาปลูกในประเทศไทย เมื่อมีการติดต่อค้าขายกับต่างประเทศหรือการเสด็จเยือนต่างประเทศ มีการส่งผลองุ่นจีนมาขาย เนื่องจากองุ่นเป็นผลไม้ที่มีรสหวานอร่อย รูปร่างและสีของผลสวยงามคงจะเป็นแรงจูงใจให้ตื่นตัวคิดจะปลูกองุ่นกันขึ้น แต่ด้วยความรู้สึกที่ว่าองุ่นเป็นไม้ผลเมืองหนาว ในระยะแรก ๆ จึงนำไปปลูกทางภาคเหนือก่อน เช่น จังหวัดเชียงใหม่ แต่จากการศึกษาทดลอง ทั้งของทางหน่วยราชการและเอกชนทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศแรกในเขตร้อนที่สามารถปลูกองุ่นเป็นการค้าได้สำเร็จ พื้นที่ปลูกองุ่นได้ขยายไปในแถบภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือบ้างเล็กน้อย และยังมีข้อได้เปรียบการปลูกองุ่นในเขตหนาวอีกด้วย กล่าวคือ การปลูกองุ่นในประเทศแถบหนาว สามารถให้ผลผลิตได้เพียงหนึ่งครั้งต่อปี ส่วนองุ่นที่ปลูกในไทยสามารถให้ผลผลิตมากกว่า 1 ครั้งต่อปี ในปัจจุบันราคาขององุ่นถูกกว่าสมัยก่อนและยังสามารถส่งเป็นสินค้าออกไปขายยังประเทศใกล้เคียง อย่างไรก็ตามการปลูกองุ่นในประเทศไทยก็ยังมีปัญหาและข้อจำกัดอีกหลายประการ สภาพภูมิอากาศจึงเป็นตัวจำกัดเขตการปลูกองุ่น และลักษณะการใช้ประโยชน์ เช่น ในประเทศไทยสามารถปลูกองุ่นรับประทานผลสดได้ดี โดยเฉพาะองุ่นที่แก่ในฤดูร้อนและฤดูหนาว แต่การที่จะปลูกองุ่นสำหรับทำเหล้าองุ่นให้มีคุณภาพดี ๆ ยังสู้องุ่นในแถบยุโรปไม่ได้ ซึ่งสภาพภูมิอากาศมีผลต่อคุณภาพของผลผลิตเป็นสำคัญ ส่วนการเจริญเติบโตของต้นไม่มีปัญหามากนัก นอกจากเขตที่มีอากาศร้อนจัดหรือหนาวจัดเกินไปจะทำให้องุ่นตาย และปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการปลูกองุ่นในประเทศไทย คือ ปัญหาเรื่องโรคต่าง ๆ ระบาดทำความเสียหายอย่างมาก ทำให้ผู้ปลูกต้องลงทุนในการป้องกัน กำจัด เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก จนบางแห่งต้องเลิกปลูกองุ่นหันไปปลูกพืชอย่างอื่นแทน เนื่องจากโรคระบาดทำความเสียหายมากและป้องกันไม่ค่อยได้ผล

ดังนั้นจึงนำประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อขยายพันธุ์องุ่นให้มีจำนวนมากในระยะเวลารวดเร็ว สำหรับในการทำโครงงานพิเศษนี้ใช้องุ่น *(Vitis vinifera)* พันธุ์ไวท์มะละกา (Varieties White Malaga) เป็นพืชที่ขึ้นได้ดีทั้งในเขตหนาว เขตกึ่งร้อนและแถบเมืองร้อน เป็นพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุด ในปัจจุบันเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ผลมีสีเหลืองอมเขียว รสหวาน เปลือกหนาและเหนียว ในผลหนึ่งๆ มี 1-2 เมล็ด โดยในการทดลองทำการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบขององุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสามารถนำแคลลัสมาใช้ประโยชน์อีกต่อไป ซึ่งอาจจะนำมาใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้สามารถต้านทานกับโรคที่เกิดขึ้นได้ เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสขององุ่น
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสองุ่นในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสองุ่นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ
2. สามารถทราบถึงผลของสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 องุ่น (กลุ่มเกษตรสัญจร. 2531)

องุ่นจัดอยู่ในวงศ์ Vitaceae มีชื่อสกุลว่า Vitis ซึ่งมีชนิดอยู่มากมาย ทั้งชนิดที่ปลูกเพื่อใช้ผลรับประทานและชนิดที่เป็นไม้ป่า ซึ่งมีรสเปรี้ยว ฝาดจัด เนื้อผลน้อยไม่เหมาะสำหรับใช้รับประทาน แต่ใช้ประโยชน์ในแง่อื่น เช่นใช้เป็นต้นตอ (stock) องุ่นชนิดที่ปลูกเพื่อใช้ผลรับประทาน ซึ่งปลูกกันมากที่สุด ได้แก่ *Vitis vinifera* ซึ่งให้ผลดก คุณภาพของผลสูง รสดี ช่อใหญ่ ผลมีสีและรูปร่างต่าง ๆ กันออกไป พันธุ์องุ่นทั้งหมดของโลกมีจำนวนไม่ต่ำกว่า 8,000 ชนิด จะเห็นว่ามีจำนวนมากเป็นอย่างยิ่ง เฉพาะองุ่นที่ได้นำเข้ามาทดลองปลูกในประเทศไทยตั้งแต่แรกเริ่มก็มีจำนวนไม่ต่ำกว่า 100 พันธุ์ แต่มีองุ่นที่ปลูกได้ผลดีและนิยมปลูกเพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ไวท์มะละกาและพันธุ์การ์ดินัล

1. พันธุ์ไวท์มะละกา เป็นพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุด ในปัจจุบันเป็นที่นิยมของผู้บริโภคโดยทั่วไป ปลูกง่ายและเจริญเติบโตดี มี 2 สายพันธุ์ คือ ชนิดผลกลมและผลยาว ลักษณะช่อใหญ่ยาว การติดผลดี ผลมีสีเหลืองอมเขียว รสหวานแหลม เปลือกหนาและเหนียว ในผลหนึ่งๆ มี 1-2 เมล็ด ช่วงเวลาหลังจากตัดแต่งกิ่งจนเก็บผลได้ประมาณ 4 เดือนครึ่ง ปีหนึ่งให้ผลผลิต 2 ครั้ง ผลผลิตประมาณ 10-15 กิโลกรัมต่อต้นต่อครั้ง ปัจจุบันชาวสวนได้หันมาปลูกองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาสายพันธุ์ผลยาวกันมาก เพราะมีรสหวานกรอบและสีเหลืองสดใสกว่าพันธุ์ผลกลม

รูปที่ 1 องุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

ที่มา : www.thepwatana.com/ Clinic/Grape.shtm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. พันธุ์คาร์ดินัล เป็นองุ่นที่ปลูกง่าย การเจริญเติบโตดีมาก มีลักษณะช่อใหญ่ ผลดก ผลกลมค่อนข้างใหญ่ มีสีแดงหรือม่วงดำ รสหวาน กรอบ เปลือกบาง จึงทำให้ผลแตกง่ายเมื่อผลแก่ในช่วงฝนตกชุก ในผลหนึ่งๆ มีเมล็ด 1-2 เมล็ด ช่วงเวลาหลังจากตัดแต่งกิ่งจนเก็บผลได้ใช้เวลา 3-3 เดือนครึ่ง ในเวลา 2 ปี สามารถให้ผลผลิตได้ถึง 5 ครั้ง ผลผลิตประมาณ 10-15 กิโลกรัมต่อต้นต่อครั้ง แต่ราคาถูก ปัจจุบันจึงนิยมปลูกกันน้อย

รูปที่ 2 องุ่นพันธุ์คาร์ดินัล

ที่มา : www.maejo.com/ dupic/default.asp

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการปลูกองุ่นในแถบภาคตะวันตก เช่น อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอสามพราน อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งสามารถให้ผลผลิตได้ดี แต่เกษตรกรบางรายได้เปลี่ยนจากองุ่นเป็นพืชอื่น เนื่องจากมีโรคแมลงระบาดมาก และแมลงดื้อยาไม่สามารถกำจัดได้ ทำให้พื้นที่ปลูกองุ่นในแถบนี้ลดลง พื้นที่ปลูกองุ่นได้ขยายไปในแถบภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือบ้างเล็กน้อย ถึงแม้ว่าราคาจะเป็นแรงจูงใจ แต่ปัญหาเรื่องโรคแมลงระบาดมากทำให้พื้นที่ปลูกองุ่นไม่ค่อยขยายเท่าที่ควร

2.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการปลูกองุ่น (วัฒนา สวรรยาธิปัติ, 2531)

องุ่นถึงแม้จะไม่ใช่พืชเขตร้อน แต่จากสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นอย่างประเทศไทย องุ่นสามารถเจริญเติบโตได้ดีจึงปลูกได้โดยทั่วไป ถ้าได้รับการตัดแต่งกิ่งก็สามารถออกดอกได้ดีเช่นเดียวกันกับองุ่นที่ปลูกในเขตหนาวสามารถให้ผลผลิตมากกว่า 1 ครั้งต่อปี และสามารถบังคับให้ผลองุ่นแก่ในฤดูใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของปีก็ได้ ในขณะที่องุ่นที่ปลูกในเขตหนาวให้ผลผลิตปีละครั้งและผลแก่ช่วงฤดูร้อนเท่านั้น แต่ควรระวังคือ ในสภาพดินฟ้าอากาศที่มีความชื้นสูงฝนตกชุกจะทำให้เกิดโรคระบาดอย่างรวดเร็วทำให้เสียหายแก่ใบ ต้น และผลองุ่นได้มาก จึงต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดโรคแมลงมากไม่คุ้มกับการลงทุน แต่ถ้าฝนตกในตอนผลแก่จะทำให้ผลแตก คุณภาพของผลไม่ดี ดังนั้นสภาพภูมิอากาศจึงเป็นตัวจำกัดเขตการปลูกองุ่น และลักษณะการใช้ประโยชน์ เช่น ในประเทศไทยสามารถปลูกองุ่นรับประทานผลสดได้ดี โดยเฉพาะองุ่นที่แก่ในฤดูร้อน และฤดูหนาว แต่การที่จะปลูกองุ่นสำหรับทำเหล้าองุ่นให้มีคุณภาพดี ๆ ยังสู้องุ่นในแถบยุโรปไม่ได้ ซึ่งสภาพภูมิอากาศมีผลต่อคุณภาพของผลผลิตเป็นสำคัญ ส่วนการเจริญเติบโตของต้นไม่มีปัญหามากนัก นอกจากเขตที่มีอากาศร้อนจัดหรือหนาวจัดเกินไปต้นองุ่นอาจตายได้ จะเห็นว่าเขตปลูกองุ่นของโลกนั้นกว้างมาก สามารถปลูกได้ในพื้นที่สูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับความสูง 6,000 ฟุต แต่แหล่งปลูกองุ่นที่มีคุณภาพดีมักอยู่ในระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,000 - 4,000 ฟุตองุ่นสามารถเจริญเติบโตได้ในดินทั่วไปที่มีความอุดมสมบูรณ์เพียงพอ ดินที่เหมาะสำหรับปลูกองุ่นได้ผลดีนั้น มักเป็นดินเหนียวที่มีธาตุอาหารพืชอยู่มากตามที่ราบลุ่มแม่น้ำ มีหน้าดินลึกสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ระหว่าง 5.6-6.4 มีน้ำเพียงพอต่อความต้องการขององุ่นได้ แต่ต้องเป็นบริเวณที่น้ำท่วมไม่ถึง เพราะถ้าองุ่นถูกน้ำท่วมเพียง 2 วันก็จะตาย และต้องไม่เป็นพื้นที่ที่น้ำทะเลท่วมถึงเพราะจะทำให้ต้นองุ่นได้รับความเสียหายเช่นเดียวกัน

2.3 การขยายพันธุ์องุ่น (ปวิณ ปุณศรี, 2504) สามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น

1. การปักชำ เป็นวิธีการที่ง่ายและเหมาะสมวิธีหนึ่ง กิ่งที่ใช้ปักชำควรเป็นกิ่งที่มีอายุประมาณ 7-12 เดือน กิ่งที่แก่หรืออ่อนเกินไปจะออกรากไม่ค่อยดี ควรเลือกกิ่งขนาดไม่ใหญ่หรือเล็กเกินไป มีข้อถี่ๆ และมีตาโปนเห็นเด่นชัด เวลาทำการปักชำให้ตัดกิ่งองุ่นเป็นท่อนๆ ยาว 15-20 เซนติเมตร หรือมีข้อประมาณ 4-5 ข้อ ปักชำลงในกระบะทรายผสมขี้เถ้าแกลบ (อัตราส่วน 1 ต่อ 1) ถ้ามีสารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยในการเร่งราก ควรนำกิ่งปักชำมาจุ่มเสียก่อน จะช่วยให้ออกรากได้มากและแข็งแรง แล้วจึงปักชำในวัสดุที่เตรียมไว้ลึก 1 ใน 3 ของกิ่ง รดน้ำให้ชุ่มชื้นอยู่เสมอหลังจากการปักชำแล้วประมาณ 15-20 วัน กิ่งที่ปักชำจะเริ่มแตกรากและแตกใบอ่อน เมื่ออายุประมาณ 1 เดือนก็นำลงปลูกได้ นอกจากการปักชำในกระบะแล้ว ใต้ต้นองุ่นในแปลงปลูกมีร่มรำไรอยู่เสมอ สามารถปรับปรุงใช้เป็นแปลงปักชำกิ่งองุ่นได้ดีเช่นเดียวกัน

2. การตอน เป็นวิธีการที่ชาวสวนนิยมทำกันมากอีกวิธีหนึ่งเพราะสะดวก รวดเร็ว และตรงตามพันธุ์ กิ่งที่ใช้ตอนนั้นควรเป็นกิ่งที่ไม่อ่อนไม่แก่เกินไป กิ่งที่เหมาะสมในการตอนควรมีอายุประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 เดือน ควรเลือกกิ่งที่สมบูรณ์ขนาดเท่าแท่งดินสอ ปราศจากโรคและแมลงในกิ่งเดียวกันสามารถตอนได้หลายช่วง โดยแต่ละช่วงมีประมาณ 3-4 ข้อ

รูปที่ 3 การตอนกิ่งองุ่น

ที่มา : www.doae.go.th/library/html/detail/grape/grape4.htm

เมื่อเลือกกิ่งที่เหมาะสมได้แล้ว จึงควั่นกิ่งการตอนกิ่งให้รอยควั่นห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ลอกเปลือกออกแล้วใช้สันมีดขูดเยื่อเจริญออก จากนั้นหุ้มด้วยตุ้มขุยมะพร้าวที่เตรียมไว้ หรือจะใช้ดินเหนียวอย่างเดียวแล้วใช้พลาสติกหุ้มก็ได้ แต่ต้องคอยตรวจดูอย่าให้ตุ้มตอนแห้ง อีก 15 วันต่อมา จะเห็นรากองุ่นสีขาวออกมา 3-4 ราก รีบตัดนำไปชำในถุงพลาสติกซึ่งบรรจุทรายและขี้เถ้าแกลบในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 หลังจากนั้นอีก 15 วัน เมื่อกิ่งตอนแข็งแรงดีแล้วก็สามารถนำไปปลูกในแปลงได้

ข้อควรระวัง คือ ในระหว่างการเพาะชำในถุงพลาสติกนั้น ควรพ่นด้วยสารกำจัดเชื้อรา เช่น แคปแทน หรือเบนเลท ทุก 7 วันและเมื่อชำไว้แล้ว ควรรีบนำไปปลูกขณะที่รากยังขาวอยู่ ไม่ควรปล่อยให้รากเป็นสีน้ำตาลเหมือนพืชอื่น เพราะจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตและตายง่ายขึ้น

3. การติดตา จุดประสงค์ของการติดตาเพื่อให้ได้ต้นองุ่นที่ให้ผลผลิตดี และมีระบบรากแข็งแรงทนทาน เพราะองุ่นพันธุ์ดีอาจอ่อนแอหรือถูกรบกวนด้วยศัตรูในดินได้ง่าย แต่องุ่นพันธุ์ป่าบางพันธุ์มีระบบรากแข็งแรง ทนทานต่อโรคแมลงในดินได้ดี ก็จะเอาพันธุ์นั้นเป็นต้นตอแล้วนำตาพันธุ์ดีมาติดให้เป็นส่วนยอด เนื่องจากองุ่นมีเปลือกไม้ที่ลอกออกยาก ดังนั้นวิธีการติดตาองุ่นที่ใช้กันคือ การติดตาแบบชิบ (Chip budding) โดยเลือกตาพันธุ์ดีที่มีสีน้ำตาล ตาไม่บอดปราศจากโรคและแมลง เฉือนตาให้ติดเนื้อไม้ และเฉือนต้นตอให้เป็นรูปอย่างเดียวกับที่เฉือนตาพันธุ์ดี แล้วนำไปติดกับต้นตอ เอาพลาสติกพันเว้นให้ส่วนตาโผล่ออกหรือพันปิดตาก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเสียบยอด การเสียบยอดกิ่งองุ่นเป็นวิธีที่นิยมกันมากเช่นกัน โดยการปลูกพันธุ์องุ่นป่าไว้ในภาชนะหรือแปลงเพาะชำเสียก่อนจนตั้งตัว หรืออาจจะปลูกพันธุ์องุ่นป่าเป็นต้นตอไว้ในแปลงอย่างน้อย 1 ปี แล้วจึงทำการเสียบยอด กิ่งพันธุ์องุ่นที่นำมาเสียบยอดควรมีขนาดเท่ากันกับต้นตอ หรือขนาดใกล้เคียงกันกับต้นตอ วิธีการให้เฉือนต้นตอเป็นรูปปากฉลาม และเฉือนกิ่งพันธุ์ดีเป็นรูปลิ่ม แล้วจึงนำมาเสียบเข้าด้วยกัน พันด้วยพลาสติกให้แน่นกิ่งพันธุ์ดีที่นำเข้ามาเสียบให้มีตาเพียงตาเดียว กิ่งที่มีหลายตาจะแห้งง่ายทำให้ต่อไม่ติด เมื่อกิ่งติดกันดีแล้วก็จะแตกเป็นต้นใหม่ต่อไป

5. การเสริมราก การเสริมรากไม่ใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยตรง แต่เป็นการทำให้มีระบบรากที่แข็งแรงขึ้น ใช้ในกรณีที่ปลูกองุ่นพันธุ์ดีอยู่แล้ว แต่ต้องการให้มีระบบรากที่แข็งแรง หาอาหารได้เก่ง ต้นองุ่นที่จะนำมาเสริมมักใช้ต้นองุ่นป่า วิธีการคือปลูกต้นองุ่นป่าใกล้ๆ กับต้นพันธุ์ดีที่มีอยู่แล้ว เมื่อต้นองุ่นป่าเจริญเติบโตแข็งแรงดีแล้ว เฉือนที่องุ่นพันธุ์และเฉือนปลายกิ่งองุ่นป่าเป็นรูปปากฉลาม แล้วนำมาประกบกันให้สนิทพันด้วยพลาสติกให้แน่น ก็จะได้ต้นองุ่นที่มี 2 ขา หรือ 2 โคน ถ้าต้องการให้มี 3 ขา ก็ต่อก้านตรงข้ามกับอีกต้นหนึ่ง ขนาดของต้นองุ่นพันธุ์ และองุ่นป่าที่นำมาเสริมรากไม่จำเป็นต้องเท่ากันก็ได้ เมื่ออยู่ไปหลายๆ ปี โคนต้นทั้งสองก็จะเจริญเติบโตจนมีขนาดใกล้เคียงกัน

รูปที่ 4 การเสริมรากองุ่น

ที่มา : http://www.doae.go.th/library/html/detail/grape/grape4.htm

2.4 โรคที่เกิดขึ้นในองุ่น (กรมวิชาการเกษตร, 2539)

1. โรคราน้ำค้าง

เชื้อราน้ำค้างแพร่ระบาดได้ดีทางลมและฝน ในสภาพอากาศชื้น และมีฝนตกชุกพบการระบาดของโรคชนิดนี้มาก เชื้อราน้ำค้างพักตัวในสภาพ oospore ในเศษซากพืชในดินและสภาพเส้นใยที่พักตัวที่ตาบนกิ่งองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. โรคกิ่งแห้ง

เชื้อราตกค้างที่ใบ เถา และผลอ่อนที่เน่าแห้งดำ แพร่ระบาดได้ดีทางลมในสภาพอากาศชื้นและฝนตกชุก เข้าทำลายทางรอยปลิดตาข้างและตามรอยแผลตัดแต่งกิ่งและบริเวณง่ามกิ่งหรือบริเวณตาอ่อน ทำให้เนื้อเยื่อลำเลียงน้ำและอาหารสู่ใบและช่ออ่อนถูกตัดขาดจึงแสดงอาการเหี่ยว ในสภาพที่มีความชื้นสูง บริเวณตาและโคนช่ออ่อนจะพบการเข้าทำลายรุนแรงและสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำ ในสภาพที่มีโรคระบาดมากเชื้อราเข้าทำลายทางก้านช่อ เข้าทำลายผลอ่อนอ่อน ทำให้ผลฝ่อเน่าดำ

3. โรคสแคป

เชื้อราสร้างสปอร์ที่ใบและแพร่ระบาดส่วนสปอร์เข้าทำลายที่ยอดหรือช่อดอก และช่อผล ลม และฝนช่วยให้สปอร์ไหลไปตามกิ่งและเถาเข้าสู่ช่ออ่อน เชื้อราเข้าทำลายได้ง่ายเมื่อผลอ่อนเป็นแผล ในฤดูฝนเชื้อราแพร่ระบาดจากแหล่ง เชื้อบนเศษซากพืชภายในสวนหรือบริเวณใกล้เคียงทำให้ยอดเน่าดำเป็นโรครุนแรง

4. โรคราสนิม

ใบอ่อนเป็นจุดเล็ก ๆ สีเหลืองด้านบนใบ จุดเกิดเป็นกลุ่ม ๆ หรือกระจัดกระจายทั่วไป ด้านใต้ใบจะมีกลุ่มเชื้อราสีเหลืองส้มเมื่อแตะดูจะติดมือได้ง่าย โรคราสนิมระบาดได้รวดเร็วทำให้ใบเหลืองแห้ง และร่วงหล่น ระยะแรก ๆ จะพบกับใบแก่ และต่อมาจะเข้าทำลายระยะใบอ่อน โรคชนิดนี้พบกับต้นอ่อนที่ห่างการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ยอดอ่อนที่เป็นตอป่าบริเวณโคนต้นไม่ได้รับสารเคมีมักพบโรคราสนิมมาก

5. โรคใบจุด ผลจุดนูนดำ

ใบอ่อนเป็นจุดสีน้ำตาลเล็ก ๆ เกิดกระจัดกระจายทั่วไปจุดมักมีขนาดเล็กกว่าโรคแอนแทรคโนสและไม่แสดงอาการแผลแตกเป็นรู เชื้อราเจริญ บนผลอ่อนที่เริ่มแก่แสดงอาการเป็นจุดนูนเล็กๆ สีดำ (fly speck) เมื่อแตะดูมีความรู้สึกสากมือและทำให้ผิวไม่สวย

6. โรคใบไหม้ ใบลวก

ต้นอ่อนแสดงอาการขาดน้ำ ยอดเหี่ยวเฉาตาย ใบแสดงอาการขอบใบไหม้และมีอาการจุดซีดเหลืองขยายโต ขอบใบแห้งตายอย่างรวดเร็ว แต่บริเวณภายในของใบยังคงมีสีเขียวหรือม่วงเข้ม อาการแห้งตายจะลุกลามไปที่ฐานใบและใบที่แห้งจะร่วงเฉพาะเนื้อใบ ยังคงเหลือก้านใบติดกับกิ่ง ต่อมาก้านใบจะค่อยแห้งจากปลายเข้าไป สภาพที่มีใบไหม้มากจะทำให้ ช่ออ่อนเหี่ยวแห้งลักษณะอาการเหี่ยวแห้งของใบนั้นอาจแตกต่างกันไป ตามสภาพอุณหภูมิและความชื้นและพันธุ์อ่อน อาการดังกล่าวอาจพบเพียงบางใบและบางกิ่งเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. โรคราแป้ง

เนื้อเยื่ออ่อนที่มีสีเขียวของยอดและใบอ่อนอ่อนมีราสีขาวลักษณะคล้ายฝุ่นแป้งขาวปกคลุมผิวพืช ส่วนยอดและช่อดอกที่ถูกเชื้อราปกคลุมจะค่อยซีดเหลือง เหี่ยวแห้งตาย เชื้อราแป้งเจริญเป็นกลุ่ม ๆ ด้านบนใบทำให้เกิดอาการด่างเหลืองรวมตัวกันต่อมาใบจะแห้งและร่วง เชื้อราแป้งทำให้ช่อผลเล็ก ๆ เหี่ยวแห้ง ผลโตเป็นจุดสีม่วงมีลายตกกระ ในบางครั้ง ทำให้ผลแตก ผลอ่อนชะงักการเจริญเติบโต ในสภาพอากาศหนาวเย็นนาน ๆ เชื้อราจะสร้างสปอร์ ในส่วนที่เป็นเม็ดสีดำ ซึ่งกระจัดกระจายปะปนกันกับเส้นใยสีขาวของเชื้อราบนผิวใบอ่อนในฤดูหนาว

8. โรคใบจีบคล้ายพัด

ลำต้นอ่อนที่เป็นโรคจะมีขนาดเล็กและมีกิ่งก้านสั้น ใบมีลักษณะผิวปกติเนื้อใบรวมกันเป็นกลุ่มไม่แผ่กระจาย กลุ่มเส้นใบชิดกันทำให้ขอบใบเป็นแฉกถี่ ๆ และปลายเรียวแหลมกว่าปกติ อีกลักษณะหนึ่งของโรคคือใบจะมีเนื้อเยื่อเป็นแถบสีเหลืองรอบเส้นใบ โดยเฉพาะบริเวณปลายใบ เส้นใบมีสีขาว รูปร่างใบคล้ายปกติหรือขอบใบปลายเรียวแหลมแตกต่างพันธุ์อ่อน ช่ออ่อนมีขนาดเล็กและในแต่ละช่อจะมีผลอ่อนขนาดโตไม่เท่ากันและการเรียงตัวในช่อไม่สม่ำเสมอหรือยังมีช่อดอกเหลือในช่ออ่อนที่ติดผลแล้ว

9. โรคลำต้นและรากเน่าจากเห็ดรา

ต้นอ่อนชะงักการเจริญเติบโต บริเวณโคนต้นมีการขยายตัวน้อย มีเชื้อราสีขาวเจริญแทรกบริเวณเปลือกในแนวตามยาวของลำต้น เมื่อเป็นโรครุนแรง เปลือกบริเวณโคนต้นจะยุ่ย มีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญระหว่างลำต้นและเปลือก เปลือกยุ่ยฉีกออกได้ง่าย เมื่อดมดูจะมีกลิ่นคล้ายเชื้อเห็ด ส่วนยอดที่มีเชื้อราเข้าทำลายโคนต้นจะชะงักการเจริญ และแสดงอาการเหี่ยวแห้งตายเป็นกิ่ง ๆ ในสภาพที่มีอากาศชื้นที่เพียงพอจะพบดอกเห็ดเจริญบริเวณส่วนรากใกล้โคนต้น รากจะถูกทำลายเน่าตายอย่างรวดเร็วตรวจพบมีเชื้อรา สีขาวปกคลุมรากหนาแน่น และต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ

10. โรคแอนแทรคโนส

ผลอ่อนระยะก่อนเก็บเกี่ยวเป็นจุดเน่าสีน้ำตาลดำขยายตัว เนื้อเยื่อเป็นแอ่งบุ๋มกลางจุดที่เนื้อเยื่อเน่ามักมีกลุ่มสปอร์สีส้มของเชื้อโรคปรากฏชัดเจนเมื่อผลเน่าเป็นโรคมากพบอ่อนเป็นโรครุนแรงกับพันธุ์คาร์ดินัลในระยะเก็บเกี่ยวผลอ่อนที่เก็บเกี่ยวแล้วระหว่างรอการจำหน่ายแสดงจุดช้ำสีน้ำตาลแดงจุดเป็นแอ่งบุ๋มขยายตัวเป็นรูปวงกลม บริเวณกลางจุดมีกลุ่มเมือกสปอร์ สีชมพู เกิดเรียงตัวซ้อนกันเป็นวง ๆ โรคแอนแทรคโนส บนผล อ่อนมักลุกลามอย่างช้าจากการทดสอบปลูกเชื้อพบว่ามีความจำเป็นในการทำแผลก่อนจึงจะทำให้เกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. โรคราสีเทา

เชื้อราสีเทาเข้าทำลายส่วนตา ยอดอ่อน ช่อดอก และผลอ่อนอ่อนอ่อน ในสภาพอากาศที่ร้อนและชื้น ทำให้ช่อดอกแห้ง ช่อดอกแห้ง ช่อผลอ่อนเน่าแห้ง เรียกว่า Summer Botrytis rot ใบมีจุดสำน้ำตาล ขยายโตบริเวณขอบใบผลอ่อนระยะที่กำลังเจริญเติบโต

12. โรคผลเน่า

ผลอ่อนที่ติดช่อหนาแน่นในช่อที่แก่แตกที่ผิวตามความยาวของผล มีเชื้อราเข้าทำลายทำให้สีซีดจาง เนื้อเยื่อนิ่มมีน้ำไหลเยิ้มบริเวณกลางแผล มี กลุ่มของเชื้อราเจริญฟูระยะแรกมีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นเป็นกลุ่มสปอร์สีดำ ในสภาพที่มีฝนตกชุกผลแก่มักแตก พบเชื้อราชนิดนี้จำนวนมาก ผลอ่อนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงมักเป็นโรคชนิดนี้ได้ง่ายทำให้ผลมีสีซีดผิวแตกและมีเชื้อราสีน้ำตาลหรือสีดำ

13. โรคผลเน่าดำกำมะหยี่

ช่ออ่อนระยะหลังเก็บเกี่ยวแสดงอาการเน่าลุกลามจากก้านช่อสู่ขั้วผล ผลอ่อนมีลักษณะเป็นสีม่วงและลุกลามลงสู่ส่วนล่างของผลต่อมาผลอ่อนแตกมีเส้นใยของราเจริญปกคลุมผล เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาดำเจริญปกคลุมผลและช่ออ่อนหนาแน่น เชื้อราบนผลที่แห้งฝ่อมีสีดำคล้ายผ้ากำมะหยี่

14. โรคผลเน่านิ่ม

ช่ออ่อนที่เก็บไว้ในสภาพอากาศร้อนและชื้นถูกทำลายโดยเส้นใยเชื้อราเจริญปกคลุมลุกลามทำลายผลอ่อนทั้งช่อ ทำให้ผลมีสีซีด ผิวผลแตกมีเชื้อราเจริญฟูบนผลทำให้ผลอ่อนมีสีซีดจาง ช่ออ่อนที่เน่าโดยโรคชนิดนี้มักมีน้ำเยิ้มออกมามากทำให้กล่องกระดาษที่ใช้บรรจุเปียกและเสียรูปทรง

2.5 ประวัติและวิวัฒนาการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ทำกันมานานแล้ว ตั้งแต่ Haberlandt (1902) ซึ่งเป็นคนแรกที่ได้นำเอาใบพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เนื่องจากเขาคิดว่าเนื้อเยื่อพืชที่ประกอบด้วยเซลล์เหล่านี้น่าจะนำมาเลี้ยงให้มีชีวิตรอด และสามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ ถึงแม้ว่า Haberlandt จะทำไม่สำเร็จ เนื่องจากใช้เซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งเพาะเลี้ยงยาก และในสมัยนั้นยังไม่มีการค้นพบหรือรู้จักสารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulator) แต่แนวความคิดของเขาก็ได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านค้นคว้าและก็ประสบผลสำเร็จ การทดลองในระยะแรกส่วนใหญ่นั้น ทำได้เพียงให้เนื้อเยื่อพืชมีชีวิตรอดอยู่ได้ในอาหารสังเคราะห์ จนกระทั่ง White (1934) ได้ค้นพบสูตรอาหารใหม่ คือ อาหารที่มีองค์ประกอบของเกลือแร่ น้ำตาลที่สกัดจากอ้อย (น้ำตาลซูโครส) และยีสต์สกัด (yeast extract) เลี้ยงรากมะเขือเทศให้มีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยรากมีการเจริญเติบโตได้เรื่อย ๆ ไม่มีที่สิ้นสุด และต่อมาเขาก็สามารถเลี้ยงรากยาสูบได้สำเร็จและนอกจากนั้นยังมีนักวิทยาศาสตร์คิดสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน เพื่อเลี้ยงพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เฉพาะเจาะจงยิ่งขึ้น เช่น สูตรอาหารเลี้ยงกล้วยไม้ของ Knudson C (1946) และ Vacin and Went (1949)

นอกจากนี้ Skoog และ Miller (1957) (อ้างโดย George, 1993) ยังพบว่า การพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นหรือรากขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารเร่งการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน (auxins) และไซโตไคนิน (cytokinins) โดยพบว่า ถ้าอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินสูงกว่าอัตราสมดุลแล้ว เนื้อเยื่อพืชจะเจริญไปเป็นแคลลัส (callus) และราก แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำกว่าอัตราสมดุลเนื้อเยื่อพืชจะเจริญไปเป็นยอด ถ้าอัตราส่วนของสารทั้งสองกลุ่มนี้สมดุล เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอดและราก ผลจากการค้นคว้าเรื่องสารเร่งการเจริญเติบโตนี้ ทำให้ความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแผ่กระจายกว้างขวางยิ่งขึ้น

ต่อมา Murashige และ Skoog (1962) ได้ศึกษาและปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น คือมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชในอัตราที่สูงขึ้น ทั้งสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ เพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ และสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog นี้ยังสามารถนำไปใช้กับพืชอื่น ๆ ได้อีกหลายชนิดด้วยกัน การเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ประสบผลสำเร็จเรื่อยมาและก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว

2.6 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กล่าวได้เป็นข้อ ๆ ดังนี้

1. เพื่อการผลิตต้นพืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ เริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพืชเพียงต้นเดียว และทำการย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง และแต่ละเดือนต้นพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ 10 ต้น

2. เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการผลิตพืชก็คือ โรคซึ่งอาจจะมีสาเหตุมากจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราเป็นอันดับแรก เพราะหากมีอนุภาคของเชื้อเหล่านี้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็จะเกิดการปนเปื้อน (contamination)ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะทั้งเชื้อราและแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร ปรากฏเป็นกลุ่มโคโลนีที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เราจึงสามารถขจัดออกได้ ส่วนกรณีของเชื้อไวรัสไม่มีทางแก้ไขได้ นอกจากจะกำจัดหรือทำลายทิ้งเท่านั้น ฉะนั้นก่อนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องมีการคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อ จนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อไวรัส ชิ้นส่วนของพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัสมากที่สุดคือ epical meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และส่วนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อคัพภะ (embryo) ที่อยู่ในเมล็ด อันเนื่องมาจากอนุภาคไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหารและท่อน้ำ แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อน้ำ และท่ออาหารที่ติดกับส่วนอื่น ๆ ของลำต้น

3. เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์พืช เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant) สามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง หรือต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช เป็นต้น หรือเพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถที่จะคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อม เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA recombinant) และการย้ายยีน (gene transformation)

4. เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชเหล่านั้น ในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่เราต้องการได้มากขึ้น

5. เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองนั้นสามารถที่จะติดตามการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและอย่างใกล้ชนิด เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ในหลอดทดลองทำได้ง่ายได้กว่าในแปลงทดลอง

6. เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช ปัจจุบันพืชหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปหรือกำลังจะ สูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง ด้วยเหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพันธุ์ต่าง ๆ ไว้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด หรือมีสารที่ทำให้เกิดความเครียดของน้ำขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามาก ๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อบ่อย ๆ จนกว่าเมื่อใดที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อนั้นสามารถย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้น ๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ อุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในสภาพเช่นนี้เซลล์และเนื้อเยื่อจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา, 2524)

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับความเหมาะสมต่อชนิดของพืชพันธุ์ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด คือ อาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนามีช่องว่างในเซลล์จำนวนมาก และเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปร่างที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่น ๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็งที่อย่างน้อยที่สุดประกอบด้วยเกลือของ ธาตุอาหารที่ต้องการครบ คือ สารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แม้พืชทั้งต้นจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนมากนักก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า คือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก (macro-elements nutrients) และธาตุอาหารรอง (micro-elements nutrients) ที่ใช้ตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารอื่น ๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามินอย่างมาก ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและ สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ต่าง ๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืช แล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่น ๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึม อย่างไรก็ตาม ผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม (secondary metabolites) เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของ สูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) และการกำเนิดคัพภะ (embyogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันได้โดยง่าย

ประเภทของอาหาร

1. อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium)

เทคนิคที่ใช้ในยุคแรก ๆ นั้น ใช้วุ้น (agar) เพื่อปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น โดยนึ่งใน หม้อนึ่งความดันเพื่อหลอมละลายอาหารแล้วเทใส่ภาชนะและทิ้งให้แข็งตัวอยู่ในสภาพ อาหารกึ่งแข็ง แต่มักพบว่าคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารประกอบเคมีในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว (liquid medium) กระนั้นก็ตามวุ้นยังคงถูกนำมาใช้แต่จำเป็นต้องดัดแปลงให้เหมาะสม และต้องแน่ใจว่ามีความบริสุทธิ์จริง ๆ ในทางปฏิบัติแนะนำให้ล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์อย่างน้อย 3 ครั้ง รายงานว่าการเจริญเติบโตของถั่ว Pea abies จะดีที่สุดในอาหารแข็งที่ใช้วุ้น Difco Purified

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

agar ขณะที่ Difco Noble agar ซึ่งผ่านการฟอกใสมากกว่าจะให้ผลที่ไม่ดีเท่า และการใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นความเข้มข้นของวุ้นที่พอเหมาะสำหรับอาหารแต่ละชนิดจะต้องมีการทดสอบเสียก่อน อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดีเพื่อวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ คือร้อยละ 0.8 สารสังเคราะห์พวก เจลาติน และ ซิลิกาเจล ได้เคยมีการใช้ และในปัจจุบันมี การพัฒนาสารประกอบพวกอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gels) เช่นเดียวกับ starch co-polymers ก็มีการแนะนำมาใช้แทนวุ้น สารเหล่านี้มีข้อดีที่ไม่จำเป็นต้องต้มให้เดือดเพื่อช่วยให้ละลายน้ำได้ แต่ยังมีปัญหาในเรื่องการปรับค่าพีเอช ในขณะที่สารพวกผงถ่าน (charcoal) ได้นำมาเติมในอาหารหลายสูตรเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตเนื่องจากสามารถดูดซับสารพิษพวก toxic metabolites ที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงได้ดี

2. อาหารเหลว (liquid medium)

อาหารเหลวเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเนื้อเยื่อจะจมหรือแขวนลอยอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มในอาหารเหลวตลอดเวลา ในทางปฏิบัติอาจใช้ glass wool ช่วยพยุงเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้เช่นกัน เช่นเดียวกับการใช้ fabric support (100 % polyester) ที่อิ่มตัวด้วยอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานเกิดได้ดีขึ้น เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจถูกคนที่ความเร็ว 1 - 150 รอบต่อนาที (rpm) เพื่อช่วยในการหายใจ

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน ซึ่งเป็นสารประกอบพวกอนินทรีย์ (inorganic compound) และพวกสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) เนื่องจากสารประกอบที่กล่าวมาเป็นสารกลุ่มใหญ่ในที่นี้จะจัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ดังนี้

1. ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (inorganic compound) ประกอบด้วยธาตุต่าง ๆ ดังนี้

1.1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (Macro-nutrient) ได้แก่ คาร์บอน(C) ไฮโดรเจน(H) ไนโตรเจน (N) ออกซิเจน (O) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และ แมกนีเซียม (Mg)

1.2 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (Micro-nutrient) ได้แก่ เหล็ก (Fe) คลอไรด์(Cl) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) และ โมลิบดีนัม (Mo)

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (organic compound)

2.1 วิตามิน (Vitamin) วิตามินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ไทอะมีน (Thiamin) กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) ไพริดอกซิน (pyridoxine) อินโนซิทอล (inositol) กรดเพนโททรีนิก (panthothenic acid) ไบโอติน (biotin) กรดโฟลิก (folic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอรีน (choline) คลอไรด์ (Cholide) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และ กรดแอสคอบิก (ascorbic acid)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโต (Hormones and growth regulators) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่สร้างขึ้นในต้นพืช (plant hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วม ในกระบวนการต่าง ๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติการเจริญเติบโตตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และ secondary metabolism เป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านี้ทั้งสิ้น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่จำเป็นเสมอไปโดยเฉพาะในการเลี้ยงแคลลัส อย่างไรก็ตามโดยปกติจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการกำเนิดอวัยวะ และมีเนื้อเยื่อพืชไม่กี่ชนิดที่สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชออกซินและไซโตไคนินมีความสำคัญที่สุด พืชบางชนิดสร้างสารเหล่านี้อยู่แล้ว แต่ควรเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อช่วยให้การเจริญดีขึ้น บางครั้งอาจต้องใช้จิบเบอเรลลิน หรือ เอทิลีน การเก็บสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชมักเก็บในตู้เย็นในรูปสารละลายเข้มข้น การนำสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชไปใช้อาจมีปัญหาการทำละลายของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในน้ำ การละลายออกซินควรทำในด่าง เช่น 0.1 KOH ไซโตไคนินก็เช่นเดียวกัน แต่ จิบเบอเรลลินละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ ออกซินและไซโตไคนินที่เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นควรเก็บไว้ในที่มืด หรือใส่ขวดสีชาเพราะจะเสื่อมสภาพเมื่อได้รับแสง

1. ออกซิน (auxin) เช่น IAA (indole acetic acid) IBA (indole butyric acid) NAA (naphthalene acetic acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ใช้ในช่วง 0.01- 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกซินช่วยเพิ่มขนาดของเซลล์ มักใช้ร่วมกับไซโตไคนินเพื่อช่วยในการแบ่งเซลล์ การสร้างราก แต่การเจริญของรากจะถูกยับยั้งถ้ามีออกซินในปริมาณที่สูง
2. ไซโตไคนิน (cytokinin) ไซโตไคนินที่สังเคราะห์ได้ในธรรมชาติ คือ ซีอะทิน (zeatin) ใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ไซโตไคนินที่ใช้กันมากคือ ไคเนติน (kinetin) 2iP (N6-isopentenyl adenine) BAP (benzyl aminopurine) มีหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์โดยเฉพาะถ้าใช้ร่วมกับออกซิน ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงขึ้นจะช่วยในสร้างราก แต่ยับยั้งการเจริญของรากส่งเสริมการสร้างยอดโดยลดผลจากการที่ตายอดข่มตาข้าง มีบทบาทในการเปลี่ยนสภาพเซลล์เป็นอวัยวะได้และชักนำให้เกิดเป็นต้น ไซโตไคนินทนความร้อนได้ดีจึงมักเติมในอาหารก่อนฆ่าเชื้อ บทบาทของออกซินและไซโตไคนินในพืชทั้งต้นและในสภาพหลอดแก้วอาจจะเหมือนกันหรือไม่เหมือนกันก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. จิบเบอเรลลิน (gibberellin) สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มนี้มี 60 กว่าชนิด แต่ GA3 เป็นชนิดที่ใช้มากที่สุด จิบเบอเรลลินไม่ค่อยใช้กันมากนักในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีบทบาทในการชักนำให้ปล้องยาวขึ้นหลังจากการสร้างยอด ช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญมีการเจริญเติบโตและช่วยในการงอกของเมล็ด ไม่ควรฆ่าเชื้อจิบเบอเรลลินด้วยหม้อนึ่งความดัน เพราะจิบเบอเรลลิน ส่วนหนึ่งจะเสื่อมสลายไปเมื่อได้รับความร้อน ควรทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้เครื่องกรองเมมเบรน นอกจากนี้จิบเบอเรลลินนั้นเคยถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่โดยทั่ว ๆ ไป มีผลปิดกั้น การเกิดอวัยวะ
4. แอบไซซิกแอซิค (ABA; abscisic acid) มักยับยั้งการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อแต่ในบางครั้งพบว่า เอบีเอส่งเสริมการเจริญของแคลลัส และการเกิด เป็นต้นใหม่ และการเกิดเป็นต้นใหม่ ควรทำให้สารนี้ปลอดเชื้อ โดยใช้เครื่องกรองเมมเบรน เอบีเอมีบทบาทเกี่ยวกับ การสังเคราะห์ไซโตไคนินและเป็นตัวต่อต้านการทำงานของ จิบเบอเรลลิน
5. เอทิลีน (ethylene) อวัยวะพืช แคลลัส หรือเซลล์ในสภาพหลอดแก้วมีการผลิตเอทิลีน จึงไม่ควรปิดหลอดแก้วแน่นเกินไปเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของแก๊สนี้ ผลของเอทิลีนมีทั้งส่งเสริม และยับยั้งการเจริญเติบโต การเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มีแสง จะมีการสะสมเอทิลีนมากกว่า ในที่มืด ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดการฉ่ำน้ำของพืชได้ แก๊สนี้ยังเป็นสาเหตุของการแก่ของเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ 1 แสดงตัวทำละลายและการเก็บรักษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ตัวทำละลาย	การเก็บรักษา
Auxin	2,4,5-T	50% EtOH	RT
	2,4-D	50% EtOH	RT
	IAA	1 N NaOH	0 ºC
	IBA	1 N NaOH	0-5 ºC
	NAA	1 N NaOH	RT
	BAP	1 N NaOH	RT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ตัวทำละลาย	การเก็บรักษา
Cytokinin	Kinetin	1 N NaOH	0 °C
	Zeatin	1 N NaOH	0 °C
Other plant growth regulators	ABA	1 N NaOH	0 °C
	GA	50% EtOH	RT
	Picloram	2 N NaOH	0 °C

หมายเหตุ RT = Room temperature
EtOH = Ethanol
N = Normality
M = Molarity

2.3 สารที่เป็นแหล่งให้ธาตุคาร์บอน (carbon sources)
เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อ การเจริญเติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้ว หรือมี การสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำเพราะได้รับแสงน้อย และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และ มีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด โดยปกติมักใช้ในปริมาณร้อยละ 1 - 5 และมีหลักฐานชี้ว่าการสร้างสารเมตาโบไลท์บางชนิดในเนื้อเยื่อที่เลี้ยง เป็นผลมาจากความเข้มข้นของซูโครส สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) มีการใช้บ้าง ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นเมื่อได้รับปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง จากนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นอีกจะลดการเจริญเติบโตลง น้ำตาลอาจเปลี่ยนรูปได้เมื่อถูกนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากนี้น้ำตาลพอลิแซ็คคาไรด์อาจเปลี่ยนเป็นมอโนแซคคาไรด์ เมื่อเกิดการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis)

2.4 พวกกรดอะมิโน (Amino acid) ได้แก่ กลูตามีน (glutamine) แอสพาราจีน (asparagines) อะดีนีน (adenine) ไกลซีน (glycine) และ เคซีนไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
61826

2.5 สารอินทรีย์ (organic salt)

ก. สารอินทรีย์จากผักหรือผลไม้ที่สำคัญมากคือ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำมะเขือเทศ สารสกัดจากยีสต์ น้ำแอปเปิล กล้วยบด สารเหล่านี้ไม่ควรใช้ในงานวิจัย เนื่องจากไม่ทราบส่วนประกอบแน่นอน (undefined medium) ในระยะที่นำมาใช้

ข. สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เช่น กรดอะมิโน ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะเกิดเป็นต้นได้ เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate) 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทริปโทน (tryptone) 0.25 - 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอลต์ (malt extrat) 0.5 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สารเหล่านี้ประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโน ส่วนสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ซึ่งมีวิตามินบีสูงมักใช้ในปริมาณ 0.25 -2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.8 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สำหรับขั้นตอนที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอยู่ 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ การเลือกชิ้นส่วน และ การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน ดังนี้

1. การเลือกชิ้นส่วน

ขนาดของเนื้อเยื่อ โดยเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่จะง่ายต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และเชื้อโรคต่าง ๆ ขณะที่เนื้อเยื่อขนาดเล็กมีโอกาสหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็กที่สุดที่มีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งที่ควรพิจารณา เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจโตช้าและไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเท่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ หากเกิดสภาพเครียดหรือช็อคจากการแยกในทางปฏิบัตินิยมแก้ไขโดยเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเล็กหลาย ๆ ชิ้นในภาชนะ (ขวด) เดียวกัน เพื่อกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้นแต่อาจเกิดปัญหาอิทธิผลของชิ้นส่วนจากแคลลัสที่โตเร็วกว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพียงชิ้นเดียวมาก ทำให้ต้องย้ายเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งขึ้น ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองทั้งเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่าย ทั้งยังเพิ่มความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนมากขึ้นด้วย

1. การเลือกต้นแม่พันธุ์ ควรพิจารณาดังนี้

1.1 พันธุ์ นอกจากการเลือกชนิดพืชที่ต้องการแล้ว นิสัยของพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่าย หรือมีการสร้างรากง่ายขึ้นอยู่กับพันธุกรรม ถ้าเป็นไปได้ควรเลือกหลายพันธุ์ เนื่องจากบางพันธุ์อาจขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อง่ายกว่าพันธุ์อื่น โดยทั่วไปพืชที่ขยายพันธุ์ง่ายด้วยวิธีการปักชำมักจะขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2 สภาพของต้นแม่พันธุ์ ชิ้นส่วนพืชที่เริ่มต้น ที่จะนำมาเลี้ยงควรมาจากต้นที่แข็งแรง จะทำได้สำเร็จมากกว่าการนำมาจากต้นที่อ่อนแอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 หลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อที่ได้จากต้นแม่พันธุ์ที่เป็นโรค ควรเลือกเฉพาะเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์แข็งแรงปลอดโรค

2. ชิ้นส่วนของพืช (explant) ทุกส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ทั้งนั้น แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตอาจแตกต่างกันเพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัว (active) ไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ตื่นตัวมากที่สุดคือเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งพบได้ในส่วนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ส่วนปลายยอดของลำต้น (shoot apex) เป็นบริเวณที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด ส่วนนี้นับจากปลายยอดสุดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2.2 ส่วนปลายราก (root apex) ถัดจากส่วนของหมวกราก ก็จะมีส่วนที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับส่วนของปลายยอด

2.3 เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในส่วนของลำต้นและราก ซึ่งอยู่ระหว่างกลุ่มของท่ออาหาร และท่อน้ำ

2.4 เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) ซึ่งจะพบในพืชพวก ใบเลี้ยงเดี่ยว ทำหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง นอกจากนี้มีเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ที่สามารถนำทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีดังนี้

- ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) ซึ่งส่วนนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อของชั้นโฟเอ็ม (phloem) และ คอเท็ก (cortex)
- ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่ในใจกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยเซลล์พวกพาเรนไคมา (parenchyma)
- ใบ (leaf) ในส่วนของใบมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่าพาริเซท พาเรนไคมา (palisade parenchyma) และ สปอนจี พาเรนไคมา (spongy parenchyma) อยู่จำนวนมากซึ่งนิยมใช้สำหรับแยกโพรโทพลาสต์
- ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์พวกพาเรนไคมา ยกเว้นในส่วนของก้านดอก (peduncle) และฐานรองดอก (receptacle) ซึ่งอาจมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ด้วยยกตัวอย่างในฐานรองดอกของเยอบีร่าและเบญจมาศที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดี
- ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์พวกพาเรนไคมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลสด (fleshy fruit) ชนิดที่ผลมีเปลือกหุ้มผลนิ่มทั้งผล มักมีเมล็ดมากมาย (berry) เช่น กล้วย มะละกอ ละมุด ส่วนผลมีผนังชั้นนอกของเปลือกหุ้มผล พัฒนามาจากฐานรองดอก เมื่อผลแก่ผนังนี้จะแข็งและเหนียวแน่น ภายในผลนิ่มทั้งผล (pepo) เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชตระกูลแตง เป็นต้น และผลที่มีเปลือกหนาคล้ายหนังและมีต่อมน้ำมันจำนวนมากข้างในผลแยกเป็นส่วนๆ ชัดเจน (hesperidium) เช่น พืชตระกูลส้ม เป็นต้น

- เมล็ด (seed) ในส่วนของเมล็ดซึ่งประกอบด้วยคัพภะ (embryo) ใบเลี้ยง (cotyledon) และ เอนโดสเปิร์ม (endosperm) ทั้ง 3 ส่วนนี้ให้ความสำเร็จสูงในการเพาะเลี้ยง

2. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน

เนื้อเยื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยงจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจมีติดอยู่ที่บริเวณผิวของเนื้อเยื่อออกเสียก่อนด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (sterilizing agent) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด การเลือกชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงซึ่งจะต้องทำการทดลองหาสารเคมีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการใช้คือ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorte) แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ (calcium hypochlorite) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เป็นต้น ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้น้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในบ้าน เช่น คลอรอกซ์ผลิตภัณฑ์นี้มีโซเดียมไฮโปคลอไรต์ร้อยละ 5.25 อัตราที่ใช้ คือร้อยละ 10-20 สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะทำงานได้ไม่ดีเมื่อมีพีเอชมากกว่า 8 และจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 6 และเพื่อให้การทำงานของคลอรอกซ์ มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ควรเติมสบู่เหลวเข้าไปในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เช่น Tween-20 2 - 3 หยด ถ้าไม่มีสามารถใช้น้ำยาล้างจานและในขณะที่ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ต้องเขย่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ตลอดเวลาหรืออาจวางบนเครื่องเขย่าได้เวลาในการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชว่าทนต่อสารละลายคลอรอกซ์ นานแค่ไหน ถ้ามีความทนทานมาก ก็ใช้เวลานานขึ้นได้ มีสารเคมีหลายชนิดและวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำความสะอาดให้ตัวอย่างพืชให้มีความปลอดเชื้อ ซึ่งผู้ทำการเพาะเลี้ยงต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้ให้เกิดความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชและประสิทธิภาพที่จะได้รับ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกใช้ ดังนี้คือ มีประสิทธิภาพดีให้ร้อยละความปลอดเชื้อสูง ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย เตรียมได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และไม่เป็นอันตราย หรือมีอันตรายน้อยที่สุดต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและชิ้นตัวอย่างพืช

ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อตายอดและตาข้าง

ตายอดและตาข้างเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristemmatic tissue) ที่มี การตื่นตัว (active) อยู่ตลอดเวลา เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์ ความสำเร็จสูง มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดเอาส่วนของยอดหรือตามาทำการแยกเอาใบและก้านใบออกให้หมด หรือถ้ามีใบเกล็ดที่ห่อหุ้มตาอยู่ก็ให้แกะออกจนสังเกตเห็นส่วนของตา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 หรือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 เติม tween-20 ในอัตราส่วน 1 หยด ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร หรือประมาณร้อยละ 0.01 เพื่อช่วยให้สารละลายจับกับผิวตัวอย่างได้

3. ทำการเขย่าเป็นระยะ ๆ หรือวางไว้บนเครื่องเขย่าเป็นเวลาประมาณ 15 นาที

4. ล้างเอาสารละลายออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

5. ย้ายตัวอย่างไปวางผึ่งบนจานแก้วให้แห้งพอหมาด ๆ แล้วทำการตัดแต่งพืชตัวอย่าง เพื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของแผ่นใบ

ใบพืชเป็นอวัยวะที่ค่อนข้างจะบอบบางเนื่องจากประกอบด้วยเนื้อเยื่อเพียงไม่กี่ชั้นเซลล์ โอกาสที่เนื้อเยื่อจะตายหรือได้รับอันตราย จากสารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อมีมาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ มีขั้นตอนดังนี้

1. เลือกใบพืชที่สมบูรณ์ มาทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่ เพื่อขจัดคราบฝุ่นและเศษซากของแมลงที่อาจติดอยู่กับใบ และเป็นการช่วยลดแรงตึงผิวของใบด้วย

2. แช่ใบในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เวลาประมาณ 10 นาที โดยทำการเขย่าเป็นระยะๆ หรือวางบนเครื่องเขย่า

3. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

4. ย้ายตัวอย่างลงในจานแก้ว เพื่อทำการตัดแต่งตัวอย่าง และทิ้งไว้ให้แห้ง พอหมาด ๆ จึงย้ายลงเลี้ยงในอาหาร

ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดพืช

เมล็ดพืชเป็นอวัยวะที่มีความแข็งแรงทนทานกว่าส่วนอื่น ๆ สามารถทนต่อสารเคมีที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ดี จึงเป็นการสะดวกในการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบกับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเมล็ด คือ คัพภะ และใบเลี้ยง มีสภาพที่มีความปลอดเชื้อสูง จึงเหมาะแก่การใช้ในการเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเมล็ดพืชมีความแตกต่างกันมาก จึงมีเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อแตกต่างกันด้วยดังนี้

1. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่มีลักษณะแข็ง เช่น ถั่วต่าง ๆ หน่อไม้ฝรั่ง น้อยหน่า เป็นต้น มีขั้นตอนดังนี้

1. แช่เมล็ดในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 เวลาประมาณ 5 นาที เพื่อการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ด และช่วยขจัดคราบไขมันบริเวณผิวเมล็ด

2. ถ่ายเอาแอลกอฮอล์ออก ผึ่งเมล็ดไว้ให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. แช่เมล็ดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 20 เติม tween-20 ประมาณร้อยละ 0.01 ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

4. ทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

5. ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหาร

2. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่มีความอ่อนนุ่มหรือเมล็ดที่ยังไม่แก่เต็มที่ (immature seed) มีขั้นตอนดังนี้

1. ถ้าเมล็ดมีเยื่อห่อหุ้ม เช่น เมล็ดมะเขือเทศจะมีลักษณะคล้ายวุ้น หรือเมล็ดมะละกอที่มีผนังเมล็ดที่เป็นเยื่อใส ๆ และสารละลายเหลว ๆ ห่อหุ้มอยู่ ก็ให้ทำการกำจัดออกเสียก่อน เพราะสิ่งดังกล่าวเหล่านั้นเป็นตัวยับยั้งการงอกของเมล็ด

2. แช่เมล็ดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เติม tween-20 ประมาณร้อยละ 0.01 ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที

3. ทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

4. ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหาร

ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อของกิ่งไม้

ส่วนของกิ่งไม้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตที่จะใช้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ก็คือ กลุ่มเนื้อเยื่อของท่อลำเลียงอาหาร เนื้อเยื่อแคมเบียม และเนื้อเยื่อตรงใจกลางของ ลำต้น ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวอยู่ในส่วนภายในของกิ่งหรือลำต้น ซึ่งมีสภาพที่ปลอดเชื้ออยู่แล้ว ฉะนั้นการฟอกฆ่าเชื้อจึงทำเฉพาะผิวนอกเท่านั้น ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำส่วนของกิ่งหรือลำต้นมาลนไฟ หรือจุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ก่อนแล้วเผาไฟ ก็จะสามารถฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิวของตัวอย่างได้

2. ใช้มีดผ่าและตัดแยกเอาเฉพาะเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่ดังกล่าวข้างต้น ลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงได้

ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้ออับเรณู

การเพาะเลี้ยงอับเรณูมีวัตถุประสงค์เพื่อการผลิตพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid plant) จากเซลล์สร้างสปอร์ (microspore mother cell) ที่อยู่ภายในอับเรณู มีขั้นตอนดังนี้

1. เลือกดอกที่ยังตูม โดยที่กลีบเลี้ยงและกลีบดอกยังไม่กางออก มาทำการฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 70 ทิ้งไว้ให้แห้งพอหมาด ๆ

2. แช่ดอกในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เติม tween-20 ประมาณ 1 - 2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที โดยเขย่าเป็นระยะ ๆ

3. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ย้ายดอกลงในจานแก้ว ผึ่งให้แห้งพอหมาด ๆ แล้วทำการแกะดอกแยกเอาเฉพาะอับเรณูลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง

2.9 การเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะมีประโยชน์ใน การศึกษาการจัดระเบียบ พัฒนาการของเนื้อเยื่อ และความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะพืชกับ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช จากเทคนิคต่าง ๆ ที่ได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ทำให้ความฝันของ Haberlandt ในการที่จะสร้างเอมบริโอเทียม (artifical embryo) จากเซลล์ที่มีชีวิตกลายเป็นความจริงขึ้นมา เพราะภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถชักนำให้แคลลัส เซลล์แขวนลอยและโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงสร้างรากและต้นหรือเอ็มบริออยด์ได้ Totipotency หมายถึงความสามารถของเซลล์พืชที่พร้อมจะพัฒนากลับไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ใหม่ได้ การเปลี่ยนกลับนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากมายเกี่ยวกับขบวนการต่าง ๆ ภายในพืช เช่น ทางด้านสรีระ ทางด้านเคมี ทางด้านกายวิภาค (anatomy) และทางด้านmorphology การพัฒนาไปเป็นต้นพืชจะผ่านการพัฒนาอยู่ 2 วิถีทางคือ

1. ออร์แกนโนเจเนซิส (organogenesis) คือ การพัฒนาเป็นอวัยวะ
2. เอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) คือ การพัฒนาเป็นต้นอ่อน

ปกติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักได้แคลลัส จากแคลลัสที่ได้ถ้ามีการสร้างอวัยวะขึ้นมา เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือดอก เรียกว่า เกิดออร์แกนโนเจเนซิส การเกิดยอดและรากค่อนข้าง ง่ายกว่าอวัยวะอย่างอื่น ด้วยเหตุผลสองประการ คือ ประการแรก ชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเกิด เกิดการเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญใหม่มีไซโตพลาสซึมเข้มข้น นิวเคลียสใหญ่เห็นได้ชัด ประการที่สอง ในชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีจุดกำเนิดของยอดและรากอยู่แล้ว เช่น เอาข้อมาเลี้ยงตรงข้อมีตา เพราะฉะนั้นข้อจะเจริญให้ยอด ถ้าเอาปล้องมาเลี้ยงจะได้แคลลัส อวัยวะที่เกิดใหม่มีเนื้อเยื่อลำเลียงติดต่อกับชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยง เซลล์เริ่มต้นในการเกิดอวัยวะนั้นมีเพียงไม่กี่เซลล์ที่เกี่ยวข้อง อาจเจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยที่หนึ่งเซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ เช่น ราก ยอด ใบ หรือเจริญมาจากกลุ่มเซลล์ข้างเคียงกัน โดยที่กลุ่มเซลล์เหล่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ กระบวนการเกิดอวัยวะเหล่านี้เกิดไม่พร้อมกัน ทำให้บางครั้งไม่สามารถคาดเดาได้

กระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส

เอ็มบริโอเจเนซิส หรือ โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส คือ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกาย เป็นคำตรงกันข้ามกับ zygotic embryogenesis ที่ได้จากการปฏิสนธิของเซลล์ไข่ ในหนังสือแต่ละเล่มอาจใช้คำต่าง ๆ แทนโซมาติกเอ็มบริโอได้ เช่น embryoid, adventitious embryo, vegetative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

embryos, embryo-like structure และ กระบวนการที่เกิดอาจเรียกได้หลายชื่อ เช่น adventitious embryogenesis, asexual embryogenesis เป็นต้น ซึ่งมีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ จากเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโด และต้นกล้า ตามลำดับ โดยพบการเกิดเอ็มบริออยด์เป็นครั้งแรกจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของแครอท โดยพบว่าแคลลัสแครอทแสดงการเปลี่ยนสภาพเมื่อย้ายจากอาหารที่มีน้ำมะพร้าวไปยังอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโน วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อย้ายครั้งที่สองไปยังอาหารที่มี ออกซินความเข้มข้นต่ำจะได้ต้นเล็ก ๆ จำนวนมากซึ่งก็คือ เอ็มบริออยด์ เมื่อศึกษาเอ็มบริออยด์ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นไบโพลาออร์แกน (bipolar organ) คือ มีด้านหนึ่งเจริญเป็นรากอีกด้านเจริญเป็นต้น การพบครั้งแรก ๆ นี้คิดว่าเป็นกรณียกเว้น แต่จากการทดลองในเวลาต่อมาพบว่าทำให้เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ได้ ดังเช่นการทดลองเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวพบว่าเซลล์เดี่ยวกลายเป็นเอ็มบริออยด์ได้ และรูปแบบการเจริญของเอ็มบิรออยด์ในหลอดทดลองเหมือนกับ ไซโกติกเอ็มบริโอ เมื่อย้ายเอ็มบริออยด์เหล่านี้ไปยังอาหารจะได้ต้นสมบูรณ์ขึ้นมา ต่อมาพบว่าไม่เฉพาะแต่เพียงน้ำมะพร้าวเท่านั้น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สังเคราะห์ขึ้นมาบางตัวก็ให้ผลเช่นกัน เช่น Halperins ทำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้โดยไม่ต้องอาศัยน้ำมะพร้าว โดยใช้ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและไนโตรเจนในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ แทนการเกิดเอ็มบริออยด์ไม่จัดว่าเป็นออร์แกโนเจเนซิส ทั้งนี้เพราะเอ็มบริออยด์ที่ได้ไม่มีการต่อเชื่อมของเนื้อเยื่อลำเลียงติดกับชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเลย เนื่องจากเอ็มบริออยด์ มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร ดังนั้นการเจริญของ เอ็มบริออยด์ มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร ดังนั้นการเจริญของเอ็มบริออยด์จะไม่มีโครงสร้างที่เรียกว่า true suspensor เหมือนอย่างในเอ็มบริออยด์ เมื่อนำเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเอ็มบริออยด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีออร์แกเนลล์ต่าง ๆ มากมาย ใน ไซโทพลาสซึมทำให้ดูทึบ มีเม็ดแป้ง นิวเคลียสขนาดใหญ่ และเห็นนิวคลีโอลัสย้อมติดสีชัดเจน จากการย้อมสีทำให้ทราบว่ามีโปรตีนและอาร์เอ็นเอในปริมาณสูง การเจริญของเอ็มบริออยด์อาจถูกขัดขวางได้โดยความสมดุลของสารเคมีในอาหารทำให้เกิดความผิดปกติที่เรียกว่า embryonal budding และ embryogenic clump ขึ้นมา การเปลี่ยนสภาพของเอ็มบริออยด์เกิดได้ 2 แบบ คือ

1. ทางตรง ในกรณีนี้เอ็มบริออยด์เกิดขึ้นโดยตรงจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยไม่ผ่านขั้นตอนการเกิดแคลลัส เซลล์ที่ให้การเจริญเป็นเอ็มบริออยด์เกิดขึ้น เรียกว่า pre-embryonic determined cells (PEDC) ตัวอย่างได้แก่ ส้ม

2. ทางอ้อม การเกิดเอ็มบริออยด์แบบนี้มาจากแคลลัส แคลลัสที่มีเอ็มบริออยด์เกิดขึ้นเรียกว่า embryogenically determined cells ซึ่งจะเกิดเอ็มบริออยด์ต่อเมื่อถูกชักนำโดยปัจจัยต่าง ๆ เรียกเซลล์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดเอ็มบริออยด์แบบนี้อีกชื่อหนึ่งว่า induced embryogenically determined cells (IEDC) พบว่า การเกิดเอ็มบริออยด์แบบนี้เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงก่อน และหลังจากเกิดการแบ่งเซลล์แล้วก็กลับเป็นเอ็มบริโอเจนนิกใหม่ บางครั้งออกซินและไซโตไคนินมีผลต่อการเกิดขบวนการนี้ ตัวอย่างได้แก่ แครอท กาแฟ หน่อไม้ฝรั่ง

การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

1. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกต

โดยเริ่มจากไซโกต แบ่งตัวออกเป็น เซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เซลล์ที่มีขนาดเล็ก เรียกว่า apical cell ซึ่งอยู่ทางด้านบน ส่วนเซลล์ที่มี ขนาดใหญ่กว่าอยู่ทางด้านล่าง เรียกว่า basal cell ส่วนที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ ก็คือ ส่วนของ apical cell ซึ่งจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเรื่อย ๆ จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม และเรียกระยะนี้ว่า ระยะ globular-shaped ต่อจากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็นรูปหัวใจ จึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะ heart-shaped จนสุดท้ายเมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่จะมีรูปร่างเหมือนตอร์ปิโต จึงเรียกระยะนี้ว่า torpedo-shaped ส่วนของ basal cell จะแบ่งตัวทางด้านขนาน (periclinal division) เท่านั้นจะได้เป็นเซลล์แถวยาว ที่เรียกว่า suspensor ซึ่งทำหน้าที่ช่วยยึดตัวเอ็มบริโอให้ฝังอยู่ใน mucellus และช่วยดูดซึมอาหารให้แก่เอ็มบริโอ เซลล์ที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างตัวเอ็มบริโอกับ suspensor เรียกว่า hypolysis cell ซึ่งทำหน้าเป็นจุดกำเนิดของราก (radicle) เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่แล้ว ส่วนของ suspensor ก็จะหมดหน้าที่และ สลายตัวไป

2. การพัฒนาของเอ็มบริโอที่ได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัส

เริ่มจากเซลล์บางเซลล์ในก้อนของแคลลัสที่มีความตื่นตัวมากกว่าเซลล์อื่น ๆ สังเกตได้จากการทดสอบด้วยสีย้อม ซึ่งจะติด สีเข้มกว่าเซลล์อื่น ๆ และเมื่อตัดผ่านเซลล์ และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์เหล่านั้นมีไซโตพลาสซึมที่เข้มข้นและมีออร์แกนเนลหนาแน่น เซลล์ดังกล่าวนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้เป็นกลุ่ม และปูดยื่นออกมามีลักษณะคล้ายระยะ globular-shaped ต่อมาก็พัฒนาเป็นระยะ heart-shaped และ torpedo-sphaped

3. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากเซลล์ผิว (epidermis cell)

เซลล์ผิวของพืชจะพบได้ที่ใบ ก้านใบ และลำต้นที่ยังอ่อนอยู่ แต่เซลล์ผิวที่นิยมนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ จะใช้จากส่วนของใบ เพราะใบมีลักษณะเป็นแผ่นบางมีพื้นที่ผิวมากมีเซลล์ผิวทั้งด้านบน (upper epidermis) และด้านล่าง (lower epidermis) การพัฒนาของเอ็มบริโอจะเริ่มจากเซลล์บางเซลล์จากเซลล์ผิว มีการตื่นตัวปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เจริญซึ่งมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เซลล์อื่น ๆ ข้างเคียงไม่มีการแบ่งตัว จนต่อมาก็จะเกิดเป็นลักษณะ globular-shaped และพัฒนาต่อไปเป็น heart-shaped จนในที่สุดก็เป็นเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ รูปร่างแบบ torpedo-shaped อนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอเจเนซิสของแผ่นใบ พบว่านอกจากเซลล์ชั้นผิวแล้วเซลล์ชั้นอื่น ๆ คือ palisade cell และ spongy cell ก็สามารถที่จะชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้เหมือนกัน

4. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell culture)

เซลล์เดี่ยวอาจได้มาจากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์ (pectinase enzyme) หรือได้จากการแยกเซลล์จากแคลลัส การเพาะเลี้ยงกระทำในอาหารเหลว จึงเรียกวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบนี้ว่าการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การพัฒนาของเอ็มบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยว ๆแบ่งตัวออกเป็น2 , 4 เซลล์และทวีคูณไปเรื่อย ๆ จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ ต่อมาพัฒนาเป็นก้อนกลม ๆ (globular-shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped และ torpedo-shaped ในที่สุด

ข้อแตกต่างระหว่าง organogenesis และ embryogenesis มีดังนี้คือ

1. **การเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก (shoot-root connection)**
   ในการเกิดออร์แกนโนเจเนซิสนั้น การเกิดยอดและรากจะเป็นอิสระต่อกัน คือ การเกิดยอดและรากอาจจะไม่ติดต่อกันก็ได้ รากอาจจะเกิดจากบริเวณหนึ่ง ส่วนยอดจะเกิดอีก บริเวณหนึ่ง แม้บนแคลลัสก้อนเดียวกัน แต่ในบางครั้งอาจจะพบว่า เนื้อเยื่อที่เกิดยอดและรากอยู่ใกล้กันอาจจะเจริญติดกันได้ หรือเนื้อเยื่อส่วนยอดด้านโคน อาจจะสามารถเกิดรากขึ้นมาจนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ส่วนในเอ็มบริโอเจเนซิสส่วนยอดและรากจะต้องติดต่อกัน เนื่องจากพัฒนามาจากเซลล์ ๆ เดียวกัน
2. **Polarity การเกิดยอดหรือรากในแคลลัส** นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกหรือสิ่งที่จะมากระตุ้นให้เกิดเป็น meristematic cell และ meristematic cell เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากก็ได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่า polarity ของออร์แกนโนเจเนซิส เสียไป หรือ ไม่มี polarity ส่วนใน เอ็มบริโอเจเนซิสนั้นจะมี polarity ซึ่งเป็นแบบ bipolar เนื่องจากการพัฒนาจากเซลล์ ๆ เดียวเป็นกลุ่มเซลล์ขึ้น ด้านหนึ่งของกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดเจริญขึ้นไปบนอากาศ อีกด้านหนึ่งพัฒนาเป็นราก เจริญลงสู่แนวดิ่ง เหมือนต้นพืชที่เจริญทั่ว ๆ ไป
3. **การเชื่อมต่อระหว่างท่อน้ำท่ออาหาร (Vascular bundle connection)** ท่อน้ำท่ออาหารของยอดและรากในขบวนการออร์แกนโนเจเนซิสอาจจะต่อหรือไม่ต่อกันก็ได้ แต่โดยทั่ว ๆ ไป มักจะต่อถึงกัน โดยจะต่อผ่านเนื้อเยื่อเดิม แต่ในขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ท่อน้ำและท่ออาหารของยอดและรากจะเชื่อมต่อกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อปัจจัย

1. ปัจจัยทางด้านเคมี

ธาตุอาหารพืชแต่ละชนิดหรือแต่ละอวัยวะต้องการอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ฉะนั้นจึงมีความจำเป็นในการเลือกสูตรอาหารให้เหมาะสมกับพืชที่จะทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งผู้คิดค้นไว้มากมายหลายสูตร ต่อไปนี้จะขอกล่าวถึงธาตุอาหารบางตัวที่มีบทบาทอย่างสำคัญใน การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสเพื่อเป็นแนวทางในการปรับใช้ควบคู่ไปกับการเลือกสูตรอาหาร

- ธาตุโพแทสเซียม (K) ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- การลดปริมาณของไนโตรเจน (N) ให้ต่ำกว่าระดับปกติ ในสูตรอาหารช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสดีขึ้น
- น้ำมะพร้าวส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- น้ำตาลแซคคาโรส (saccharose) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 - 3 ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- ธาตุแคลเซียม (Ca) ในปริมาณสูง จะยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

2. ปัจจัยทางด้านพืช

ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) การเจริญและพัฒนาไปเป็นและราก ของพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถเจริญและพัฒนาได้ไม่เหมือนกัน พืชบางชนิดสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและรากได้ง่าย บางชนิดก็ยาก แม้ว่าได้เลี้ยงบนหรือในอาหารที่เหมาะสมแล้วก็ตาม พืชบางชนิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและราก โดยผ่านขบวนออร์แกนโนเจเนซิสบางชนิดก็ผ่านขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบจะพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้โดยการพัฒนาผ่านออร์แกนโนเจเนซิสในขณะที่แครอทจะผ่าน เอ็มบริโอเจเนซิส ส่วนเนื้อเยื่อ รังไข่ และอับละอองเกสรพัฒนาผ่านขบวนการ เอ็มบริโอเจเนซิส มากกว่าขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส สารควบคุมการเจริญเติบโต (Hormones) ที่มีอยู่ภายในพืช มีบทบาทอย่างมากกับขบวนการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง จากทฤษฎีของโฮบ ได้มีผู้พยายามพิสูจน์ว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ควบคุมด้วยชนิดและระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังนั้นภายในเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงจึงมีสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดส่งเสริมการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง และมีสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกบางชนิดที่ยับยั้งการเกิดขบวนการนี้ นอกจากนี้พบว่าชนิด (kinds) และระดับ (levels) ของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในชิ้นส่วนของพืชจะแตกต่างกันไปดังนี้

ก. ชนิดของพืช ภายในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น พืชบางชนิดอาจจะมีออกซินในปริมาณที่สูง เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้ไปเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อก็สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสและรากได้ดี พืชบางชนิดอาจจะมีไซโตไคนินเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้เมื่อนำไปเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นหน่อได้ดี เป็นต้น

ข. ชนิดของเนื้อเยื่อ ในพืชชนิดเดียวกันหรือต้นเดียวกัน ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตในแต่ละส่วนของต้นพืชจะไม่เหมือนกัน เช่น ส่วนปลายยอดจะมีออกซินปริมาณสูงกว่าส่วนต้น ในรังไข่ก็มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ส่วนในเมล็ดนอกจากจะมีออกซินค่อนข้างสูงแล้ว ปริมาณของจิบเบอริลลินยังสูงด้วย เป็นต้น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช เนื้อเยื่อพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างกันที่ชิ้นส่วนเช่น ยอด ใบ ราก ก็จะมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ ภายในแตกต่างกัน สภาพของเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตกับเนื้อเยื่อที่มีการพักตัวจะมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชหลังจากนำมาเพาะเลี้ยง

ค. สภาพของเนื้อเยื่อ เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญและพัฒนาอยู่เสมอ ดังนั้นชนิดและระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อจึงมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพของเนื้อเยื่อในระยะนั้น ๆ เป็นที่เชื่อกันว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในเนื้อเยื่อเป็นสาเหตุให้เนื้อเยื่อ มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ จึงทำให้การเปลี่ยนชนิดและระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเกิดควบคู่กันไปเสมอ เช่น หัวลิลลี่ (lily) และซ่อนกลิ่นฝรั่ง (gladiolus) ขณะที่เก็บเกี่ยวมาใหม่จะมีสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibitor) เช่น abscissic acid (ABA) ในปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นถ้านำเนื้อเยื่อในระยะนี้มาเลี้ยงจะไม่ค่อยประสบความสำเร็จ ในการเกิดหัวย่อย (bulblets หรือ cormels) แต่ถ้านำหัวลิลลี่ หรือซ่อนกลิ่นฝรั่งนี้เก็บไว้สักระยะหนึ่ง ปริมาณ ABA ก็จะลดลง ขณะที่จิบเบอริลลินเพิ่มขึ้น เมื่อนำหัวระยะนี้ไปเลี้ยงโอกาสที่จะประสพความสำเร็จในการเกิดหัวย่อยก็มีสูงขึ้น

3. ปัจจัยทางด้านกายภาพ

1. แสง (light) แสงที่ให้กับพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญ พืชที่เจริญในแปลงปลูกกับที่เจริญในหลอดทดลองจะมีความต้องการแสงที่แตกต่างกัน พืชที่เจริญในหลอดทดลองยังไม่มีการสังเคราะห์แสงเนื่องจากได้รับคาร์โบไฮเดรตจากน้ำตาล อย่างไรก็ตามแสงยังมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชในหลอดทดลองเช่น ช่วยในการสร้างราก การสร้างต้นใหม่จากแคลลัส เป็นต้น และต้นพืชที่อยู่ในช่วงย้ายออกจากหลอดทดลองจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์แสงเพื่อเตรียมพร้อมออกสู่ภายนอกหลอดทดลอง แต่ถ้าความเข้มแสงมากเกินไปอาจทำให้พืชตายได้ ลักษณะของแสงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มแสง (light intensity) ช่วงแสง (photoperiod) และคุณภาพของแสง (light quality)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ความเข้มแสง (light intensity) มีรายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อ การเจริญเติบโตของพืชในสภาพหลอดแก้วมากกว่าทางด้านช่วงแสง ถ้าหากพืชในสภาพหลอดแก้วได้รับความเข้มแสงสูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย ควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1,000-4,000 ลักซ์ (lux) (1 ฟุตกำลังเทียน = 10.75 ลักซ์) การที่พืชต้องการความเข้มแสงต่ำ สันนิษฐานว่าการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้วถูกจำกัดด้วยปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ ในหน่อไม้ฝรั่ง เยอบีร่าและสับปะรด ความเข้มแสงที่เหมาะสมในระยะเพิ่มจำนวนคือ 1,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสงคือ 1,000-3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันการให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูกลงดิน

ข.ระยะเวลาในการให้แสง (light duration) ไม่ค่อยมีนักวิจัยทดลองด้านช่วงแสง กับการเจริญของเนื้อเยื่อในสภาพหลอดแก้ว มากนัก โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง 14-16 ชั่วโมง บางครั้งได้รับตลอด 24 ชั่วโมง หรือเลี้ยงในที่มืดเช่น การเลี้ยงแคลลัส การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ โดยหลักการแล้วช่วงแสงที่เหมาะสมควรเป็นช่วงแสงที่พืชนั้นเจริญอยู่ในธรรมชาติ ช่วงแสงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ในการเจริญเป็นรากและยอดของเนื้อเยื่อแคลลัสยาสูบและเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของหน่อไม้ฝรั่ง ช่วงแสงที่เหมาะสมคือ 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะหล่ำเพื่อให้สร้างยอดจะใช้ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ โดยรับช่วงแสง 9 ชั่วโมงต่อวัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นขององุ่นพันธุ์ที่เป็นวันสั้นจะเกิดรากเมื่อได้รับวันสั้น แต่ถ้าเพาะเลี้ยงองุ่นวันยาวจะออกรากเมื่อพืชได้รับวันยาว อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการให้แสงกับความเข้มของแสงจะมีความสัมพันธ์กัน เช่น ถ้าให้แสงที่มีความเข้มสูงอาจจะใช้ระยะเวลาในการให้แสงน้อยลง เป็นต้น

ค.คุณภาพของแสง (light quality) จากการทดลองพบว่าแสงสีแดง (red light) และแสงสีน้ำเงิน (blue light) เป็นต้นกระตุ้นให้เกิดยอดของพืชหลายชนิด เช่น ในการเลี้ยงส่วนใบของพิทูเนียเนื้อเยื่อจะเกิดยอดเป็นปริมาณมากเมื่อได้รับแสงสีแดงและเนื้อเยื่อจะเกิดยอดน้อย เมื่อได้รับแสงชนิดไหนหลังสุด ก็จะมีผลตามแสงชนิดนั้น ตัวอย่างต่อไปนี้เนื้อเยื่อที่ได้รับ Red light จะเกิดยอดปริมาณมากเนื้อเยื่อที่ได้รับ F-Red light จะเกิดยอดน้อยเนื้อเยื่อที่ได้รับ Red หลังจากนั้นได้รับ F-Red light จะเกิดยอดน้อยเนื้อเยื่อที่ได้รับ F-Red light หลังจากนั้นได้รับ Red light จะเกิดยอดมากจากผลอันนี้จึงได้มีสมมติฐานว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ถูกควบคุมด้วยระบบ phytochrome จึงทำให้นิยมใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดไฟที่ให้แสงอัลตราไวโอเลต จะยับยั้งการสร้างยอด การใช้แสงสีแดงจะ ดีกว่าสีน้ำเงินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อยาสูบ แสงสีแดง (660 นาโนเมตร) ยังทำให้เกิดการสร้างราก มีรายงานว่าแสงสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขาวและสีน้ำเงินจะทำให้การเจริญของแคลลัสดีกว่าแสงสีเขียวและสีแดงหรือเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด โดยทั่วไปแสงสีแดงและอินฟราเรดจะกระตุ้นการเกิดยอด มีเพียงบางรายงานที่พบว่าแสงสีแดงยับยั้งการเกิดยอดในมอส (Pohlia nutans) การสร้างตายอดต้องการแสงทั้งแสงสีแดงและสีน้ำเงิน โดยถ้าได้รับแสงสีแดง 11 ชั่วโมงตามด้วยสีน้ำเงิน 6 ชั่วโมง ทุกวันจะทำให้เกิดตายอดจำนวนสูงสุด แต่ถ้าให้แสงชนิดเดียวจะไม่ช่วยในการสร้างยอด จากตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืช ต้องการคุณภาพแสง ความเข้มแสง และช่วงแสงที่เหมาะสม

2. อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิที่ใช้มักคงที่ประมาณ 24-26 องศาเซลเซียส ในการทดลองอาจเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส หรือสูงถึง 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช มักต่ำกว่าในธรรมชาติจึงควรเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่ำกว่าธรรมชาติ อุณหภูมิที่ต่ำมากเกินไปเช่นเย็นจัดถึง 4 องศาเซลเซียส ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต บางครั้งพืชต้องการอุณหภูมิต่ำสลับการอุณหภูมิสูง เช่น การสร้างรากของทานตะวันจะดีขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 26 องศาเซลเซียส กลางคืน 15 องศาเซลเซียส การเลี้ยงแคลลัสของพืชบางชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน อุณหภูมิทำให้พืชเกิดการพ้นระยะการพักตัว (break dormancy) ใน gladiolus hortulans หัวหรือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นต้นพืชที่ปลูกลงดินได้ต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส นาน 4-6 สัปดาห์ ก่อนการย้ายลงดินเช่นเดียวกับลิลลี่ต้นจะพักตัวจึงต้องทำให้พ้นระยะการพักตัวโดยเลี้ยงที่ในที่มืดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูก

3. ความชื้น (humidity) เนื่องจากความชื้นในหลอดแก้วค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำ ก็จะเกิดการสูญเสียน้ำภายในหลอดส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกินไปก็จะเอื้ออำนวยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในหลอดทดลองสูงมากจะทำให้พืชเกิดอาการฉ่ำน้ำ

4. ออกซิเจน (oxygen) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ การเลี้ยงบนอาหารเหลวอาจใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนสะพานกระดาษ หรือ วางบนเครื่องเขย่า คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แม้ว่าจะเป็นแหล่งพลังงานของพืชซึ่งเกิดการสังเคราะห์แสงแต่ถ้าเกิดการสะสมมากเกินไปก็จะเป็นอันตราย

5. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมลงในอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากที่จะกระตุ้นให้พืชเกิดการเจริญของเนื้อเยื่อ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมจากภายนอกจะต้องเกิดการสมดุลกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชจึงจะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการเจริญไปในทิศทางที่ต้องการ จำเป็นต้องมีการทดลองเพื่อหาจุดสมดุล ซึ่งพอจะแยกบทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดได้ดังนี้ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ออกซิน บทบาทที่มีต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่

- ส่งเสริมให้เนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงเกิดแคลลัส เพื่อประโยชน์ในการที่จะนำแคลลัสนี้ไปชักนำให้เป็นต้นพืชต่อไป
- กระตุ้นให้ต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดราก

ข. ไซโตไคนิน บทบาทที่มีต่อการเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่

- ส่งเสริมการเจริญเติบโตของใบ
- ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก
- เร่งให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดใหม่เป็นจำนวนมาก

บทบาทของออกซินและไซโตไคนินรวมกัน มีผลในการเลี้ยงเนื้อเยื่อถ้าหากเติมออกซินและไซโตไคนินรวมกันจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ออกซินหรือ ไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่งแต่เพียงอย่างเดียว

ค. สารกลุ่มอื่น ๆ เช่น จิบเบอริลลิน พบว่า ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อถ้าหากในอาหารมี GA เป็นปริมาณมากจะไปยับยั้งการเกิดลักษณะรูปร่าง แต่ในพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง GA มีความสำคัญมากในการที่ให้เนื้อเยื่อมันฝรั่งเกิดเป็นหน่อ ส่วนพวกกรดแอบไซซิค (ABA) จะไปยับยั้งการเกิดต้นและราก จะไปยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสในแครอท และยับยั้งการงอกของสปอร์เฟิร์น สำหรับสารพวกอนุพันธ์เพียวรีน (purine derivative) เช่น อะดินีน (adenine) หรือ กวานีน (guanine) จะมีผลคล้าย กับสารในกลุ่มไซโตไคนิน คือ ช่วยในการกระตุ้นให้เกิดหน่อ

4. ปัจจัยอื่น

1. ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (size of explant) ขนาดของชิ้นส่วนมีความสำคัญต่อการประสพความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือ การเกิดลักษณะรูปร่างมาก การใช้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่จะมีโอกาสประสพความสำเร็จมากกว่าการใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก

2. สภาพของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition) หมายถึงสภาพภายในภาชนะที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สภาพของอาหารเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว เนื้อเยื่อบางชนิดจะเกิดลักษณะรูปร่าง ได้บนอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารวุ้น แต่จะไม่เกิดลักษณะรูปร่าง ในอาหารเหลว เช่น กล้วยไม้ แต่เนื้อเยื่อบางชนิดสามารถเกิดลักษณะรูปร่าง ได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็ง และในอาหารเหลว หรือถ้าปริมาณออกซิเจนภายในภาชนะที่ใช้เลี้ยงมาก คาร์บอนไดออกไซด์น้อย เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซินน้อย คาร์บอนไดออกไซด์มากเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเปลี่ยนอาหาร (subculture) การย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าไปยังอาหารใหม่หลาย ๆ ครั้ง จะมีผลทำให้การเกิดลักษณะรูปร่าง ลดลง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมขึ้น ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด

4. ส่วนประกอบอาหารอื่น ๆ (medium component) นอกเหนือจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช อาหารบางชนิดจะมีผลต่อการเกิดลักษณะรูปร่าง เช่น ถ้ามีฟอสเฟตในอาหารเป็นปริมาณสูงจะเกิดยอดได้ดีกว่าที่มีฟอสเฟตในปริมาณต่ำ ถ้าให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม (NH^{4+}) ในปริมาณมาก เนื้อเยื่อจะเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสมากกว่าการเกิดออร์แกนโนเจนเนซิสนอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลก็เป็นตัวควบคุมการเกิดลักษณะรูปร่างเหมือนกัน เช่น ถ้าในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยมีน้ำตาลร้อยละ 2 จะช่วยให้เนื้อเยื่ออ้อยเกิดยอด ถ้าร้อยละ 3 จะยับยั้งการเกิดยอด ส่วนในการเลี้ยงลิลลี่ พบว่า น้ำตาลร้อยละ 2 จะทำให้เกิดท่อน้ำ ในก้อนแคลลัส และร้อยละ 4 จะทำให้เกิดท่ออาหาร ส่วนน้ำตาลร้อยละ 3 จะชักนำให้เกิดทั้งท่อน้ำ และท่ออาหาร

2.10 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมาแต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคคิวโอจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและ ชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่ได้จะมีรูปร่างสี แตกต่างออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและอาหารที่เลี้ยง เช่น แคลลัสของมันสำปะหลัง จะเป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันหลวม ๆ สามารถหลุดได้ง่าย เรียกว่า soft หรือ friable callus บางชนิด แคลลัสจะประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะ ตัวกันแน่น หลุดได้ยาก เรียกว่า compact หรือ hard callus โดยทั่วไปไม่ว่าแคลลัสจะอยู่ในที่มืดหรือมีแสง จะมีสีครีมหรือสีเหลืองอ่อน แต่บางชนิดก็อาจจะมีสีเขียว เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ บางชนิดมีสีส้มเนื่องจากมีแคโรทีนอยด์ และบางชนิดมีสีม่วงแดงเนื่องจากมีแอนโทไซยานิน ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่าง ๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วร้อยละความสำเร็จสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของคัพภะ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ปลายยอด ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่อพิเศษอื่น ๆ ของพืชที่สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกันคือ แคมเบียม คอร์เทค ไส้หรือแกนลำต้น ท่อลำเลียงอาหาร ไซเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พาเรนไคมา และเอ็นโดสเปิร์ม คำว่า การเจริญ หมายถึง การเพิ่มขนาดโดยถาวร เกิดจากการแบ่งเซลล์แล้วเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญของแคลลัสในอาหารแข็งเห็นได้จากการที่มีก้อนโตขึ้น

วิธีวัดการเจริญของแคลลัสทำได้หลายวิธี เช่น ชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง การนับจำนวนเซลล์ นิยมใช้วิธีชั่งน้ำหนักสด เนื่องจาก สะดวกรวดเร็ว และง่ายต่อการติดตามน้ำหนักเนื่อเยื่อที่เพิ่มขึ้น และไม่ต้องทำลายแคลลัส และสามารถนำแคลลัสกลับมาเลี้ยงในอาหารตามเดิม ถ้าชั่งในสภาพปลอดเชื้อ วิธีทำคือ นำแคลลัสออกจากภาชนะที่เลี้ยงวางบนกระดาษที่ปลอดเชื้อ แล้วนำไปชั่งในตู้ปลอดเชื้อ สามารถทราบน้ำหนักที่เพิ่มโดยเปรียบเทียบกันระหว่างน้ำหนักก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง เมื่อชั่งเสร็จนำแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารได้อีก นอกจากนี้วัดการเจริญเติบโตดังกล่าวแล้ว ยังอาจใช้การหาค่าโปรตีนทั้งหมด (total protein) เป็นพารามิเตอร์ในการวัด แต่ไม่นิยมใช้

การพัฒนาของแคลลัส

การพัฒนาไปเป็นยอดและรากของแคลลัส อาจจะผ่านขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส หรือ เอ็มบริโอเจเนซิส ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ เช่น ถ้าหากเกาะตัวเป็นกลุ่ม การพัฒนาไปเป็นต้นและรากจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส ถ้าเป็นเซลล์เดี่ยว การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จะผ่านขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสคล้ายกับ เอ็มบริโอ จึงเรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis)

การกำหนดการพัฒนาของแคลลัส (Determination in Callus)

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถชักนำให้เจริญเติบโตได้จากหลาย ๆ ทาง ขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมีอื่น ๆ ที่เติมลงในอาหาร พืชหลายชนิดโดยเฉพาะยาสูบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของราก และ ลำต้น ขึ้นกับสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน แคลลัสบางชนิดกลับไม่เป็นเช่นนี้เพราะไม่มีการตอบสนอง เชื่อกันว่าการที่เซลล์มีความสามารถแรกเริ่มที่จะเปลี่ยนแปลงไปได้เป็นสิ่งจำเป็นอันดับแรก และอาจต้องมีการจัดสภาพเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นเซลล์จะมีความสามารถ (competent) ที่จะเปลี่ยนแปลงการพัฒนาหรือกำเนิดพัฒนาการอื่น ๆ กล่าวได้ว่าเซลล์มีความพร้อมและมีการกำหนดพัฒนาแล้ว กระบวนการทั้งสองนี้จำแนกได้จากเซลล์ที่มีขั้นตอนการพัฒนาอย่างใหม่เกิดขึ้น แต่ไม่ใช่แปลกแยกออกมาจากขั้นตอนการพัฒนาเดิมที่เป็นอยู่ แคลลัสของพืชบางชนิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเหล่านี้สามารถชักนำและทดสอบได้ ตัวอย่างเช่น แคลลัสของถั่วอัลฟัลฟา (Medicago sative) มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง และยังคงสภาพเป็นแคลลัสต่อไปเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D และไคเนติน แต่เมื่อย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจากสารกระตุ้นการเจริญเติบโตแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงและกำเนิดเป็นรากหรือลำต้น ทั้งนี้ขึ้นกับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่ได้รับมาก่อน ถ้าได้รับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัดส่วนที่มีค่าสูง (ออกซิน > ไซโตไคนิน) มักเกิดเป็นราก แต่ถ้ามีค่าต่ำ (ออกซิน < ไซโตไคนิน) มักเกิดเป็นยอด การทำ pre-tretment โดยการเลี้ยงในอาหารชักนำการเกิดแคลลัส (induction medium) เป็นเวลา 3 - 4 วัน ก่อนย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจาก สารควบคุมการเจริญเติบโตต้องใช้ระยะเวลาที่พอเหมาะ เพราะถ้านานเกินไปจะไปยับยั้งไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ การตอบสนองมากที่สุดพบในกรณีใช้ชิ้นส่วนแคลลัสขนาดใหญ่ (ประมาณ 200 - 800 มิลลิเมตร) อย่างไรก็ตาม การชักนำการเกิดแคลลัสเองเกิดขึ้นมากในชิ้นส่วนขนาดใหญ่ที่มีนำมาเลี้ยงซึ่งต่อมาจะถูกแยกและเลี้ยงในจานหรือขวดแยกกันเพื่อตรวจสอบความสามารถในการกำเนิดเป็นอวัยวะ ดังนั้น ในทางปฏิบัติจะทราบแต่เพียงผลสุดท้ายของตอบสนอง ว่าต้องใช้แคลลัสที่ควรมีจำนวนเซลล์ไม่ต่ำกว่า 12 เซลล์ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 105 มิลลิเมตร เป็นอย่างน้อย) การศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า

1. แคลลัสมีความสามารถ (competent) ตอบสองต่อการชักนำของออกซิน และ ไซโตไคนิน

2. มีการชักนำเกิดเป็นอวัยวะ ซึ่งชี้ว่าเซลล์มีการกำหนดพัฒนาเกิดขึ้นขณะทำ pre-treatment ก่อนที่จะสร้างอวัยวะนั้น ๆ และต้องการสภาพเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันไป

3. ความสามารถในการตอบสนองของเซลล์ ขึ้นกับขนาดของแคลลัสที่มีจำนวนเซลล์ที่เหมาะสม ดังนั้นแคลลัสนั้นมีลักษณะที่ไม่มีการกำหนดพัฒนา และสามารถพัฒนาไปเป็นราก ลำต้น หรือพืชทั้งต้นได้ ขณะเดียวกันก็มีแคลลัสบางชนิดที่มีการกำหนดพัฒนาไว้แล้วว่าจะมี การสร้างเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชที่สมบูรณ์ครบถ้วนได้ด้วยเช่นกัน

แคลลัสในกรณีที่มีการกำหนดพัฒนา (Callus as Determined Cells)

แม้ว่าการกำหนดพัฒนาของเซลล์เป็นสิ่งจำเป็นในการกำเนิดเป็นโครงสร้างต่าง ๆ ก็ตาม การทดลองโดยใช้แคลลัสชี้ว่าการกำหนดพัฒนาเกิดขึ้นได้ในเซลล์ที่ยังไม่มีการพัฒนาเป็นอวัยวะ ในรากปม (crown gall) ซึ่งเซลล์จะอยู่เป็นกลุ่มคล้ายแคลลัส และไม่มีการพัฒนาเป็นอย่างอื่น หรือในกรณีเกิดสภาพเป็นกระบวนการที่แคลลัสซึ่งปกติต้องการ สารควบคุมการเจริญเติบโตบางอย่างที่จำเพาะกลับไม่ต้องการสารดังกล่าว หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเป็นอิสระต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับจากภายนอก จึงสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้แม้จะไม่ได้รับสารเหล่านั้นก็ตาม ลักษณะดังกล่าวเท่าที่พบคือในกรณีออกซินและไซโตไคนิน สำหรับสารอื่น ๆ โดยปกติไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง แม้ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องเติมลงไปเพื่อยับยั้งการเกิดอวัยวะ หรือไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของคัพภะ เซลล์ที่ไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดได้ แต่ความต้องการเฉพาะเซลล์ที่ได้จากลูกผสมที่มีการสร้างรากปมจะเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่ต้องเติมสารควบคุม การเจริญเติบโต จึงกล่าวได้ว่ามีความสามารถเกิดรากปมได้เองแคลลัสที่สามารถสังเคราะห์ออกซินและไซโตไคนินได้เองพบได้ในพืชหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกำหนดพัฒนาของแคลลัสเพื่อกำเนิดคัพภะ (Determination in Callus : Embryogenesis)

การสร้างคัพภะจากเซลล์ร่างกายขณะเพาะเลี้ยง (somatic embryo หรือนิยมเรียกว่า embryoids เพื่อให้ต่างจาก zygotic embryos ที่เกิดจากการปฏิสนธิของเซลล์เพศ) เกิดขึ้นได้ในแคลลัสบางชนิดเท่านั้นกล่าวคือ เฉพาะแคลลัสและบางเซลล์เท่านั้นที่มีความสามารถสร้างคัพภะโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการสร้างเซลล์เพศมารวมกันตามปกติ การกำเนิดคัพภะในกรณีนี้เกิดโดยตรงจากเซลล์ที่มีความพร้อมซึ่งเรียกว่า pre-embryonic determined cells (PEDC) เมื่อเซลล์เหล่านี้เกิด dedifferentiation และเพิ่มจำนวนเป็นแคลลัสก่อนที่จะมีสภาพเป็น PEDC เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า induced embryogenic determined cell (IEDC) สมมติฐานที่เกี่ยวข้องคือ PEDC นั้นมีความสามารถในการเกิดคัพภะ และต้องการสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อการกำหนดพัฒนาไปเป็นเซลล์คัพภะ ขณะที่ IEDC นั้นต้องการชักนำให้มีความสามารถเสียก่อนที่จะเริ่มมีการกำหนดพัฒนาเป็นเซลล์คัพภะ เซลล์ PEDC นั้นรวมไปถึงแคลลัสที่สามารถสร้างคัพภะได้โดยตรง เช่นกรณีของ epidermis cells ของ Ranunculus celeratus และ nucellar cells ของผลส้ม (citrus) ซึ่งสามารถสร้างคัพภะได้โดยไม่ต้องใช้เพศ ข้อสังเกตที่พบเสมอคือ แคลลัสที่มีสภาพเป็นเซลล์คัพภะนั้นแรกสุดต้องได้รับออกซินสังเคราะห์ 2,4-D จากนั้นจึงย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจาก 2,4-D จะชักนำให้เกิดคัพภะได้ แคลลัสดังกล่าวเชื่อว่าเป็น IEDC และการได้รับ 2,4-D ทำให้เกิดความสามารถพัฒนาเป็นคัพภะเมื่อย้ายสู่อาหารที่แตกต่างไปจากเดิม แคลลัสที่เลี้ยงจากใบถั่วอัฟฟัลฟา (*Medicago* sp.) และ *Convolvulus* sp. พบว่าความสามารถในการกำเนิด คัพภะถูกชักนำในอาหารชนิดหนึ่ง และการกำเนิดอวัยวะ จะเกิดขึ้นในอาหารอีกชนิดหนึ่ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. ขนาดและรูปร่าง (size and shape)

ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงแม้ไม่มีข้อจำกัดหรือข้อวิกฤต แต่ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กว่านี้แล้วจะไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ ตัวอย่าง ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารของ รากแครอท (Daucus carota) ที่มีน้ำหนักเพียง 3.8 มิลลิกรัม สามารเกิดแคลลัสได้ แต่ถ้าเป็นเนื้อเยื่อจากหัว (tuberous meristematic tissues) ของ Jesusalem artichoke แล้ว อาจมีขนาดเล็กเกินไปทั้งนี้เพราะเซลล์ของแครอทมีขนาดเล็กกว่า จึงมีร้อยละถูกทำลายหรือถูกกระทบกระเทือนขณะแยกเนื้อเยื่อน้อยกว่า

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators)

โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่ว ๆ ไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซิน>ไซโตไคนิน) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ (ออกซิน <ไซโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล (ออกซิน = ไซโตไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ นั้นพบว่า ออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01 - 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1 - 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส จะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

3. ธาตุอาหาร (nutrients)

นอกจากจะต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่ว ๆ ไป ของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโนเช่น กลูตามีน แอสปาติน อาร์จินีน พิวรีน และไพริมิดีน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

4. แหล่งคาร์บอน (carbon sources)

ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และ แซคคาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 2 - 4

5. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors)

โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย (เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

6. สภาพอาหาร (media status)

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

ประโยชน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. การขยายพันธุ์ (micropropagation)

โดยชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก

2. การผลิตโพรโทพลาส (protoplasts)

แคลลัสเหมาะอย่างยิ่งในการนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้วและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

3. การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม (secondary metabolites)

ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมได้

4. ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploids)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้สารโคลซิซินชักนำ

5. การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน (tolerant and resistant plants)

เช่น ทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อนและหนาว หรือต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

6. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (cryopreservation)

การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากใบและเกสรตัวผู้ขององุ่น (J.A. Stamp และ C.P. Meredith, 1987)

นำใบองุ่นจากเรือนเพาะชำ ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร และนำ *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon) ที่ได้จาการเพาะเลี้ยง ส่วน *Vitis rupestris* หรือชื่อที่รู้จักกันคือ du Lot โดยนำมาจากเรือนเพาะชำและ PI 200692 ซึ่งทำให้เกิดเป็นต้นใหม่เมื่อเลี้ยงในอาหาร Nitsch and Nitsch (NN) และ Murashige and Skoog (MS) ทำนองเดียวกันคือใช้เกสรตัวผู้จากเรือนเพาะชำและจากไร่องุ่นโดยใช้ *Vitis vinifera* (Cardinal, Grenache, Sauvignon Blanc, Thompson seedless และ White Riesling) ส่วน Vitis rupestris หรือ du Lot และ PI 200692 และ *Vitis vinifera* × *Vitis rupestris* Ganzin NO 1. เกิดต้นใหม่ในอาหาร NN และ MS เพียงเลี้ยงใบบนอาหารแข็งก็เกิดการเจริญเป็นต้นอ่อน ส่วนเกสรก็เป็นเช่นเดียวกัน โดยทั่วไปแล้วสารควบคุมการเจริญที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดต้นใหม่ของใบและชิ้นส่วนคือ NN ที่มี 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ 2-naphthoxyacetic acid (NAA) และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 6- benzylaminopurine (BA) มีผลต่อเนื้อเยื่อของทุกสายพันธุ์ แต่ปริมาณที่ใช้แตกต่างกันไป โดยสายพันธุ์ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อ แหล่งที่มา วิธีการเพาะเลี้ยง และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ทั้งหมดที่กล่าวมานี้มีผลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ทั้งสิ้นการเจริญเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะเข้าไปในเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะที่เหมาะสมจะทำให้เกิดเป็นต้นใหม่ขึ้นโดยใช้เวลามากกว่า 1 ปี และในการเลี้ยงต้นอ่อนที่เกิดขึ้นมาจากชิ้นส่วนในอาหารที่มีและไม่มีสารควบคุมการเจริญที่เข้าไปกระตุ้นให้เกิดรากและยอดเป็นผลให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์และนำไปปลูกในธรรมชาติ

ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ ก้าน และลำต้นขององุ่น (Seung-Heui Kim และ Seon-Kyu Kim , 2002)

การสร้างแอนโทไซยานินในแคลลัสองุ่นและในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เป็นผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคยานิน การสร้างแคลลัสแบบอ่อนจากการศึกษานี้พบว่าแคลลัสแบบอ่อนใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เป็นหลัก และมีสารควบคุมการเจริญอื่น ๆ มีการใช้ IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากก้านและลำต้นขณะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NAA ให้ผลในการเกิดราก พบว่าอัตราการชักนำให้เกิดแคลลัสลดลงตามระดับ 2,4-D และพบว่าร้อยละการเกิดเป็นแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น หรือ ก้าน มีร้อยละสูงเกือบร้อยละ 100 ที่ระดับการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในก้านและลำต้น ตามลำดับ และสำหรับการใช้ 2,4-D ร่วมกับไคเนติน และ NAA ร่วมกับ BA พบว่าแคลลัสที่ได้จากก้านและลำต้นที่ระดับการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ไคเนติน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสมีร้อยละการเกิดใกล้กับร้อยละ 100

ผลของไทไดอะซูรอนต่อการชักนำให้เกิดยอดใน Lentil (*Lens culinarisMedik*) (Khawar. K et al.,2003)

ไทไดอะซูรอน (Thidiazuron,TDZ) เป็นสารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโตไคนินที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดยอดในพืชหลายชนิดได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญตัวอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันพบว่าในการเพาะเลี้ยง Turkish lentil ในอาหาร MS ที่มีการเติม TDZ มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ผลจะมีการพัฒนาเป็นยอดอย่างรวดเร็ว และมีการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายใน TDZ เพื่อป้องกันการตายของเนื้อเยื่อ ในการทดลองใช้ข้อบริเวณใบเลี้ยง และ ข้อบริเวณลำต้นพบว่าข้อบริเวณใบเลี้ยงมีความสามารถที่จะเกิดเป็นยอดสูงกว่าข้อบริเวณลำต้น ในอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่ชักนำให้เกิดนี้ยาวประมาณ 10 – 20 มิลลิเมตรจะนำมาชักนำให้เกิดรากในอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายต้นที่ได้นี้ไปในถาดทรายเพื่อให้ได้ต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. พืชที่นำมาใช้ในการทดลอง
   - ใบองุ่น
2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตร MS (ภาคผนวก)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต
   - N^6-benzyladenine (BA)
   - napthaleneacetic acid (NAA)
   - thidiazuron (TDZ)

2.3 สารอินทรีย์
   - น้ำตาลซูโครส

2.4 สารที่ใช้ทำให้อาหารแข็งตัว
   - วุ้นผง (agar)

2.5 สารเคมีที่ใช้ปรับพีเอช
   - NaOH 1 นอร์มอล
   - HCl 1 นอร์มอล

2.6 สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทำความสะอาดเนื้อเยื่อก่อนย้ายลงขวดเพาะเลี้ยง
   - สารละลายไฮเตอร์
   - น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.7 สารฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
   - เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อุปกรณ์ที่ใช้

3.1 ประเภทเครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ ปิเปตต์ ฟลาสก์รูปชมพู่ ขวดวัดปริมาตร ขวดสีชา แท่งแก้วคน จานเพาะเชื้อและ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 เครื่องมือต่าง ๆ

1) เครื่องชั่ง (balance) ทั้ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2) ช้อนตักสาร (spatula)
3) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
4) เตาอุ่นความร้อนและแท่งแม่เหล็ก (hot plate and magnetic stirrer)
5) เตาอบไมโครเวฟ (microwave)
6) เตาอบความร้อน (hot air oven)
7) ตู้เย็น (refrigerator)
8) หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
9) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet)
10) กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
11) ตะเกียงแอลกอฮอล์
12) มีผ่าตัดแบบต่างๆ
13) อุปกรณ์ถ่ายภาพ

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งควบคุมการให้แสงที่ความเข้ม 700 ลักซ์ โดยหลอด fluorescent Toshiba FL 40T9W/38 W cool white ช่วงสว่าง 16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมง ต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

สามารถแบ่งออกเป็น 7 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบองุ่น

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาอิทธิพลของระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสองุ่น

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส

ขั้นตอนที่ 5 ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสองุ่นในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ขั้นตอนที่ 6 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนที่ 7 สรุปผลการทดลองและนำเสนอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลองโดยละเอียด

ขั้นตอนที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อน

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารแข็งสูตร MS ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละประมาณ 10 มิลลิลิตร เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Seung-Heui Kim และ Seon-Kyu Kim , 2002)
2. นำเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน ทำตามขั้นตอนดังนี้
    - นำอุปกรณ์ที่จะใช้ในการทดลองไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
    - นำเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนมาล้างน้ำเปล่าแล้วจึงนำไปแช่ในสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เติม Tween 20 จำนวน 2-3 หยด
    - ทุกขั้นตอนต่อไปนี้ทำในตู้ลามินาร์
    - เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วนำเนื้อเยื่อมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 7 ครั้ง ครั้งละประมาณ 15 นาที
    - ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยตัดเอาชิ้นส่วนบริเวณที่ตายออกเพราะเป็นส่วนที่สัมผัสกับสารละลายคลอรอกซ์นานเกินไปจนทำให้เซลล์ตาย
    - ตัดแบ่งตัวอย่างออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำมาวางบนอาหารที่เตรียมในขวดเพาะเลี้ยง
3. นำขวดอาหารเพาะเลี้ยงไปเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ
2. นำแคลลัสอ่อนที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นก่อนนำไปใส่ในขวดอาหารที่เตรียมไว้
3. บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลองพร้อมกับชั่งน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นในแต่ละระดับความเข้มข้นของอาหารและคำนวณหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตจากสูตร

$$\text{ร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส} = \frac{\text{น้ำหนักแคลลัสสุดท้าย} - \text{น้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น}} \times 100$$

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาอิทธิพลของระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสอ่อน

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ต่อ BA ต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 2)
2. นำแคลลัสอ่อนที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นก่อนใส่ในขวดอาหารที่เตรียมไว้
3. นำขวดเพาะเลี้ยงจากข้อ 3 ไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง
4. บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลองพร้อมกับชั่งน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นในแต่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและคำนวณหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต ตามสูตรในขั้นตอนที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

NAA(mg/l) / BA (mg/l)	0	0.05	0.1	0.2
0	A	B	C	D
0.05	E	F	G	H
0.1	I	J	K	L
0.2	M	N	O	P

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลง และการพัฒนาของแคลลัส

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ต่อ TDZ ต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 3)
2. นำแคลลัสอ่อนที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นแล้วจึงนำใส่ในขวดอาหารที่เตรียมไว้
3. นำขวดเพาะเลี้ยงจากข้อ 3 ไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง
4. บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลองพร้อมทั้งชั่งน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นในอาหารแต่ละระดับความเข้มข้นและคำนวณหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต ตามสูตรในขั้นตอนที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงอาหารสังเคราะห์สูตร MS เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

NAA(mg/l) / TDZ(mg/l)	0	0.05	0.1
0	A	B	C
0.1	D	E	F
0.5	G	H	I
1	J	K	L
3	M	N	O
5	P	Q	R

ขั้นตอนที่ 5 ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสอ่อนในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารสูตร MS
2. นำแคลลัสอ่อนที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 มาชั่งน้ำหนักสดและย้ายลงในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยแต่ละสูตรอาหารในขั้นตอนที่ 4 ทำการทดลองสูตรละ 5 ซ้ำ
3. บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส สัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารแต่ละระดับความเข้มข้นและคำนวณหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตตามสูตรในขั้นตอนที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสองุ่น เริ่มต้นจากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบองุ่น โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ในระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูตรอาหารนี้จากการทดลองของ Seung-Heui Kim และ Seon-Kyu Kim (2002) ซึ่งได้ทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมให้การชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้ส่วนต่าง ๆ ขององุ่นพบว่ามีการเกิดแคลลัสสูง จากการทดลองพบว่าชิ้นส่วนเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแคลลัสทุก 4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสจนได้แคลลัสจำนวนมากพอที่จะใช้ในการทดลองจึงย้ายแคลลัสลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัส

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบองุ่น

ในการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบนั้น เริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อใบองุ่น หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนวางลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซินและไซโตไคนิน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าในระยะเวลา ประมาณ 1 เดือนเริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้น (รูปที่ 5) แคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่เป็นแคลลัสแบบอ่อนมีสีครีม

รูปที่ 5 แคลลัสจากใบองุ่นในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส

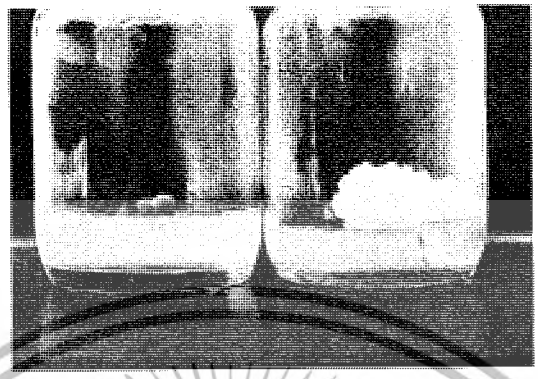
ในการทดลองย้ายแคลลัสลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้น 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยแคลลัสที่ใช้ในการทดลองนำมาจากขั้นตอนที่ 1 เป็นแคลลัสที่มีอายุ 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นที่ 8 สัปดาห์ของการทดลองทำการบันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตลักษณะของแคลลัส (ตารางที่ 4) และวัดการเจริญเติบโตโดยการหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (ตารางที่ 5, รูปที่ 7)

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของแคลลัสในอาหารสูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

ความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ลักษณะของแคลลัส
1	เป็นแคลลัสแบบอ่อน (friable callus) แคลลัสมีสีครีมทั่วทั้งก้อน
1.5	แคลลัสส่วนใหญ่เป็นแบบอ่อน (friable callus) แคลลัสมีสีครีมบางส่วนมีสีเขียวอ่อน
2	แคลลัสส่วนใหญ่เป็นแบบอ่อน (friable callus) แคลลัสมีสีครีม สีน้ำตาลเข้ม บางส่วนมีสีเขียวอ่อน

จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่อยู่ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับแคลลัสที่อยู่ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (รูปที่ 6) โดยคิดเป็นร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตเท่ากับ 3,735.78 (ตารางที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



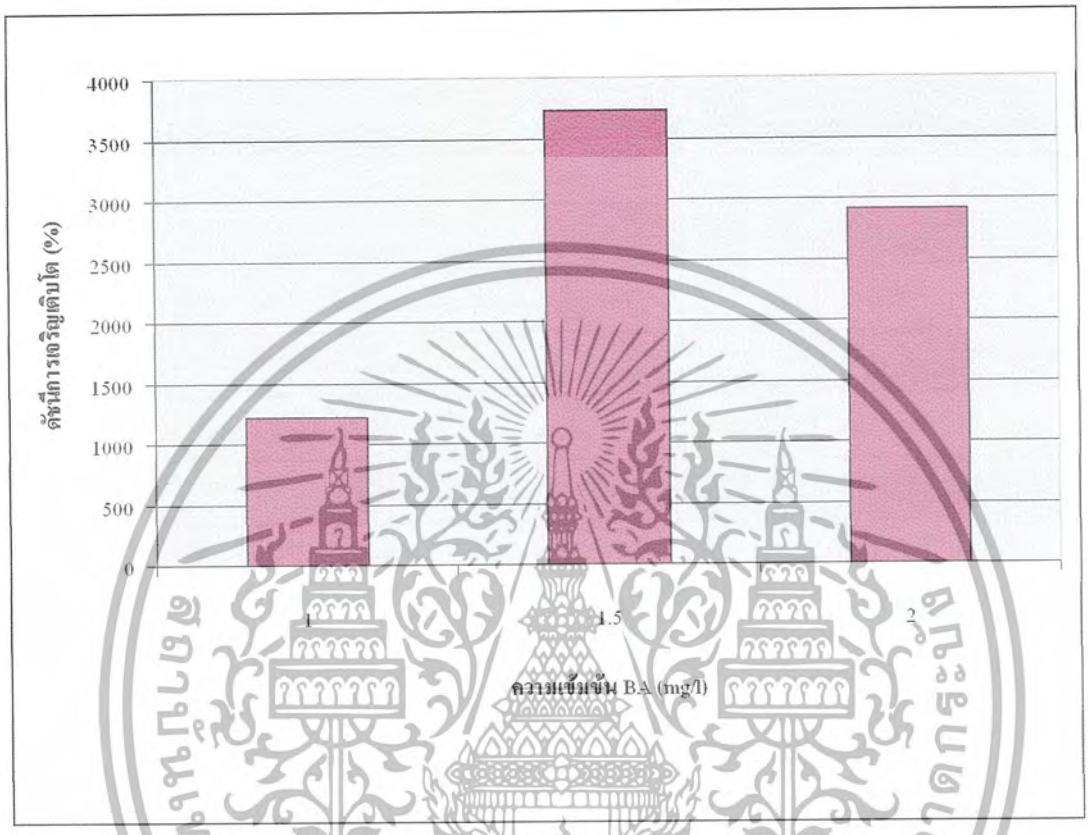
(a) (b)

รูปที่ 6 เปรียบเทียบแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร **(a)** แคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต BA **(b)** แคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

ตารางที่ 5 แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

ความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (%)
1	1,219.85
1.5	3,735.78
2	2,911.378

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส กับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

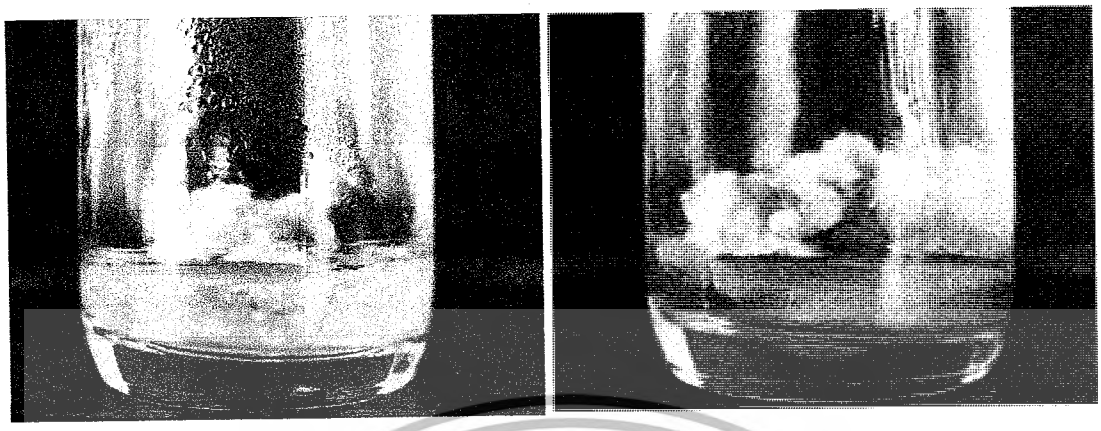
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส

ในการทดลองย้ายแคลลัสลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตระหว่าง NAA ต่อ BA ต่างๆ กัน 16 สูตร (ตารางที่ 2) โดยแคลลัสที่ได้นั้นนำมาจากขั้นตอนที่ 1 เป็นแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และทำการบันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตลักษณะของแคลลัส (ตารางที่ 6) และ วัดการเจริญเติบโต โดยการหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (ตารางที่7, รูปที่ 9) ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง พบว่า ในสูตรอาหาร N O และสูตร P แคลลัสมีการเจริญเติบโตสูง (รูปที่ 8) โดยสังเกตได้จากค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตเท่ากับ 1,440.03 (ตารางที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A) (B)

(C)

รูปที่ 8 แคลลัสในอาหารสังเคราะห์ MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (A) NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะของแคลลัสในอาหารสูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแคลลัสอายุ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

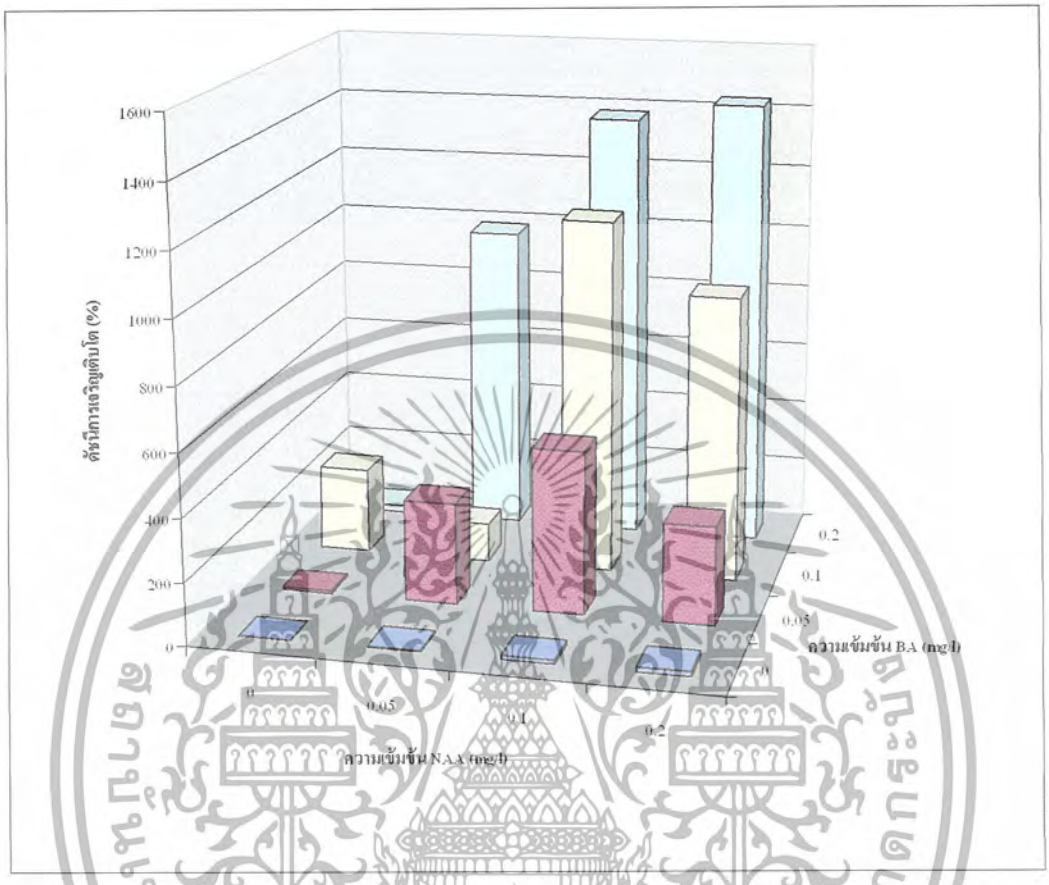
ชื่อสูตรอาหาร	ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		ลักษณะของแคลลัส
	NAA	BA	
A	0	0	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลดำ
B	0.05	0	แคลลัสมีสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
C	0.1	0	แคลลัสมีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
D	0.2	0	แคลลัสมีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
E	0	0.05	แคลลัสมีสีน้ำตาลดำ
F	0.05	0.05	แคลลัสมีสีครีมและลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
G	0.1	0.05	แคลลัสมีสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
H	0.2	0.05	แคลลัสมีสีน้ำตาลอ่อน สีขาวและสีเขียวอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
I	0	0.1	แคลลัสมีสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
J	0.05	0.1	แคลัสมีสีเขียวอ่อน บางส่วนเป็นสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
K	0.1	0.1	แคลลัสมีสีครีมทั้งก้อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
L	0.2	0.1	แคลลัสมีสีครีมบางส่วนเป็นสีเขียวลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
M	0	0.2	แคลลัสมีสีน้ำตาลเข้ม อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม
N	0.05	0.2	แคลลัสมีสีเขียวเข้มบางส่วนเป็นสีเขียวอ่อนและสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
O	0.1	0.2	แคลลัสมีสีเขียวเข้มบางส่วนมีเป็นสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
P	0.2	0.2	แคลลัสมีสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAAในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

ชื่อสูตรอาหาร	ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		ร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (%)
	NAA	BA	
A	0	0	0.189
B	0.05	0	5.081
C	0.1	0	10.885
D	0.2	0	15.156
E	0	0.05	8.012
F	0.05	0.05	332.475
G	0.1	0.05	518.482
H	0.2	0.05	312.971
I	0	0.1	274.908
J	0.05	0.1	122.34
K	0.1	0.1	1,134.910
L	0.2	0.1	915.459
M	0	0.2	23.204
N	0.05	0.2	988.343
O	0.1	0.2	1,381.789
P	0.2	0.2	1,440.034

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส กับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส

ในการทดลองย้ายแคลลัสลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ต่อ TDZ ต่างๆ กัน 18 สูตร (ตารางที่ 3) โดยแคลลัสที่ได้นั้นนำมาจากขั้นตอนที่ 1 เป็นแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และทำการบันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตลักษณะของแคลลัส (ตารางที่ 8) และวัดการเจริญเติบโต โดยการหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (ตารางที่ 9, รูปที่ 11) ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

ตารางที่ 8 แสดงอิทธิพลของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแคลลัส ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

ชื่อสูตรอาหาร	ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		ลักษณะของแคลลัส
	NAA	TDZ	
A	0	0	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลดำ
B	0.05	0	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลดำ
C	0.1	0	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลดำ
D	0	0.1	แคลลัสเป็นสีน้ำตาล
E	0.05	0.1	แคลลัสมีสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
F	0.1	0.1	แคลลัสมีสีครีมบางส่วนมีสีเขียวอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
G	0	0.5	แคลลัสมีสีครีมทั้งก้อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
H	0.05	0.5	แคลลัสมีสีครีม บางส่วนมีสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
I	0.1	0.5	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อสูตรอาหาร	ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		ลักษณะของแคลลัส
	NAA	TDZ	
J	0	1	แคลลัสมีสีครีม บางส่วนมีสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
K	0.05	1	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน ๆ บางส่วนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อนบางส่วนเป็นแบบแข็ง
L	0.1	1	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน ๆ ทั้งก้อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
M	0	3	แคลลัสมีสีเขียวเข้ม บางส่วนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
N	0.05	3	แคลลัสมีสีเขียวเข้มส่วนใหญ่ บางส่วนมีสีเขียวอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
O	0.1	3	แคลลัสมีสีครีม บางส่วนเป็นสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
P	0	5	แคลลัสมีสีครีมและสีเขียวอ่อน ๆ บางส่วนเป็นสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
Q	0.05	5	แคลลัสมีสีครีมและสีเขียวอ่อน ๆ ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
R	0.1	5	แคลลัสมีสีครีม บางส่วนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน

จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสในอาหารสูตร M มีการเจริญเติบโตสูงสุด (รูปที่ 10(A)) โดยคิดเป็นร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตเท่ากับ 2,427.72 เมื่อเทียบกับอาหารสังเคราะห์ MS สูตรอื่น ๆ (ตารางที่ 9) และพบว่าแคลลัสในสูตรอาหารอื่น เช่น สูตรอาหาร N O P Q และ R แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่ดีเช่นกัน พบว่าในสูตรอาหาร N นั้นแคลลัสมีสีเขียวเข้ม (รูปที่ 10(B)) ซึ่งลักษณะเช่นนี้เหมาะแก่การเกิดเป็นต้นใหม่ของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A) (B)

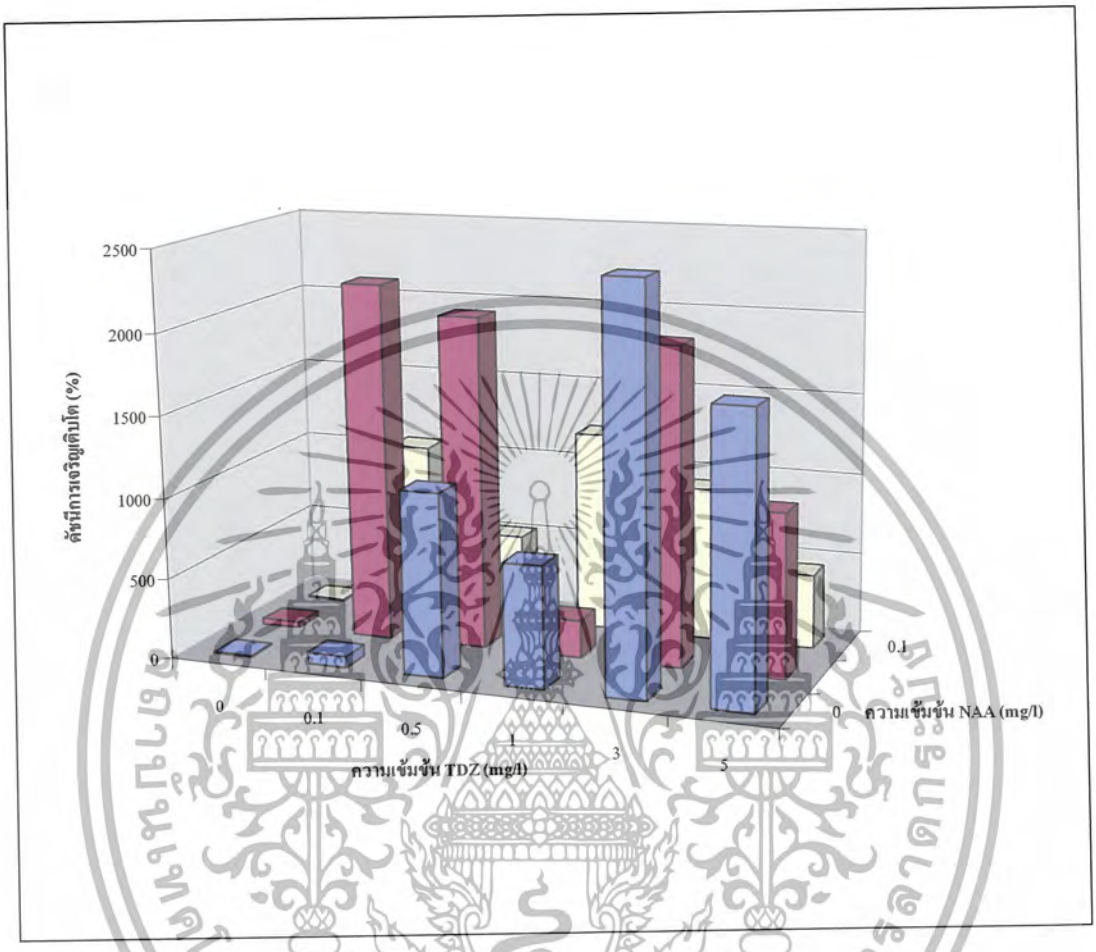
รูปที่ 10 แคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (A) NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

ชื่อสูตรอาหาร	ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		ร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (%)
	NAA	TDZ	
A	0	0	9.59
B	0.05	0	35.54
C	0.1	0	7.62
D	0	0.1	71.86
E	0.05	0.1	2,207.02
F	0.1	0.1	1,067.04
G	0	0.5	1,122.71
H	0.05	0.5	2,042.17
I	0.1	0.5	532.93
J	0	1	742.47
K	0.05	1	232.60
L	0.1	1	1,231.56
M	0	3	2,427.72
N	0.05	3	1,942.14
O	0.1	3	935.99
P	0	5	1,751.00
Q	0.05	5	998.63
R	0.1	5	457.38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส กับ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสอ่อนในอาหาร MS

ในการทดลองย้ายแคลลัสจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 3) ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

จากการทดลองย้ายแคลลัสจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 13) และหาค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (ตารางที่ 11, รูปที่ 12)

ตารางที่ 10 แสดงลักษณะของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในระยะเวลา 4 สัปดาห์

แคลลัสจากสูตรอาหาร	ลักษณะของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต
A	แคลลัสเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
B	แคลลัสเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
C	แคลลัสเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
D	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลบางส่วนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
E	แคลลัสเป็นสีขาว ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
F	แคลลัสมีสีครีม บางส่วนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
G	แคลลัสมีสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
H	แคลลัสมีสีเขียวทั้งก้อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
I	แคลลัสเป็นสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน แคลลัสบางส่วนเป็นแบบแข็ง
J	แคลลัสเป็นสีเขียวอ่อน บางส่วนเป็นสีขาว ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน
K	แคลลัสมีสีเขียวเข้ม บางส่วนเป็นสีขาว มีลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสจากสูตรอาหาร	ลักษณะของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต
L	แคลลัสมีสีเขียวอ่อนทั้งก้อนลักษณะเป็นแคลลัส แบบแข็ง
N	แคลลัสมีสีน้ำตาล บางส่วนมีสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
O	แคลลัสมีสีน้ำตาลทั้งก้อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
P	แคลลัสมีสีเขียวอ่อน บางส่วนเป็นสีขาว ลักษณะเป็นแคลลัส แบบแข็ง
Q	แคลลัสมีสีเขียวเข้ม บางส่วนเป็นสีขาว ลักษณะเป็นแคลลัสแบบแข็ง
R	แคลลัสมีสีขาว บางส่วนมีสีเขียวอ่อน ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน บางส่วนเป็นแบบแข็ง

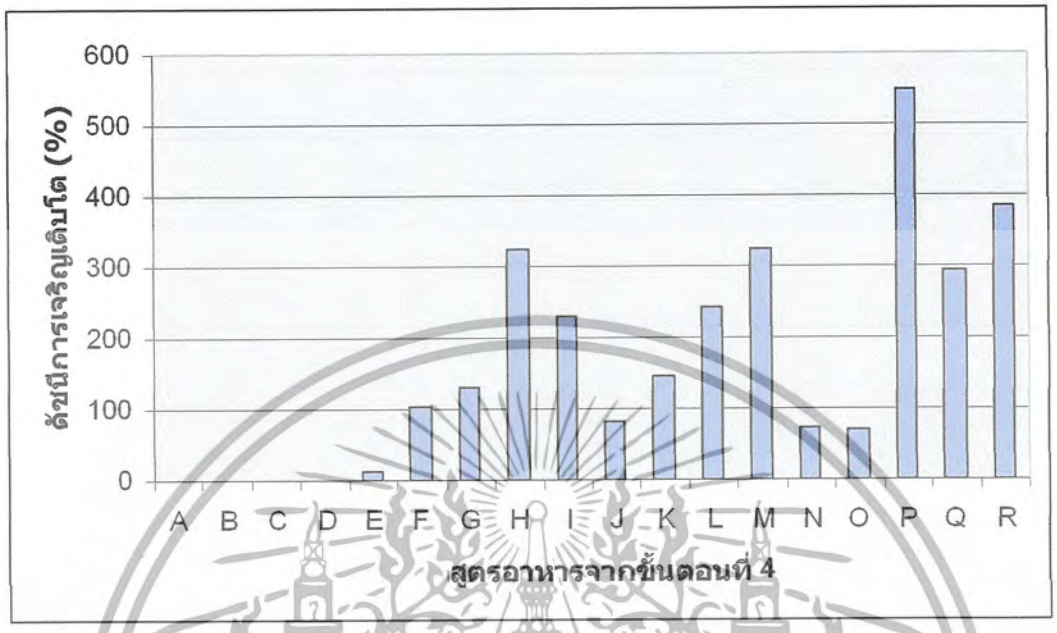
ตารางที่ 11 แสดงร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

แคลลัสจากสูตรอาหาร	ร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (%)
A	0
B	0
C	0
D	0
E	12.96
F	101.94
G	129.35
H	325.11
I	231.76
J	81.89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสจากสูตรอาหาร	ร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต (%)
K	146.52
L	241.77
M	324.16
N	73.29
O	68.76
P	548.58
Q	293.36
R	384.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ย้ายจากการทดลองตอนที่ 4 มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองตอนที่ 1 เป็นการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อนซึ่งความสามารถในการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนขึ้นอยู่กับ ชนิด อายุ และขนาดของชิ้นส่วน นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนที่นำมาใช้ สภาวะที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาใช้นั้นทุกส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ทั้งนั้นแต่ความสามารถในการเจริญเติบโตต่างกันไป เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัวไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ตื่นตัวมากที่สุดคือเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งพบได้ในส่วนปลายยอดของ ลำต้น ส่วนปลายราก เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง ขนาดของชิ้นส่วน โดยเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่จะง่ายต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และเชื้อโรคต่างๆ ขณะที่เนื้อเยื่อขนาดเล็กจะสามารถหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนได้ดี แต่เนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้โตช้า และไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเท่าเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ ในทางปฏิบัติจึงนิยมแก้ไขโดยเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเล็กหลายๆ ชิ้นในภาชนะเดียวกัน เพื่อกระตุ้นการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้น

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ เนื้อเยื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต้องผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจมีติดอยู่ที่บริเวณผิวของเนื้อเยื่อออกเสียก่อน จึงต้องเลือกน้ำยาฆ่าเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ในการทดลองนี้ใช้สารละลายไฮเตอร์ในการฟอกฆ่าเชื้อ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อมีการเติมสารลดแรงตึงผิว Tween- 20 2-3 หยดลงไปด้วยเมื่อฟอกฆ่าเชื้อแล้วต้องล้างน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ให้สะอาด หรือให้แน่ใจว่าไม่มีน้ำยาฆ่าเชื้อเหลืออยู่เพราะถ้าเหลืออยู่จะทำให้ชิ้นส่วนนั้นตาย

ปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและสภาวะต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง สภาวะที่ต้องควบคุมคือ อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มแสง พีเอชของอาหารเป็นต้น เพราะเนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดจะใช้สภาวะในการชักนำให้เกิดแคลลัสต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืช

จากการทดลองแคลลัสที่ได้นั้นเป็นแคลลัสลักษณะอ่อนเช่นเดียวกับแคลลัสที่ได้จากทดลองของ Seung-Heui Kim และ Seon-Kyu Kim ในปี 2002 ได้ทำการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำชิ้นส่วนต่างๆ ขององุ่นให้เกิดแคลลัส พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อน

การทดลองขั้นตอนที่ 2 เป็นการศึกษาอิทธิพลของระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วแม้ในอาหาร MS จะมีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงชนิดเดียวโดยที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นแคลลัสมีค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต 3,735 ซึ่งเป็นค่าสูงสุด และที่ความเข้มข้น BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น แคลลัสมีค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตที่ลดลงโดยมีค่าอยู่ที่ 2,911 จะพบว่าปริมาณความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่มีผลทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตเร็วขึ้นแต่มีผลทำให้การเจริญลดลงแสดงว่าความเข้มข้นของ BA สูงๆ ทำให้การเจริญของแคลลัสลดลงที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในแคลลัสที่นำมาจากการทดลองตอนที่ 1

จากการทดลองตอนที่ 3 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส ทุกความเข้มข้นของ NAA พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อมีความเข้มข้นของ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นเพียงที่ความเข้มข้น NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนั้นยังสังเกตได้ว่าในสูตรอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่าง NAA ต่อ BA เป็น 1 ต่อ 1 จะมีการเจริญเติบโตสูงที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในแคลลัสที่นำมาจากการทดลองตอนที่ 1

ในการทดลองตอนที่ 4 เป็นการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส ซึ่งแคลลัสที่นำมาใช้ในการทดลองนี้นั้นเป็นแคลลัสที่ได้จากการทดลองในตอนที่ 1 พบว่าในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูง โดยเฉพาะในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ NAA ต่ำ โดยแคลลัสจะมีการเจริญเติบโตสูงกว่าในสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารโดยเฉพาะในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA สูง การเจริญเติบโตของแคลลัสจะต่ำกว่าในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ต่ำ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในกรณีที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สูง มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตลดต่ำลง และ TDZ มีส่วนทำให้แคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่มีสีเขียวเกิดขึ้นต่างจากการทดลองตอนที่ 3 ซึ่งแคลลัสที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 นั้นส่วนใหญ่เป็นแคลลัสสีครีม ในกรณีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ก็เช่นเดียวกันแม้ว่าในสูตรอาหารจะใช้ปริมาณความเข้มข้นของ NAA ต่ำ ก็ตามแต่แคลลัสที่นำมาใช้มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA สะสมอยู่ในแคลลัสแล้ว จึงทำให้ที่ความเข้มข้นของ NAA สูงๆ นั้นการเจริญเติบโตของแคลลัสจึงลดลงโดยดูได้จากค่าร้อยละดัชนีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองตอนที่ 5 เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสอ่อนในอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จากรายงานการทดลองของ Prathanturarug et al. (2003) พบว่าอาหารที่มี TDZ 18.2 ไมโครโมลาร์ ลดระยะเวลาการเลี้ยงชิ้นส่วนขมิ้นชัน จาก 8 สัปดาห์ เป็น 4 สัปดาห์ แล้วเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าจะได้อัตราการสร้างยอดใหม่เพิ่มขึ้น ยอดใหม่มีการสร้างรากใหม่เพิ่มมากขึ้น และต้นที่ได้มีความสมบูรณ์สามารถย้ายปลูกได้ นพมาศ และคณะ (2546) รายงานตรงกันว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดชมิ้นชันนั้นในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 18.2 ไมโครโมลาร์ ทำให้ได้ยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น ในระยะเวลา 12 สัปดาห์ สรุปว่า ระยะเวลา 4 สัปดาห์ที่ชิ้นส่วนพืชได้รับ TDZ เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดยอด และเมื่อย้ายไปลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะทำให้ได้จำนวนยอดเพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก TDZ เป็นสารออกฤทธิ์คล้ายไซโตไคนินที่มีฤทธิ์แรง และมีผลต่อความสูงของยอด การย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีจุดประสงค์เพื่อให้ตายอดที่เกิดขึ้นนั้นมีการเจริญเติบโตด้านความสูงเป็นปกติ ซึ่งจากการทดลองเมื่อย้ายแคลลัสจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ลงในอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าแคลลัสไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ แต่แคลลัสยังคงมีการเจริญเติบโต โดยสังเกตจากค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น และพบว่าแคลลัสที่นำมาจากสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สูงสุดคือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงกว่าสูตรอาหารอื่น ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่มีอยู่ในแคลลัสที่นำมาจากการทดลองตอนที่ 4

ในการทดลองทุกการทดลองพบว่าแคลลัสที่นำมาใช้นั้นอยู่ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญหลายชนิดเป็นเวลานานอาจทำให้แคลลัสเกิดความแปรปรวน (somaclonal variation) เป็นผลให้พันธุกรรมของพืชเกิดความแปรปรวนในอนาคต ซึ่งความแปรปรวนนี้อาจเกิดจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เนื่องจากสารดังกล่าว ชักนำให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว วงจรการแบ่งเซลล์ (cell cycle) ถูกเร่งให้สั้นกว่าปกติ เมื่อเป็นเช่นนี้สารที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ได้แก่ เอนไซม์ และโปรตีนถูกสร้างอย่างรวดเร็วเช่นกันในบางครั้งทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้างสารที่จำเป็นบางตัว เซลล์ลูกที่ได้หลังจากกระบวนการแบ่งเซลล์จึงผิดปกติ นอกจากนี้สารที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลแย่งที่กับเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ ผลที่ตามมาคือ ความผิดปกติของเซลล์ลูกเมื่อนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดเป็นต้นอาจทำให้เกิดความแปรปรวนแสดงออกให้เห็นทางฟีโนไทป์ได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัสองุ่น โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เริ่มต้นจากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบองุ่น โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ในระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสในระยะเวลา 4 สัปดาห์โดยทำกาเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นในระยะเวลา 4 เดือน จึงย้ายแคลลัสลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของแคลลัส เป็นดังนี้

1. การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัสว่า การเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็ง MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด มีค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตเป็น 3,735 แคลลัสที่ได้ส่วนมากเป็นแคลลัสชนิดอ่อน สีครีม และค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA มากกว่า 1.5 มิลลิกรัม

2. การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส พบว่าการเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็ง MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงสุด มีค่าร้อยละดัชนีการเจริญเป็น 1,440 ซึ่งแคลลัสที่ได้นั้นเป็นสีครีม ลักษณะเป็นแคลลัสแบบอ่อน และพบว่าแคลลัสจะมีการเจริญเติบโตสูงเมื่อ ปริมาณของ NAA และ ปริมาณ BA ที่สมดุลกัน เช่น ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นจะมีค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าในอาหารที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 0 0.05 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เสริมด้วย TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงชนิดเดียว โดยมีค่าร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2,427 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสโดยเสริมด้วย NAA และ TDZ พบว่าแคลลัสส่วนมากมีสีเขียว ถ้าอยู่ในอาหารสูตรที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมอาจมีการพัฒนาในขั้นต่อไปได้

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสอ่อนในอาหาร MS แสดงให้เห็นว่าแคลลัสที่นำมาจากอาหารสังเคราะห์สูตรของ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้ายแคลลัสเหล่านั้นลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ 4 สัปดาห์ของการทดลองพบว่าลักษณะและสีของแคลลัสส่วนใหญ่ไม่แตกต่างไปจากเดิม แต่แคลลัสมีการเจริญเติบโตโดยวัดการเจริญจากร้อยละดัชนีการเจริญเติบโต พบว่าแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตสูงส่วนใหญ่เป็นแคลลัสที่นำมาจากในสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้นสูง คือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในทุก ๆ สูตรอาหารและ ลักษณะของแคลลัสที่เจริญขึ้นมาใหม่นั้นส่วนมากจะมีสีขาว และเป็นลักษณะแบบอ่อน

จากการทดลองถ้าต้องการนำแคลลัสที่ได้ไปใช้ประโยชน์หรือต้องการแคลลัสจำนวนมากควรเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS ที่เสริมด้วย BA เนื่องจากแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูง แคลลัสที่ได้มีลักษณะที่ดีคือเป็นแคลลัสชนิดอ่อน มีสีครีม ซึ่งแคลลัสชนิดอ่อนนี้สามารถนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวได้

ถ้าต้องการนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดยอด ชักนำให้เกิดราก หรือชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ควรใช้แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA และ TDZ เนื่องจากแคลลัสที่ได้นั้นส่วนมากเป็นสีเขียวเข้ม หรือสีเขียวอ่อน ถ้านำไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมอาจเกิดการพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรือพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร . 2539 . เอกสารวิชาการเทคโนโลยีการเกษตร ฉลองศิริราชสมบัติครบ 50 ปี . กรุงเทพฯ

กลุ่มเกษตรสัญจร . 2531 . องุ่น . กรุงเทพฯ

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, มาลิน จุลศิริ, ยุวดี วงษ์กระจ่าง, อำพล ไมตรีเวช, สมภพ ประธานธุรารักษ์, วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุล, อุดม คชินทร, จรินทร์ โรจนบวรวิทยา, ชัยพร โรจนวัฒน์ศิริเวช, พรชัย จิระชนากุล, สมบูรณ์ เกียรตินันท์, พร้อมจิต ศรลัมพ์ และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ . 254. การวิจัยและพัฒนาขมิ้นชันเพื่อใช้เป็นยารักษาโรค. รายงานการสัมมมนาการเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านสมุนไพร วันที่ 31 กรกฎาคม – 1 สิงหาคม 2546 ณ โรงแรมมารวยกาเด้นส์ กรุงเทพมหานคร. หน้า 101-111

ปวิณ ปุณศรี . 2504 . การขยายพันธุ์องุ่น . กรุงเทพฯ

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา . 2524 . หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ . กรุงเทพฯ

วัฒนา สวรรยาธิปัติ . 2531 . การปลูกองุ่น . กรุงเทพฯ

George, E (1993) Plant Propagation by Tissue Culture (part 1) The Technology (2nd). Exegetics limited.

Grenan S (1992) Micropropagation of grapevine (Vitis vinefera L.). In: Biotechnology om Agriculture and Forestry (Bajaj YPS Ed). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Newyork, pp 371-398

Horgan, R (1987) Plant Growth Regulators and the Control of Growth and Differentiation in Plant Tissue Culture. *In* Green *et al.* (eds.). 135-149.

Khawar. K, Sancak. G, Uranbey. S, Zcan. S (2003) Effect of Thidiazuron on Shoot Regeneration from Different Explants of Lentil (*Lens culinarisMedik*) via Organogenesis. Turk J Bot, 421-426

Knudson (1946) Originally cited by (A new nutrient solution for orchid seed germination. American Orchid Society Bulletin, 15, 214-17.

Mok, M., Mok, D., Turner, J. and Mujer, C. 1987. Biological and Biochemical Effects of Cytokinin-active Phenylurea Derivatives in Tissue Culture Systems. Hortscience 22(6): 1194-1197.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W. and Saralamp, P. 2003. High-frequency Shoot Multiplication of Curcuma longa L. Using Thidiazuron. Plant Cell report 21: 1054-1059

Seung-Heui Kim, Seon-Kyu Kim. (2002) Effects of Auxins and cytokinins on Callus Induction Horticulture, Chungbuk National university, Cheongju, 361-763, Korea

S. Jayasankar . D.J. Gray . R.E. Litz. (1999) High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. Plant Cell Report 18: (533-537)

White, R.P. (1934) The Dermatergoses or Occupational affections of the skin. 4th ed. London. H.K. Lewis.

Vacin and Went (1949) Modified from through the addition of ferrous sulfate + EDTA. PhytoTechnology V. 891

Valerii A. Zlenkc, Ilia V. Kotikov & Leonid P. Troshin. (2002) Efficient GA3-assisted plant regeneration from cell suspensions of three grape genotypes via somatic embyogenesis

www.thepwatana.com/ Clinic/Grape.shtm

www.maejo.com/ dupic/default.asp

www.doae.go.th/library/html/detail/grape/grape4.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS) (1962)

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชั่งสารเตรียม stock (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	NH_4NO_3	1,650	82,500	50	20
2	KNO_3	1,900	95,000	50	20
3	H_3BO_3	6.2	1,240	200	
	KH_2PO_4	170	34,000	200	
	KI	0.83	166	200	5
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	50	200	
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	5	200	
4	$CaCl_2.2H_2O$	440	88,000	200	5
5	$MgSO_4.7H_2O$	370	74,000	200	
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3	4,460	200	5
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	1,720	200	
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	5	200	
6	Na_2EDTA	37.25	7,450	200	5
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	5,570	200	
7	glycine	2.0	400	200	
	nicotinic acid	0.5	100	200	5
	pyridoxine-HCl	0.5	100	200	
	thiamine-HCl	0.1	20	20	
8	myo-inositol	100	100	1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

วิธีการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS

1. เตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS สำเร็จรูป

นำอาหารสังเคราะห์สูตร MS สำเร็จรูป ซึ่งอยู่ในรูปผง ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร หลังจากนั้นแบ่งสารละลายอาหารสังเคราะห์สูตร MS ใส่ในขวดสีชา ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่แข็ง

2. นำอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่อยู่ในขวดสีชามาละลาย หลังจากนั้นเติมน้ำตาลร้อยละ 3 ปรับปริมาตร (เติมสารควบคุมการเจริญ ในสูตรอาหารที่ต้องการสารควบคุมการเจริญ) และปรับพีเอชของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 5.6-5.8

3. ถ้าต้องการเตรียมอาหารแข็ง เติมวุ้นลงในสารละลายอาหารร้อยละ 0.8 แล้วนำเข้าไมโครเวฟให้วุ้นละลาย

4. เทสารละลายอาหารที่ได้ลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

6. ทิ้งอาหารไว้ให้เย็น

วิธีการเตรียม Stock สารควบคุมการเจริญเติบโต

1. เตรียม stock NAA (naphthalene acetic acid) (น้ำหนักโมเลกุล = 186.20)
ชั่ง NAA โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการเตรียม แล้วใช้ NaOH 1 N เป็นตัวทำละลาย

2. เตรียม stock BA (benzyladenine) (น้ำหนักโมเลกุล = 225.26)
ชั่ง BAโดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการเตรียม แล้วใช้ NaOH 1 N เป็นตัวทำละลาย

3. เตรียม stock TDZ (Thidiazuron) (น้ำหนักโมเลกุล = 220.25)
ชั่ง TDZโดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการเตรียม แล้วใช้ NaOH 1 N เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้