สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี

เรื่อง

ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในสบู่ดำ

Effect of Hormone on Callus Induction of Physic Nut

โดย

นางสาวเรณู สามเณร

T 1 0 2 6 8 5

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ

ปพ.
ร 765 ผ
2550
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 102685
วัน,เดือน,ปี 18 ส.ค. 2552

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่)

พุทธศักราช 2550

b. 12036493
i. .....
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในสบู่ดำ

Effect of Hormone on Callus Induction of Physic Nut

โดย

นางสาวเรณู สามเณร

ได้พิจารณาเห็นชอบ

....

(อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

....

(รศ.ดร.สมยศ เดชภิรัตนมงคล)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่..18..เดือน..เมษ.....พ.ศ...2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรีนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เป็นการเรียนรู้ ฝึกฝนสติปัญญา การปรับปรุงกระบวนการทางด้านความคิด และการแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

การศึกษาครั้งนี้ ผู้ทำการวิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ อาจารย์ วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำและถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ตลอดทั้งตรวจทานแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การอนุเคราะห์สถานที่ทดลอง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นต่างๆ

ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านไม่ว่าจะเป็นเรื่องค่าใช้จ่ายหรือความสะดวกในการเดินทางไปศึกษาหาข้อมูลหรือวัสดุนอกสถานที่

นางสาวเรณู สามเณร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	: ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในสบู่ดำ
โดย	: นางสาวเรณู สามเณร
ภาควิชา	: ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะ	: เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ

บทคัดย่อ

การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของสบู่ดำ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยการนำเมล็ดสบู่ดำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ในปริมาณความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0, 0.0250, 0.0625, 0.1250, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการตอบสนองสูงสุดของการเกิดแคลลัสได้มาจากอาหารที่เติม NAA 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ต่อมาได้ทำการทดลองเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการทดลองพบว่า ในอาหารสูตรที่เติม Kinetin 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่พบมีการพัฒนาเป็นราก แต่สูตรที่เติม Kinetin 0, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสไม่มีการพัฒนาเป็นรากและต้น

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, แคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	: Effect of Hormone on Callus Induction of Physic Nut
Anothor	: Miss Renu Sammanane
Department	: Plant Production Technology
Faculty	: Agricultural of Technology
Advisor	: Mr. Vichai Limkarchanaphong

ABSTRACT

The method of callus induction of physic nut by tissue culture medium was studied to search for suitable mediums. First, physic nut seeds were conducted on MS medium in different concentration of NAA : 0, 0.025, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 and 1 mg/l. After 8 weeks, calluses induction medium that contain 0.75 and 1 mg/l (NAA) showed the best response. After that, medium was changed to MS medium with kinetin (0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg/l). The result was the calluses were regenerated into root in kinetin in 3.0 mg/l. But there was no regenerated into root and plant of calluses in kinetin in 0, 1.0, and 2.0 mg/l.

Key word : Tissue culture, Callus.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
สารบัญภาคผนวก	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	25
ผลการทดลอง	27
วิจารณ์	39
สรุป	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	43
ประวัติผู้เขียน	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการพัฒนาเป็นต้นของเมล็ดสบู่ดำ บนอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA ในความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นระดับคะแนน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	30
2	แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำ บนอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA ในความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เป็นระดับคะแนน	32
3	แสดงการพัฒนาของแคลลัสสบู่ดำ ภายหลังการ subculture ครั้งแรกลงบน อาหารMS ที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	36
4	แสดงผลการเกิดและพัฒนาแคลลัสในอาหารสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย Kinetin ที่มีความเข้มข้นในระดับที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการพัฒนาเป็นต้นของเมล็ดสบู่ดำ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	31
2	แสดงลักษณะการให้คะแนนการเกิดแคลลัสของสบู่ดำ	33
3	แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสู่ดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์	34
4	แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	34
5	แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	35
6	แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	35
7	แสดงการพัฒนาของแคลลัสภายหลังการ subculture ครั้งแรกเป็นเวลา 4 สัปดาห์	36
8	แสดงการพัฒนาของแคลลัสสบู่ดำในอาหารสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย Kinetin ที่มีความเข้มข้นในระดับที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

ภาพผนวกที่		หน้า
1	แสดงลักษณะต้นของสบู่ดำ	44
2	แสดงลักษณะใบของสบู่ดำ	44
3	แสดงลักษณะดอกของสบู่ดำ	45
4	แสดงลักษณะผลของสบู่ดำ	45
5	แสดงลักษณะผลแก่ของสบู่ดำ	46
6	แสดงลักษณะเมล็ดของสบู่ดำ	46

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปัจจุบันนี้หลายๆประเทศประสบกับปัญหาราคาน้ำมันที่สูงขึ้น รวมถึงประเทศไทยก็ประสบกับปัญหาราคาน้ำมันที่เพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตทั้งภาคเกษตรและภาคอุตสาหกรรมสูงขึ้น ผู้ประกอบการจึงมีกำไรจากการลงทุนประกอบกิจการต่างๆลดลง พลังงานทดแทนจากพืชจึงเป็นเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่จะช่วยให้ต้นทุนในการผลิตลดลงกว่าเดิม และสบู่ดำก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการสกัดน้ำมันเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ การเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อสบู่ดำสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการเพาะเลี้ยงสบู่ดำในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสก่อน แล้วจึงนำแคลลัสไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสในสบู่ดำ
2. เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 เปราะหักได้เพราะเป็นไม้เนื้ออ่อนไม่มีแก่น เมื่อสบู่ดำมีอายุมากขึ้น โคนต้นมีสีน้ำตาลอมเทา และเริ่มแตกทรงพุ่มเมื่อลำต้นมีความสูงจากระดับพื้นดินประมาณ 12 เซนติเมตร โดยมีกิ่งแขนงเจริญออกทางด้านข้าง เป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ขึ้นได้ในที่ดอนและดินลูกรัง แต่ไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วมขัง อายุยืนไม่น้อยกว่า 20 ปี หากมีการดูแลรักษาที่ดีจะมีอายุยืนยาวถึง 50 – 60 ปี (ปรัชญา, 2537)

ใบ

ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปหัวใจกว้างถึงรูปโล่ 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 สบู่ดำมักทิ้งใบในช่วงฤดูร้อนถ้าแห้งแล้งมากจะทิ้งใบทั้งต้น

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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 ปริมาณดอกย่อย ประมาณ 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) ออก จะพบผนังชั้นใน (endocarp) สานกันเป็นชั้นหุ้มเมล็ดไว้ภายใน 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) และคัพภะ (embryo) มีสีขาวแต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.6 กรัม

น้ำยาง

น้ำยางมีลักษณะใส ไม่มีสี พบมากบริเวณลำต้นอ่อนและกาบใบ ลำต้นแก่พบน้ำยางเฉพาะที่ bark เท่านั้น

สบู่ดำ....พืชที่น้ำมันที่คนทั่วโลกรู้จัก (ปรัชญา, 2537)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์หลากหลายทั้งด้านอุตสาหกรรม ยารักษาโรค หลายประเทศจึงนิยมนำสบู่ดำไว้ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ประเทศทราแวนเกอร์ (Travancore) จะนำเมล็ดสบู่ดำมาคั่วบดกับน้ำอ้อยให้เป็นผงใช้แก้อาการปวดท้องและแก้พิษ เมล็ดสบู่ดำให้น้ำมัน 30 – 40 % น้ำมันที่ยังใหม่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เชื้อเพลิงเอธานอล หรือแก๊สโซฮอล์

อยู่ในรูปของแอลกอฮอล์ นำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อนำไปใช้กับเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินได้โดยไม่ต้องปรับแต่งเครื่องยนต์จนประสบความสำเร็จมาแล้ว โดยเริ่มมีการทดลองใช้มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 การผลิตแอลกอฮอล์จากพืชเกษตรเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมัน โดยเฉพาะการนำแอลกอฮอล์ในสัดส่วนร้อยละ 15 มาผสมกับน้ำมันเบนซินร้อยละ 85 เพื่อใช้ในรถยนต์นั้น พบว่าโครงการดังกล่าวมีประโยชน์หลายด้านด้วยกัน เช่น จะช่วยลดปริมาณการใช้น้ำมันเบนซินในประเทศลงได้ร้อยละ 15 หรือประมาณ 1,054 ล้านลิตร นอกจากนี้ยังช่วยแก้ปัญหามลพิษทางอากาศที่เกิดจากรถยนต์ได้ เพราะพลังงานประเภทนี้จะผลิตไอเสียรถยนต์ออกมาน้อย เนื่องจากมีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์

2. ไบโอดีเซล

เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่รัฐบาลจะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน เพราะเป็นวัตถุดิบที่หาง่ายในท้องถิ่น เพราะเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตได้จากนำมันพืช 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 (ปรัชญา, 2537)

สบู่ดำ มีข้อดีเหนือกว่าพืชน้ำมันอื่น ๆ

1. สามารถนำมาใช้ได้โดยตรงกับเครื่องยนต์ เพราะมีกระบวนการสกัดที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. น้ำมันที่สกัดได้จากสบู่ดำมีคุณค่าสูงกว่าการนำไปใช้เป็นพืชพลังงานทั่วไป เนื่องจากสบู่ดำมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง เหมาะสำหรับการใช้งานในเครื่องยนต์หรือเครื่องจักรขนาดใหญ่ที่ต้องใช้ความเร็วต่อรอบสูง เช่น ใช้เป็นน้ำมันหล่อลื่นในรถแข่ง เครื่องจักรขนาดใหญ่ที่ใช้ในโรงพิมพ์ซึ่งน้ำมันสังเคราะห์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติพิเศษนี้

3. น้ำมันสบู่ดำดีกว่าน้ำมันปาล์มเพราะมีจุดแข็งตัวที่ -7 องศาเซลเซียส ใช้กับรถไถนาเดินตาม เครื่องยนต์ดีเซลได้ผลดี แต่มีความหนืดที่สูงกว่าน้ำมันดีเซล

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 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช

5. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากแคลลัสในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา

6. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Organized culture ได้แก่ การเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้นหรืออวัยวะ ซึ่งลักษณะของโครงสร้างอวัยวะยังคงดำรงอยู่ นับว่าคล้ายคลึงกับการขยายพันธุ์พืชตามธรรมชาติ เช่น การปักกิ่งชำ หรือติดตาพืช

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

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 ในสภาพปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหลายภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง”

ส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง (นพพร, 2543)

เซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยทั่วไป เป็นชิ้นส่วนจากพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งประกอบด้วยหลายเซลล์เรียกว่า explant วิธีการเพาะเลี้ยงส่วนของ explant และจุดประสงค์ของการเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเพาะเลี้ยงแคลลัส (cullius culture) ส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง คือกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงหน้าที่ ซึ่งได้มาจากการนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น ส่วนของราก ก้าน ใบ ไฮโปคอทพิล ใบเลี้ยง หรือเนื้อเยื่อเจริญเพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์จำนวนมาก

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดแก้วโดยใช้อาหารเหลวและวางบนเครื่องเขย่า เพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์จำนวนมากสำหรับเตรียมโปรโตพลาสต์

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

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

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (คำนูณ, 2542)

การนำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงในหลอดทดลองนาน ๆ อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในวิถีของเมแทบอลิซึม ดังนั้นความต้องการอาหารของพืชที่นำมาเลี้ยง อาจเนื่องมาจาก 2 สาเหตุ คือความไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเอง 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 ในรูปของวิตามินและกรดอะมิโนโดยเฉพาะฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน ไซโทไคนิน และจิบเบอเรลลินส์ ในความเข้มข้นและสัดส่วนต่าง ๆ กัน เมื่อมีสารเหล่านี้ครบถ้วน ชิ้นส่วนพืชสามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นการดำรงชีวิตของชิ้นส่วนพืชแบบนี้ จัดว่าเป็นแบบที่สร้างอาหารเองไม่ได้ (heterotropic organism)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนพืชชั้นสูงเหมาะต่อการเจริญของอินทรีย์ รา สาหร่าย และแบคทีเรียเป็นอย่างดี จุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเร็วกว่าชิ้นส่วนพืช ทำให้เกิดการแย่งอาหารกัน บางครั้งการเจริญของจุลินทรีย์ยับยั้งการเจริญของชิ้นส่วนพืชได้ โดยการปล่อยสารพิษออกมา 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) มักใส่ในรูปแคทอิออน 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สารอินทรีย์

1. คาร์บอน แหล่งที่ให้คาร์บอนที่สำคัญน้ำตาลซูโครส
2. กรดอะมิโน
3. วิตามิน เป็นตัวเร่งการทำงานของเอนไซม์

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 จากนั้นพืชจะหยุดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโต 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 ตัวอย่างของสารมนกลุ่มนี้ได้แก่ ไคเนทิน – เบนซิลอะมิโนพิวรีน (benzylaminopurine) หรือ BAP ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ ซีเอทิน และน้ำมะพร้าว

สรุปหน้าที่ของไซโทไคนิน

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

4. จิบเบอเรลลินส์

ไม่นิยมใช้สารกลุ่มนี้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่อาจใช้บ้าง เช่น กรดจิบเบิอเรลลิกซึ่งสลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน โดยทั่วไปจิบเบอเรลลินส์จะชักนำให้เกิดการยืดตัวของลำต้น การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญหรือตา ช่วยทำลายการพักตัวของเมล็ด ทำให้เมล็ดหรือเอ็มบริโอที่แยกออกมางอกได้ นอกจากนี้จิบเบอเรลลิกมักยับยั้งการเกิดรากและยอด อีกทั้งช่วยกระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิด และช่วยชะลอการแก่ของผลไม้บางชนิด

5. กรดแอบซิซิก

สารประเภทนี้ส่วนใหญ่สังเคราะห์เองตามธรรมชาติสำหรับควบคุมกระบวนการทางสรีระวิทยาต่าง ๆ ไม่ให้เกิดขึ้นเร็วเกินไป หรือไม่เกิดในช่วงเวลาที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

6. เอทิลีน

เอทิลีนเป็นแก๊สที่เกิดจากการเผาไหม้ของถ่านหิน น้ำมัน และสารพวกไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ พืชสามารถสร้างได้เองจากกระบวนการเมทาบอลิซึมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการสุกของผลไม้ พืชตอบสนองต่อเอทิลีนได้หลายทาง เช่น เร่งการสุกของผลไม้ กระตุ้นการเกิดรากฝอย และรากแขนง กระตุ้นการงอกของเมล็ด กระตุ้นให้ใบและผลร่วงจากต้น กระตุ้นการออกดอกสามารถทำให้สีของดอกไม้จางลง เป็นต้น

สารอินทรีย์เชิงซ้อนธรรมชาติ

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

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

2.1 IAA และกรดจิบเบอเรลลิกมีความคงตัวต่ำ

2.2 วุ้นไม่แข็งตัว

2.3 เกลือบางอย่าง เช่น ฟอสเฟต เหล็ก ตกตะกอน

2.4 วิตามินบี 1 และกรดแพนโททินิกไม่เสถียร

2.5 การนำเข้าของแอมโมเนียอิออนในเซลล์เกิดได้ช้า

การปรับ pH อาหารควรใช้โซเดรียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) กับกรดไฮโดรริก (HCl) โดยใช้ความเข้นในช่วง 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลดีและผลเสียของผงถ่านมีดังนี้

3.1 ช่วยดูดซับพิษของรงควัตถุสีดำและสีน้ำตาลซึ่งส่วนมาก คือสารประกอบฟีนอลและเมลานิน นอกจากนี้ยังดูดสารพิษที่ไม่มีสีอีกด้วย

3.2 ช่วยดูดซับสารอินทรีย์บางชนิด เช่น สาร ABA (abscissic acid) ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชในขวดเนื้อเยื่อ

3.3 ทำให้เกิดสภาพดำมืดของอาหาร ส่งผลให้เกิดรากได้ดี

3.4 สามารถกระตุ้นการเกิดเอ็มบริโอเจนเนซิสในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นยาสูบ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเติบโต และออร์แกโนเจนเนซิสของพืชไม้เนื้อแข็ง

3.5 ช่วยคงเสถียรภาพของพีเอช

3.6 อาจเป็นไปได้ว่าผงถ่านปล่อยสารที่ส่งเสริมการเติบโต แต่ยังไม่มีผู้พิสูจน์อย่างจริงจัง

3.7 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น อาหาร (มก./ล)	สารละลายเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้ (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	
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	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			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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% เพราะทำให้ชิ้นส่วนพืชสูญเสียน้ำมากเกินไป

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ

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

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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อจากส่วนต่าง ๆ ของพืช (ดัดแปลงจาก คำนูณ, 2542)

		ขั้นตอน	
เนื้อเยื่อ	ก่อนการฟอก	ช่วงการฟอก	หลังการฟอก
เมล็ด	จุ่มในเอทานอล 70% นาน 10 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด	แช่เมล็ดใน 10 % แคลเซียมไฮเพอร์คลอไรด์นาน 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

โดยทั่วไปขนาดและรูปร่างของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเพื่อให้เกิดการเติบโตหรือพองฟูนั้น นิยมตัดให้เป็นชิ้นใหญ่พอสมควร เนื่องจากเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นและเพิ่มโอกาสการเลี้ยงให้อยู่รอด ควรตัดเนื้อเยื่อด้วยขนาดหรือปริมาตรที่สม่ำเสมอ โดยใช้กระดาษกราฟหรือคอร์กบอเรอ (cork borer) เป็นตัวช่วยกะขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
102685

วิธีการอินนอคคูเลตนับว่ามีความสำคัญกล่าวคือ ถ้าเป็นการเลี้ยงเมล็ดหรือส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ควรวางชิ้นส่วนบนอาหารไม่ใช่ในอาหาร เพราะทำให้เซลล์ได้รับออกซิเจนดีขึ้น ถ้าเป็นเนื้อเยื่อพิทหรือส่วนของกิ่ง อาจวางกดในอาหารครึ่งหนึ่งและควรวางตามขั้ว ซึ่งสำคัญต่อการรีเจนเนอเรตของอวัยวะ เพราะยอดมักเกิดทางด้านบน ส่วนรากมักเกิดบริเวณด้านล่างของชิ้นส่วนพืช ดังนั้นการวางตามขั้วทำให้เกิดกิ่งและรากดียิ่งขึ้น

การอินนอคคูเลตชิ้นส่วนพืชทำได้ทั้งในอาหารแข็งซึ่งมีการใส่วุ้น เจลาติน หรือซิลิกาเจล เพื่อช่วยให้แข็ง หรือในอาหารเหลวที่มีทั้งแบบเขย่าตลอดเวลาและแบบไม่เขย่า ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงเมื่อเจริญไปได้ระยะหนึ่งจำเป็นต้องมีการย้ายลงสู่อาหารใหม่เป็นระยะ วิธีการนี้เรียกว่า "การสับคัลเจอร์" การสับคัลเจอร์มีความสำคัญด้วยเหตุผลต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

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

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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียวมีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวทีอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่เกาะกันอย่างหลวมๆเรียกว่า friable callus (รังสฤษฏ์, 2541)

แคลลัส เป็นกลุ่มเซลล์ที่เกิดขึ้นและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ แคลลัสมักจะเกิดจากเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เกิดรอยแผล เช่น ต้นไม้ที่ถูกฟันด้วยมีดหรือของมคมอื่นๆ เนื้อเยื่อรอบๆรอยแผลจะสร้างเซลล์ขึ้นมาเพื่อสมานแผล เนื้อเยื่อที่เกิดมาใหม่นี้ก็คือแคลลัสนั่นเอง ในทำนองเดียวกันเมื่อเรานำชิ้นพืชมาตัดเป็นชิ้นๆแล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารก็จะเกิดแคลลัสขึ้นมาตามบริเวณรอยตัดเหล่านั้นได้ เมื่อเกิดแคลลัสขึ้นมาแล้วเราสามารถทำให้ก้อนแคลลัสนี้เติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นไปได้อีกเรื่อยๆ โดยการเปลี่ยนย้ายใส่อาหารขวดใหม่ และในบางครั้งจากแคลลัสนี้อาจจะเจริญเป็นอวัยวะหรือพืชต้นใหม่ขึ้นมาได้อย่างไรก็ตามระหว่างแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและแคลลัสที่เกิดขึ้นจากรอยแผลตามธรรมชาติก็มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันหลายประการ ทั้งโครงสร้างของเซลล์ การเจริญเติบโต และเมแทบอลิซึม (Torres,1989:73) จากแคลลัสอาจจะนำไปทำเป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) หรือเซลล์เดี่ยว (single cell) และเพาะเลี้ยงต่อไปเพื่อศึกษาการเจริญของพืชหรือสกัดเอาสารที่เป็นประโยชน์หรือกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็นเอ็มบริโอแล้วนำไปทำเป็นเมล็ดเทียมต่อไปได้ (ศิวพงศ์ ,2546)

แคลลัส มีลักษณะดังนี้

1. คล้ายคลึงกับเซลล์พาเรงคิมา ซึ่งไม่มีสีในพืชทั่วๆไป

2. มีรูปร่างหลายแบบ ถ้ายังมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว จะมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเล็ก และถ้าแบ่งเซลล์ลดลง เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และค่อนข้างยาว ถ้าเซลล์หยุดแบ่งตัวจะยืดขยายออกทำให้เซลล์ยาวขึ้นโดยการดูดน้ำเข้าเซลล์

3. มีผนังเซลล์บาง

4. มีการไหลเวียนในไซโทพลาสซึม

5. ไม่ค่อยมีการติดต่อระหว่างเซลล์ที่เรียกว่า พลาสโมเดสมาทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส (รังสฤษฎ์, 2541)

1. ขนาดและรูปร่าง (size and shape) ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงแม้ไม่มีขีดจำกัดหรือข้อวิกฤต แต่ในพืชทั่วไปมักจำเป็นมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดที่ค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป นั่นคือมี critical minimum size ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กกว่านี้แล้วจะไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโทไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มนี้ มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วๆไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินสูง (ออกซิน>ไซโทไคนิน) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ (ออกซิน<ไซโทไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล (ออกซิน=ไซโทไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆนั้นพบว่าออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01-10.0 มก./ล. และไคเนตินซึ่งเป็นไซโทไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มก./ล. ทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

3. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่วๆไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโนเช่น กลูตามิน แอสพาติก อาร์จินิน พิวรีน และไพริมิดิน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าวมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

4. แหล่งของคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และ/หรือแซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4%

5. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยเฉพาะแสงซึ่งต้องการความเข้มข้นต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย (เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการหายใจของเซลล์ด้วย

6. สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักจะเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส (รังสฤษฏ์, 2541)

1. การขยายพันธุ์ (micropropagation) โดยการชักนำให้เป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก

2. การผลิตโปรโตพลาส (protoplast) แคลลัสเหมาะอย่างยิ่งในการชักนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้วและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

3. การผลิตสารที่ได้จากขบวนการเมเทโบลิซึม (secondary metabolite) ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมได้

4. ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploids) โดยใช้สารโคชิซินชักนำ

5. การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน (tolerant and resistant plants) เช่นทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อนและหนาว หรือต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

6. เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (cryopreservation)

การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง (รังสฤษฏ์, 2541)

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ควรมีสภาพเหมาะต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส กล่าวคือเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญที่มีอายุน้อย ในทางปฏิบัตินิยมใช้เนื้อเยื่อจากเมล็ดที่เพาะให้งอกในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบอ่อน ในกรณีของเนื้อยื่อพิเศษ เช่น แคมเบียม เอนโดสเปรอร์มหรือไส้นั้นการเพิ่มจำนวนแคลลัสจะขึ้นอยู่กับช่วงเวลาของการแยกเนื้อเยื่อมาใช้ ตัวอย่างเอนโดสเปอร์มจากเมล็ดข้าวโพด ที่มีอายุเกิน 11 วันหลังจากการถ่ายละอองเกสร มักไม่มีการสร้างแคลลัส ส่วนของลำต้นโดยเฉพาะไม้เนื้อแข็งจะให้ชิ้นส่วนพืชที่ยากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทางปฏิบัติ เช่น อโวกาโด แก้ไขโดยตัดกิ่งด้านข้างให้เกิดบาดแผลซึ่งจะชักนำให้เกิดแคลลัสขึ้นจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อแล้วใช้ โดยทั่วๆไปแล้ว เมล็ดเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการใช้ชิ้นส่วนพืชเพื่อเลี้ยงเป็นแคลลัส เพราะ

1. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยตรง โดยเพาะเมล็ดทั้งเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

2. เมื่อเพาะเมล็ดให้งอกในอาหารวุ้นที่ปราศจาก หรือมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย จะชักนำให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบที่ปลอดเชื้อ ใช้เป็นชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

3. ขณะเดียวกันสามารถแยกเอาส่วนเนื้อเยื่อส่วนของรากและปลายยอด ออกมาจากเมล็ดได้โดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกระตุ้นให้เกิดแคลลัส (ศิวพงศ์ ,2546)

เนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของพืชไม่ว่าจะเป็น เมล็ด เอ็มบริโอ ราก ลำต้น ใบ หรือดอก สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัสได้ทั้งนั้น ส่วนที่เติบโตเป็นแคลลัสได้ดีคือ เอ็มบริโอ ใบเลี้ยงและใบอ่อน ถ้านำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงแล้วไม่เกิดเป็นแคลลัส ก็สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นแบ่งเซลล์แล้สร้างแคลลัสได้โดยใช้ฮอร์โมน ฮอร์โมนที่ใช้ก็คือฮอร์โมนพวกออกซิน ตัวที่นิยมใช้มากคือ 2,4-D และ NAA หรือในพืชบางชนิดอาจจะต้องการไซโทไคนินร่วมด้วยเพื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัส ในบางครั้งมีการเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับออกซินจะช่วยกระตุ้นได้แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Pierik,1987:216) นอกจากนี้การเจริญเติบโตของแคลลัสยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีกหลายประการ ได้แก่ จีโนไทป์ องค์ประกอบของอาหาร สภาวะแวดล้อมทางกายภาพ เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เป็นผลสำเร็จไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง แต่มักขึ้นอยู่กับสภาพของการเพาะเลี้ยงมากกว่า ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงแคลลัสได้ทั้งนั้น และเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของพืชก็สามารถนำมากระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ทุกส่วนเช่นเดียวกัน

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัส นิยมใช้สูตรของมูราชิเกและสคูก หรือดัดแปลงจากสูตรนี้แล้วเติมน้ำตาลทรายหรือกลูโคส 2-4% ในบางครั้งอาจจะเติมแคเซอีนไฮโดรไลเสต สารสกัดจากมอลต์ สารสกัดจากยีสต์ หรือน้ำมะพร้าวลงไปด้วย สาวนประกอบสำคัญคือ ออกซินและไซโทไคนิน ที่เติมลงในอาหาร ออกซินที่นิยมใช้ เช่น IAA ความเข้มข้น 10-5-10-10 M และ NAAความเข้มข้น 10-5-10-10M เนื้อเยื่อบางชนิดต้องการไซโทไคนินด้วย ไซโทไคนินที่ใช้คือ ไคเนทิน ความเข้มข้น 10-7-10-6M ช่วยให้มีประสิทธิภาพในการเกิดแคลลัสได้ดีขึ้น

การเพาะเลี้ยงแคลลัสนิยมเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง สารที่นิยมใช้ทำอาหารแข็งคือวุ้น โดยใช้ความเข้มข้น 6-10 กรัมต่อลิตร พืชบางชนิดต้องการแสงแต่บางกรณีก็อาจจะต้องการความมืด อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการเจริญของแคลลัสอยู่ในช่วง 22-28 องศาเซลเซียส

ผิวนอกของพืชไม่ว่าจะเจริญในสภาพธรรมชาติหรือเจริญในเรือนเพาะชำ หรือในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตก็มักจะมีจุลินทรีย์เกาะอยู่เสมอมากบ้างน้อยบ้าง แต่โดยทั่วๆไป เนื้อเยื่อภายในมักจะปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากว่าเนื้อเยื่อในท่อลำเลียงจะมีจุลินทรีย์เข้าไปโดยไม้แสดงอาการออกให้เห็น ดังนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องเลือกพืชที่มีสุขภาพสมบูรณ์มาเพาะเลี้ยง และจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องล้างทำความสะอาดผิวของชิ้นพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง วิธีการที่ใช้ก็เป็นวิธีการธรรมดาทั่วๆไป เช่นเดียวกับที่ใช้ทำความสะอาดพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วๆไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดและรูปร่างของเอ็กซ์แพลนต์ที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารครั้งแรกไม่ค่อยมีความสำคัญมากนัก จะเป็นขนาดค่อนข้างโตหรือเล็กก็ได้ แต่ถ้าเอ็กซ์แพลนต์มีขนาดใหญ่ก็จะมีจำนวนเซลล์มาก จึงมีโอกาสที่เซลล์จะรอดชีวิตได้มากกว่าใช้เอ็กแพลนต์ขนาดเล็ก

การถ่ายเนื้อเยื่อและเพิ่มจำนวนแคลลัส (ศิวพงศ์ ,2546)

เมื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัสขึ้นมาแล้ว จะนำมาเพาะเลี้ยงต่อไปต้องถ่ายแคลลัสใส่อาหารขวดใหม่ การย้านแคลลัสเข้าไปใส่อาหารใหม่ควรทำเป็นระยะๆ การเติบโตอย่างรวดเร็วของแคลลัสจะใช้อาหารไปจำนวนมาก และมีการปล่อยของเสียออกมาด้วย และทำให้อาหารแห้งลงด้วยจึงต้องมีการย้ายเนื้อเยื่อไปใส่ในอาหารใหม่บ่อยๆ เพื่อไม่ให้แคลลัสหยุดเติบโต ถ้าเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านี้ควรจะเปลี่ยนอาหารใหมาทุกๆ 4-6 สัปดาห์ ถ้าก้อนแคลลัสมีขนาดใหญ่ จำเป็นต้องตัดแบ่งเป็นก้อนเล็กๆ ก่อนที่จะย้ายไปลงในอาหารใหม่ แต่ละชิ้นไม่ควรมีขนาดเล็กมากนัก ถ้าชิ้นเล็กเกินไปอาจจะไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ โดยชิ้นแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด ชิ้นแคลลัสที่ตัดแยกมาจากก้อนแคลลัสที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแล้วมักจะไม่ค่อยเติบโต ไม่เหมือนก้อนแคลลัสที่กำลังมีการเติบโต ซึ่งจะเติบโตได้ดีกว่าในการถ่ายเนื้อเยื่อครั้งแรกควรจะใช้อาหารแข็ง แต่บางกรณีอาจจะถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหารเหลวเลยก็ได้ ถ้าหากว่าในการเปลี่ยนถ่ายอาหารครั้งแรกแคลลัสไม่ค่อยเติบโต ควรจะให้ชิ้นของเนื้อเยื่อเดิมติดไปด้วย อาหารและสภาวะแวดล้อมทางกายภาพในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะเหมือนกันกับอาหารและสภาวะขฯะที่กระตุ้นให้เกิดแคลลัส ยกเว้นปริมาณของออกซินกับไซโทไคนิน ซึ่งอาจจะลดน้อยลงกว่าเดิม แต่ถ้าหากว่าเมื่อถ่ายแคลลัสใส่อาหารใหม่แล้วมันเน่าหรือไม่เติบโต แสดงว่าอาหารใหม่ไม่เหมาะสมกับการเติบโตของมัน บางครั้งต้องเติมกรดอะมิโนลงไปในอาหารด้วย เช่น ไกลซีน อาร์จินิน หรือบางครั้งต้องเติมน้ำมะพร้าวหรือแคเซอีนไฮโดรไลเสต หรือสารสกัดจากมอลต์ ฯลฯ ลงในอาหารเพื่อให้แคลลัสเติบโตต่อไป

คาร์โบไฮเดรตก็จำเป็นต่อการเติบโตของแคลลัสเช่นเดียวกัน คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสคือน้ำตาลซูโครส การใช้น้ำตาลความเข้มข้นระหว่าง 20-60 กรัม/ลิตร ช่วยให้แคลลัสเติบโตได้ดี ความเข้มข้นที่พอเหมาะของน้ำตาลซูโครสต่อการเติบโตของแคลลัสคือ 3% แต่ถ้าใช้น้ำตาลฟรุกโตสจะยับยั้งการเติบโตของแคลลัส

แคลลัสที่เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน จะมีโครงสร้างและการเติบโตแตกต่างกันแคลลัสอาจจะเป็นก้อนมีเซลล์เกาะกันแน่น (คอมแพคต์) หรืออยู่กันหลวมๆ(ไฟรเอบิล) อาจจะอ่อนนุ่มหรือแข็งอาจจะมีสีขาวหรือเหลืองหรือเขียวก็ได้ แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญรวดเร็วมากและเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารไปนานๆ อาจจะไม่ต้องการฮอร์โมนเลย มันก็สามารถเติบโตต่อไปได้เรื่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และความสามารถในการที่จะเจริญเป็นต้นพืชใหม่ก็อาจจะหายไป มันจะเติบโตเป็นแคลลัสต่อไปเรื่อยๆ แคลลัสจะเติบโตในอาหารเหลวได้ดีกว่าในอาหารแข็ง เนื่องจากว่าแคลลัสสัมผัสอาหารและอากาศได้ดีกว่า และถ้าแคลลัสเติบโตบนอาหารแข็งมักจะมีโพลาริตีซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะต่อไป การเติบโตเป็นแคลลัสจึงหยุดลง

การเกิดอวัยวะหรือเอ็มบริโอ (ศิวพงศ์ ,2546)

จากเนื้อเยื่อแคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อของร่างกาย ดังนั้นเมื่อเซลล์เหล่านี้ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่เกี่ยวกับเพศเจริญขึ้นเป็นเอ็มบริโอ จึงเรียกว่า เอ็มบริโอไม่เกี่ยวกับเพศ ซึ่งแตกต่างจากเอ็มบริโอทั่วไปที่เกิดจากไซโกตหรือเรียกว่าไซโกติกเอ็มบริโอ (zygotic embryo) เกิดจากไข่กับสเปิร์มผสมกัน เอ็มบริโอไม่เกี่ยวกับเพศอาจเรียกว่า โครงสร้างที่คล้ายเอ็มบริโอ (embryo-like structure) หรือเอ็มบริออยด์ หรืออาจจะเรียกว่า เอ็มบริโอพิเศษ (adventitious embryo) หรือเวเจเททีฟเอ็มบริโอ (vegetative embryo) ก็ได้ กระบวนการสร้างเอ็มบริโอเช่นนี้เรียกว่า การเกิดเอ็มบริโอไม่เกี่ยวกับเพศ หรือการเกิดเอ็มบริโอแบบไม่อาศัยเพศ (asexual embryogenesis) หรือการเกิดเอ็มบริโอพิเศษ (adventitious embryosis)

ส่วนการสร้างอวัยวะเรียกว่า การเกิดอวัยวะ จากแคลลัสเป็นใบ ราก หรือยอดขึ้นมา โดยไม้ต้องเปลี่ยนเป็นเอ็มบริโอก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.เมล็ดสบู่ดำ

2.สารเคมีต่างๆ

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร (Murashige and Skoog,1962)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ NAA , Kinetin , BA

2.3 น้ำตาล ได้แก่ ซูโครส

2.4 ผงวุ้น

2.5 น้ำกลั่น

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (analytical balance)

3.2 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.3 กระบอกตวง (cylinder)

3.4 บีกเกอร์ (beaker)

3.5 ปิเปต (pipette)

3.6 ขวดแก้ว (bottle) พร้อมฝาปิด

3.7 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

3.8 เครื่องชั่ง (balance)

3.9 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)

4. สารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

4.1 คลอรอกซ์ (Clorox)

4.2 แอลกอฮอล์ 95% (alcohol)

4.3 Teepol

5. เครื่องมือและสารที่ใช้ในการตัดแยกย้ายชิ้นส่วน

5.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)

5.2 มีดผ่าตัด (knives and scalpels)

5.3 ปากคีบ (forceps)

5.4 ตะเกียง (turnel)

5.5 จานแก้ว (peter dish)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.6 ขวดอาหาร (bottle)

6. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอุณหภูมิประมาณ 25 ± 3 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางมีหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว (white light fluorescence) ที่มีแสง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง

7. ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ

8. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับถ่ายรูป กล้อง กระดาษสี

วิธีการ

การเตรียมอาหาร

1. ชั่งสารเคมีต่างๆตามสูตร (Murashige and Skoog,1962) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) เพื่อสะดวกในการใช้เตรียมอาหารแต่ละครั้ง

2. เตรียมกระบอกตวงปริมาตร 1000 ml แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 500 ml

3. ดูดสารละลายจาก stock solution ต่างๆ มารวมกัน โดยมีสูตรอาหารดังต่อไปนี้

Stock ที่ 1	20 ml/l
Stock ที่ 2	10 ml/l
Stock ที่ 3	10 ml/l
Stock ที่ 4	10 ml/l
Stock ที่ 5	10 ml/l

4. ปรับปริมาตรสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละสูตรด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

5. เทสารละลายในข้อ 4 ลงในหม้อ แล้วใส่น้ำตาลลงไป 30 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปต้ม เมื่อน้ำเริ่มเดือดใส่ผงวุ้นที่ละลายน้ำในบีกเกอร์แล้วประมาณ 8 กรัมต่อลิตร ลงไป คนให้เข้ากัน

6. ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยใช้ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.025, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 mg/l Kinetin ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0 และ 3.0 mg/l BA ความเข้มข้น 1 mg/l ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml

7. เทวุ้นลงในบีกเกอร์ที่ใส่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในข้อ 6

8. ปรับความเป็นกรดเป็น-ด่าง (pH) ของสารโดยใช้ ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของอาหารเป็น 5.8

9. บรรจุอาหารลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปิดฝาให้สนิท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อนำมาเลี้ยงพืชทดสอบ

การฟอกฆ่าเชื้อ

1. นำเมล็ดสบู่ดำจำนวน 150 เมล็ดมาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก

2. ใส่สารละลายคลอรอกซ์ 10 % และหยด Teepol ลงไปประมาณ 2-3 หยด ในขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3. นำเมล็ดสบู่ดำที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก แล้วมาใส่ลงในขวดน้ำกลั่นที่มีสารละลายคลอรอกซ์ และ Teepol ในข้อ 2

4. เข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที

5. นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง

การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส

1. นำเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ดังนี้

อาหารสูตรที่ 1	MS + NAA	0	มิลลิกรัมต่อลิตร
อาหารสูตรที่ 2	MS + NAA	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร
อาหารสูตรที่ 3	MS + NAA	0.0625	มิลลิกรัมต่อลิตร
อาหารสูตรที่ 4	MS + NAA	0.125	มิลลิกรัมต่อลิตร
อาหารสูตรที่ 5	MS + NAA	0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
อาหารสูตรที่ 6	MS + NAA	0.50	มิลลิกรัมต่อลิตร
อาหารสูตรที่ 7	MS + NAA	0.75	มิลลิกรัมต่อลิตร
อาหารสูตรที่ 8	MS + NAA	1	มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์

การชักนำให้เกิดแคลลัส

1. หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์เมล็ดพัฒนาเป็นต้น เลือกเอาเฉพาะขวดที่เกิดต้น และต้นมีขนาดใกล้เคียงกัน มาตัดเอาเฉพาะส่วนโคนต้น

2. นำมาเลี้ยงลงในอาหารสูตรเดิม คือ สูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อให้เกิดเป็นแคลลัส

3. ไว้ในสภาพที่มีแสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. บันทึกการเจริญเติบโต การเกิดแคลลัส และระดับคะแนนการเกิดแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มจำนวนแคลลัส

1. นำแคลลัสที่มีลักษณะสีเขียวเกาะกันแน่นมาตัดแบ่งออกให้มีขนาดที่พอเหมาะ
2. นำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส
3. ไว้ในสภาพที่มีแสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์
4. บันทึกการเจริญเติบโต การพัฒนา และขนาดของแคลลัส

การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น

1. นำแคลลัสที่เจริญเติบโตดีมาเปลี่ยนลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับดังนี้

- ความเข้มข้นของ Kinetin เป็น 0.00 มิลลิกรัม/ลิตร
- ความเข้มข้นของ Kinetin เป็น 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร
- ความเข้มข้นของ Kinetin เป็น 2.00 มิลลิกรัม/ลิตร
- ความเข้มข้นของ Kinetin เป็น 3.00 มิลลิกรัม/ลิตร

2. แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มีแสงสว่าง เป็นเวลา 3 สัปดาห์เพื่อชักนำให้แคลลัสเป็นต้น
3. บันทึกผลการทดลอง แล้วจัดแสดงผลการเจริญเติบโตและการพัฒนาของแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่มี NAA ความเข้มข้นต่างๆ

การเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำลงในอาหารสูตร MS+ NAA ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารทุกสูตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำ ไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส แต่กลับพัฒนาเป็นต้นทุกสูตร คือ ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร พัฒนาไปเป็นต้นหมด เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 1) และแต่ละสูตรอาหารลักษณะของต้นสบู่ดำจะมีการพัฒนาที่แตกต่างกันออกไป (ภาพที่ 1) โดยที่ความเข้มข้นที่ 0 mg/l เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ เมล็ดสบู่ดำจะยังไม่มีการพัฒนาเป็นต้น เนื่องจากเมล็ดที่นำมาฟอกและเพาะเลี้ยงเป็นเมล็ดที่เก็บมาจากต้นใหม่ๆ เมล็ดมีระยะพักตัวจึงทำให้ไม่เกิดต้น ความเข้มข้น 0.025 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เมล็ดสบู่ดำมีการพัฒนาไปเป็นต้นเล็กน้อย ความเข้มข้น 0.0625 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร มีการพัฒนาไปเป็นต้นดีกว่าความเข้มข้น 2.50 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เล็กน้อยและเริ่มมีใบแตกออกมาจากเมล็ด ความเข้มข้น 0.125 ,0.25 และ 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร ต้นมีการพัฒนาที่ดีกว่าสูตรที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ต้นสูงและมีขนาดใหญ่กว่าทุกสูตร แต่ใบยังไม่โผล่ออกมาจากเมล็ดเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการพัฒนาของเมล็ดสบู่ดำ บนอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA ในความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นระดับคะแนน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังนี้

ระดับความเข้มข้นของ	การพัฒนาเป็นต้นของเมล็ดสบู่ดำ (ระดับคะแนน)			
NAA (mg/l)	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	0	0	0	0
0.025	0	0	0	1
0.0625	0	0	0	1.5
0.125	0	0.5	1	2
0.25	0	0.5	1	2
0.5	0	0	0	1.5
0.75	0	0.5	1	2
1	0	0	0	1

หมายเหตุ

ระดับคะแนน 0 = ไม่มีการพัฒนาเป็นต้น

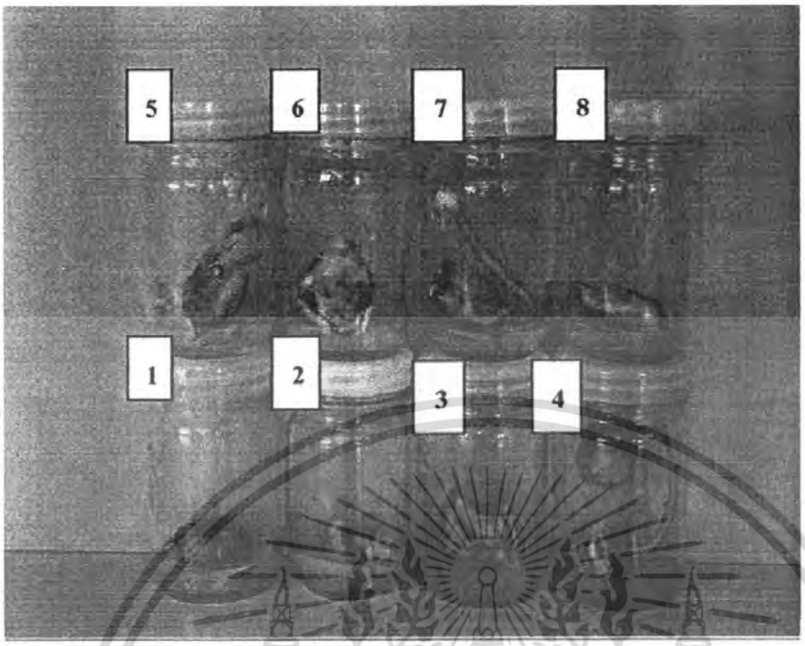
ระดับคะแนน 1 = พัฒนาเป็นต้นเล็กน้อย

ระดับคะแนน 2 = พัฒนาเป็นต้นดี

ระดับคะแนน 3 = พัฒนาเป็นต้นดีมาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ

1	อาหารสูตรที่ 1 (NAA 0	มิลลิกรัม/ลิตร)
2	อาหารสูตรที่ 2 (NAA 0.025	มิลลิกรัม/ลิตร)
3	อาหารสูตรที่ 3 (NAA 0.0625	มิลลิกรัม/ลิตร)
4	อาหารสูตรที่ 4 (NAA 0.125	มิลลิกรัม/ลิตร)
5	อาหารสูตรที่ 5 (NAA 0.25	มิลลิกรัม/ลิตร)
6	อาหารสูตรที่ 6 (NAA 0.50	มิลลิกรัม/ลิตร)
7	อาหารสูตรที่ 7 (NAA 0.75	มิลลิกรัม/ลิตร)
8	อาหารสูตรที่ 8 (NAA 1	มิลลิกรัม/ลิตร)

ภาพที่ 1 แสดงการพัฒนาเป็นต้นของเมล็ดสบู่ดำภายหลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนที่ 2 การชักนำให้เกิดแคลลัส

ภายหลังจากการนำเมล็ดสบู่ดำเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วเมล็ดสบู่ดำได้เกิดการพัฒนาเป็นต้นขึ้นมา ดังนั้นจึงได้ตัดเอาตรงส่วนบริเวณโคนต้นสบู่ดำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยทำการเพาะเลี้ยงลงในอาหารสูตรเดิม คือ MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0 ,0.025 ,0.0625 ,0.125 ,0.25 ,0.50 ,0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสลงในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีการพัฒนาเป็นแคลลัสดีที่สุด ลักษณะสีของแคลลัสค่อนข้างเขียว ความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส ความเข้มข้น 2.50 และ 0.0625 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสมีการพัฒนาเล็กน้อย ลักษณะสีของแคลลัสมีสีเขียวอ่อน ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสมีการพัฒนาค่อนข้างดี ลักษณะสีของแคลลัสมีสีเขียว และที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาที่ดี (ตารางที่ 2) ที่แสดงถึงระดับคะแนนการเกิดแคลลัส บนอาหารสูตร MS+NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน และ (ภาพที่ 2) เป็นการแสดงภาพในการให้ระดับคะแนนการพัฒนาแคลลัสของสบู่ดำ (ภาพที่ 3-6) เป็นภาพที่แสดงถึงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-4

ตารางที่ 2 แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำ บนอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA ในความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เป็นระดับคะแนน ดังนี้

ระดับความเข้มข้นของ	การพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำ (ระดับคะแนน)			
NAA (mg/l)	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	0	0	0	0
0.025	0	0	0	0.25
0.0625	0	0	0.25	0.75
0.125	0.25	0.5	0.75	1
0.25	0.25	0.75	1	1
0.5	0.5	1	1.5	2.5
0.75	1	1	2.5	3
1	1	1.5	2.5	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

ระดับคะแนน 0 = ไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส

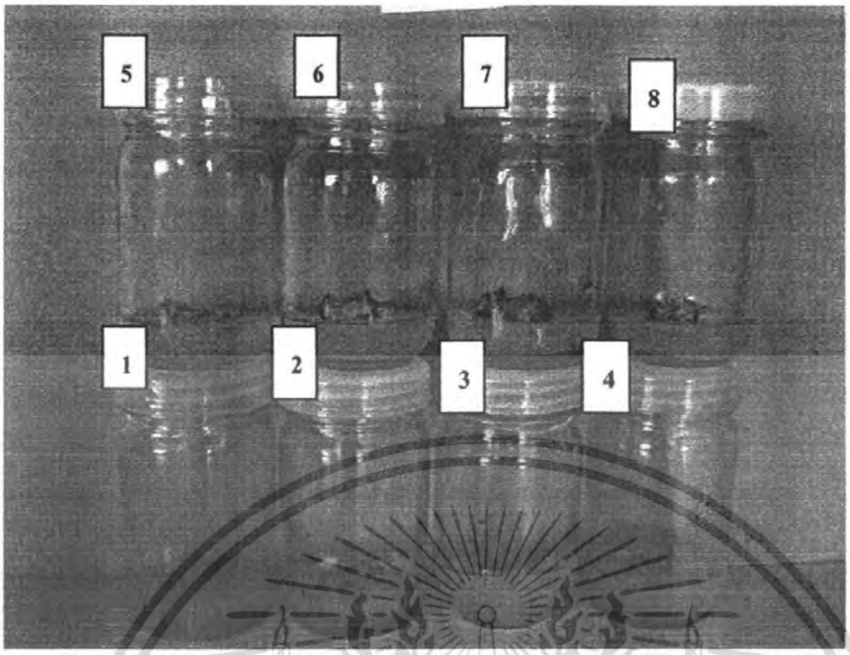
ระดับคะแนน 1 = มีการพัฒนาเป็นแคลลัสเล็กน้อย

ระดับคะแนน 2 = มีการพัฒนาเป็นแคลลัสดี

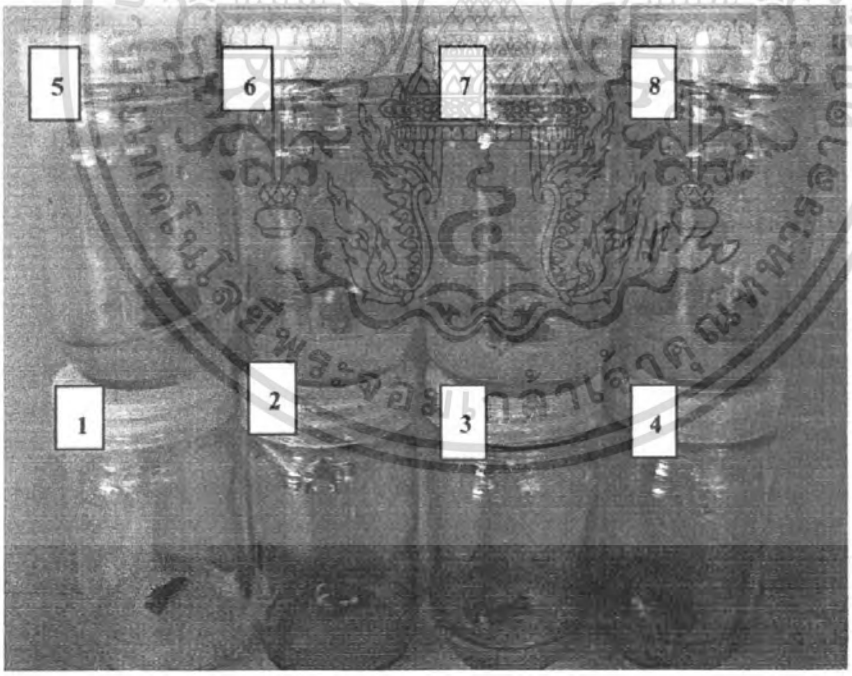
ระดับคะแนน 3 = มีการพัฒนาเป็นแคลลัสดีมาก

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการให้คะแนนการเกิดแคลลัสของสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

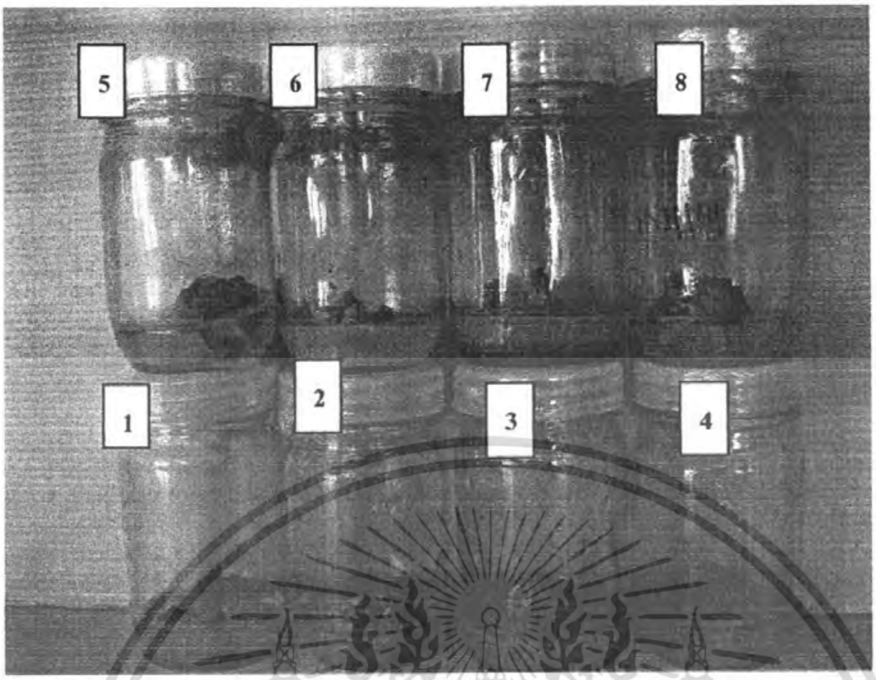


ภาพที่ 3 แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำเมื่อเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

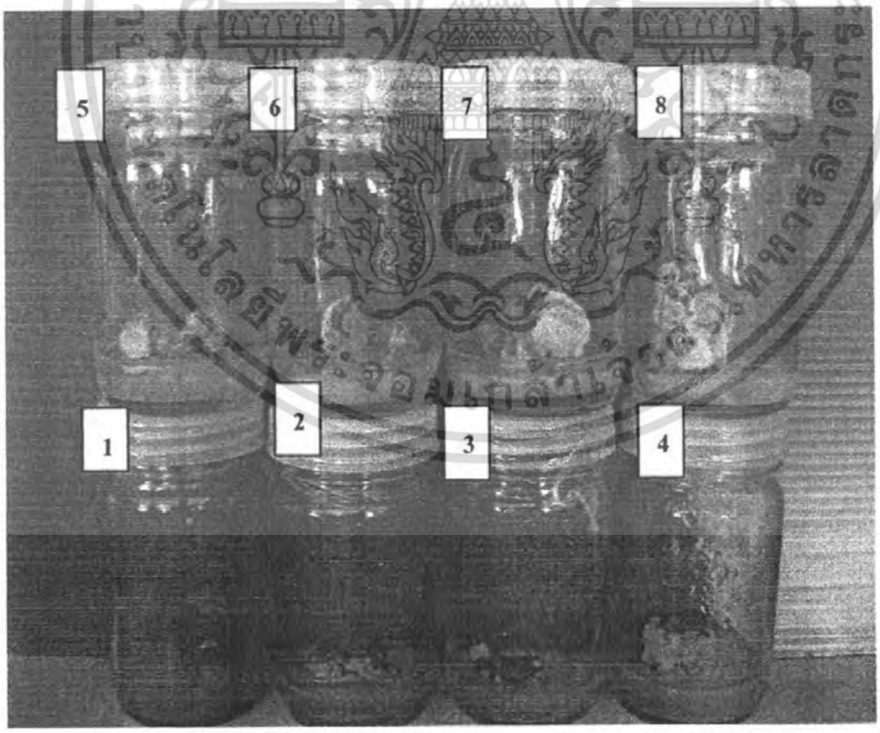


ภาพที่ 4 แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำเมื่อเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 3 สัปดาห์



ภาพที่ 6 แสดงการพัฒนาเป็นแคลลัสของสบู่ดำเมื่อเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนที่ 3 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

การเพิ่มแคลลัสของสบู่ดำ หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสคือ สูตร MS ที่มี NAA ความเข้มต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสให้เพียงพอในสูตรอาหาร MS+BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา (ตารางที่ 3) ที่แสดงถึงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสสบู่ดำ และ (ภาพที่ 7) เป็นภาพที่แสดงถึงลักษณะของแคลลัสสบู่ดำภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง MS+BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีลักษณะแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น มีสีเขียว

ตารางที่ 3 แสดงการพัฒนาของแคลลัสภายหลังการ subculture ครั้งแรกลงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
BA (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(เซนติเมตร)
1	2.3	2.4	2.5	2.5	2.7	3	3	2.8	2.6	2.9	2.67

ภาพที่ 7 แสดงการพัฒนาของแคลลัสภายหลังการ subculture ครั้งแรกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนที่ 4 การเพาะเลี้ยงแคลลัสของสบู่ดำในในอาหารสูตรที่มี Kinetin

ทำการทดลองโดยการเปลี่ยนอาหาร (subculture) ครั้งที่สองของหลังจากที่ได้มีการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งเปลี่ยนอาหารเป็นสูตร MS ที่มี Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0 ,1.0 ,2.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และเก็บไว้ในที่มีแสงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ปรากฏผลดังตารางที่ 4 พบว่าสูตรอาหารที่มี Kinetin 0 ,1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นรากและต้น (ภาพที่ 8.1) แคลลัสมีลักษณะสีเขียวเกาะกันแน่น ส่วนสูตรที่มี Kinetin 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสมีการพัฒนาเป็นราก (ภาพที่ 8.2) Kinetin 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นรากในระยะเวลา 2 สัปดาห์

ตารางที่ 4 แสดงผลการเกิดและพัฒนาของแคลลัสในอาหารสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย Kinetin ที่มีความเข้มข้นในระดับที่ต่างกัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์

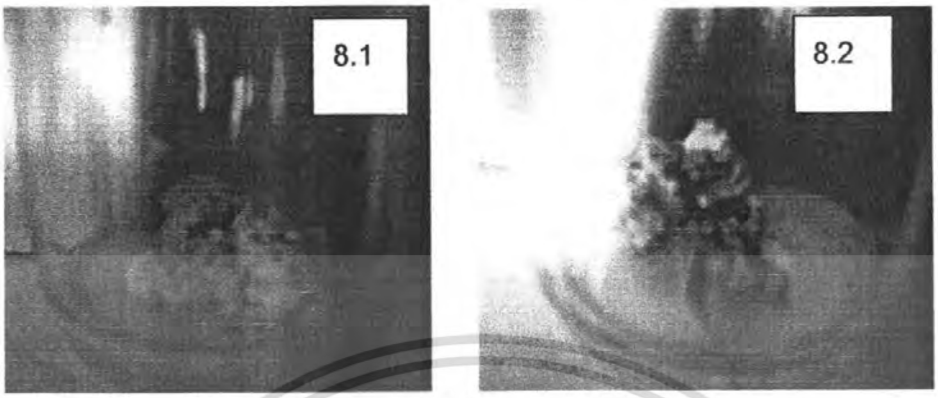
ความเข้มข้นของ	การเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของแคลลัส		
Kinetin (mg/l)	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์
0	C	C	C
1	C	C	C
2	C	C	C
3	C	R	R

หมายเหตุ

C = แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นและราก

R = แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 แสดงการพัฒนาของแคลลัสสบู่ดำในอาหารสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย Kinetin ที่มีความเข้มข้นใน ระดับที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ภาพที่ 8.1 แสดงถึงผล C แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นและราก

ภาพที่ 8.2 แสดงถึงผล R แคลลัสที่มีการพัฒนาไปเป็นราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดสบู่ดำแล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ในัดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสแต่พัฒนาเป็นต้นแทน โดยที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมล็ดจะไม่มีการพัฒนาเป็นต้น เนื่องจากว่า เมล็ดที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อเป็นเมล็ดแห้งที่เก็บมาจากต้นใหม่ๆ ทำให้เมล็ดมีระยะพักตัว เมื่อใส่ NAA ลงไปในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเมล็ดสบู่ดำมีการพัฒนาเป็นต้น เนื่องจาก NAA อาจไปทำลายระยะพักตัวของสบู่ดำ

การเพาะเลี้ยงแคลลัสในชิ้นส่วนของสบู่ดำ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มี NAA ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตรที่มี NAA 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส ในขณะที่สูตรที่มี NAA ระดับต่ำจะมีการพัฒนาของแคลลัสได้น้อย เนื่องจากฮอร์โมนมีปริมาณน้อยเกินไป จึงไม่เพียงพอต่อการพัฒนาของแคลลัส

หลังจากการเลี้ยงแคลลัสนาน 4 สัปดาห์ ทำการ subculture โดยย้ายแคลลัสไปไว้ในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าปริมาณของแคลลัสเพิ่มได้น้อย ซึ่งการตัดแบ่งแคลลัสนั้นมีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสด้วย โดยแคลลัสไม่ควรมีขนาดเล็กเกินไป ถ้าเล็กเกินไปอาจไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ศิวพงศ์,2546)

การทดลองเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรที่มี Kinetin 0 ,1.0 ,2.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าสูตรที่มี Kinetin 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นรากได้ดีกว่าสูตรอื่น เพราะไซโตไคนินทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ควบคุมการเกิดอวัยวะ (พรทิพย์, 2528) และการที่แคลลัสมีการเจริญเติบโตได้ก็เพราะ Kinetin มีคุณสมบัติส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในระยะ S-G2 ของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส ในสภาพที่มีแสงจะเกิดแคลลัสได้ดีกว่าสภาพมืด โดยแสงที่ให้เพื่อช่วยในการพัฒนารากหรือต้น (Jenet และ Seabrook ,1980) และถ้าใช้ Kinetin ในระดับที่สูงขึ้นกว่านี้ อาจทำให้การพัฒนาเป็นต้นและรากดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำ ภายหลังจากการฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อชักนำให้เมล็ดเกิดเป็นแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสแต่กลับมีการพัฒนาเป็นต้นแทน อาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมล็ดไม่มีการพัฒนาเป็นต้น เนื่องจากว่า เมล็ดสบู่ดำที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อเป็นเมล็ดแห้งที่เก็บมาจากต้นใหม่ๆจะมีการพักตัว การใส่ NAA ลงไปในระดับความเข้มข้นต่างๆ จะไปทำลายระยะพักตัวของสบู่ดำทำให้ การใส่ NAA ที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ เมล็ดมีการพัฒนาเป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเมล็ดสบู่ดำ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ในระดับความเข้มข้น 0 , 0.025 ,0.0625 ,0.125 ,0.25 ,0.50 ,0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า อาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 0.75 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งแคลลัสจะมีลักษณะการพัฒนาที่ดีกว่าความเข้มข้นในระดับอื่นๆ โดยแคลลัสจะมีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น มีสีเขียวอ่อน ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/ลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส และหลังจากนั้นได้ทำการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร MS+BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น มีสีเขียว และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.67 เซนติเมตร

ส่วนการเพาะเลี้ยงสบู่ดำในอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ 0 ,1.0 ,2.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร เก็บไว้ในที่มีแสงสว่างเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0 ,1.0และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสเกาะกลุ่มกันแน่น สีเขียว ไม่มีการพัฒนาเป็นต้นและราก ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

บุญยืน กิจวิจารณ์.2540.เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยมหิดล.214 หน้า.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์.2537.การปลูกและการดูแลรักษาสบู่ดำ.สำนักพิมพ์เพชรกะรัต.กรุงเทพฯ. 76 หน้า.

พรทิพย์ ธนูทอง.2528.วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ.มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.112 หน้า.

พีรเดช ทองอำไพ.2529.ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์.ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.224 หน้า.

รงรอง วิเศษสุวรรณ.2542.เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่องเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นพื้นฐาน.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.นครปฐม.198 หน้า.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ.2540.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:หลักการและเทคนิค.กรุงเทพฯ.สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.219 หน้า.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์.2546.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.158 หน้า.

ศิรินทร์ สาธุสินประเสริฐ.2547.ผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนขิงข้าวหอมนิลและข้าวหอมกุหลาบดำ.ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชไร่ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.35 หน้า.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์.2526.ฮอร์โมนพืช.ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.128 หน้า.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อารีย์ วิรัญญูวัฒก์.2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อติสรรค์. กรุงเทพฯ. 133 หน้า.

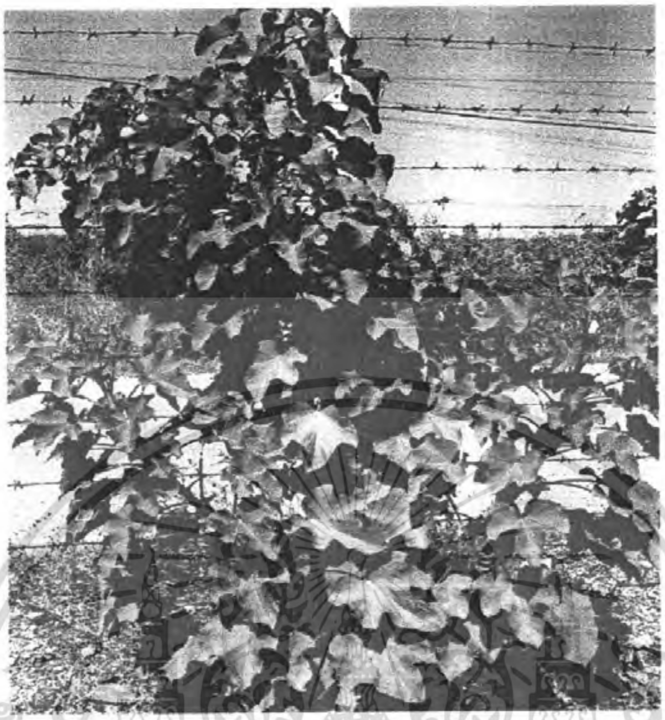
Jenet,R.A.Seabrook.1980.Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.).Plant cell Physiol.33:577-583.

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช.15 มกราคม 2551. http://my.dek-d.com/Writer/Story/viewlongc.phd?id=223518&chapter=8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

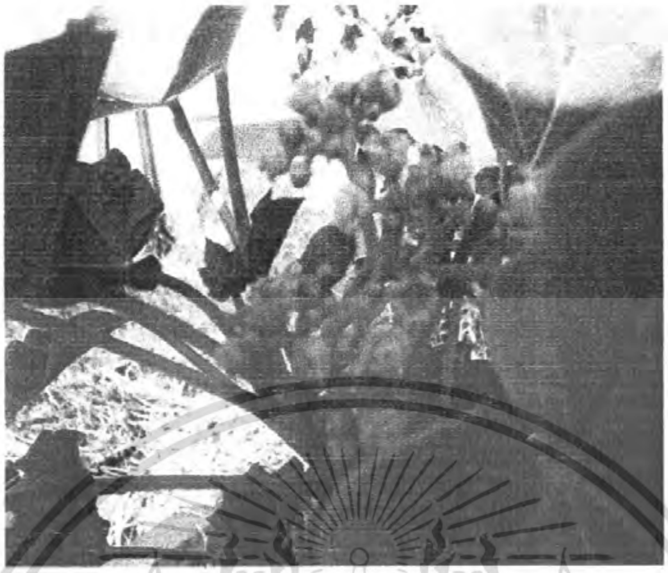
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 แสดงลักษณะต้นของสบู่ดำ

ภาพผนวกที่ 2 แสดงลักษณะใบของสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

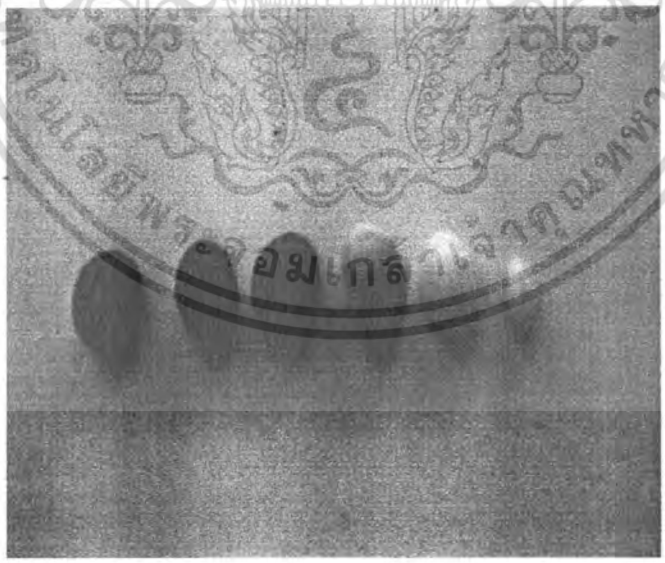


ภาพผนวกที่ 3 แสดงลักษณะดอกของสบู่ดำ

ภาพผนวกที่ 4 แสดงลักษณะผลของสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 5 แสดงลักษณะผลแก่ของสบู่ดำ



ภาพผนวกที่ 6 แสดงลักษณะเมล็ดของสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวเรณู สามเณร
วัน/เดือน/ปีเกิด	21 ตุลาคม 2528
ที่อยู่ตามทะเบียนบ้าน	163 หมู่ 7 ต.หนองบุนนาก อ.หนองบุญมาก จ.นครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30410
โทรศัพท์	089-0205024
ที่อยู่ปัจจุบัน	163 หมู่ 7 ต.หนองบุนนาก อ.หนองบุญมาก จ.นครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30410

ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ.2535-2541	ระดับประถมศึกษา โรงเรียนเทียมนครวิทยา จังหวัดนครราชสีมา
ปี พ.ศ.2541-2544	ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเทียมนครวิทยา จังหวัดนครราชสีมา
ปี พ.ศ.2544-2547	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนหนองบุนนากพิทยาคม จังหวัดนครราชสีมา
ปี พ.ศ.2547-2551	ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้