สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำ

Embryo Rescue Culture of Physic Nut (*Jatropha curcas*)

โดย

นางสาวพีชญา ศิลป์มี

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์

ปพ.
ป16ก
2550

เลขหมู่.....102746
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี 18 ส.ค. 2552

T102746

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่)

พุทธศักราช 2550

b19041002
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำ

Embryo Rescue Culture of Physic Nut (*Jatropha curcas*)

โดย

นางสาวปพิชญา ศิลป์มี

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรอง

.....

(รศ. ดร. สมยศ เดชภิรัตนมงคล)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ ๒ **เดือน** ตุลาคม **พ.ศ.** ๒๕๕๗

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในระดับปริญญาตรี การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้ทำการวิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่เคารพอย่างสูง ที่คอยให้คำแนะนำช่วยเหลือในด้านความรู้ ตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณศรีจันทร์ หลักทอง เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการที่คอยให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำ ตลอดระยะเวลาในการทำการทดลอง

ขอขอบคุณท่านคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ในภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทดลอง เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมทั้งเพื่อนที่คอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุก ๆ คนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมาจนสำเร็จด้วยดี

นางสาวพิชญา ศิลป์มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำ
โดย : นางสาวปพิชญา ศิลป์มี
ภาควิชา : เทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำ เพื่อศึกษาช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของเอ็มบริโอ ภายหลังการผสมเกสร ที่เหมาะสมต่อการงอกไปพัฒนาเป็นต้น โดยการนำเมล็ดสบู่ดำช่วงอายุ 15, 20, 30, 45, 50 และ 60 วัน แกะเอาเฉพาะเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าช่วงอายุ 15 และ 20 วัน ไม่มีการงอกเกิดขึ้น ช่วงอายุ 30 วันถึง 60 วัน เอ็มบริโอมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ต่อมาได้นำต้นที่งอกมาเปลี่ยนใส่อาหารสูตร MS สูตรเดิม เพื่อดูการพัฒนาขนาดของลำต้น เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ช่วงสัปดาห์แรกลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 – 0.25 เซนติเมตร สัปดาห์ที่ 2 ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 – 0.35 เซนติเมตร สัปดาห์ที่ 3 ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 – 0.45 เซนติเมตร และสัปดาห์สุดท้าย ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

คำสำคัญ : สบู่ดำ, เอ็มบริโออ่อน, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : Embryo Rescue Culture of Physic Nut (*Jatropha curcas)*

Anthor : Miss Papichaya Silmee

Department : Plant Production Technology

Faculty : Agriculture of Technology

Advisor : Mr.Vichai Limkarchanaphong

ABSTRACT

Embryo rescue culture of physic nut was studies on the period of embryo from proper time of pollination to promoting the growth and development. Embryo of physic nut's period was 15, 20, 30, 45, 50 and 60 days after pollination. Then, only embryo were cultured on the Murashige and Skoog (MS) agar medium non-hormone within 4 weeks. The result was that, ages of embryo between 15 and 20 days, no change from the beginning. Contrast, the ages of 30, 45, 50 and 60 days, embryo is complete development respectively. After that, sub-culture and used MS agar medium to observe the development of the stem's sizes for 4 weeks. Its diameter from the first to fourth week was 0.2 - 0.25 cm., 0.3 - 0.35 cm., 0.4 - 0.45 cm. and 0.5 cm. respectively.

Key word : Physic nut, Embryo Rescue, Tissue culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
สารบัญภาคผนวก	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลการทดลอง	25
วิจารณ์	34
สรุป	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	38
ประวัติผู้เขียน	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog	18
2	เปรียบเทียบขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อจากส่วนต่าง ๆ ของพืช	20
3	แสดงจำนวนต้นสบู่ดำที่เกิดขึ้นและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาไปเป็นต้น ในช่วงอายุต่าง ๆ ของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ ภายหลังการผสมเกสร ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MS	25
4	แสดงระดับคะแนนความสมบูรณ์ของการพัฒนาไปเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำในช่วงอายุต่าง ๆ ของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ ภายหลังการผสมเกสรในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS	27
5	แสดงการพัฒนาขนาดต้นสบู่ดำ ในช่วงอายุต่าง ๆ ของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำภายหลังการผสมเกสรในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MS สูตรเดิม	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงจำนวนต้นสบู่ดำที่เกิดขึ้นของเอ็มบริโออ่อน ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	26
2	แสดงความสมบูรณ์ของการพัฒนาเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อน ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	28
3	แสดงการพัฒนาเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์	29
4	แสดงการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของสบู่ดำ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	29
5	แสดงการพัฒนาเป็นต้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อครบ 4 สัปดาห์	30
6	แสดงการพัฒนาขนาดของลำต้นสบู่ดำหลังจากการเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	32
7	แสดงการขยายขนาดของต้นสบู่ดำที่นำมาเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เริ่มจาก 4, 3, 2 และ 1 สัปดาห์ ตามลำดับจากซ้ายไปขวา	33
8	แสดงการพัฒนาขนาดของต้นสบู่ดำที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

ภาพผนวกที่		หน้า
1	ต้นสบู่ดำในแปลงทดลอง	39
2	ลักษณะของต้นสบู่ดำ	39
3	ลักษณะใบของสบู่ดำ	40
4	ลักษณะดอกตัวผู้และดอกตัวเมียของต้นสบู่ดำ	40
5	ผลของสบู่ดำ	41
6	แสดงลักษณะผลของสบู่ดำในช่วงอายุต่าง ๆ กัน	41
7	เมล็ดสบู่ดำที่อยู่ในผลของสบู่ดำ	42
8	แสดงลักษณะเมล็ดสบู่ดำในช่วงอายุต่าง ๆ กัน	42
9	ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow)	43
10	เครื่องวัด pH	43
11	การเขย่าเมล็ดสบู่ดำในขณะการฟอกฆ่าเชื้อ	44
12	แสดงการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟ	44
13	เมล็ดสบู่ดำที่แกะออกจากผล ในตู้ปลอดเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	45
14	แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ	45
15	การนำเอ็มบริโอออนไสลงอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS	46
16	เอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์	46
17	เอ็มบริโอออนสบู่ดำที่วางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่ปลอดเชื้อ	47
18	เอ็มบริโอออนสบู่ดำที่วางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่ปลอดเชื้อ	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ในสภาวะที่หลายประเทศในปัจจุบันได้ประสบปัญหาทางด้านเศรษฐกิจ อันเนื่องมาจากราคาน้ำมันได้สูงขึ้น แต่ละประเทศต่างก็ต้องการหาแหล่งพลังงานของตน เพื่อทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม (วัลซลีย์, 2527) ทำให้ทั้งภาครัฐ และเอกชนรวมทั้งสถาบันทางการศึกษาให้ความสำคัญกับการนำพืชประเภท น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว รวมทั้งน้ำมันสบู่ดำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันดีเซล เพราะการนำเอาน้ำมันพืชมาผลิตเป็นไบโอดีเซลถือเป็นพลังงานบริสุทธิ์ที่ไม่สร้างมลภาวะต่อสภาพแวดล้อม อีกทั้งเป็นวัตถุที่หาได้ง่ายภายในประเทศ จึงเท่ากับเป็นการลดการนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศ และประหยัดเงินตราเป็นจำนวนมากไม่ให้รั่วไหลสู่ต่างประเทศ สบู่ดำเมื่อนำมาสกัดเป็นน้ำมันจะสามารถใช้กับเครื่องจักรกลทางการเกษตร ซึ่งเป็นเครื่องยนต์หมุนช้าได้ทันทีเลย เช่น เครื่องสูบน้ำ รถไถนา รถอีแต๋น ฯลฯ โดยไม่สร้างปัญหาให้แก่เครื่องยนต์ และมลภาวะทางอากาศ ทำให้สบู่ดำกลายเป็นพืชเศรษฐกิจตัวใหม่ที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรจำนวนมาก (ปริชญา, 2537)

ปัจจุบันสบู่ดำมีผลผลิตที่ต่ำ ไม่คุ้มกับการลงทุน เนื่องจากสบู่ดำมีฐานพันธุกรรมที่แคบ ผลผลิตจึงไม่สูงมากนัก จึงมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น วิธีการหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์คือการผสมข้ามกับพืชคนละชนิด โดยการผสมพันธุ์กันระหว่าง สบู่ดำกับละหุ่ง ซึ่งเป็นการผสมกันระหว่างพ่อแม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก ทำให้เกิด heterosis เกิดความดีเด่นของพันธุ์พ่อ และพันธุ์แม่ การผสมพันธุ์ระหว่างพืชที่มีฐานพันธุกรรมต่างกันห่างกันมากจะเกิดการเข้ากันไม่ได้ระหว่างเอนโดสเปิร์มกับเอ็มบริโอ เป็นสาเหตุให้เกิดการฝ่อตายไปของเอ็มบริโอ การใช้วิธีเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนเพื่อช่วยเหลือไม่ให้เกิดการแท้ง (abortion) เมื่อผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดกัน เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองเฉพาะเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำเพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการผสมข้ามกับพืชคนละชนิดในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาช่วงอายุต่าง ๆ ที่เหมาะสมของเอ็มบริโออ่อน ต่อการพัฒนาให้เกิดเป็นต้น
2. เพื่อศึกษาช่วงเวลาที่น้อยที่สุดที่เอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำสามารถเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้
3. เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

สบู่ดำ

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ (ปรัชญา, 2537)

ชื่อสามัญ : Physic Nut, Purging Nut, bados Nut, Purge Nut, Curcas Bean

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Jatropha curcas* Linn.

วงศ์ : "สบู่ดำ" เป็นพืชที่อยู่วงศ์ Euphobiaceae เช่นเดียวกับไม้ยางพารา สบู่แดง ปัตตาเวีย มะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม ผักหวานบ้าน ฯลฯ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สบู่ดำเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางเจริญเติบโตได้สูงประมาณ 6 เมตร เป็นไม้ยืนต้นมีอายุไม่น้อยกว่า 20 ปี ทรงพุ่มมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร ยอดและใบอ่อนมีสีม่วงแกมเขียวลำต้นส่วนที่มีอายุน้อยอยู่มีสีเขียว ผิวเรียบ อวบน้ำ เปราะหักได้เพราะเป็นไม้เนื้ออ่อน ไม่มีแก่น เมื่อสบู่ดำมีอายุมากขึ้น โคนต้นมีสีน้ำตาลคล้ายคอมเทา และเริ่มแตกทรงพุ่มเมื่อลำต้นมีความสูงจากระดับพื้นดินประมาณ 12 เซนติเมตร โดยมีกิ่งแขนงเจริญออกทางด้านข้าง เป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ขึ้นได้ในที่ดอนและดินลูกรัง แต่ไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วมขัง อายุยืนไม่น้อยกว่า 20 ปี หากมีการดูแลรักษาที่ดีจะมีอายุยืนยาวถึง 50 - 60 ปี (ปรัชญา, 2537)

ใบ

ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปหัวใจกว้างถึงรูปไข่ คล้าย ๆ ใบฝ้าย ใบพุดตานหรือใบละหุ่ง แต่หนากว่า เพราะมีไข (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบเรียบ มีรอยหยักเว้าเป็นพู 5 พู พูข้างปลายมน พูปลายหรือพูกลางรูปหัวใจปลายแหลม การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแห (palmataly netted venation) ขนาดของใบมีความกว้างประมาณ 18 เซนติเมตร มีความยาวประมาณ 16 เซนติเมตร ก้านใบยาวประมาณ 24 เซนติเมตร สบู่ดำมักทิ้งใบในช่วงฤดูร้อน ถ้าแห้งแล้งมากจะทิ้งใบทั้งต้น

ดอก

ออกดอกบริเวณซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ลักษณะเป็นช่อคล้ายช่อเชิงหลั่น มักออกเป็นคู่ ๆ ช่อยาวได้ถึง 12 เซนติเมตร ก้านช่อยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ใบประดับแกมใบหอก ขอบเรียบ ปลายแหลม ยาว 5 - 10 มิลลิเมตร ดอกย่อยแยกเพศ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันแต่อยู่ภายในช่อดอกเดียวกัน เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้มีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉก รูปไข่ แกมขอบขนาน สีเหลืองแกมเขียว กว้าง 1.5 มิลลิเมตร ยาว 3 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยประมาณ ปลายกลม ด้านในมีขนยาวห่าง มีต่อมน้ำหวานที่โคนกลีบด้านใน เกสรตัวผู้มี 10 อัน แบ่งออกเป็น 2 วง วงนอกแยกจากกัน วงในเชื่อมต่อกัน อับเรณูยาว 1.5 มิลลิเมตร สีเหลือง ดอกตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้อยู่กลางของช่อย่อย กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ลักษณะอื่นคล้ายดอกตัวผู้ กลีบดอก รูปขอบขนานแกนรี สีเขียวอ่อน มีเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน 10 อัน สีขาว รังไข่รูปกระสวยมี 3 พู ปลายก้านมียอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 2 แฉก อัตราส่วนดอกตัวผู้ : ดอกตัวเมีย ประมาณ 7 : 1 ปริมาณดอกย่อยประมาณ 70 - 100 ดอกต่อช่อ แต่จะติดผล 7 - 15 ผลเท่านั้น

ผล

ผลค่อนข้างป้อมหรือรูปกระสวย กว้าง 2 – 3 เซนติเมตร ยาว 2.5 - 3.5 เซนติเมตร ลักษณะเป็นแบบเปลือกแข็ง (nut) มี 3 พู (lobes) ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเมื่อแก่จัดเปลือกนอกที่เป็นสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลแห้งที่ยังติดอยู่บนต้นจะไม่แตกออก แต่เมื่อผลร่วงลงสู่พื้นดินอาจแตกได้ ผลสดหนึ่งผลมีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือ 2.6 กรัม ผลเมื่อแกะผนังด้านนอก (exocarp) และผนังชั้นกลาง (mesocarp) ออกจะพบผนังชั้นใน (endocarp) สานกันเป็นขั้นหุ้มเมล็ดไว้ภายใน หนึ่งผลมีจำนวนเมล็ด 2 – 3 เมล็ด แต่ส่วนมากพบว่ามีจำนวนเมล็ด 3 เมล็ด

เมล็ด

เมล็ดรูปร่างป้อมยาว (oblong) รูปกระสวยแกมขอบขนานแบน ข้างกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1.7 เซนติเมตร โดยประมาณ เปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ จัดเป็นพวกมีเยื่อหุ้มเมล็ด (albumimous seed) โดยเยื่อ (albumin) บุอยู่ภายใน เป็นที่เก็บสะสมน้ำมัน (oil) และสารเคอร์ซิน (curcin) ส่วนของเนื้อใน (endosperm) และต้นอ่อน (embryo) มีสีขาวแต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.6 กรัม

น้ำยาง

น้ำยางมีลักษณะใส ไม่มีสี พบมากบริเวณลำต้นอ่อนและกาบใบ ลำต้นแก่พบน้ำยางเฉพาะที่ bark เท่านั้น

สบู่ดำ....พืชน้ำมันที่คนทั่วโลกรู้จัก (ปรัชญา, 2537)

สบู่ดำ ถูกเรียกตามคุณสมบัติเด่น คือ มีผลสีดำ ให้ฟองใช้แทนสบู่ได้ สบู่ดำ เป็นพืชที่มีอายุยาวนานมาตั้งแต่ยุคฟอสซิลเมื่อประมาณ 70 ล้านปีก่อน สบู่ดำเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ มีการกระจายพันธุ์ในประเทศเขตร้อนแถบอเมริกาใต้ และเอเชีย เช่น อินเดีย ศรีลังกา จีน รวมทั้งประเทศไทยที่มีการปลูกสบู่ดำอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ เนื่องจากสบู่ดำมีประโยชน์หลากหลายทั้งด้านอุตสาหกรรม ยารักษาโรค หลายประเทศจึงนิยมนำสบู่ดำไว้ใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวิตประจำวัน เช่น ประเทศทราแวนเกอร์ (Travancore) จะนำเมล็ดสบู่ดำมาคั่วบดกับน้ำอ้อย ให้เป็นผงใช้แก้อาการปวดท้องและแก้พิษ เมล็ดสบู่ดำให้น้ำมัน 30 – 40 % น้ำมันที่ยังใหม่ไม่มีสี และไม่มีกลิ่น แต่ถ้าตั้งทิ้งไว้ จะเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีน้ำตาลปนเหลือง และกลิ่นไม่ชวนดม น้ำมันที่ได้จากการบีบ หรือสกัดด้วยตัวทำละลาย ในทางการค้าเรียกว่า เคอคัส ออย (curcas oil) น้ำมันสบู่ดำต่างจากน้ำมันละหุ่งตรงที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า และละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์แต่ผสมได้เป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันปิโตรเลียม

สบู่ดำในประเทศไทย ชาวโปรตุเกสนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยตั้งแต่ 300 ปีก่อน ในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยาได้รับซื้อเมล็ดไปคัดบีบเอาน้ำมันสำหรับทำสบู่ เพราะในสมัยก่อนยังไม่มีสารเคมีที่ทำให้เกิดฟอง สำหรับใช้ชำระล้างและฟอกผ้าให้สะอาด

คนไทยที่นำสบู่ดำมาแปรรูปให้เป็นน้ำมันสำหรับใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลล์เป็นครั้งแรกคือ คุณระพีพันธุ์ ภาสบุตร วิศวกรการเกษตร กองเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร และคุณสุขสันต์ สุทธิพลไพบูลย์ อดีตผู้ตรวจราชการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยในปี 2522 น้ำมันปิโตรเลียมมีราคาสูงขึ้นทั้งสองท่านได้พยายามค้นคว้าทดลองหาพลังงานจากพืชน้ำมัน เช่น น้ำมันถั่วเหลือง ละหุ่ง เมล็ดดอกทานตะวัน ฯลฯ รวม 18 ชนิด เพื่อคัดเลือกพืชน้ำมันที่มีคุณสมบัติเหมาะสมมาใช้แทนน้ำมันดีเซลเพื่อให้เกษตรกรมีน้ำมันใช้อย่างเพียงพอในครัวเรือน ไม่ต้องเดือดร้อนกับการซื้อหาน้ำมันซึ่งราคาผันแปรตลอดเวลา

การแสวงหาพลังงานทดแทนในประเทศไทย (ปรัชญา, 2537)

รัฐบาลได้คาดการณ์ว่า ภายในปี 2555 ประเทศไทยจะมีความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงสูงขึ้นถึง ร้อยละ 5.45 หรือคิดเป็นอัตราการใช้น้ำมันดีเซลโดยเฉลี่ย 85 ล้านลิตร/วัน หรือ 31,000 ล้านลิตร/ปี ซึ่งในสถิติตัวเลขดังกล่าว มีความต้องการใช้น้ำมันดีเซลในภาคการเกษตรอยู่ที่ร้อยละ 6 หรือเป็นปริมาณน้ำมันอยู่ที่ 5.1 ล้านลิตร/วัน หรือ 1,860 ล้านลิตร/ปี คิดเป็นมูลค่าเงินอยู่ที่ 37,200 ล้านบาท/ปี การเร่งรัดพัฒนานำเอาพลังงานจากแหล่งอื่น ๆ มาใช้เพื่อทดแทนหรือลดการพึ่งพาพลังงานจากน้ำมันน่าจะเป็นทางออกหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขปัญหาได้ในระยะยาว เพราะมีพืชน้ำมันอยู่เป็นจำนวนมากภายในประเทศ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย เมื่อนำมาแปรรูปเป็นพลังงานใน 2 รูปแบบ คือ เชื้อเพลิงเอธานอลหรือแก๊สโซฮอล์ และไบโอดีเซล

1. เชื้อเพลิงเอธานอล หรือแก๊สโซฮอล์

อยู่ในรูปของแอลกอฮอล์ นำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อนำไปใช้กับเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินได้โดยไม่ต้องปรับแต่งเครื่องยนต์จนประสบความสำเร็จมาแล้ว โดยเริ่มมีการทดลองใช้มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 การผลิตแอลกอฮอล์จากพืชเกษตรเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมัน โดยเฉพาะการนำแอลกอฮอล์ในสัดส่วนร้อยละ 15 มาผสมกับน้ำมันเบนซินร้อยละ 85 เพื่อใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รถยนต์นั้น พบว่าโครงการดังกล่าวมีประโยชน์หลายด้านด้วยกัน เช่น จะช่วยลดปริมาณการใช้น้ำมันเบนซินในประเทศลงได้ร้อยละ 15 หรือประมาณ 1,054 ล้านลิตร นอกจากนี้ยังช่วยแก้ปัญหามลพิษทางอากาศที่เกิดจากรถยนต์ได้ เพราะพลังงานประเภทนี้จะผลิตไอเสียรถยนต์ออกมาน้อย เนื่องจากมีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์

2. ไบโอดีเซล

เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่รัฐบาลจะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน เพราะเป็นวัตถุดิบที่หาง่ายในท้องถิ่น เพราะเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตได้จากน้ำมันพืช เช่น ปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ทานตะวัน เมล็ดเรพ สบู่ดำ หรือน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ ที่ใช้แล้ว นำมาทำปฏิกิริยาทางเคมีร่วมกับเมทานอล หรือเอธานอลจนเกิดเป็นสารเอสเทอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมีนดีเซล ซึ่งเมื่อนำมาผสมกับน้ำมันดีเซลเกรดที่ใช้กันในปัจจุบันในสัดส่วนร้อยละ 5 – 10 จะสามารถนำมาใช้งานได้เป็นอย่างดี

ในปัจจุบันมีหลายประเทศในยุโรปและอเมริกาหันมาส่งเสริมการใช้ไบโอดีเซลกันอย่างแพร่หลาย แต่ประเทศเยอรมันถือได้ว่าเป็นทั้งผู้นำในการนำไบโอดีเซลมาใช้แทนน้ำมันดีเซลและเป็นผู้นำทางด้านเทคโนโลยีการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้วัตถุดิบจากเมล็ดเรพ และได้รับการยอมรับจากผู้ใช้รถเป็นอย่างดี ทั้งนี้รัฐบาลเยอรมันได้เข้ามาส่งเสริมด้วยการยกเว้นภาษีน้ำมัน ทำให้ราคาไบโอดีเซลถูกกว่าน้ำมันดีเซลปกติ

ประโยชน์ที่เห็นเด่นชัดจากการผลิตไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันดีเซล คือ ลดการสูญเสียเงินตราต่างประเทศในการนำเข้าน้ำมัน ช่วยแก้ไขปัญหาความยากจนในระดับรากหญ้า ทำให้เกษตรกรมีรายได้ดีขึ้น นอกจากนั้นยังช่วยลดปัญหามลภาวะทางอากาศ เนื่องจากไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงสะอาดไม่มีกำมะถัน และสารก่อมะเร็งเป็นองค์ประกอบ

ข้อดีของสบู่ดำในแง่ของพืชน้ำมัน (ปรัญญา, 2537)

สบู่ดำ มีข้อดีเหนือกว่าพืชน้ำมันอื่น ๆ

1. สามารถนำมาใช้ได้โดยตรงกับเครื่องยนต์ เพราะมีกระบวนการสกัดที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน

2. น้ำมันที่สกัดได้จากสบู่ดำมีคุณค่าสูงกว่าการนำไปใช้เป็นพืชพลังงานทั่วไป เนื่องจากสบู่ดำมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง เหมาะสำหรับการใช้งานในเครื่องยนต์หรือเครื่องจักรขนาดใหญ่ที่ต้องใช้ความเร็วต่อรอบสูง เช่น ใช้เป็นน้ำมันหล่อลื่นในรถแข่ง เครื่องจักรขนาดใหญ่ที่ใช้ในโรงพิมพ์ซึ่งน้ำมันสังเคราะห์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติพิเศษนี้

3. น้ำมันสบู่ดำดีกว่าน้ำมันปาล์มเพราะมีจุดแข็งตัวที่ -7 องศาเซลเซียส ใช้กับรถไถนาเดินตาม เครื่องยนต์ดีเซลได้ผลดี แต่มีความหนืดที่สูงกว่าน้ำมันดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ราคาสบู่ดำไม่ผันผวนมากนัก เนื่องจากไม่ได้ขึ้นอยู่กับตลาดโลกเหมือนปาล์มน้ำมัน ให้ผลผลิตเร็วกว่า 8 เดือน และลงทุนเพียงครั้งเดียวแต่สามารถเก็บผลผลิตนานกว่า 30 ปี ในขณะที่ปาล์มน้ำมันต้องรอผลผลิตประมาณ 2 – 3 ปี

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความหมายและชนิดต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (คำนูณ, 2542)

Street (1977) นิยามคำว่า "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ" ไว้ว่าหมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (explant) ซึ่งมีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งเนื้อเยื่อ แล้วได้เป็นแคลลัสขึ้นมา โดยไม่มีโครงสร้างหรือหน้าที่ที่เกี่ยวข้องร่วมกับเนื้อเยื่อเดิมเลย นอกจากนี้ Street ยังได้ให้คำนิยามอื่น ๆ ของการเพาะเลี้ยงอีก เนื่องจากพืชประกอบด้วยอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งแต่ละอวัยวะก็ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจึงแบ่งออกได้หลายชนิดคือ

1. การเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้น คือ การนำเอาเมล็ดไปเพาะในหลอดทดลองจนเป็นต้นกล้าและพืชสมบูรณ์ต่อไป เช่น การเพาะเมล็ดกล้วยไม้

2. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ คือ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอไม่ว่าแก่หรืออ่อน หลังจากที่แยกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกไปแล้ว

3. การเพาะเลี้ยงอวัยวะ คือ การเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะพืชที่แยกออกมา เช่น ปลายยอด ปลายราก ดอก ผล อับเรณู

4. การเพาะเลี้ยงแคลลัส คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่ จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช

5. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากแคลลัสในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา

6. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

ในปีเดียวกันนี้เอง De Fessard (1977) ได้แบ่งการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (*invitro culture*) ของพืชชั้นสูงออกเป็น 3 แบบ คือ

1. Organized culture ได้แก่ การเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้นหรืออวัยวะ ซึ่งลักษณะของโครงสร้างอวัยวะยังคงดำรงอยู่ นับว่าคล้ายคลึงกับการขยายพันธุ์พืชตามธรรมชาติ เช่น การปักกิ่งชำ หรือติดตาพืช

2. Non – organized culture ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส ซึ่งอาจมีเซลล์เกาะกันอยู่หลวม ๆ หรือเกาะติดกันแน่น ไม่เป็นรูปร่างที่แน่นอน โดยทั่วไปมักจะทำการเลี้ยง เพื่อให้เกิดการเติบโตของแคลลัสในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของออกซินหรือไซโทไคนินสูง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Non – organized culture / Organized culture ได้แก่ การเพาะเลี้ยงที่อยู่กึ่งกลางระหว่างข้อ 1 และ 2 โดยที่เซลล์ในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่แยกออกมานั้นจะเกิดดีดีฟเฟอเรนทิเอท (dedifferentiate) ในตอนแรกแล้วสร้างเป็นเนื้อเยื่อแคลลัสขึ้นมา หลังจากนั้นแคลลัสที่ได้จะมีการเจริญพัฒนาสร้างเป็นอวัยวะ เช่น ราก ลำต้น หรือแม้กระทั่งเกิดเอ็มบริโอขึ้นมาใหม่ การพัฒนาเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์แน่นอนจากแคลลัส หรือ non-organized culture นี้อาจทำโดยใช้เทคนิคพิเศษหรือเกิดเองตามธรรมชาติ

จากความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว อาจให้คำจำกัดความว่า "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นเซลล์ โพรโทพลาสต์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยเกลือแร่ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ในสภาพปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหลาย ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง"

ส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง (นพพร, 2543)

เซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยทั่วไป เป็นชิ้นส่วนจากพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งประกอบด้วยหลายเซลล์เรียกว่า explant วิธีการเพาะเลี้ยงส่วนของ explant และจุดประสงค์ของการเพาะเลี้ยง แบ่งเป็น 5 ประเภท คือ

1. การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ culture) ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงอาจเป็นต้นอ่อน อับละอองเกสรตัวผู้ รังไข่ ตา ราก ดอก หรือส่วนอื่น ๆ เพื่อการศึกษา morphogenesis หรือเพาะเลี้ยงให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญและเนื้อเยื่ออื่น ๆ (meristem and tissue culture) ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงอาจเป็น ปลายยอด ใบ ลำต้น หรือเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ เพื่อเพะเลี้ยงให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์จำนวนมาก

3. การเพาะเลี้ยงแคลลัส (cuillus culture) ส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง คือกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงหน้าที่ ซึ่งได้มาจากการนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น ส่วนของราก ก้าน ใบ ไฮโปคอทิล ใบเลี้ยง หรือเนื้อเยื่อเจริญเพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์จำนวนมาก

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดแก้วโดยใช้อาหารเหลวและวางบนเครื่องเขย่า เพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์จำนวนมากสำหรับเตรียมโปรโตพลาสต์

5. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture) เป็นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เตรียมจากเซลล์เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ เพื่อนำยีนจากพืชที่ผสมกันไม่ได้ด้วยวิธีทางธรรมชาติมารวมกันโดยวิธีที่เรียกว่า protoplast fusion จากนั้นชักนำให้เจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงจะได้รับความสำเร็จเพียงใดขึ้นกับส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วย ในพืชส่วนใหญ่การพัฒนาของเซลล์จะแตกต่างกันไปตามอาหารที่ใช้ แต่โดยทั่วไปหลังการเพาะเลี้ยงประมาณ 4 – 8 สัปดาห์ เซลล์ของ explant จะแบ่งตัวให้เซลล์จำนวนมาก เรียกว่าแคลลัส ซึ่งจะต้องแยกและเปลี่ยนอาหาร ซึ่งเรียกว่า sub-culture การตัดแยกและเปลี่ยนอาหารหลายครั้งถึงแม้จะทำให้แคลลัสมีขนาดใหญ่เร็วขึ้น แต่บางครั้งอาจเป็นการลดโอกาสในการชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์และพันธุกรรมอาจไม่คงที่

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ

วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน ก็เพื่อแก้ปัญหาเมล็ดเป็นหมันหรือพักตัวหรือเอ็มบริโอไม่เจริญต่อไปจนเป็นต้นอ่อน อันเนื่องมาจากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก เช่น การผสมพันธุ์ระหว่างพืชคนละชนิด แต่เนื่องจากเอ็มบริโออ่อนหลังจากการผสมพันธุ์ยังมีขนาดเล็ก ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงจึงแตกต่างจากอาหารที่ใช้กับเอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นแล้ว (อารีย์, 2541)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนได้พัฒนาประมาณปี ค.ศ. 1900 โดยสามารถนำเอาเมล็ด หรือเอ็มบริโอมาเพาะโดยวิธีช่วยชีวิตดูกเฉินในสภาพปลอดเชื้อ จนพัฒนากลายเป็นต้นเล็กได้ (www.stbw.nl/Embryo-Rescue%20Techniques.pdf, 2550)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจะเป็นการแยกเอาเอ็มบริโออ่อนหรือเอ็มบริโอแก่มาเลี้ยงในหลอดทดลองอย่างปลอดเชื้อ ในปี ค.ศ. 1904 Hanning เป็นคนแรกที่เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ของพืชในตระกูล Cruciferae คือ *Cochlearia* และ *Raphanus* ได้สำเร็จ (คำนูณ, 2542) แต่ไม่ค่อยประสบผลดีนัก อาจเนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงยังไม่เหมาะสม (อารีย์, 2541)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1924 Dietrich ได้ทดลองใช้อาหารกึ่งแข็ง (semi – solid medium) ที่มีธาตุอาหารและน้ำตาลซูโครส 2.5 – 5 % เพื่อเลี้ยงเอ็มบริโอของพืชชนิดต่าง ๆ พบว่ามีการงอกเกิดขึ้นได้ทั้งในเอ็มบริโออ่อนและแก่ ส่วน Laibach ในปี ค.ศ. 1925 Tukey ในปี ค.ศ. 1933 ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเอ็มบริโอของต้นลิลลี่ และ Stone fruit ที่ปกติในธรรมชาติจะฝ่อตาย ให้เจริญเป็นต้นพืชปกติในหลอดทดลองได้

จากการค้นพบของ Van Overbeek ในปี ค.ศ. 1941 ว่าน้ำมะพร้าวช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอต้นลำโพง ทำให้คนหันมาสนใจทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอกันมากขึ้น โดยเฉพาะพวกนักปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อช่วยย่นระยะเวลาการผสมพันธุ์ให้สั้นเข้าและเร่งการงอกให้มากขึ้น (คำนูณ, 2542)

เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักของการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของพืชก็เพื่อ การช่วยเหลือไม่ให้เกิดการแท้ง (abortion) เมื่อผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดกัน ดังนั้นเพื่อเป็นประโยชน์ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปรับปรุงพันธุ์พืชจึงมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยเหลือเอ็มบริโออ่อน (embryo rescue) (อารีย์, 2541)

โดยปกติเอ็มบริโอได้รับอาหารและการป้องกันอันตรายจากเอนโดสเปิร์มและนูเซลัส (nucellus) ดังนั้นจึงมีผู้พยายามศึกษาถึงสารต่าง ๆ ที่ได้จากเอนโดสเปิร์มและนูเซลัส เช่น Steward (1952) ใส่น้ำมะพร้าวซึ่งเป็นเอนโดสเปิร์มเหลวลงในอาหาร พบวาสามารถเลี้ยงเอ็มบริโอได้ดี นอกจากนี้น้ำมะพร้าวยังทำให้เซลล์ร่างกายสร้างเอ็มบริออยด์ขึ้นมาได้ (คำนูณ, 2542)

ในหลักการแล้วสามารถแบ่งการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอออกได้เป็น 2 แบบคือ

1. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนซึ่งได้มาจากเมล็ดที่ยังไม่แก่ เพื่อป้องกันการฝ่อตายไปของเอ็มบริโอ การเพาะเลี้ยงวิธีนี้ค่อนข้างยาก เพราะไม่เพียงการตัดแยกเอาเอ็มบริโอออกมาจะทำได้ลำบากแล้ว อาหารที่ใช้เลี้ยงก็ค่อนข้างซับซ้อน โอกาสที่เอ็มบริโอจะรอดได้นั้น ขึ้นกับระยะการเจริญของเอ็มบริโอในขณะที่แยกมาเลี้ยง

2. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ซึ่งได้จากเมล็ดที่แก่เต็มที่แล้ว วิธีนี้ค่อนข้างง่ายเพราะมักเป็นการแยกเลี้ยงเพื่อกำจัดตัวยับยั้งการงอกของเอ็มบริโอออกไป อาหารที่ใช้เลี้ยงก็เป็นแบบง่าย ๆ

วิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอทำได้ไม่ยากนัก โดยการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ผิวภายนอกตัดเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก แล้วแซะเอาเอ็มบริโอออกมา ถ้าเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ไม่ต้องใช้กล้องสเตอริโอช่วย แต่ถ้าเอ็มบริโอมีขนาดเล็กก็จำเป็นต้องใช้กล้อง ขณะตัดเอาเปลือกหุ้มออกต้องระวังไม่ให้เอ็มบริโอเกิดบาดแผล

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (คำนูณ, 2542)

1. จีโนไทป์ เอ็มบริโอของพืชบางอย่างเจริญง่าย บางอย่างเจริญยาก

2. ระยะการเจริญของเอ็มบริโอขณะแยกมาเลี้ยง โดยทั่วไปเอ็มบริโอที่มีขนาดเล็กมากและยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพมักเลี้ยงยาก แต่ถ้าเอ็มบริโอนั้นมีการพัฒนาการมากเท่าไรในสิ่งมีชีวิตเมื่อนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองก็จะประสบความสำเร็จมากเท่านั้น

อาจใช้เทคนิคพิเศษมาช่วยถ้าเอ็มบริโอมีขนาดเล็กมาก ๆ เช่น ใช้ชิ้นส่วนของเอนโดสเปิร์มหรือลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงพร้อมกับเอ็มบริโอ โดยวางให้ใกล้ชิดกัน

3. สภาวะการเจริญเติบโตของต้นแม่ ถ้าต้นแม่ได้รับการปลูกอย่างดี เช่น ในเรือนต้นไม้จะทำให้เอนโดสเปิร์มมีการเจริญที่ดี ซึ่งจะมีผลทำให้เอ็มบริโอเจริญดีตามไปด้วย

4. องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง เอ็มบริโออ่อนจะมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อนกว่าเอ็มบริโอแก่ แต่เอ็มบริโอทั้งสองแบบก็ยังต้องการแมคโครนิวเทรียนต์และน้ำตาลเช่นเดียวกัน เอ็มบริโอแก่เจริญดีในอาการที่มีน้ำตาล 2 – 3 % ในขณะที่เอ็มบริโออ่อนต้องใช้น้ำตาล 8 – 12 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซินและไซโทไคนินไม่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ เพราะสารพวกนี้จะชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสมากกว่า กรดจิบแบอเรลลิกบางครั้งมีผลในการส่งเสริมทางด้านลดการพักตัวของเอ็มบริโอ อาจต้องใช้วิตามินในบางครั้ง ส่วนน้ำมะพร้าว เคซีอีนไฮโดรไลเซต และมอลท์สกัดเหมาะที่จะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน เนื่องจากเชื่อว่ากรดอะมิโนบางตัวในส่วนผสมเหล่านี้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ เช่น กลูตามีน (glutamine) สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน

5. ออกซิเจน จัดว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญ ความต้องการออกซิเจนของการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบางครั้งสูงกว่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่มีอยู่ในอากาศ

6. แสง บางครั้งเอ็มบริโอที่แยกออกมาเลี้ยงต้องเพาะเลี้ยงในที่มืด 7 - 14 วันก่อนจะนำไปเลี้ยงในที่มี แสง

7. อุณหภูมิที่เหมาะสม ขึ้นกับชนิดของพืช โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิประมาณ 22 - 28 องศาเซลเซียส แต่พืชบางชนิด เช่น ต้นลิลลี่ต้องการ 17 องศาเซลเซียส ในบางครั้งการเก็บเอ็มบริโอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนเพาะเลี้ยง อาจช่วยทำลายการพักตัวได้

ประโยชน์ที่ได้รับจากการเลี้ยงเอ็มบริโอ

1. กำจัดตัวยับยั้งต่อการงอกของเมล็ดพืชหลายชนิด เช่น ต้นกล้วย ต้นสน ที่เมล็ดไม่มีทางงอกในสภาพธรรมชาติได้เลยเนื่องจากมีตัวยับยั้ง ซึ่งกรณีนี้การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจะมีประโยชน์มาก

2. ย่นระยะเวลาของการผสมพันธุ์ พืชหลายชนิดที่มีการพักตัวของเมล็ดนั้นเนื่องจากมีตัวยับยั้ง ซึ่งอาจอยู่ที่เปลือกหุ้มเมล็ดหรือเอนโดสเปิร์ม เพราะฉะนั้นการเอาเอ็มบริโอมาเลี้ยงทำให้ไม่ต้องห่วงเรื่องการพักตัว ทำให้สามารถนำไปใช้ในการผสมพันธุ์ได้เร็วขึ้น

3. การสร้างแฮพลอยด์ เมื่อนำข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) เป็นต้นตัวเมีย ผสมกับข้าวบาร์เลย์พันธุ์พื้นเมือง (*H. bulbosum*) โดยใช้เป็นตัวผู้ หลังจากเกิดการปฏิสนธิขึ้นพบว่าโครโมโซมของ *H. bulbosum* ถูกกำจัดออกไป ทำให้ไซโกตที่ได้กลายเป็นแฮพลอยด์ เอ็มบริโอของ *H. vulgare* ซึ่งเป็นแฮพลอยด์ เอ็มบริโอที่ได้นี้ไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากไม่มีเอนโดสเปิร์ม ฉะนั้นถ้าใช้วิธีเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจะเป็นการช่วยแฮพลอยด์ของ *H. vulgare* ให้รอดชีวิต ซึ่งต้นที่ได้นี้มีประโยชน์มากทางด้านการผสมพันธุ์ เพราะเมื่อทำการเพิ่มจำนวนโครโมโซมจะได้พืชที่เป็นโฮโมไซกัสหรือพันธุ์แท้ขึ้นมา เทคนิคนี้ยังใช้ได้กับกะหล่ำและลิลลี่

4. ป้องกันปัญหาการเข้ากันไม่ได้ ในกรณีการผสมกันระหว่างสกุล (intergeneric cross) หรือระหว่างชนิด (interspecific cross) หรือการผสมกันระหว่างดิพลอยด์ (diploid) กับเทตตราพลอยด์ (tetraploid) เอนโดสเปิร์มมักเจริญได้ไม่ดีหรือไม่มีการเจริญเกิดขึ้นเลย เนื่องจากเกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้ากันไม่ได้ เป็นสาเหตุให้เกิดการฝ่อตายไปของเอ็มบริโอ สามารถใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในการแก้ปัญหานี้ได้

5. การขยายพันธุ์พืชในตระกูลหญ้าและสน นิยมใช้เอ็มบริโอในการขยายพันธุ์ เพราะเอ็มบริโอที่เอามานั้นอยู่ในช่วงอ่อนวัย เมื่อเพาะเลี้ยงได้แคลลัสง่ายและจะมีการเจริญได้ดีอันจะช่วยให้การขยายพันธุ์ต่อไป

6. นอกจากพืชที่กล่าวมาแล้ว นิยมเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอกล้วยไม้เช่นกัน Knudson (1922) แนะนำให้ใช้เทคนิคนี้กับเอ็มบริโอกล้วยไม้ เนื่องจากเอนโดสเปิร์มภายในเมล็ดไม่เพียงพอที่จะเลี้ยงจนกลายเก็บต้นได้ เมื่อใช้วิธีนี้ทำให้ได้กล้วยไม้จำนวนมากอย่างรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในกล้วยไม้อาจเรียกอีกชื่อว่า green pod culture

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (คำนูณ, 2542)

การนำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงในหลอดทดลองนาน ๆ อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในวิถีของเมแทบอลิซึม ดังนั้นความต้องการอาหารของพืชที่นำมาเลี้ยง อาจเนื่องมาจาก 2 สาเหตุ คือ ความไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเอง หรือเป็นความต้องการที่เกิดใหม่เนื่องจากเมแทบอลิซึมเปลี่ยนไป เซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชเจริญได้ดีในหลอดทดลองก็ต่อเมื่อได้อาหารที่เหมาะสมกับความต้องการ อาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดมีองค์ประกอบต่างกัน ต้องคำนึงถึงสภาพที่เปลี่ยนไปของพืช ชิ้นส่วนพืชเหล่านี้ก็เหมือนกับพืชปกติในธรรมชาติทั่วไปคือ ต้องการแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น N, P, Ca, Fe, Mg, Mn, Zn, Cu, B, Mo, S และ K ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงในรูปของเกลืออินทรีย์นอกจากนี้ชิ้นส่วนพืชต้องการออกซิเจนและไฮโดรเจนในรูปของน้ำ ตลอดจนออกซิเจนในรูปของแก๊ส ต้องการสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในรูปของวิตามินและกรดอะมิโน โดยเฉพาะฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน ไซโทไคนิน และจิบเบอเรลลินส์ ในความเข้มข้นและสัดส่วนต่าง ๆ กัน เมื่อมีสารเหล่านี้ครบถ้วน ชิ้นส่วนพืชสามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นการดำรงชีวิตของชิ้นส่วนพืชแบบนี้ จัดว่าเป็นแบบที่สร้างอาหารเองไม่ได้ (heterotropic organism)

อาหารเพาะเลี้ยงที่นำมาใช้มีหลายรูปแบบ เช่น อาหารเหลว ในสภาพเช่นนี้ชิ้นส่วนพืชจมหรือมีบางส่วนลอยในอาหารเหลว แต่ถ้าเป็นอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง (semi-solid media) ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงอาจใช้วิธีวางบนหรือฝังบางส่วนในอาหาร โดยทั้งอาหารเพาะเลี้ยงและชิ้นส่วนพืชต้องบรรจุในภาชนะแก้ว เช่น ไวแอล หรือฟลาสก์ เป็นต้น

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนพืชชั้นสูงเหมาะต่อการเจริญของอินทรีย์ รา สาหร่าย และแบคทีเรียเป็นอย่างดี จุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเร็วกว่าชิ้นส่วนพืช ทำให้เกิดการแย่งอาหารกัน บางครั้งการเจริญของจุลินทรีย์ยับยั้งการเจริญของชิ้นส่วนพืชได้ โดยการปล่อยสารพิษออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะจึงต้องกำจัดจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นอาหารเพาะเลี้ยง เครื่องมือ เครื่องแก้ว และชิ้นส่วนพืชเอง ต้องทำให้สะอาดปราศจากจุลินทรีย์

องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง (คำนูณ, 2542)

น้ำ น้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารตลอดจนในกระบวนการอื่น ๆ ควรใช้น้ำกลั่น (distilled water) เครื่องกลั่นน้ำควรมีสองเครื่องติดกัน เครื่องหนึ่งกลั่น single distilled water อีกเครื่องกลั่น double distilled water น้ำที่นำมากลั่นควรเป็นน้ำที่ดึงอิออนออกแล้ว (ion-exchanged purifield water) แต่ถ้าไม่มีน้ำกลั่นก็ใช้น้ำดื่มแทนได้

สารอนินทรีย์ ธาตุอาหารอนินทรีย์และเกลือแร่ต่าง ๆ มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก แบ่งประเภทธาตุอาหารอนินทรีย์ตามความต้องการของพืชได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) เป็นแร่ธาตุที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ N, P, K, Ca, Mg และ S โดย
   - ไนโตรเจน (N) มักใส่ในรูปไนเตรต หรือแอมโมเนีย
   - ฟอสฟอรัส (P) มักใส่ในรูปของฟอสเฟส
   - ซัลเฟอร์ (S) มักใส่ในรูปของซัลเฟต
   - โพแทสเซียม (K) มักใส่ในรูปแคทไอออน เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์ หรือโพแทสเซียมไนเตรต
2. ธาตุอาหารรอง (micronutrients) เป็นแร่ธาตุที่พืชต้องการในปริมาณน้อยได้แก่ Fe, Zn, B, Mn, Cu, Co, Ni, Al, Mo และ I เนื่องจากพืชต้องการน้อย ดังนั้นการเตรียมสารเหล่านี้ควรเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ส่วนเหล็กมักเตรียมแยกต่างหากในรูปของคีเลท (cheleted form) สารอนินทรีย์เหล่านี้ต้องมีความบริสุทธิ์มาก หากมีสิ่งเจือปนจะทำให้การอ่านผลการทดลองคลาดเคลื่อนหรืออาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการติดเชื้อได้ง่าย

สูตรอาหารต่าง ๆ มักตั้งตามชื่อผู้คิดค้นขึ้นมา เช่น สูตร Murashige และ Skoog (MS), White (WH), Vacin และ Went (VW), Knudson (K) เป็นต้น แต่ละสูตรอาหารมีความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไม่เท่ากัน

สารอินทรีย์

1. คาร์บอน แหล่งที่ให้คาร์บอนที่สำคัญน้ำตาลซูโครส
2. กรดอะมิโน
3. วิตามิน เป็นตัวเร่งการทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโต

1. ออกซิน

เป็นชื่อเรียกกลุ่มสารที่กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ทั้งในส่วนต้นและส่วนราก แหล่งสังเคราะห์ออกซิน ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ใบอ่อน ดอก ผล ปลายราก และปลายโคลิออฟไทล์ (coleoptile) การลำเลียงออกซินเกิดขึ้นในโฟลเอ็ม (phloem) และเป็นแบบตามขั้ว (polarity) คือจากบนลงล่าง (basipetal) ในยอดและลำต้น และจากล่างขึ้นบน (acropetal) ในราก การเคลื่อนที่ของออกซินต้องอาศัยพลังงาน ออกซินถูกทำลายโดยแสง (photo oxidation) หรืออาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ได้ ตัวอย่างออกซิน เช่น IAA, IBA, NAA และ 2,4-D

IAA เป็นออกซินที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ถูกทำลายโดยแสงและเอนไซม์

NAA เป็นออกซินที่สังเคราะห์ขึ้นมาจึงไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์

2,4-D เป็นออกซินที่มีฤทธิ์ค่อนข้างแรงกว่า IAA และ NAA

สรุปหน้าที่ของออกซินได้ดังนี้

1. ช่วยในการยืดตัวของเซลล์
2. ส่งเสริมหรือชักนำการแบ่งเซลล์
3. ช่วยในเรื่องการเปลี่ยนสภาพของเซลล์
4. เพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงโดยเพิ่มการสังเคราะห์ mRNA ในนิวเคลียส
5. ออกซินบริเวณปลายยอดควบคุมการแตกออกของตาข้าง (lateral bud)

2. ไซโทไคนิน

เมื่อปี ค.ศ. 1940 มีผู้ค้นพบสารพวกไซโทไคนินซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ ในขณะนั้นมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าพืชจะเติบโตระยะแรกในสูตรอาหารที่มีออกซินอยู่ด้วยเป็นระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น จากนั้นพืชจะหยุดการเจริญเติบโต แต่ถ้าใส่น้ำมะพร้าว หรือสารละลายที่สกัดจากยีสต์เพิ่มลงไปในสูตรอาหารที่มีออกซินอยู่ด้วย พืชจะเติบโตต่อไปและมีรากเกิดขึ้นได้ จึงสันนิษฐานว่าในน้ำมะพร้าวหรือสารละลายที่สกัดจากยีสต์มีสารที่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้

ปี ค.ศ. 1975 Miller พบไคนินที่มีสูตรเป็น 6 – furfuryl amino purine ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และที่มีชื่อไคเนทินก็เพราะว่าสารชนิดนี้ช่วยในกระบวนการแบ่งไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่เรียกว่า ไซโทไคเนซิส (cytokinesis)

หลังจากนั้นมีผู้ค้นพบสารที่มีพิวรีนอยู่ในโครงสร้าง และมีคุณสมบัติคล้ายกับไคเนทินอีกหลายตัว จึงได้รวมเรียกสารเหล่านี้ว่า ไซโทไคนิน อาจใช้ไซโทไคนินแทนแสงหรือเกิดปฏิกิริยาร่วมกับแสงในการควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ในพืช เช่น การสังเคราะห์รงควัตถุ พัฒนาการของคลอโรพลาสต์ และอาจใช้แทนแสงสีแดงในการงอกของเมล็ดได้ ตัวอย่างของสารมนกลุ่มนี้ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคเนทิน – เบนซิลอะมิโนพิวรีน (benzylaminopurine) หรือ BAP ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ ซีเอทิน และน้ำมะพร้าว

สรุปหน้าที่ของไซโทไคนิน

1. เร่งการแบ่งเซลล์
2. ช่วยในกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์
3. ช่วยชะลอการแก่ในใบ
4. ช่วยกานขยายตัวของเซลล์
5. ชักนำการสังเคราะห์รงควัตถุ

3. จิบเบอเรลลินส์

ไม่นิยมใช้สารกลุ่มนี้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่อาจใช้บ้าง เช่น กรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งสลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน โดยทั่วไปจิบเบอเรลลินส์จะชักนำให้เกิดการยืดตัวของลำต้น การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญหรือตา ช่วยทำลายการพักตัวของเมล็ด ทำให้เมล็ดหรือเอ็มบริโอที่แยกออกมางอกได้ นอกจากนี้จิบเบอเรลลิกมักยับยั้งการเกิดรากและยอด อีกทั้งช่วยกระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิด และช่วยชะลอการแก่ของผลไม้บางชนิด

4. กรดแอบซิซิก

สารประเภทนี้ส่วนใหญ่สังเคราะห์เองตามธรรมชาติสำหรับควบคุมกระบวนการทางสรีระ-วิทยาต่าง ๆ ไม่ให้เกิดขึ้นเร็วเกินไป หรือไม่เกิดในช่วงเวลาที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

5. เอทิลีน

เอทิลีนเป็นแก๊สที่เกิดจากการเผาไหม้ของถ่านหิน น้ำมัน และสารพวกไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ พืชสามารถสร้างได้เองจากกระบวนการเมทาบอลิซึมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการสุกของผลไม้ พืชตอบสนองต่อเอทิลีนได้หลายทาง เช่น เร่งการสุกของผลไม้ กระตุ้นการเกิดราก ฝอย และรากแขนง กระตุ้นการงอกของเมล็ด กระตุ้นให้ใบและผลร่วงจากต้น กระตุ้นการออกดอกสามารถทำให้สีของดอกไม้จางลง เป็นต้น

สารอินทรีย์เชิงซ้อนธรรมชาติ

1. เคซิอินไฮโดรไลเซต หรือกรดซามิโน มักใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์
2. สารประกอบที่ได้มาจากพืช ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำมะเขือเทศ น้ำองุ่น น้ำสับปะรด
3. เปปโทน ยีสต์สกัด และมอลต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารอื่น ๆ

1. วุ้น (agar)

เป็นสารที่ได้จากสาหร่ายน้ำเค็มอยู่ในรูปผง ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงแข็งตัว จัดว่าเป็นสารที่ราคาแพงในองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเอาวุ้นมาละลายน้ำจะเกิดเป็นเจล ซึ่งสามารถไปจับตัวกับน้ำ ดังนั้นถ้าใส่วุ้นมาก ชิ้นส่วนพืชจะดูดน้ำและสารอาหารได้ยาก

2. พีเอช (pH)

โดยทั่วไปมักใช้ pH ในช่วง 5.0 – 6.5 ถ้าต่ำกว่า 4.5 หรือสูงกว่า 7.0 เซลล์หรือเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต การที่ pH ต่ำเกินไปอาจเกิดสิ่งต่อไปนี้ คือ

IAA และกรดจิบเบอเรลลิกมีความคงตัวต่ำ

วุ้นไม่แข็งตัว

เกลือบางอย่าง เช่น ฟอสเฟต เหล็ก แคลเซียม

วิตามินบี 1 และกรดแพนโททินิกไม่เสถียร

การนำเข้าของแอมโมเนียออนในเซลล์เกิดได้ช้า

การปรับ pH อาหารควรใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) กับกรดไฮโดรริก (HCl) โดยใช้ความเข้มในช่วง 0.1 – 1.0 โมลาร์

3. ผงถ่าน (activited charcoal) (อัมพา และคณะ, 2546)

ผงถ่าน ใช้ประมาณ 0.2 – 3 % ผสมลงในอาหารสามารถดูดเอาแก๊สหรือสารเคมีที่มีสีน้ำตาล / ดำ (phenolic compound หรือ แทนนิน) ที่พืชปล่อยออกมา และจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช แต่ผงถ่านที่ผสมในอาหาร ควรใช้ปริมาณที่เหมาะสมเพราะจะมีผลกระทบต่อชิ้นส่วนพืช

ผลดีและผลเสียของผงถ่านมีดังนี้

1. ช่วยดูดซับพิษของรงควัตถุสีดำและสีน้ำตาลซึ่งส่วนมาก คือสารประกอบฟีนอลและเมลานิน นอกจากนี้ยังดูดสารพิษที่ไม่มีสีอีกด้วย

2. ช่วยดูดซับสารอินทรีย์บางชนิด เช่น สาร ABA (abscissic acid) ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชในขวดเนื้อเยื่อ

3. ทำให้เกิดสภาพดำมืดของอาหาร ส่งผลให้เกิดรากได้ดี

4. สามารถกระตุ้นการเกิดเอ็มบริโอเจนเนซิสในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นยาสูบ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเติบโต และออร์แกโนเจนเนซิสของพืชไม้เนื้อแข็ง

5. ช่วยคงเสถียรภาพของพีเอช

6. อาจเป็นไปได้ว่าผงถ่านปล่อยสารที่ส่งเสริมการเติบโต แต่ยังไม่มีผู้พิสูจน์อย่างจริงจัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ถ้าผสมผงถ่านมากเกินไปจะดูดซับฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตได้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษฎ์, 2541)

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละสูตร ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติและข้อจำกัดแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องจัดแบ่งสารเหล่านี้ออกเป็นกลุ่ม ด้วยเหตุผลสำคัญคือ

1. สารเคมีบางชนิดใช้ในปริมาณที่น้อยมาก เช่น $CoCl_2$, $CuSo_4$, thiamine-HCl และ H_3BO_3 เป็นต้น ทำให้ต้องใช้เครื่องชั่งที่มีความละเอียดมาก ๆ และอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ง่าย ดังนั้นในทางปฏิบัติจะใช้วิธีเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าที่ใช้จริงหลาย ๆ เท่า (ประมาณ 50 – 1,000 เท่า) ซึ่งทำให้เตรียมได้ง่ายขึ้น และเรียกสารละลายที่เตรียมได้นี้ว่า stock solutions

2. สารเคมีบางชนิด อาจทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ต้องการและ/หรือเป็นพิษ ดังนั้น ในแต่ละกลุ่มของสารละลายเข้มข้น (stock solution) จึงต้องเป็นสารที่อยู่ร่วมกันได้

3. สารเคมีบางชนิด หากอยู่ร่วมกับสารอื่น ๆ จะไม่ละลาย ละลายได้เล็กน้อย หรือละลายได้ไม่หมด จึงจำเป็นต้องแยกกลุ่มออกต่างหาก

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

1. ดูดสารละลายจาก stock solution ต่าง ๆ มารวมกัน

2. เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส แต่อาจดัดแปลงใช้ กลูโคส หรือฟรุสโตส แล้วแต่สูตรอาหารที่ใช้

3. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่น ๆ ตามความต้องการของสูตรอาหาร

4. ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร ให้ได้ครบตามที่ต้องการเตรียม

5. ปรับค่าความเป็นกรดและด่าง ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ให้ได้ประมาณ 5.5 – 5.8

6. เติมวุ้น ในกรณีที่เตรียมอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง

7. เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาลวดความร้อน (hot plate) เตาแก๊ส หรือเตาไมโครเวฟ

8. เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง เช่น ขวด หลอดทดสอบ และจาน Petri – dish เป็นต้น

9. นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 15 lsi (ปอนด์/ตารางนิ้ว) นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเตรียมอาหารควรใช้ช้อนตักสารแยกกันสำหรับสารแต่ละชนิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างสาร สารที่เหลือใช้ไม่ควรใส่กลับเข้าไปในขวดอีก ควรเตรียมอาหารในรูปของสารละลายเข้มข้น โดยเตรียมให้เข้มข้นกว่าเดิม 10 เท่า หรือ 100 เท่า ขวดที่ใส่สารละลายเข้มข้นควรเก็บในที่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และควรเก็บในที่มืดเพราะถ้าถูกแสงอาจมีสาหร่ายสีเขียวเจริญขึ้นได้

102746

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) (คำนูณ, 2542)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น		ปริมาณที่ใช้
	อาหาร (มก./ล)	สารละลายเข้มข้น	(มล./ล)
แมคโครนิวเทรียนด์		กรัม/1000(10x)	100
NH_4NO_3	1,650	16.5	
KNO_3	1,900	19.0	
$CaCl_2.2H_2O$	440	4.4	
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.7	
KH_2PO_4	170	1.7	
ไมโครนิวเทรียนด์		กรัม/100(100x)	1
$MNSO_4.4H_2O$	22.3	2,230	
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6	860	
H_3BO_3	6.2	620	
KI	0.83	83	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25	
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5	
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5	
วิตามิน		กรัม/100(10x)	1
Glycine	2.	0.20	
Thiamine HCl	0.1	0.01	
Nicotinic acid	0.5	0.05	
Pyridoxine HCl	0.1	0.01	
เหล็ก		กรัม/1000(100x)	10
Na_2EDTA	37.25	3.73	
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	2.78	
ซูโครส	30,000		
พีเอช 5.7 – 5.8			

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช (คำนูณ, 2542)

โดยหลักเกณฑ์แล้วการติดเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เกิดขึ้นได้จาก 4 แหล่งคือ จากพืช (ทั้งภายในและภายนอก) จากอาหาร (ฆ่าเชื้อไม่หมด) จากอากาศ และจากผู้ปฏิบัติการเอง

สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือจากพืชเอง เช่น มันฝรั่งหรือพืชที่มีลำต้นใต้ดิน ดังนั้นก่อนที่การฆ่าเชื้อควรเอาส่วนอื่น ๆ เช่น ดินทรายหรือส่วนที่ตายแล้วออกให้หมด แล้วล้างด้วยน้ำ จากนั้นปอกเปลือกออก แล้วจึงเริ่มขั้นตอนการฆ่าเชื้อ โดยเริ่มจุ่งลงในเอทานอล 70% หลาย ๆ วินาที ไม่ควรใช้เอทานอล 95% เพราะทำให้ชิ่นส่วนพืชสูญเสียน้ำมากเกินไป

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ

(http://my.dek-d.com/Writer/Story/viewlongc.php?id=223518&chapter=8, 2551)

1. เลือกชิ้นส่วนพืชที่อยู่ในช่วงเจริญเติบโต เช่น ยอดอ่อน เมล็ด ตาข้าง ปลายราก แล้วแต่ชนิดของพืชนั้น
2. นำชิ้นส่วนนั้นมาตัดเป็นท่อนให้ส่วนข้อที่จะออกรากควรอยู่ตรงกลาง หรือถ้าเป็นเมล็ดควรทำความสะอาดแต่ถ้าเมล็ดนั้นแข็งควรนำไปแช่น้ำอุ่นสัก 1 คืน
3. เตรียมน้ำปริมาณขวดละ 90 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
4. เมื่อได้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตวง Chlorox ปริมาณ 10 - 15 ml หยด Tween ประมาณ 2-3 หยด
5. นำชิ้นส่วนที่ล้างสะอาดแล้ว ใส่ลงไปในขวด แล้วเขย่าประมาณ 15 นาที
6. หลังจากเขย่าครบ 10 - 15 นาทีแล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แต่ควรทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ
7. หลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นส่วนลงปลูกในขวดอาหารที่เตรียมไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อจากส่วนต่าง ๆ ของพืช
(ดัดแปลงจาก คำนูณ, 2542)

เนื้อเยื่อ	ขั้นตอน ก่อนการฟอก	ช่วงการฟอก	หลังการฟอก
เมล็ด	จุ่มในเอทานอล 70% นาน 10 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด	แช่เมล็ดใน 10 % แคลเซียไฮเพอร์คลอไรด์นาน 20 – 30 นาที	ล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาดแล้ววางในจานเพาะเลี้ยงที่มีกระดาษกรองรองอยู่
ผล	ล้างด้วยเอทานอล 70%	แช่ใน 2% (w/v) โซเดียมไฮเพอร์คลอไรด์นาน 10 นาที	ล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด 3 ครั้ง
ชิ้นส่วนของลำต้น	ถูล้างด้วยน้ำประปาตามด้วยเอทานอล 70%	แช่ใน 2% (w/v) โซเดียมไฮเพอร์คลอไรด์นาน 15 – 30 นาที	ล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด 3 ครั้ง
อวัยวะเก็บสะสม	ถูล้างด้วยน้ำประปา	แช่ในไฮเพอร์คลอไรด์ 2% (w/v) นาน 20 – 30 นาที	ล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่สะอาด
ใบ	ใช้เอทานอล 70% เช็ดถูผิวใบ	แช่ใบใน 0.1 % (w/v) เมอคิวริกคลอไรด์ประมาณ 1 นาที	ล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาดซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่สะอาด

การแยก การอินนอคคูเลต และการสับคัลเจอร์

หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อและล้างด้วยน้ำกลั่นแล้ว ให้ใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อจับชิ้นส่วนพืชวางบนจานเพาะเลี้ยง อาจมีหรือไม่มีกระดาษกรองรองรับอีกที่ก็ได้ จากนั้นให้ตัดส่วนที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกออก โดยใช้มีดผ่าตัดที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว

โดยทั่วไปขนาดและรูปร่างของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้เกิดการเติบโตหรือพองฟูนั้น นิยมตัดให้เป็นชิ้นใหญ่พอสมควร เนื่องจากเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นและเพิ่มโอกาสการเลี้ยงให้อยู่รอด ควรตัดเนื้อเยื่อด้วยขนาดหรือปริมาตรที่สม่ำเสมอ โดยใช้กระดาษกราฟหรือคอร์กบอเรอ (cork borer) เป็นตัวช่วยกะขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการอินนอคคูเลตนับว่ามีความสำคัญกล่าวคือ ถ้าเป็นการเลี้ยงเมล็ดหรือส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ควรวางชิ้นส่วนบนอาหารไม่ใช่ในอาหาร เพราะทำให้เซลล์ได้รับออกซิเจนดีขึ้น ถ้าเป็นเนื้อเยื่อพิทหรือส่วนของกิ่ง อาจวางกดในอาหารครึ่งหนึ่งและควรวางตามขั้ว ซึ่งสำคัญต่อการรีเจนเนอเรตของอวัยวะ เพราะยอดมักเกิดทางด้านบน ส่วนรากมักเกิดบริเวณด้านล่างของชิ้นส่วนพืช ดังนั้นการวางตามขั้วทำให้เกิดกิ่งและรากดียิ่งขึ้น

การอินนอคคูเลตชิ้นส่วนพืชทำได้ทั้งในอาหารแข็งซึ่งมีการใส่วุ้น เจลาติน หรือซิลิกาเจล เพื่อช่วยให้แข็งหรือในอาหารเหลวที่มีทั้งแบบเขย่าตลอดเวลาและแบบไม่เขย่า ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงเมื่อเจริญไปได้ระยะหนึ่งจำเป็นต้องมีการย้ายลงสู่อาหารใหม่เป็นระยะ วิธีการนี้เรียกว่า "การสับคัลเจอร์" การสับคัลเจอร์มีความสำคัญด้วยเหตุผลต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. อาหารหมด
2. อาหารอาจแห้งด้วยน้ำระเหยไป ทำให้เกลือแร่ และน้ำตาลมีความเข้มข้นสูงขึ้น
3. มีการเจริญของพืชที่เลี้ยงเต็มหลอดทดลอง หรือฟลาสก์
4. เกิดการปล่อยสารพิษจากพืชลงสู่อาหาร
5. อาหารอาจเหลวขึ้นเนื่องจากพีเอชต่ำลง ซึ่งสาเหตุมาจากชิ้นส่วนพืชที่ใช้
6. ให้ชิ้นส่วนมีการเจริญเติบโตในอาหารที่เตรียมขึ้นซึ่งองค์ประกอบที่แน่ชัด

วิธีการสับคัลเจอร์

1. ฆ่าเชื้อภายนอกหลอดทดลองหรือฟลาสก์ โดยการเช็ดด้วยเอทานอล 70 %
2. ถอดกระดาษตะกั่ว ฟิล์ม หรือจุกสำลีที่หุ้มปากภาชนะออกภายในตู้ปลอดเชื้อ
3. นำชิ้นส่วนพืชหรือก้อนแคลลัสออกมาวางบนจานเพาะเลี้ยงที่อบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
4. ตัดแคลลัสหรือชิ้นส่วนพืชออกเป็นชิ้น ๆ แล้วอินนอคคูเลตเข้าไปในอาหารใหม่ โดยเลือกแต่ชิ้นส่วนที่แข็งแรง ถ้าเห็นเป็นจุดสีดำหรือสีน้ำตาล ไม่ควรนำมาเพาะเลี้ยง

การสับคัลเจอร์ควรทำสม่ำเสมอโดยทำเป็นช่วง ๆ เช่น ทุก 4 – 6 สัปดาห์ ภายหลังการสับคัลเจอร์พบว่าแต่ละชิ้นของแคลลัสเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นใหม่ บางครั้งอาจพบว่าการเจริญของแคลลัสลดลงในระยะแรกลงจากย้ายชิ้นส่วนเดิมออกไป เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารไม่สมดุลกับสารที่ช่วยในการเจริญที่ได้จากชิ้นส่วนเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์

    1.1 เมล็ดสบู่ดำอายุ 15 วันหลังจากผสมเกสร

    1.2 เมล็ดสบู่ดำอายุ 20 วันหลังจากผสมเกสร

    1.3 เมล็ดสบู่ดำอายุ 30 วันหลังจากผสมเกสร

    1.4 เมล็ดสบู่ดำอายุ 45 วันหลังจากผสมเกสร

    1.5 เมล็ดสบู่ดำอายุ 50 วันหลังจากผสมเกสร

    1.6 เมล็ดสบู่ดำอายุ 60 วันหลังจากผสมเกสร

2. สารเคมี

    2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

    2.2 สารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่

    - แอลกอฮอล์ 70 % และ 95 % (alcohol)
    - คลอรอกซ์ (clorox)
    - สารจับใบ (teepol)

    2.4 น้ำตาล ได้แก่ sucrose

    2.5 ผงวุ้น

    2.6 น้ำกลั่น

3. เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหาร ได้แก่

    3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (analytical balance)

    3.2 เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

    3.3 บีกเกอร์ (beaker)

    3.4 ขวดแก้วพร้อมฝาปิด (bottle)

    3.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

    3.6 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)

4. เครื่องมือและสารที่ใช้ในการตัดแยกชิ้นส่วน ได้แก่

    4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)

    4.2 มีดผ่าตัด (knives and scalpels)

    4.3 ปากคีบ (forceps)

    4.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (tunnel)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ขวดอาหารที่เตรียมและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอุณหภูมิประมาณ 25 ± 3 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางมีหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว (white light fluoresaence)

6. กล้องถ่ายรูปพร้อมอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับถ่ายรูป และกระดาษสี

7. ลวดสี

8. ไม้บรรทัด

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมอาหาร

1. ชั่งน้ำตาลในอาหารสูตร MS ในอัตรา 30 g/l
2. ชั่งผงวุ้นในอัตรา 9 g/l
3. ตวงน้ำกลั่นประมาณ 500 mg/l
4. ดูดสารละลายจาก stock solution ต่าง ๆ มารวมกันโดยใช้ปริมาตรในแต่ละ stock ดังนี้

- stock ที่ 1 20 mg/l
- stock ที่ 2 10 mg/l
- stock ที่ 3 10 mg/l
- stock ที่ 4 10 mg/l
- stock ที่ 5 10 mg/l

5. นำน้ำตาลที่ชั่งไว้มาใส่รวมกัน ปรับปริมาตรสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml

6. ปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้อยู่ในช่วงประมาณ 5.8

7. นำอาหารที่เตรียมไว้ไปตั้งไฟ เติมผงวุ้นในอาหาร คนจนวุ้นละลาย

8. บรรจุอาหารลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 20 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนที่ 2 การฟอกฆ่าเชื้อ

1. ผลสบู่ดำช่วงอายุ 15 วัน 20 วัน และ 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำผลสบู่ดำมาทำความสะอาดผิวนอกโดยไม่ต้องแกะผลสบู่ดำ เนื่องจากเมล็ดสบู่ดำยังอ่อนอยู่จึงไม่สามารถแกะได้

เตรียมตู้ปลอดเชื้อ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ภายในตู้ให้เรียบร้อย

นำผลสบู่ดำที่ได้ทำความสะอาดแล้วมาจุ่มแอลกอฮอล์ จากนั้นนำมาผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ แกะเอาเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำ

2. เมล็ดช่วงอายุ 45 วัน 50 วัน และ 60 วัน

แกะเปลือกเมล็ดสบู่ดำออก

เตรียมน้ำฟอกฆ่าเชื้อ โดยใส่สารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 ml

เติมสารจับใบ Teepol ประมาณ 2-3 หยด แล้วนำเมล็ดมาใส่ลงในน้ำฟอกฆ่าเชื้อ ปิดฝาแล้วเขย่าให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 15 นาที

นำเมล็ดสบู่ดำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง จนสะอาด แกะเอาเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำ

ขั้นตอนที่ 3 วิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอออนสบู่ดำ

1. นำเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ในสภาพปลอดเชื้อ

2. จากนั้นนำไปไว้ที่ชั้นวาง ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยในช่วงสัปดาห์แรกต้องนำไปไว้ในที่ไม่มีแสง และหลังจากที่เริ่มงอกแล้วจึงนำมาเลี้ยงในที่มีแสงได้

3. ทำการคัดเลือกขวดที่ปราศจากการปนเปื้อน (contaminate) ออกจากชั้นวาง

4. บันทึกผลการพัฒนาเป็นต้นของเมล็ดสบู่ดำ ทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ขั้นตอนที่ 4 การเปลี่ยนอาหารของเมล็ดสบู่ดำเมื่อมีการพัฒนาเป็นต้น

1. นำต้นที่มีการพัฒนาเป็นต้นมาเปลี่ยนใส่อาหาร (sub-culture) MS สูตรเดิม

2. ทำการบันทึกผลการทดลอง ทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

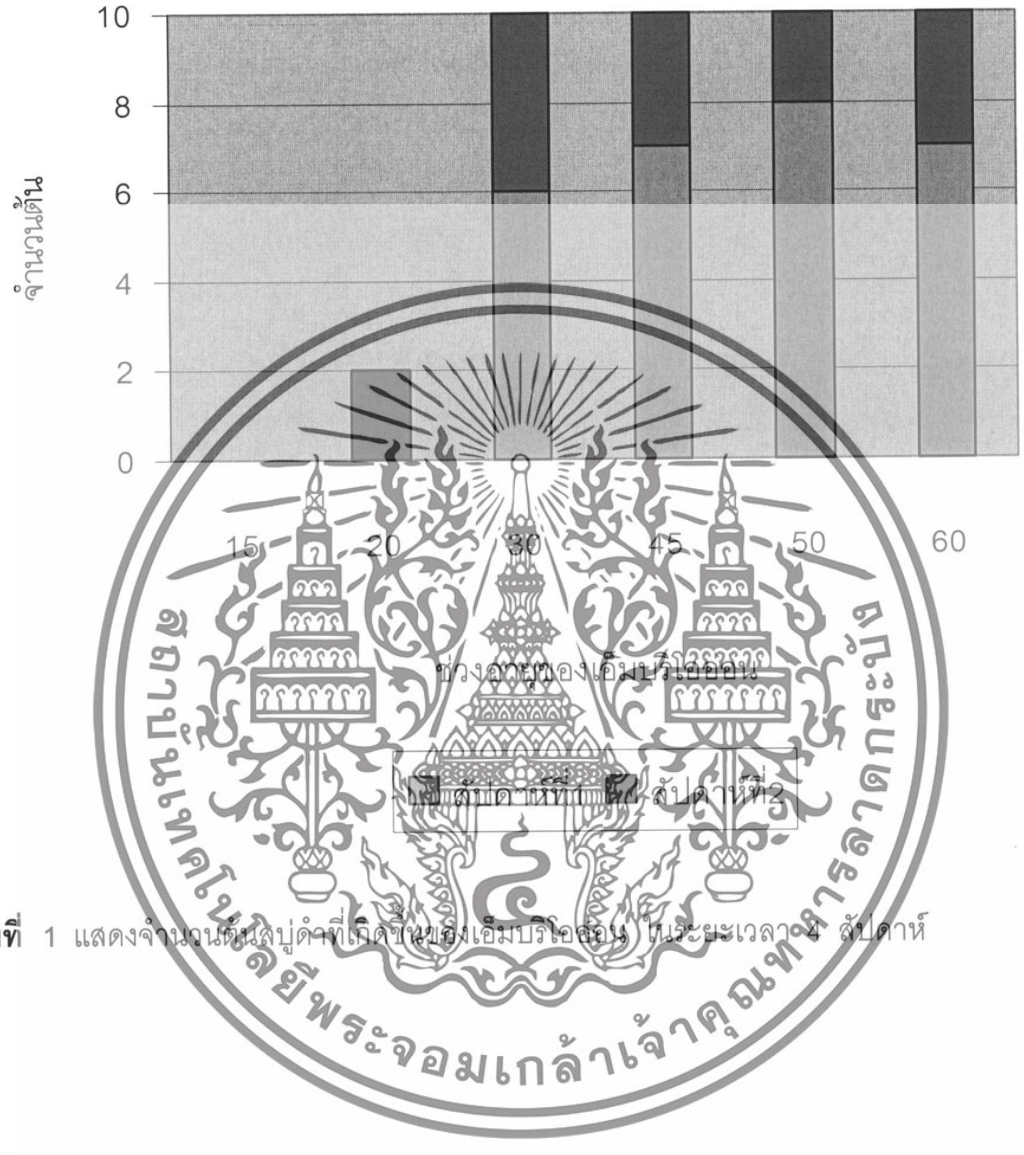
ขั้นตอนที่ 1

จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสบู่ดำ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 7 วัน โดยทำทั้งหมด 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด การพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีและสมบูรณ์อยู่ในช่วงอายุ 30 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาไปเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ ดังตารางที่ 3 และ ภาพที่ 1 และ 2 ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนต้นสบู่ดำที่เกิดขึ้นและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น ในช่วงอายุต่าง ๆ ของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ ภายหลังการผสมเกสรในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

ช่วงอายุของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ	จำนวนต้นที่เกิดขึ้นของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ (จำนวนต้น)				รวม	% การพัฒนาเป็นต้น
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4		
15	-	-	-	-	0	0
20	-	2	-	-	2	20
30	6	4	-	-	10	100
45	7	3	-	-	10	100
50	8	2	-	-	10	100
60	7	3	-	-	10	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 แสดงจำนวนหน่วยสืบพันธุ์ดำที่เกิดขึ้นของเอ็มบริโอต่อ หน่วยเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2

หลังจากที่เอ็มบริโออ่อนพัฒนาเป็นต้นแล้ว ได้ศึกษาความสมบูรณ์ของต้นว่ามีความสมบูรณ์พร้อมที่จะนำไปปลูกได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 ภาพที่ 2, 3, 4 และ 5 ดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงระดับคะแนนความสมบูรณ์ของการพัฒนาไปเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำในช่วงอายุต่าง ๆ ของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ ภายหลังการผสมเกสร ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

ช่วงอายุของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ	การพัฒนาเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อน (ระดับคะแนน)				% ความสมบูรณ์ของการพัฒนาเป็นต้น
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	
15 วัน	0	0	0	0	0
20 วัน	0	1	1	1	1
30 วัน	1	2	3	4	100
45 วัน	1	2	3	4	100
50 วัน	1	2	3	4	100
60 วัน	1	2	3	4	100

หมายเหตุ

ระดับคะแนน 0 = ไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้น

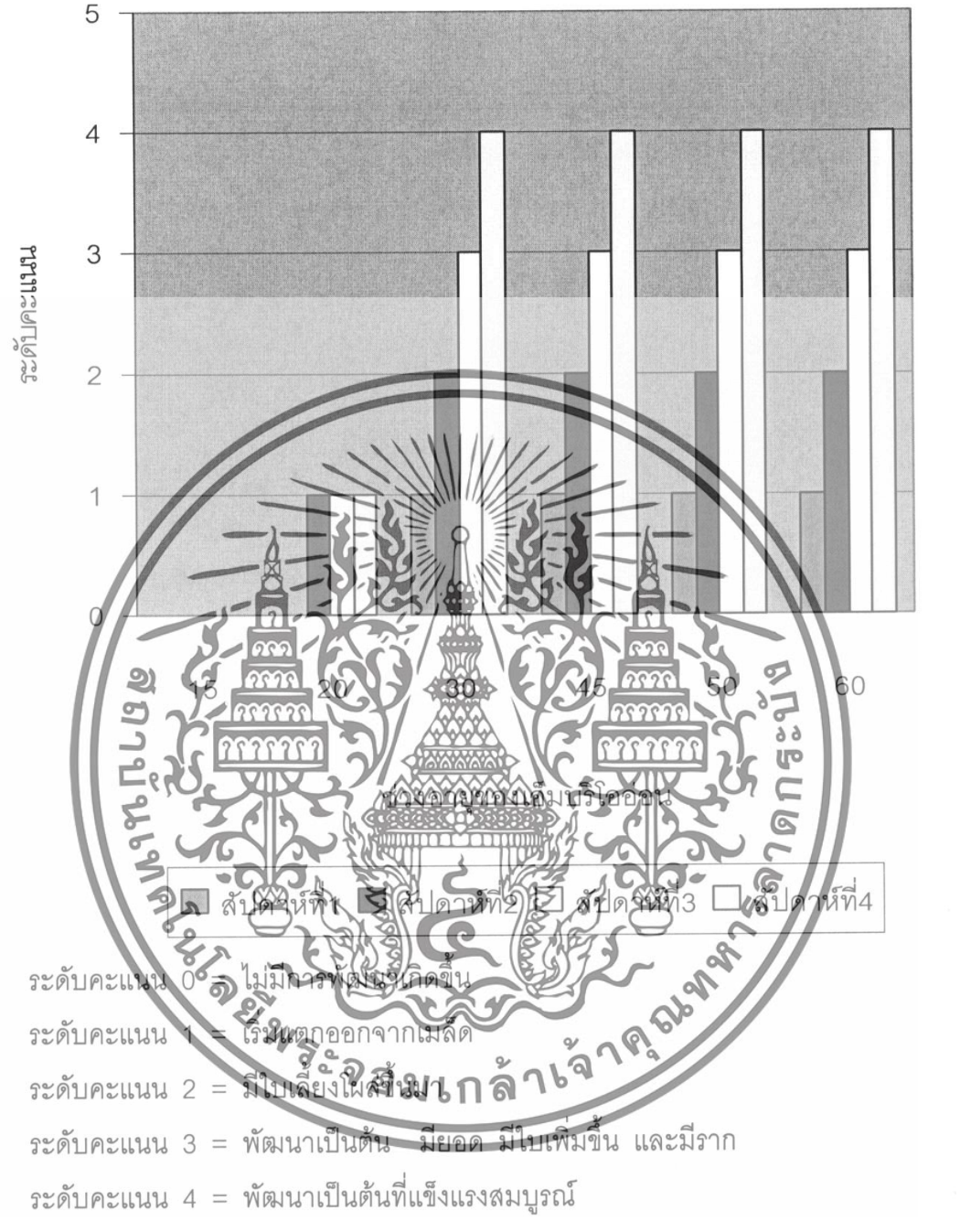
ระดับคะแนน 1 = เริ่มแตกออกจากเมล็ด

ระดับคะแนน 2 = มีใบเลี้ยงโผล่ขึ้นมา

ระดับคะแนน 3 = พัฒนาเป็นต้น มียอด มีใบเพิ่มขึ้น และมีราก

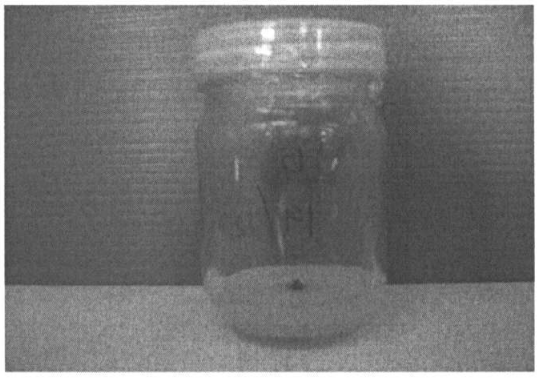
ระดับคะแนน 4 = พัฒนาเป็นต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 แสดงความสมบูรณ์ของการพัฒนาเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อน ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

ข.

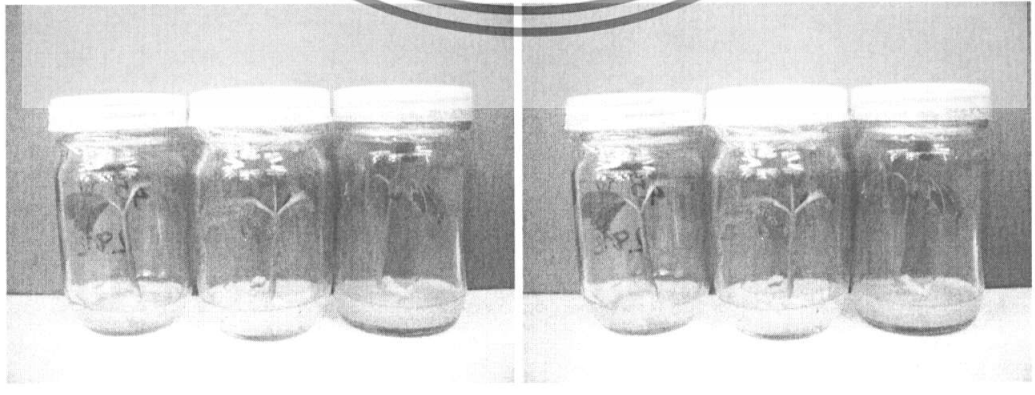
ค.

ง.

ภาพที่ 3 แสดงการพัฒนาเป็นต้นของเอ็มบริโอออนสบู่ดำ ในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังนี้

ก. ระดับที่ 1 ข. ระดับที่ 2

ค. ระดับที่ 3 ง. ระดับที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของสบู่ดำ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5 แสดงการพัฒนาเป็นต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อครบ 4 สัปดาห์ ล่าง เอ็มบริโอออนอายุ 15, 20 และ 30 วัน จากซ้ายไปขวา บน เอ็มบริโอออนอายุ 45, 50 และ 60 วัน จากซ้ายไปขวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 3

นำผลจากตอนที่ 1 มาเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) ลงบนอาหารสูตร MS สูตรเดิม เพื่อดูการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของต้นสบู่ดำ ปรากฏว่าต้นสบู่ดำมีการขยายขนาดของลำต้นเพิ่มขึ้น ตามระดับคะแนน ดังตารางที่ 5 ภาพที่ 6, 7 และ 8 ดังนี้

ตารางที่ 5 แสดงการพัฒนาขนาดต้นสบู่ดำ ในช่วงอายุต่าง ๆ ของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ ภายหลังการผสมเกสร ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS สูตรเดิม

ช่วงอายุของเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ	การพัฒนาเป็นต้นของเอ็มบริโออ่อน (ระดับคะแนน)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
15 วัน	0	0	0	0
20 วัน	0	0	0	0
30 วัน	1	2	3	4
45 วัน	1	2	3	4
50 วัน	1	2	3	4
60 วัน	1	2	3	4

หมายเหตุ

ระดับคะแนน 0 = ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

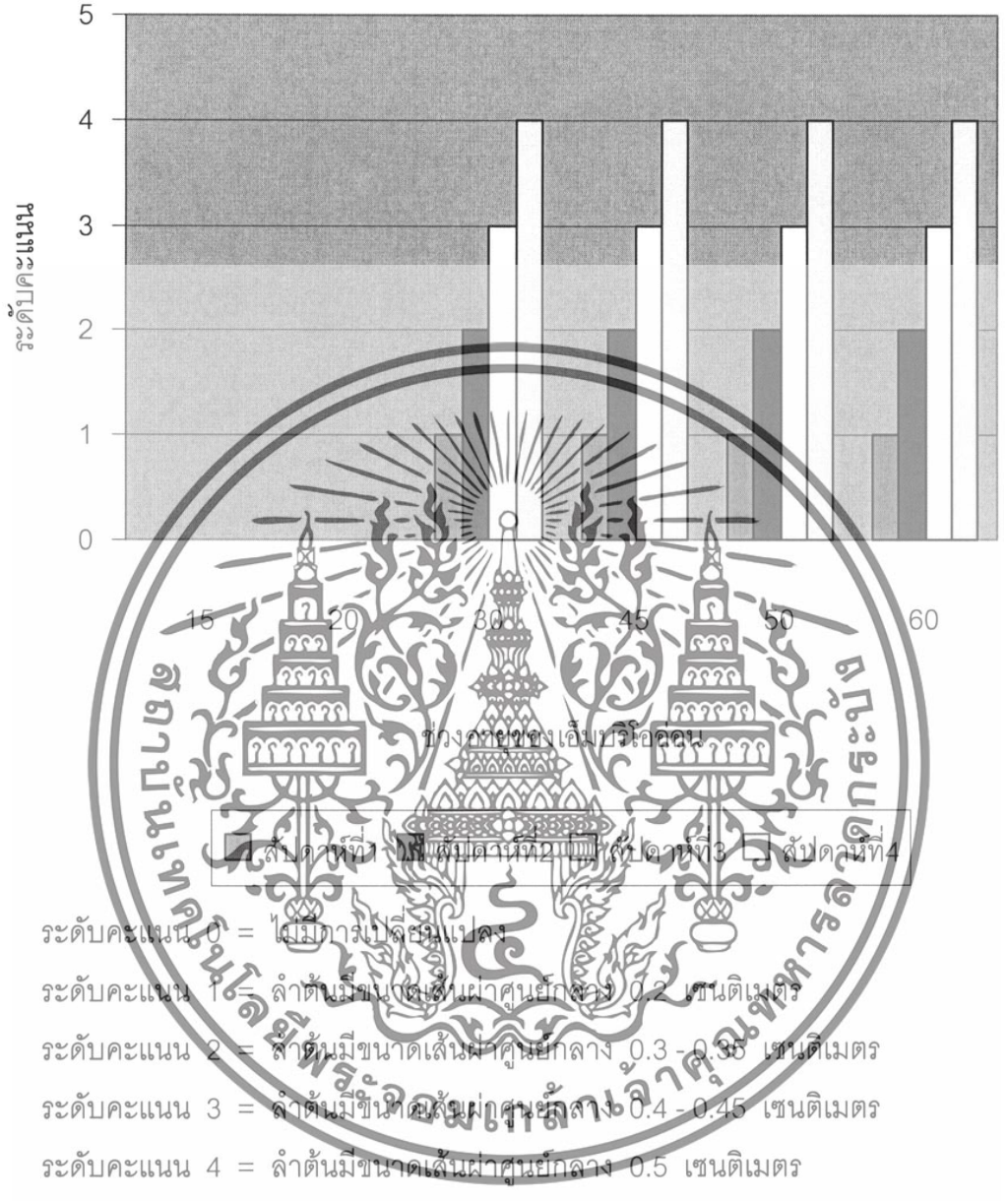
ระดับคะแนน 1 = ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร

ระดับคะแนน 2 = ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 - 0.35 เซนติเมตร

ระดับคะแนน 3 = ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 - 0.45 เซนติเมตร

ระดับคะแนน 4 = ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 แสดงการพัฒนาขนาดของลำต้นสบู่ดำหลังจากการเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) ใน ระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 7 แสดงการขยายขนาดของต้นสบู่ดำที่นำมาเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เริ่มจาก 4, 3, 2 และ 1 สัปดาห์ ตามลำดับ จากซ้ายไปขวา

ก.

ค.

ง.

ภาพที่ 8 แสดงการพัฒนาขนาดของต้นสบู่ดำ ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ดังนี้

ก. สัปดาห์ที่ 1 ต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร

ข. สัปดาห์ที่ 2 ต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 – 0.35 เซนติเมตร

ค. สัปดาห์ที่ 3 ต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 – 0.45 เซนติเมตร

ง. สัปดาห์ที่ 4 ต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

จากการนำเมล็ดของสบู่ดำในช่วงระยะเวลาต่างกัน คือ อายุ 15, 20, 30, 45, 50 และ 60 วันหลังจากดอกได้รับการผสมเกสร มาฟอกฆ่าเชื้อ จะได้วิธีการฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน เนื่องจากว่าเมล็ดสบู่ดำที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อนั้นในช่วงอายุ 15, 20 และ 30 วันเมล็ดยังอ่อนอยู่จึงไม่เหมาะที่จำนำไปฟอกฆ่าเชื้อ เพราะจะทำให้เมล็ดสบู่ดำเสียสภาพการงอก หรือเมล็ดอาจตายได้ ควรที่จะนำผลของสบู่ดำมาจุ่มแอลกอฮอล์แล้วผ่านไฟ แล้วจึงผ่าเอาเมล็ดออกมา โดยจะต้องผ่าด้วยความระมัดระวังเพราะเมล็ดยังอ่อนมาก หากได้รับบาดแผลจะทำให้เมล็ดไม่สามารถงอกได้เลย และต้องทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ ใช้วิธีนี้เนื่องจากว่าเมล็ดที่อยู่ภายในผลนั้นมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้ว ส่วนช่วงอายุ 45 วันขึ้นไปสามารถนำไปฟอกฆ่าเชื้อได้เพราะเมล็ดมีสภาพที่แข็งแรงแล้ว แต่ก็สามารถที่จะทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีแบบช่วงอายุ 15 – 30 วันได้แต่จะทำได้ลำบากกว่า เพราะว่าเปลือกของผล และเปลือกของเมล็ดนั้นแข็งมากจึงยากที่มีดผ่าตัดจะสามารถแกะออกได้ จึงเหมาะที่จะใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อมากกว่า

หลังจากการนำเอ็มบริโออ่อนของสบู่ดำมาเพาะในอาหารสูตร MS ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน พบว่าเอ็มบริโอที่อายุ 15 วันไม่มีการเปลี่ยนแปลง เอ็มบริโออายุ 20 วันมีเอ็มบริโอที่สามารถงอกได้เพียง 2 ต้นและไม่สมบูรณ์ หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ก็มีต้นตายไป 1 ต้น ต้นที่มีอยู่ก็มีขนาดเล็กมากและเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ต้นก็ไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้น แต่ถ้าหากทดลองเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่เอ็มบริโอในช่วงนี้อาจพัฒนาเป็นต้นได้ หรืออาจเป็นเพราะว่าการทดลองนี้ไม่ได้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เอ็มบริโออายุ 30 วัน สามารถเจริญเป็นต้นได้ทุกต้น และเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต้นก็ยังพัฒนาและโตขึ้นอย่างสมบูรณ์ เอ็มบริโออายุ 45, 50 และ 60 วันก็มีการพัฒนาเป็นต้นที่แข็งแรง และสมบูรณ์เช่นเดียวกับเอ็มบริโออายุ 30 วัน โดยในช่วงสัปดาห์แรกนำมาเลี้ยงไว้ในที่ไม่มีแสง เพราะหากไว้ในที่มีแสงช่วงแรกเอ็มบริโอจะไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้น เมื่อเกิดการงอกขึ้นจึงสามารถนำมาเลี้ยงไว้ในที่มีแสงได้ และต้องมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตลอดเวลา จะเห็นได้ว่าเอ็มบริโอที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้นั้นต้องมีอายุ 30 วันขึ้นไปหลังจากที่ดอกได้รับการผสมเกสรแล้ว เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำต้นที่ได้มาเปลี่ยนอาหารใหม่ (sub-culture) โดยใช้อาหาร MS ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน สูตรเดิมเลี้ยง ปรากฏว่าต้นมีการขยายขนาดของต้นเพิ่มขึ้นและพร้อมที่จะนำไปปลูกได้ โดยในช่วงสัปดาห์แรก ต้นมีการขยายขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเป็น 0.2 เซนติเมตร สัปดาห์ที่ 2 ขนาดของลำต้นเพิ่มเป็น 0.3 - 0.35 เซนติเมตร สัปดาห์ที่ 3 ขนาดของลำต้นเพิ่มเป็น 0.4 - 0.45 เซนติเมตร และสัปดาห์ที่ 4 ขนาดของลำต้นเพิ่มเป็น 0.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการทดลองนำเอาเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำในช่วงระยะเวลาต่างกันมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเอ็มบริโออ่อนที่มีอายุ 15 วัน และ 20 วันไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้น คือไม่มีการงอกเกิดขึ้น ส่วนเอ็มบริโออ่อนที่มีอายุตั้งแต่ 30 - 60 วัน มีการพัฒนาเป็นต้น และเมื่อเลี้ยงต่อไปเรื่อย ๆ ก็มีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ทำการเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) มาเลี้ยงในอาหาร MS สูตรเดิมปรากฏว่าลำต้นมีการขยายขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นจาก 0.2 เซนติเมตร เป็น 0.5 เซนติเมตรในระยะเวลา 4 สัปดาห์

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน(embryo rescue) สามารถช่วยย่นระยะเวลาในการนำเมล็ดมาปลูกได้ คือจากที่เคยนำเมล็ดที่แตกออกจากผลมาเพาะปลูก ก็สามารถนำเมล็ดที่มีอายุเพียง 30 วัน มาเพาะปลูกได้โดยทำการเอาเอ็มบริโออ่อนมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วจึงนำย้ายลงปลูกได้ ช่วยประหยัดเวลาได้ถึง 30 วัน ทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตของสบู่ดำได้อย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Plant Tissue Culture. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

ชำนาญ ฉัตรแก้ว.2549. เอกสารอ้างอิงวิชาการ สบู่ดำพืชพลังงาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง.กรุงเทพฯ. 119 หน้า.

นพพร สายัมพล.2543. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 261 หน้า.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์.2537. การเพาะปลูกและการดูแลรักษาสบู่ดำพลังงานทดแทนทางเลือกใหม่แห่งอนาคต. สำนักพิมพ์ เพชรกะรัต จำกัด. กรุงเทพฯ. 80 หน้า.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ.2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

วัลชลีย์ หุลานนท์.2527. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกและการติดผลของสบู่ดำ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 30 หน้า.

ศิรินทร์ สาธุสินประเสริฐ. 2548. ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนของข้าวหอมนิล และข้าวหอมกุหลาบ. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 38 หน้า.

อารีย์ วิรัญญวัฒก์.2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อักษรรรค์. กรุงเทพฯ. 133 หน้า.

อัมพา ว่องวิชชกร, ปริญญารัตน์ ภูศิริ, อรณัฐ ศรีพาเพลิน. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการขยายพันธุ์พืช. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. 199 หน้า.

J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. 1977. Applied and aspects of plant cell, tissue and organ culture. New York. 525 p.

R D Dixon.1985. Plant cell culture : a practical approach. British Library Cataloguing. England. 236 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://my.dek-d.com/Writer/Story/viewlongc.phd?id=223518&chapter=8.

15 มกราคม 2551. **การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช.**

http://www.stbw.nl/Embryo-Rescue%20Techniques.pdf.

SWB international BV. 20th September 2007. Embryo – rescue techinqes.

http://www.thaikumbon.th.gs/web-t/issue-culture/.

15 มกราคม 2551. Tissue culture.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 1 ต้นสบู่ดำในแปลงทดลอง

ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะของต้นสบู่ดำ

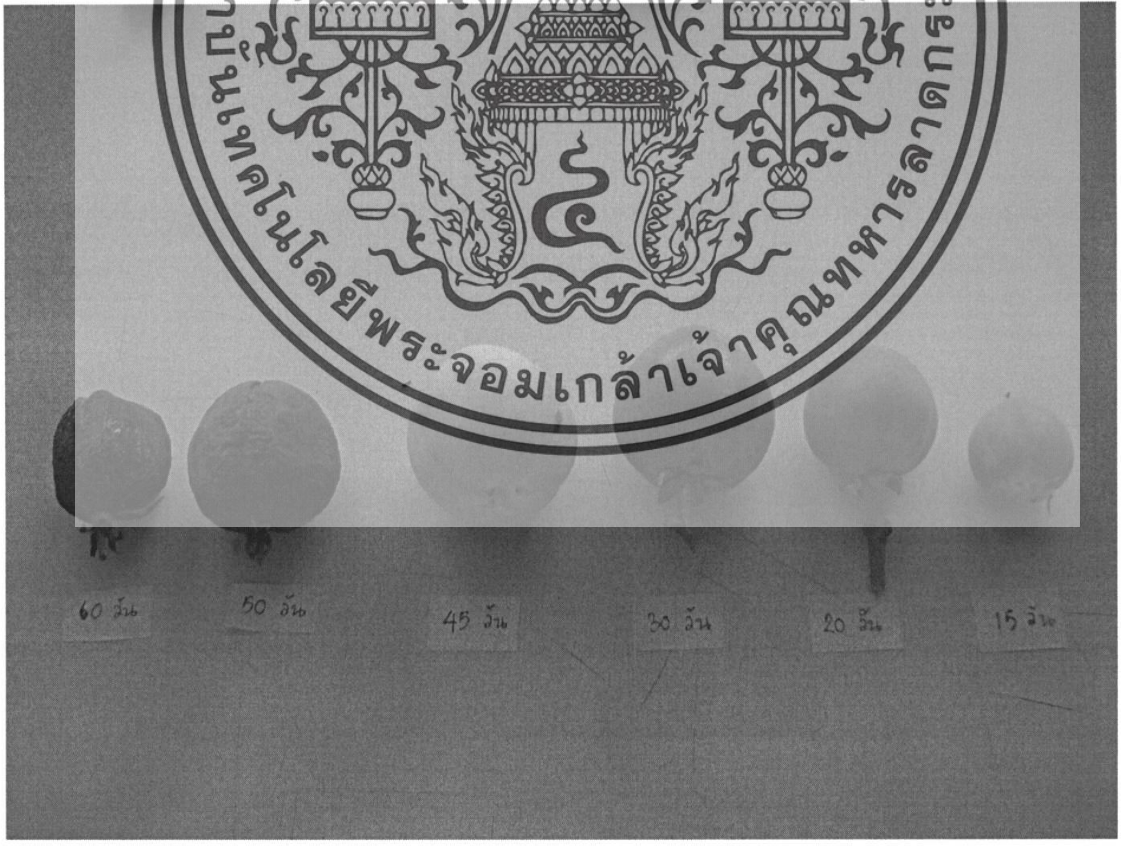
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 3 ลักษณะใบของต้นสบู่ดำ

ภาพผนวกที่ 4 ลักษณะดอกตัวผู้และดอกตัวเมียของต้นสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 5 ผลของสบู่ดำ



ภาพผนวกที่ 6 แสดงลักษณะผลของสบู่ดำในช่วงอายุต่าง ๆ กัน

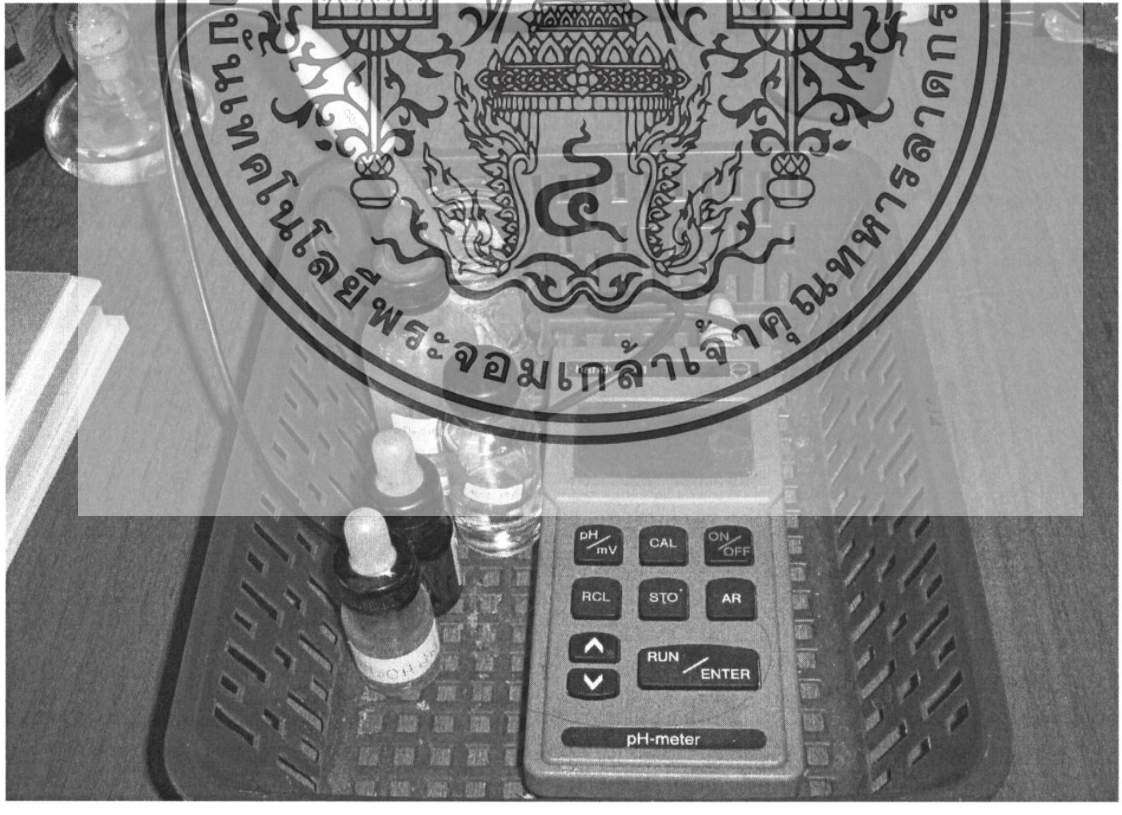
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 7 แมลงสบู่ดำที่อยู่ในผลของสบู่ดำ

ภาพผนวกที่ 8 แสดงลักษณะเมล็ดของสบู่ดำในช่วงอายุต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 9 ตู้ laminar flow



ภาพผนวกที่ 10 เครื่องวัด pH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 11 การเขย่าเพื่อคลุกด้านในขณะทำการพ่นฆ่าเชื้อ

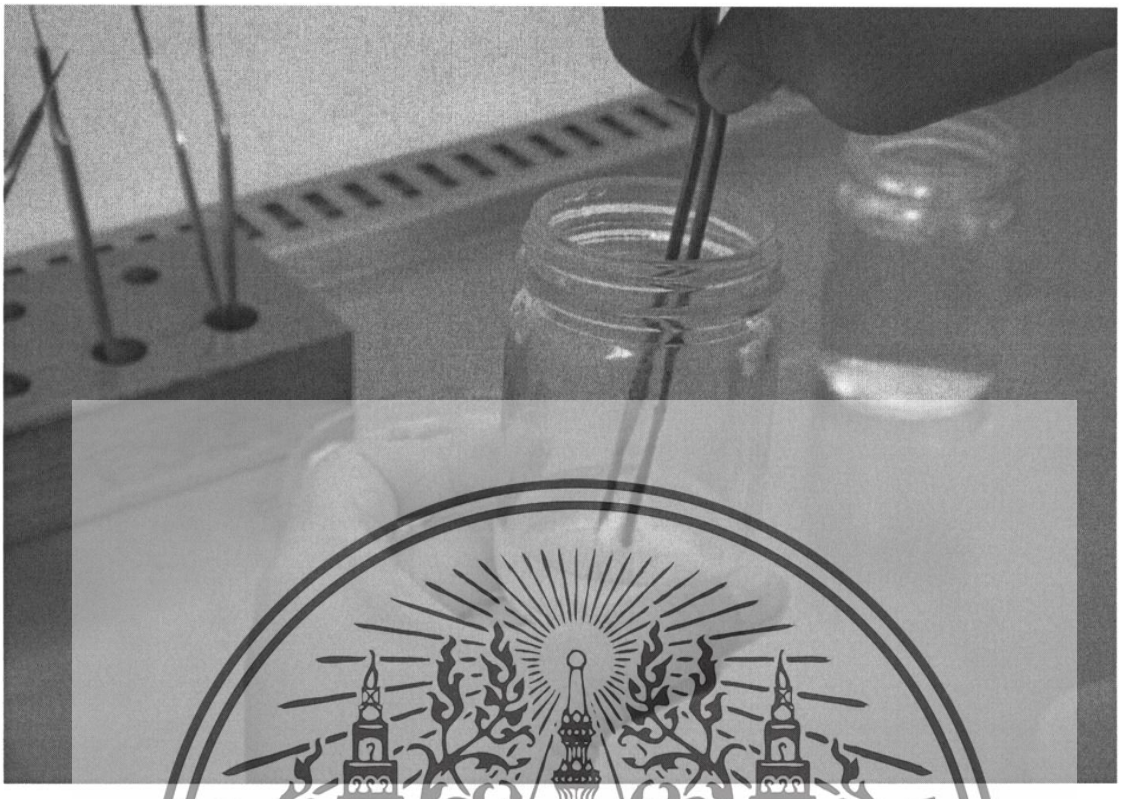
ภาพผนวกที่ 12 แสดงการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 13 ไมล็ดสบู่ดำที่แกะออกจากผล และนำไปลอกเยื่อที่หุ้มเมล็ดออกแล้ว

ภาพผนวกที่ 14 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 15 การนำเอ็มบริโออนุใสลงอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

ภาพผนวกที่ 16 เอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 17 เอ็มบริโอออนสปูดำที่วางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่ปลอดเชื้อ

ภาพผนวกที่ 18 เอ็มบริโอออนสปูดำที่วางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล : นางสาวปพิชญา ศิลป์มี

วันเดือนปีเกิด : 25 ตุลาคม 2528

ที่อยู่ตามสำเนาทะเบียนบ้าน : 220/662 ม.4 ซ.วัดใหญ่ ถ.สุขสวัสดิ์ ต.ในคลองบางปลากด อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ 10290

โทรศัพท์ : 02-818-9082

ที่อยู่ปัจจุบัน : 220/662 ม.4 ซ.วัดใหญ่ ถ.สุขสวัสดิ์ ต.ในคลองบางปลากด อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ 10290

โทรศัพท์ : 086-896-4659

การศึกษา : พ.ศ.2534-2535 ระดับอนุบาล 3 ถึง ประถมศึกษาปีที่ 1 โรงเรียนอาษาวิทยา จ.สมุทรปราการ

พ.ศ.2536-2540 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนวัดศรีไอยสวรรค์ จ.กรุงเทพฯ

พ.ศ.2541 ระดับมัธยมศึกษาปีที่ 1 โรงเรียนมัธยมวัดดุสิตาราม จ.กรุงเทพฯ

พ.ศ.2542-2546 ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนป้อมนาคราชสวาทยานนนท์ จ.สมุทรปราการ

พ.ศ.2547 ระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้