สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนต้นสบู่ดำ

The Suitable Medium for Propagation of Physic Nut

T 102736

โดย

นางสาวรุ่งอรุณ รุนรา

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เพื่อความอุดมสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่)

พุทธศักราช 2550

สน.
ร 6496
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 102736
วัน,เดือน,ปี 18 ส.ค. 2552

b.19204099x
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนต้นของสบู่ดำ

The Suitable Medium for Propagation of Physic Nut

โดย

นางสาวรุ่งอรุณ รุนรา

ได้พิจารณาเห็นชอบ

.....

(อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรอง

.....

(รศ.ดร. สมยศ เดชภิรัตนมงคล)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ ๑๘ เดือน มีนาคม พ.ศ.๒๕๕๑

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนต้นสบู่ดำ
โดย : นางสาวรุ่งอรุณ รุนรา
ภาควิชา : เทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยนำยอดสบู่ดำมาเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่ประกอบด้วย 1/2 MS ร่วมกับ BA ในความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mg/l โดย subculture ทั้งหมด 2 ครั้ง ใช้เวลาในการสังเกตุการเจริญเติบโตครั้งละ 30 วัน โดยแต่ละครั้งจะทำการบันทึกผลการเพิ่มจำนวนต้นและปริมาณ แคลัสที่เพิ่มขึ้นทุกครั้ง พบว่าสบู่ดำที่ subculture มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่มี BA 0.5 mg/l เป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนต้นของสบู่ดำ แต่พบว่าการใช้อาหารสูตรที่มี BA มีการเจริญเติบโตของแคลัสเกิดขึ้น ทุกอัตราที่ใช้

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, สบู่ดำ ,สูตรอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : The Suitable Medium for Propagation of Physic Nut.
Anothor : Miss Rungarun Runra
Department : Plant Production Technology
Faculty : Agricultural of Technology
Advisor : Mr. Vichai Limkarchanaphong

ABSTRACT

The appropriate *in vitro* multiple shoot was induction medium for physic nut (*Jatropra curcas* Linn.) . The experiment was tested by using medium (MS) with of 1/2 MS and in combination with BA . After that , these explants were culture for 2 subcultures. Which their age were 30 days of each subculture in differential concentration of BA with 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/l . Consequently,explant could be better propagating and growing in BA 0.5 mg/l . but calluses could be better growing and propagating in medium which every BA concenration.

Key word : tissue culture, physic nut ,medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือทั้งในด้านความรู้ หนังสือค้นคว้า อุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งสถานที่ทำการศึกษาทดลองและยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลองตลอดเวลา

กราบขอบพระคุณพ่อแม่ที่ให้การสนับสนุนในทุกๆด้านไม่ว่าจะเป็นค่าใช้จ่ายหรือความสะดวกในการเดินทางไปศึกษาข้อมูลนอกสถานที่

ขอบพระคุณ พี่จันทร์ ที่ช่วยเหลือเรื่องทุกอย่างตั้งแต่เรื่องการเตรียมอาหารไปจนถึงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

รุ่งอรุณ รุนรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
สารบัญภาคผนวก	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	21
ผลการทดลอง	24
วิจารณ์	32
สรุป	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	35
ประวัติผู้เขียน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงใน ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA ในความเข้มข้นต่างกันครั้นแรก เมื่ออายุ 30 วัน	24
2	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explant ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS +BA ในระดับความเข้มข้นต่างกัน โดย subculture ลงในอาหารสูตรเดิม เมื่ออายุ 30 วัน หลัง subculture ครั้งที่ 2	26
3	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จากexplant ที่เลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน	28
4	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำจาก explant ที่เลี้ยงในอาหารสูตรเดิม หลัง subculture ครั้งที่ 2	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	25
2	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA โดย subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน	27
3	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลัสสบู่ดำ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในอาหารสูตรต่างๆ ครั้งแรก เป็นเวลา 30 วัน	29
4	แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลัสสบู่ดำ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA โดย subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการให้ระดับคะแนนการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนต้นของสบู่ดำในอาหาร ½ MS +BA ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์	36
2	แสดงระดับการให้คะแนนการเจริญเติบโตของแคลัสสบู่ดำในอาหาร 1/2 MS+BA ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์	37
3	แสดงลักษณะต้นสบู่ดำ	38
4	แสดงลักษณะเมล็ดสบู่ดำ	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

สภาวะน้ำมันแพงเป็นวิกฤตของคนไทยในยุคปัจจุบัน โดยเป็นผลมาจากราคาน้ำมันในตลาดโลก ซึ่งรัฐบาลไม่สามารถควบคุมได้ จึงควรมีการนำพืชที่สามารถสกัดน้ำมันมาใช้ทดแทน

น้ำมันสบู่ดำเป็นผลผลิตจากเมล็ดสบู่ดำซึ่งเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเชื้อเพลิงใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลหลายประการ โดยกรมวิชาการเกษตรได้มีแนวคิดให้นำสบู่ดำมาผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งในขณะนี้ได้มีการทดลองปลูกสบู่ดำในหลายสายพันธุ์ตามพื้นที่ไร่นาของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งทดสอบและสาธิตให้เกษตรกรใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ทางการเกษตร ซึ่งไม่พบว่ามีผลเสียต่อเครื่องยนต์แต่ประกาใด นอกจากนี้การสกัดน้ำมันสบู่ดำ สามารถใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องนำไปผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงเหมือนกับไบโอดีเซลที่ได้จากพืชอื่น

อย่างไรก็ตามในช่วงนี้ต้องรอผลสรุปวิจัยอีกครั้งหนึ่งว่าจะหาสายพันธุ์ใดที่เหมาะสมซึ่งต้องการสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงถึงไร่ละ 1 กิโลกรัมต่อต้นต่อปีจึงจะคุ้มค่า ซึ่งถ้าหากมีการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตสูงขึ้นการขยายโคลนเหล่านั้นให้ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้จึงเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด

วัตถุประสงค์

1.เพื่อนำต้นสบู่ดำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

2.เพื่อเพิ่มจำนวนต้นทวีคูณของสบู่ดำ

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 รูปหัวใจกว้างถึงรูปไล่ 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 โดยประมาณ ปลายกลม ด้านในมีขนยาวห่าง มีต่อมน้ำหวานที่โคนกลีบด้านใน เกสรตัวผู้มี 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 เนื่องจากสบู่ดำมีประโยชน์หลากหลายทั้งด้านอุตสาหกรรม ยารักษาโรค หลายประเทศจึงนิยมนำสบู่ดำไว้ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ประเทศทราแวนเกอร์ (Travancore) จะนำเมล็ดสบู่ดำมาคั่วบดกับน้ำอ้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เป็นผงใช้แก้อาการปวดท้องและแก้พิษ 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

1.เชื้อเพลิงเอธานอล หรือแก๊สโซฮอล์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในรถยนต์นั้น 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 หรือเอธานอลจนเกิดเป็นสารเอสเทอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล 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

2.น้ำมันที่สกัดได้จากสบู่ดำมีคุณค่าสูงกว่าการนำไปใช้เป็นพืชพลังงานทั่วไป เนื่องจากสบู่ดำมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง เหมาะสำหรับการใช้งานในเครื่องยนต์หรือเครื่องจักรขนาดใหญ่ที่ต้องใช้ความเร็วต่อรอบสูง เช่น ใช้เป็นน้ำมันหล่อลื่นในรถแข่ง เครื่องจักรขนาดใหญ่ที่ใช้ในโรงพิมพ์ซึ่งน้ำมันสังเคราะห์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติพิเศษนี้

3.น้ำมันสบู่ดำดีกว่าน้ำมันปาล์มเพราะมีจุดแข็งตัวที่ -7 องศาเซลเซียส ใช้กับรถไถนาเดินตาม เครื่องยนต์ดีเซลได้ผลดี แต่มีความหนืดที่สูงกว่าน้ำมันดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช

5.การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากแคลลัสในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา

6.การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

ในปีเดียวกันนี้เอง De Fcssard (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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 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

3.การเพาะเลี้ยงแคลลัส (cullius 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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

การเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืช

เมื่อเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชตั้งตัวได้ในสภาพปลอดเชื้อ จุดประสงค์ต่อไป คือ การเพิ่มจำนวนของยอด พืชบางชนิดจะเกิดรากในอาหารพื้นฐานเช่นเดียวกับกิ่งปักชำเล็ก ๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการเนื่องจากว่าควรมีการเจริญเพิ่มปริมาณยอดก่อน พืชบางชนิดผลิตยอดจำนวนมากโดยไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ดังนั้นการใช้อาหารจึงควรพิจารณาระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชต้องการ ลักษณะของการเพิ่มจำนวน

การทำให้แตกยอดจำนวนมากทำได้หลายวิธี

-ปลายยอดมีการเจริญยืดยาวเป็นข้อและปล้องตัดแต่ละข้อไปขยายพันธุ์ได้

-ตาข้างผลิตยอด ยอดดังกล่าวผลิตจากตาบริเวณซอกใบทำให้ได้ยอดจำนวนมาก

-พืชหลายชนิดสร้างราก ยอด หัวจากชิ้นส่วนพืชซึ่งปกติไม่สร้างอวัยวะดังกล่าววิธีการนี้เรียกว่า organogenesis เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพกว่า 2 แบบแรก ตัวอย่าง เช่น ใบ 1 ใบสามารถผลิตตาและยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมากแต่ละต้นจะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ

-การสร้างเอ็มบริออยด์ (somatic embryogenesis) เป็นวิธีที่มีศักยภาพมากที่สุดในการขยายพันธุ์ โดยขั้นแรกเซลล์เดี่ยวจะผลิตเอ็มบริออยด์ และพัฒนาไปเป็นต้น การสร้างเอ็มบิรออยด์เกิดได้ทั้งในเซลล์แขวนลอยหรือการเลี้ยงแคลลัส การชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริออยด์ต้องใช้อาหารที่มีไนโตรเจนต่ำกว่าปกติ

โดยทั่ว ๆ ไปอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (media used) ปกติแล้ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำการเกิดยอด (shoot initiation) และเพิ่มจำนวนยอด (shoot multiplication) สามารใช้อาหารที่มีส่วนประกอบหรืออาจใช้สูตรอาหารที่ใกล้เคียงกันได้ แต่เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนมีความต้องการกระตุ้นจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และ ไซโตไคนิน ทั้งนี้ผันแปรขึ้นกับชนิดของพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน และระดับหรือสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง2ชนิดที่ใช้ในสูตรอาหารมีข้อสังเกตสำคัญคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนิน > ออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด (shootformation)

- ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซิน >ไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเกิดราก (rootinduction)

อย่างไรก็ตามในกรณีการสร้างยอดและกระตุ้นการแตกกิ่งข้าง สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดนี้จะต้องมีอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ยกเว้นในพืชบางชนิดที่อาจต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ในทางปฏิบัติต้องมีการทดสอบหาสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม

นอกจากนี้หลังจากผลิตยอดได้จำนวนมากพอแล้ว จำเป็นต้องให้ยอดเหล่านี้ได้รับสภาพที่เหมาะสมเพื่อเกิดการยืดตัวของยอด โดยเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต การเติมจิบเบอเรลลินในอาหารมีผลช่วยทำให้ปล้องยืดยาวขึ้นได้ ถ้ายอดมีการผลิตได้มีปล้องยาวพอแล้วก็ไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนนี้

จำนวนพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะแตกต่างไปตามสภาพที่เลี้ยง และชนิดของพืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชเพียงชิ้นเดียวต่อปี ขึ้นอยู่กับอัตราการขยายพันธุ์และจำนวนครั้งที่มีการถ่ายเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อต่างๆหรือแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเมื่อเจริญเติบโตไปได้ระยะหนึ่งจำเป็นต้องมีการย้ายลงสู่อาหารใหม่เป็นระยะๆ เพื่อเพิ่มปริมาณ วิธีการนี้เรียกว่า การซับคัลเจอร์ (Subculture)

การซับคัสเจอร์ควรทำสม่ำเสมอโดยทำเป็นช่วงๆ เช่น ทุก 4-6 สัปดาห์ ภายหลังการซับคัสเจอร์พบว่าแต่ละชิ้นของแคลลัสเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นใหม่ บางครั้งอาจพบว่าการเจริญของแคลลัสลดลงในระยะแรกหลังจากย้ายชิ้นส่วนเดิมออกไป เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารไม่สมดุลกับสารที่ช่วยในการเจริญที่ได้จากชิ้นส่วนเดิม

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนต้น

สารควบคุมการเจริญเติบโต(Plant growth Regulator) หรือฮอร์โมน พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับฮอร์โมน 2 กลุ่มคือ ออกซิน และไซโตไคนิน ทั้งนี้ผันแปรกับชนิดพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช และระดับหรือสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในสูตรอาหาร ซึ่งมีข้อสังเกตสำคัญคือ

1. ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนิน > ออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด (shoot formation)

2. ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซิน > ไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดราก (root differentiation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามในกรณีการสร้างยอด (adventitious shoot formation) และกระตุ้นการแตกกิ่งข้าง (enhanced axillary branching) ฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้จะต้องมีอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ยกเว้นในพืชบางชนิดที่อาจต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวเท่านั้นในทางปฏิบัติ ชุด (series experimentation) ที่นิยมใช้ในกลุ่มของไซโตไคนินได้แก่ kinetin, BAP, 2-ip และ zeatin และพบว่า 2-ip มักให้ผลดีกว่า BAP และ kinetin เนื่องจาก BAP ให้อัตราการเกิดยอดต่ำและเป็นพิษ ตัวอย่างในการเพาะเลี้ยง Rhododendron ยอดอาจตายได้ถ้าเติม BAP มากในอัตรา 2.5-20 มก./ล. ในทางกลับกันพบว่า 2-ip ให้ผลดีอย่างมากในการเพาะเลี้ยง blueberry โดยทั่วๆไปควรใช้ไซโตไคนินในอัตรา 0.5-30 มก./ล. (ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ 1-2 มก./ล.) อย่างไรก็ตามมักพบว่าถ้าใช้ในอัตราที่สูง จะชักนำการสร้างตาพิเศษและอาจเกิดแคลลัสพร้อมกันด้วย ดังนั้นในกรณีที่จำเป็นต้องใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากๆ อาจแก้ไขการเกิดตาพิเศษและแคลลัสนี้ได้โดยเร่งการยืดตัวของยอดด้วยกรดจิบเบอเรลลิก (GA3) ก่อนที่จะชักนำให้เกิดราก

สำหรับออกซินนั้น เนื่องจากพืชสามารถสังเคราะห์ IAA ขึ้นเองได้ และมีปริมาณที่แตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์ จึงนิยมใช้ออกซินสังเคราะห์เช่น NAA และ IBA ในความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มก./ ล. แทน ส่วน 2,4 – D นั้นมีผลอย่างมากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วย จึงควรหลีกเลี่ยงที่จะใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการชักนำให้เกิดกิ่งข้างและตาพิเศษ แต่ใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการชักนำให้เกิดคัพภะอย่างไรก็ตาม2,4–D นับว่าเป็นออกซินที่มีความสำคัญมากที่สุด

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 ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงในรูปของเกลืออินทรีย์นอกจากนี้ชิ้นส่วนพืชต้องการออกซิเจนและไฮโดรเจนในรูปของน้ำตลอดจนออกซิเจนในรูปของแก๊ส ต้องการสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในรูปของวิตามินและกรดอะมิโนโดยเฉพาะฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน ไซโทไคนิน และจิบเบอเรลลินส์ ในความเข้มข้นและสัดส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่าง 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 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 แต่ละสูตรอาหารมีความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ไม่เท่ากัน

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 จากนั้นพืชจะหยุดการเจริญเติบโต แต่ถ้าใส่น้ำมะพร้าว หรือสารละลายที่สกัดจากยีสต์เพิ่มลงไปในสูตรอาหารที่มีออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชินอยู่ด้วย 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

3.จิบเบอเรลลินส์

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

4.กรดแอบซิซิก

สารประเภทนี้ส่วนใหญ่สังเคราะห์เองตามธรรมชาติสำหรับควบคุมกระบวนการทางสรีระวิทยาต่าง ๆ ไม่ให้เกิดขึ้นเร็วเกินไป หรือไม่เกิดในช่วงเวลาที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

5.เอทิลีน

เอทิลีนเป็นแก๊สที่เกิดจากการเผาไหม้ของถ่านหิน น้ำมัน และสารพวกไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ พืชสามารถสร้างได้เองจากกระบวนการเมทาบอลิซึมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการสุกของผลไม้ พืชตอบสนองต่อเอทิลีนได้หลายทาง เช่น เร่งการสุกของผลไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระตุ้นการเกิดรากฝอย และรากแขนง กระตุ้นการงอกของเมล็ด กระตุ้นให้ใบและผลร่วงจากต้น กระตุ้นการออกดอกสามารถทำให้สีของดอกไม้จางลง เป็นต้น

สารอินทรีย์เชิงซ้อนธรรมชาติ

1.เคซีอินไฮโดรไลเซต 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 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลดีและผลเสียของผงถ่านมีดังนี้

1.ช่วยดูดซับพิษของรงควัตถุสีดำและสีน้ำตาลซึ่งส่วนมาก คือสารประกอบฟีนอลและเมลานิน นอกจากนี้ยังดูดสารพิษที่ไม่มีสีอีกด้วย

2.ช่วยดูดซับสารอินทรีย์บางชนิด เช่น สาร ABA (abscissic acid) ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชในขวดเนื้อเยื่อ

3.ทำให้เกิดสภาพดำมืดของอาหาร ส่งผลให้เกิดรากได้ดี

4.สามารถกระตุ้นการเกิดเอ็มบริโอเจนเนซิสในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นยาสูบ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเติบโต และออร์แกโนเจนเนซิสของพืชไม้เนื้อแข็ง

5.ช่วยคงเสถียรภาพของพีเอช

6.อาจเป็นไปได้ว่าผงถ่านปล่อยสารที่ส่งเสริมการเติบโตแต่ยังไม่มีผู้พิสูจน์อย่างจริงจัง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

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

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นอาหาร (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	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	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			

102736

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

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

โดยทั่วไปขนาดและรูปร่างของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเพื่อให้เกิดการเติบโตหรือพองฟูนั้น นิยมตัดให้เป็นชิ้นใหญ่พอสมควร เนื่องจากเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นและเพิ่มโอกาสการเลี้ยงให้อยู่รอด ควรตัดเนื้อเยื่อด้วยขนาดหรือปริมาตรที่สม่ำเสมอ โดยใช้กระดาษกราฟหรือคอร์กบอเรอ (cork borer) เป็นตัวช่วยกะขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.เมล็ดสบู่ดำ

2.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS,1962)

2.1สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BA (6-benzyladeninepurine)

2.2น้ำตาลทราย

2.3ผงวุ้น

2.4น้ำกลั่น

3.เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

3.1บีกเกอร์ (beaker)

3.2แท่งแก้วคนสาร

3.3ช้อนตักสาร (spatule)

3.4เครื่องชั่ง (balance)

3.5กระบอกตวงขนาด 1,000 ml

3.6ปิเปต (pipette)

3.7ขวดแก้ว (bottle)สำหรับใส่อาหารพร้อมฝาปิด

3.8หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.9เครื่องวัดความเป็นดรกด่าง (pH meter)

3.10เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)

4.สารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ (clorox) และสารจับใบ (teepol)

5.เครื่องมือที่ใช้ย้ายชิ้นส่วนของพืชประกอบด้วย ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) และเครื่องมือที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ ได้แก่ มีดผ่าตัด (knives and scalpels) ปากคีบ (forceps) ตะเกียง (turnel) จานแก้ว (Petri dish) และขวดใส่แอลกอฮอล์ 95%

6.เครื่องเขย่า (shaker) และชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ

7.ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (lux)นาน 16 ชั่วโมงและไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง ควบคุมการปิด-เปิดด้วยเครื่องตั้งเวลา (timer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1.การเตรียมอาหาร

1.1ชั่งสารเคมีตามสูตร Murashige and Skoog (1962) โดยการเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) เพื่อสะดวกในการเตรียมอาหารแต่ละครั้ง

1.2เติมน้ำกลั่นลงในกระบอกตวง ข้อ 1.2ประมาณ 500 mg /l ดูดสารละลายจาก stock solution ต่างๆมารวมกัน โดยใช้ปริมาตรในแต่ละ 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

1.3ปรับปริมาตรสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเติมน้ำกลั่นให้ได้ครบ 1,000 ml หลังจากนั้นเติมน้ำตาลคนให้ละลาย เติมผงวุ้นปริมาตร 9.5 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย

1.4เตรียมความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ใช้ BA (6-benzyladenine) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้น 0,0.125,0.25,0.5,0.75 และ 1 mg/l ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml ตามลำดับ

1.5นำสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้อ 1.3 เติมลงในบีกเกอร์ข้อ 1.4ปรับค่าความเป็นกรดหรือด่าง (pH) ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ให้อยู่ในช่วง 5.8

1.6บรรจุอาหารลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อนำมาเลี้ยงพืชทดสอบ

2.การฟอกฆ่าเชื้อ

2.1เตรียม clorox 10 % ได้จากการใช้น้ำกลั่น 90 ml นึ่งฆ่าเชื้อไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติม clorox 10ml และ teepol 1-2 หยด

2.2การเตรียมชิ้นส่วนพืช นำเมล็ดสบู่ดำ มาทุบเพื่อเอาเปลือกออกให้หมดโดยให้การกระทบกระเทือนต่อเมล็ดด้านในน้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3นำเมล็ดสบู่ดำในข้อ 2.2มาฟอกฆ่าเชื้อโดยเขย่าใน clorox 10%+ teepol 1-2 หยด นาน 10 นาที

2.4ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆละ ประมาณ 5 นาที

3.การเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

3.1นำเมล็ดสบู่ดำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารMS เพื่อทำให้เกิดยอด โดยใช้ 1 เมล็ดต่อ 1 ขวด

3.2หลังจากนั้น 3-5 วัน ตัดยอดสบู่ดำในข้อ 3.1ประมาณ 1 นิ้ว มาเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่มีความระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BA ต่างกัน ได้แก่ 0,0.125,0.25,0.5,0.75 และ 1 mg/l เพื่อเพิ่มจำนวนยอด ทำ 10 ซ้ำ โดยใช้ส่วนยอดของสบู่ดำ 1 ยอด ต่อ 1 ขวด เป็นเวลา 30 วัน แล้วบันทึกผลการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน ขนาดของแคลลัส ทำการ subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม หลังจากนั้น 30 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน ขนาดของแคลลัสอีกครั้ง(การนำชิ้นส่วนลงเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงต้องทำในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ)

4.บันทึกผลที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นของฮอร์โมน จากนั้นจัดทำตารางเพื่อแสดงผลการทดลอง

ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง วันที่ 15 พฤษภาคม 2550

สิ้นสุดการทดลอง วันที่ 8 มกราคม 2551

รวมเป็นระยะเวลาในการทดลอง 7 เดือน

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาการเทคโนโลยีผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

จากชิ้นส่วนเริ่มต้นของสบู่ดำที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS +BA ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA เป็นเวลา 30 วัน แสดงในตารางที่1 (ภาพที่ 1) หลังจากนั้น subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน แสดงผลการเจริญเติบโตแสดงในตารางที่ 2 (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ	จำนวนซ้ำที่ (ระดับคะแนน)										รวม	ค่าเฉลี่ย
BA (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		(ซม.)
0	1.2	1.2	1	1.5	1.2	1.2	1.5	1	1	1.2	12	1.2
0.125	2.1	2.1	2	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2	2.2	20.9	2.09
0.25	2.5	2.2	2	2	2	2	2.1	2.1	2.2	2.3	21.4	2.14
0.5	2.5	2.5	3	2.5	3.3	3.3	2.3	2.3	3	2.5	26.9	2.69
0.75	2.2	2.5	2.5	2	2.2	2.2	2	2	2.2	2	21.8	2.18
1	2	2.2	2.2	2.2	2.3	2.5	2	2	2	2	21.6	2.16

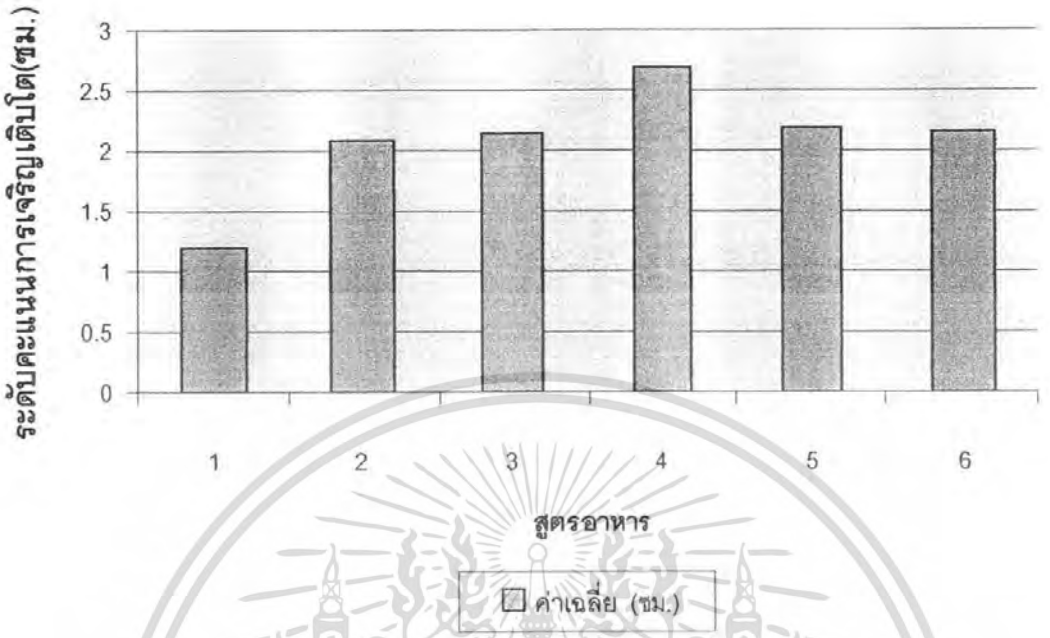
หมายเหตุ*1 คะแนน หมายถึง ต้นไม่สูงและจำนวนต้นไม่เพิ่มขึ้น

2 คะแนน หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและสูงขึ้น

3 คะแนน หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเป็น 2 ต้น

4 คะแนน หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเป็น 3 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ*สูตรอาหารที่ 1 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0 mg/l

สูตรอาหารที่ 2 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.125 mg/l

สูตรอาหารที่ 3 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.25 mg/l

สูตรอาหารที่ 4 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.5 mg/l

สูตรอาหารที่ 5 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.75 mg/l

สูตรอาหารที่ 6 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 1 mg/

ภาพที่ 1 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆ หลัง subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ	จำนวนซ้ำที่ (ระดับคะแนน)										รวม	ค่าเฉลี่ย
BA (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		(ซม.)
0	1.2	1.3	1	1.5	1.5	1.5	1.3	1	1.5	1.5	13.3	1.33
0.125	2.1	2	2.2	2.3	2.1	2.1	2.1	2	1.5	1.5	19.9	1.99
0.25	2.2	2.3	2.4	2.1	2	2.5	2.5	2.4	2	2	22.4	2.24
0.5	2.5	2.5	2.5	2.3	2.4	2.9	2.9	2.5	2.5	2.5	25.3	2.53
0.75	2.2	2.2	2.1	2.3	2.1	2.2	2.2	2	2.2	2.3	21.6	2.16
1	2.3	2.1	2.1	2.2	2.2	2	2	2.1	2	2	21.1	2.11

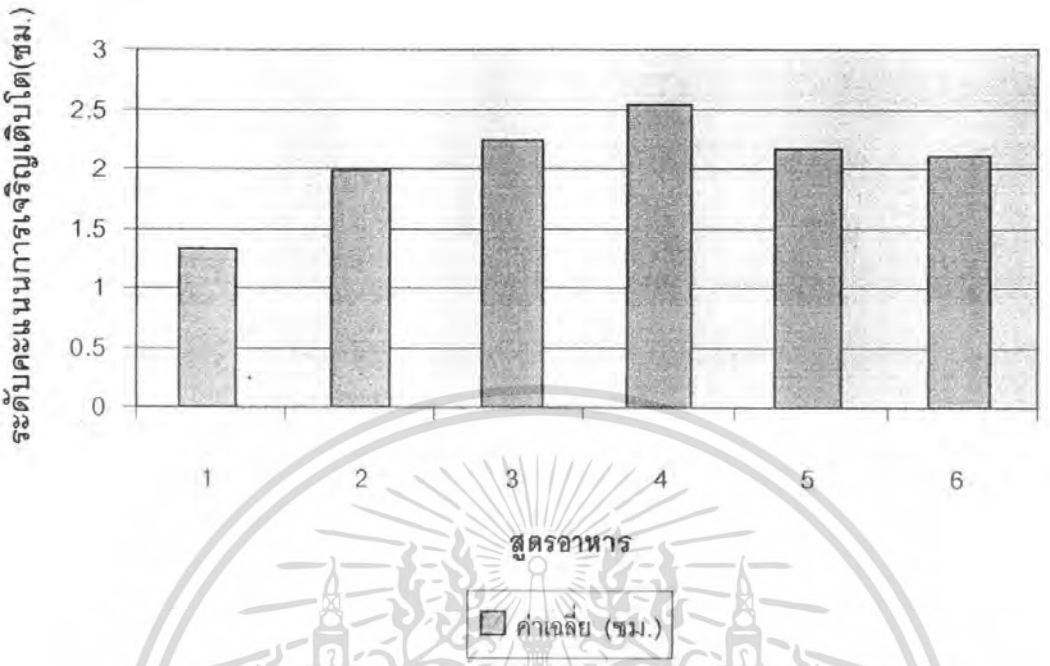
หมายเหตุ *1 คะแนน หมายถึง ต้นไม่สูงและจำนวนต้นไม่เพิ่มขึ้น

2 คะแนน หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและสูงขึ้น

3 คะแนน หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนต้นเป็น 3 ต้น

4 คะแนน หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนต้นเป็น 4 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ* สูตรอาหารที่ 1 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0 mg/l
สูตรอาหารที่ 2 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.125 mg/l
สูตรอาหารที่ 3 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.25 mg/l
สูตรอาหารที่ 4 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.5 mg/l
สูตรอาหารที่ 5 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.75 mg/l
สูตรอาหารที่ 6 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 1 mg/

ภาพที่ 2 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆ หลัง subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 30วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลัสสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ BA (mg/l)	จำนวนซ้ำที่ (ระดับคะแนน)										รวม	ค่าเฉลี่ย (ซม.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	1	1.5	1.2	1.3	1.4	1.5	1.5	1.5	1	1.2	13.1	1.31
0.125	2	2	2	2.2	2.3	2.4	2	2.2	2.3	2	21.4	2.14
0.25	2	2.5	2.8	2.9	2.5	2.3	2.5	2.8	2.5	2.5	25.3	2.53
0.5	3	3.1	3.2	3	3.2	3.3	3	3	3.1	3.1	31	3.1
0.75	3.5	3.3	3.5	3.5	4	3.5	3.6	3.4	3.4	3.4	35.1	3.51
1	3.5	3.5	4	4	3.8	3.8	3.9	4	3.5	3.5	37.5	3.75

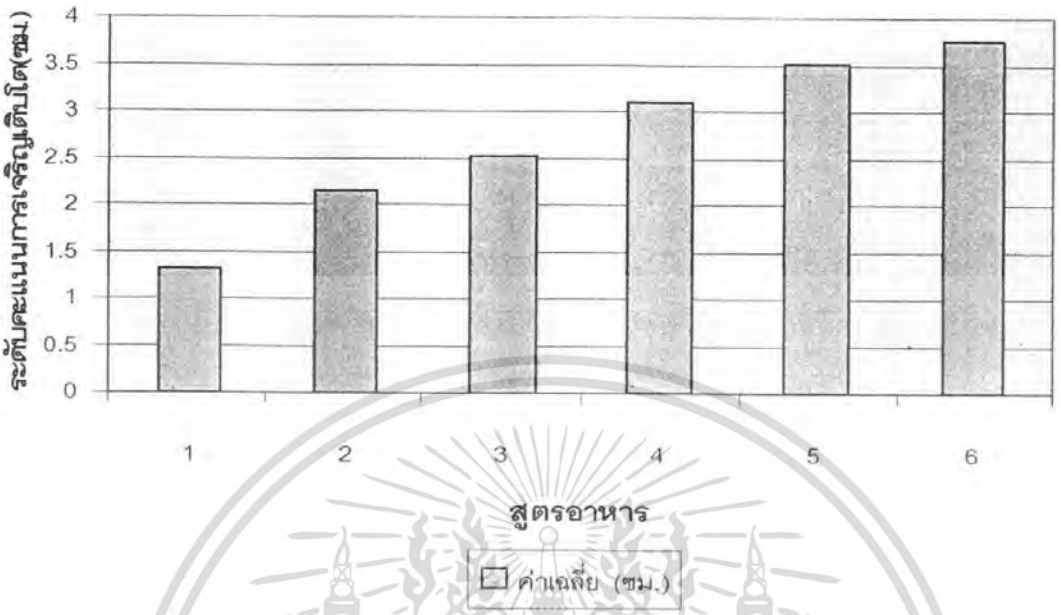
หมายเหตุ *1 คะแนน หมายถึง การเจริญของ callus น้อยมาก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 cm)

2 คะแนน หมายถึง การเจริญของ callus น้อย (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm)

3 คะแนน หมายถึง การเจริญของ callus ปานกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 cm)

4 คะแนน หมายถึง การเจริญของ calls มาก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ *สูตรอาหารที่ 1 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0 mg/l
สูตรอาหารที่ 2 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.125 mg/l
สูตรอาหารที่ 3 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.25 mg/l
สูตรอาหารที่ 4 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.5 mg/l
สูตรอาหารที่ 5 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.75 mg/l
สูตรอาหารที่ 6 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 1 mg/

ภาพที่ 3 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลัสสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลัสสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆหลัง subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ BA (mg/l)	จำนวนซ้ำที่ (ระดับคะแนน)										รวม	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		(ซม.)
0	1.5	1.3	1.3	1.1	1.1	1.2	1.5	1.5	1.3	1	12.7	1.27
0.125	2	2	2.2	2.1	2.1	2	2.2	2.5	2	2.3	21.6	2.16
0.25	2.5	2.8	2.3	2.5	2.5	2.6	2.4	2.5	2	2	24.1	2.41
0.5	3	3.1	3.2	3	3	3.2	2.6	3.1	3.4	2.1	29.7	2.97
0.75	3.5	3.5	3.3	3.2	3.5	3.4	3	3.4	3	3	32.8	3.28
1	3.8	4	4	3.9	3.5	3.5	4	3.5	4	3.2	37.4	3.74

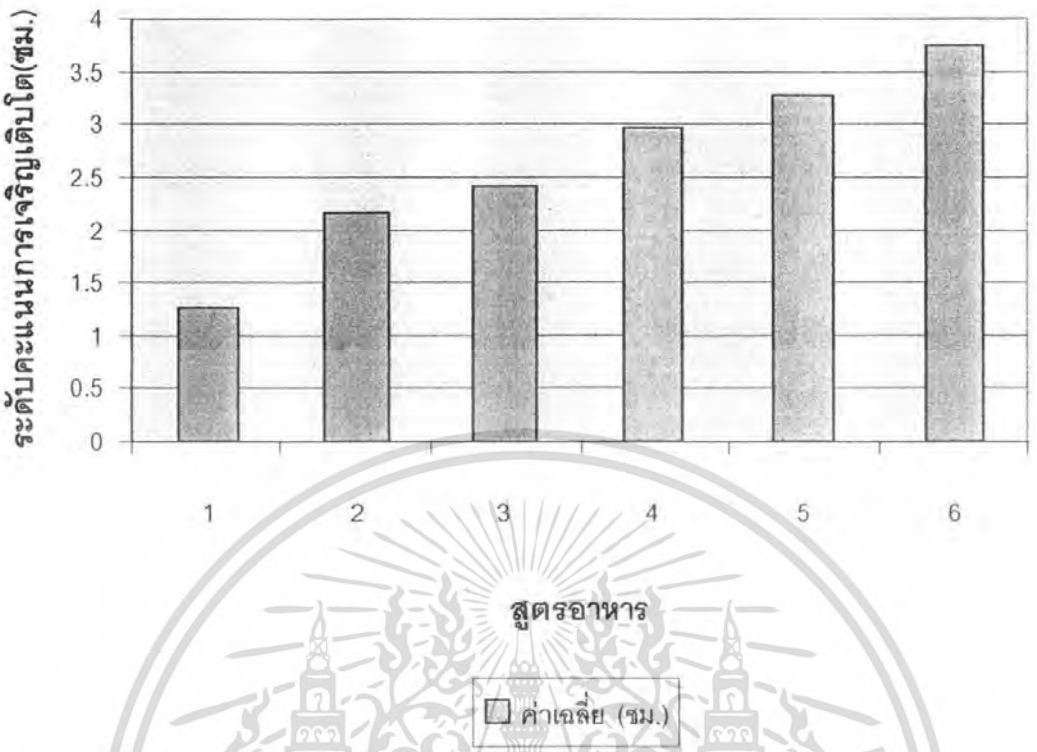
หมายเหตุ *1 คะแนน หมายถึง การเจริญของ callus น้อยมาก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0cm)

2 คะแนน หมายถึง การเจริญของ callus น้อย (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm)

3 คะแนน หมายถึง การเจริญของ callus ปานกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 cm)

4 คะแนน หมายถึง การเจริญของ calls มาก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ *สูตรอาหารที่ 1 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0 mg/l
สูตรอาหารที่ 2 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.125 mg/l
สูตรอาหารที่ 3 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.25 mg/l
สูตรอาหารที่ 4 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.5 mg/l
สูตรอาหารที่ 5 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 0.75 mg/l
สูตรอาหารที่ 6 ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 1 mg/

ภาพที่ 4 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลัสสบู่ดำ จาก explants ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS + BA ในความเข้มข้นต่างๆ หลัง subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ ในอาหารสูตร1/2 MS + BAในระดับความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mg/l เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเนื้อเยื่อสบู่ดำสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนต้นได้ดีในอาหารที่มี BA 0.5 mg/l ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดในสบู่ดำ และมีการเจริญเติบโตของแคลัสปานกลาง ในขณะที่สูตรอาหารที่มี BA 0, 0.125, 0.25 mg/l มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนต้นน้อย เนื่องจากมีปริมาณของฮอร์โมนน้อยเกินไป

ส่วนอาหารที่มี BA 0.75 mg/l ขึ้นไป พบว่ายอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะอวบอ้วน เนื่องจากมีปริมาณน้ำเป็นองค์ประกอบมากเกินไปซึ่งอาจเกิดจากการใช้ BA ปริมาณมากเกินไป(นันทียา, 2542)

หลังจากนั้น subculture ครั้งที่ 2 ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอาหารสูตรที่มี BA 0.5 mg/l มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเป็น 3-4 ต้น และแคลัสมีการเจริญเติบโตเล็กน้อย และอาหารที่มี BA 0.75 mg/l ขึ้นไปต้นที่เกิดขึ้นมีอาการฉ่ำน้ำและไม่สามารถกลับมาเป็นปกติได้(นันทียา,2542)

นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้อาหารสูตร1/2 MS + BA ในทุกระดับความเข้มข้นจะพบการเจริญเติบโตของแคลัสสูงขึ้นตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้นเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลัส

แนวทางการแก้ไขอาจใช้ไคเนตินหรือไซโตไคนินชนิดอื่นแทน BA เพื่อหลีกเลี่ยงอาการฉ่ำน้ำและการเกิดแคลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำในอาหารสูตร MS ที่มี BA ½ mg/l ในระดับความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอาหารสูตร MS ที่มี BA 0,0.125 และ0.25 mg/l มีการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนต้น มีคะแนนเฉลี่ย 1.26,2.04 และ 2.19 ตามลำดับ โดยที่สูตรที่มี BA 0.125 และ 0.25 มีการเพิ่มจำนวนต้น 1-2 ต้น และมีคะแนนเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของแคลัส 2.20 และ 2.47 ตามลำดับ

อาหารที่มี BA 0.75 mg/l ขึ้นไป พบว่ายอดของสบู่ดำที่เกิดขึ้นมีอาการฉ่ำน้ำ(นันทิยา, 2542)ซึ่งอาจจะเกิดจากการใช้ปริมาณ BA สูงเกินไปโดยยอดที่มีอาการฉ่ำน้ำ จะไม่สามารถกลับมาเป็นปกติได้ แนวทางการป้องกันอาจใช้ kinetin หรือ ไซโตไคนิน ชนิดอื่นแทน BA นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารสูตร ½ MS ที่มี BA 0.75 mg/l ขึ้นไปมีการเจริญเติบโตของแคลัสสูงขึ้นตามลำดับ

ส่วนอาหารสูตร ½ MS ที่มี BA 0.5 mg/l มีคะแนนเฉลี่ยของการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนต้นสูงที่สุด โดยมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 2.61 และมีการเจริญเติบโตของแคลัสปานกลางมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 3.03

การที่อาหารสูตรที่มี BA 0.5 mg/l มีการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนต้นสูงสุดและมีขนาดของแคลัสปานกลางซึ่งถือว่าเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในสบู่ดำดีที่สุด

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 พับบลิชชิ่ง.กรุงเทพฯ. 119 หน้า.

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

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

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

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

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

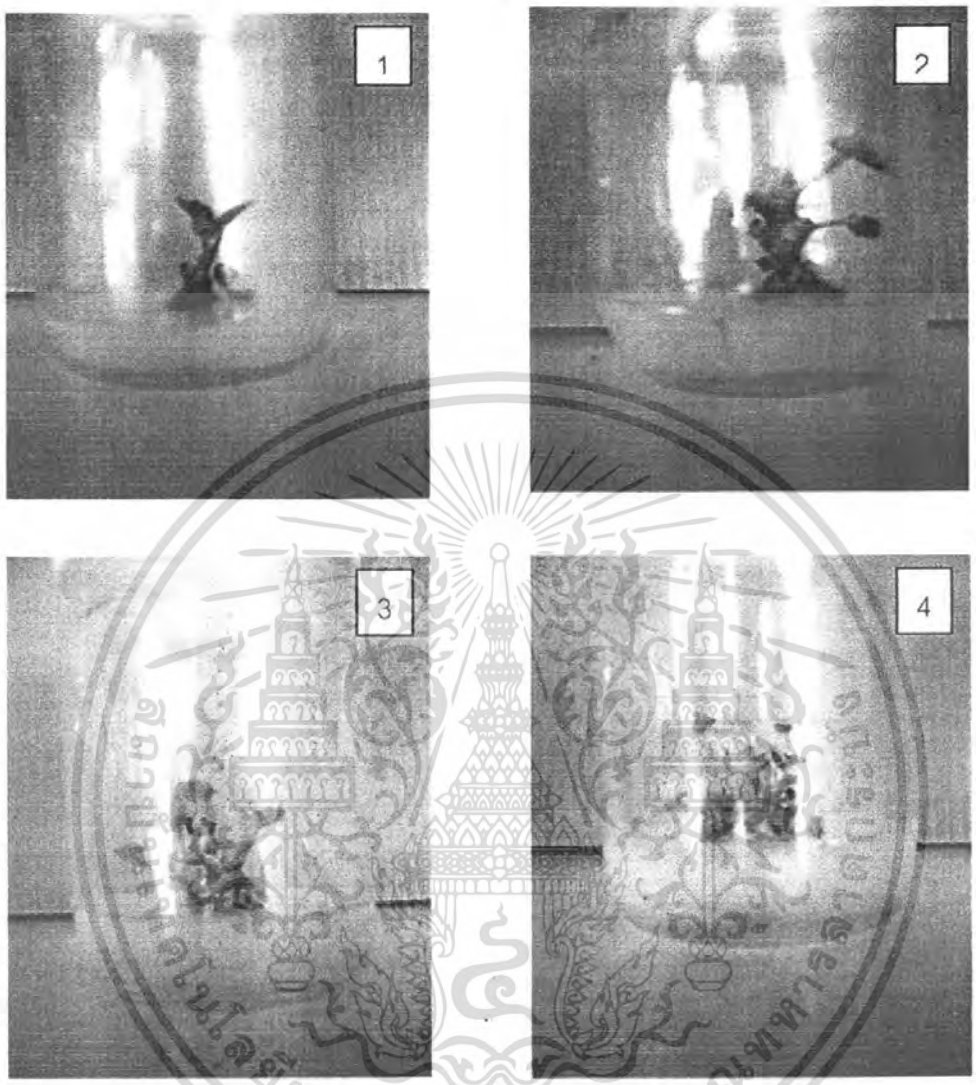
http://my.dek-d.com/Writer/Story/viewlongc.phd?id=223518&chapter=8

15 มกราคม 2551.การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 แสดงการให้ระดับคะแนนการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนต้นของสบู่ดำในอาหารสูตร 1/2 MS ที่มี BAความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4สัปดาห์

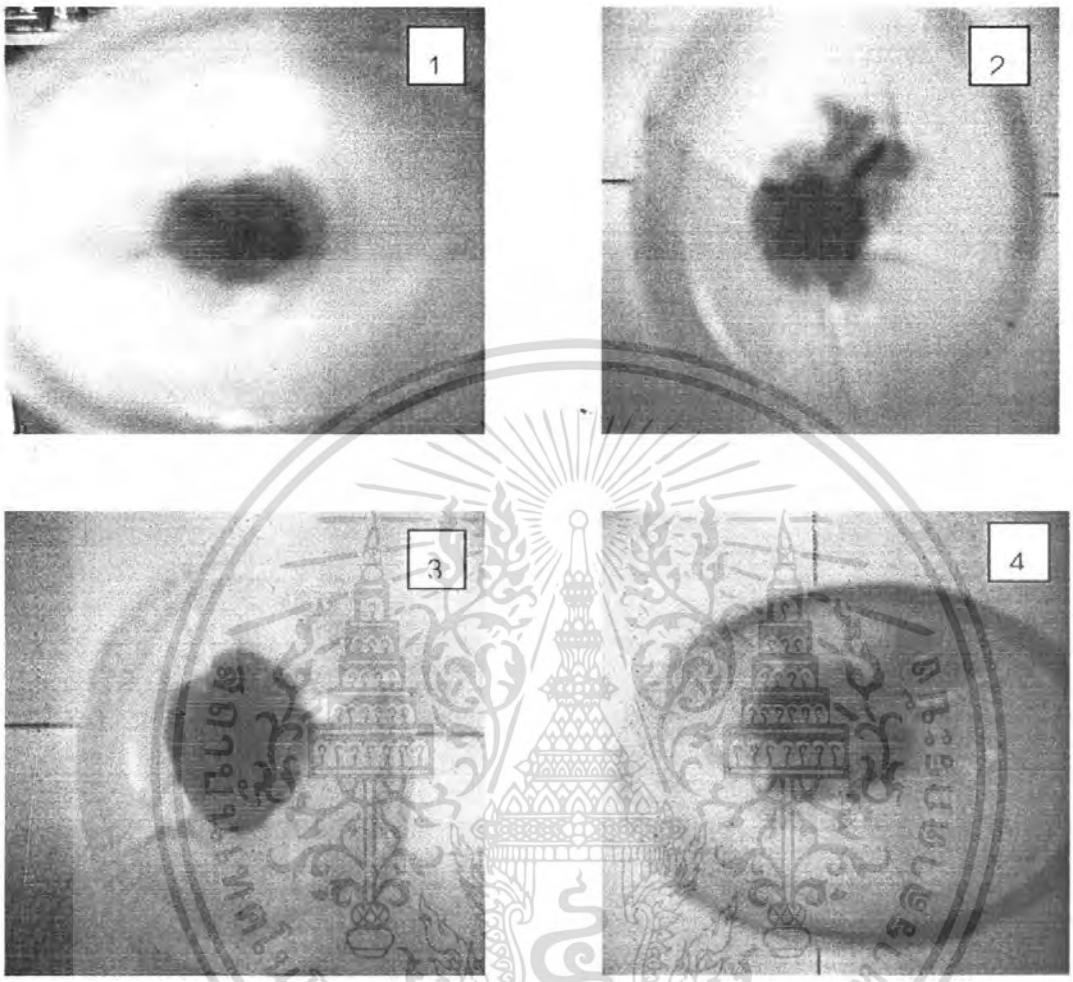
ภาพที่ 1 ระดับคะแนน 1 หมายถึง ต้นไม่สูงและจำนวนต้นไม่เพิ่มขึ้น

ภาพที่ 2 ระดับคะแนน 2 หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและสูงขึ้น

ภาพที่ 3 ระดับคะแนน 3 หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน 3 ต้น

ภาพที่ 4 ระดับคะแนน 4 หมายถึง ต้นเจริญเติบโตและเพิ่มเป็น 4 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 2 แสดงระดับการให้คะแนนการเจริญเติบโตของแคลัสสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลง ในอาหารสูตร 1/2 MS ที่มี BA ในระดับความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา สัปดาห์

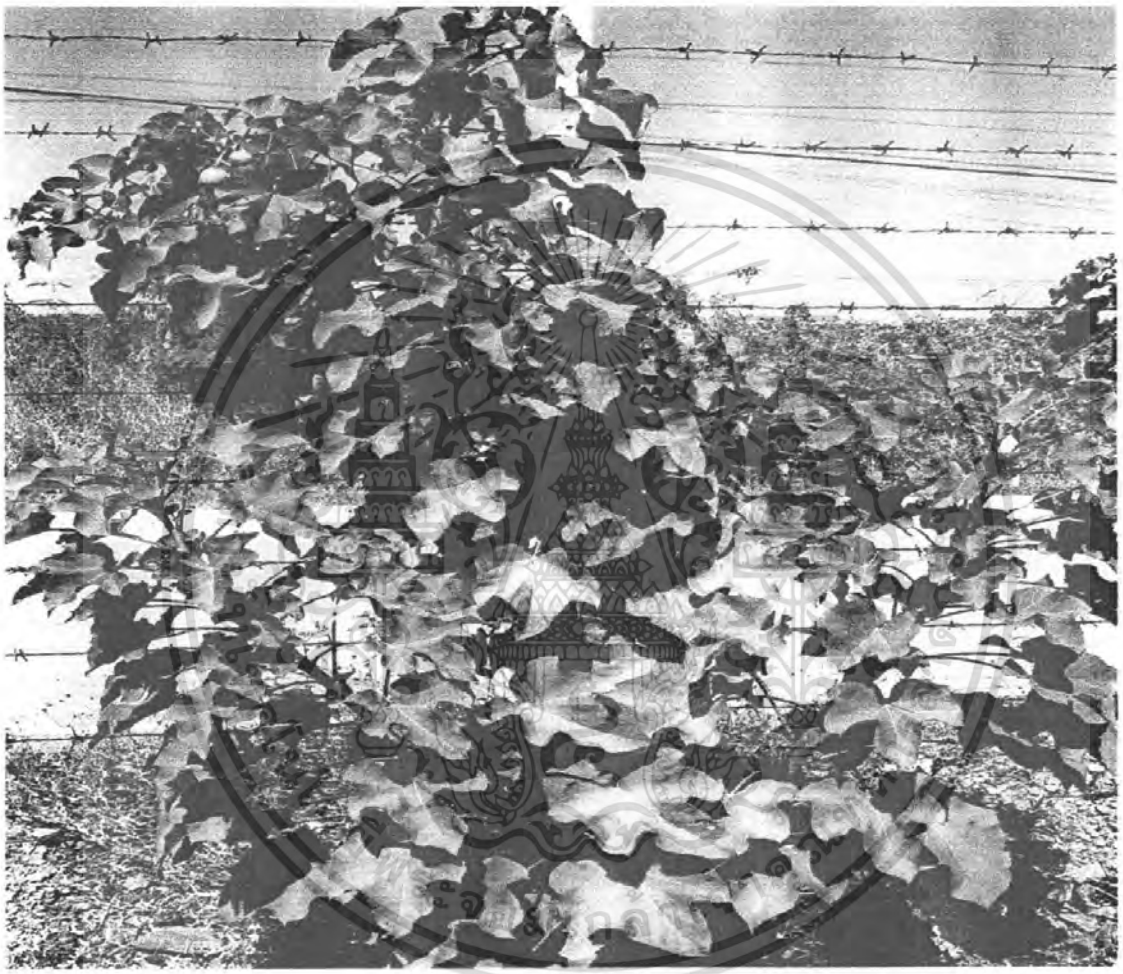
ภาพที่ 1 ระดับคะแนน1 หมายถึง การเจริญของcallusน้อยมาก(เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0cm)

ภาพที่ 2 ระดับคะแนน2 หมายถึง การเจริญของcallus น้อย (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm)

ภาพที่ 3 ระดับคะแนน3 หมายถึง การเจริญของcallusปานกลาง(เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0cm)

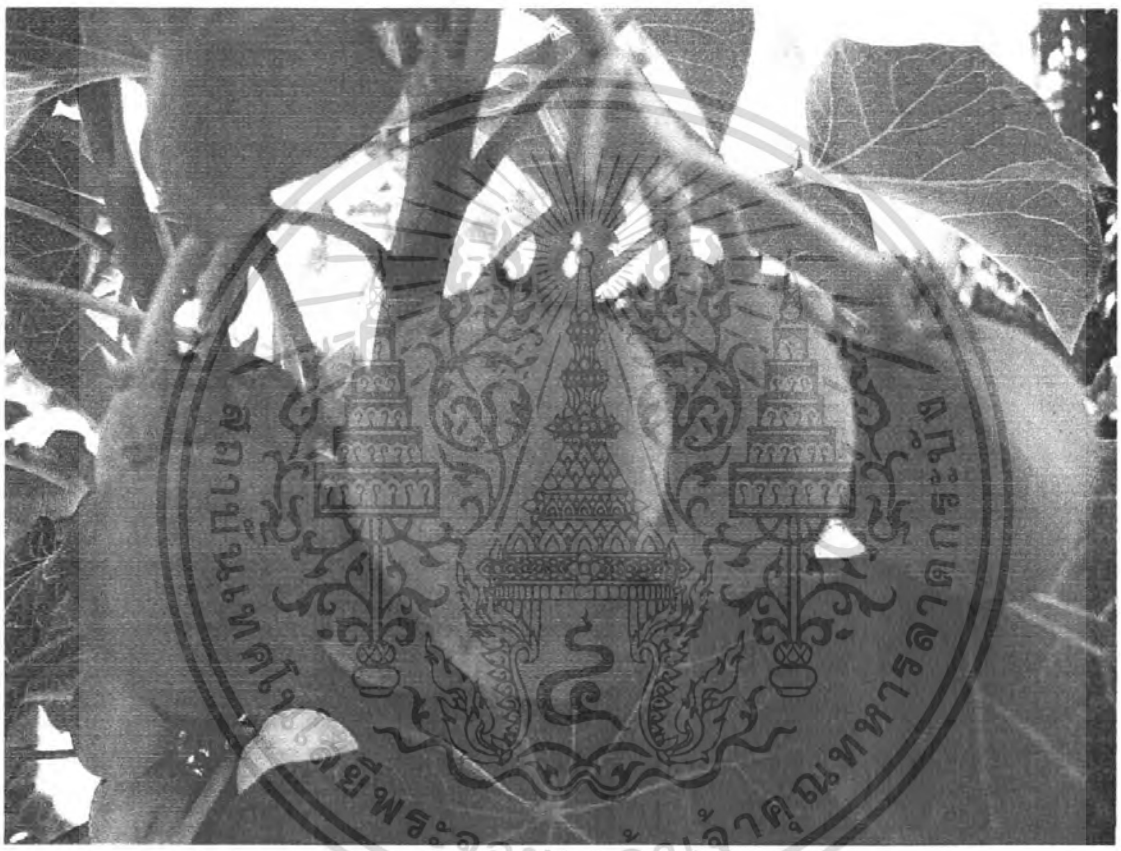
ภาพที่ 4 ระดับคะแนน4 หมายถึง การเจริญของ calls มาก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 3 แสดงลักษณะต้นสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 4 แสดงลักษณะผลสบู่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	:	นางสาวรุ่งอรุณ รุนรา
วันเดือนปีเกิด	:	22 พฤศจิกายน 2527
ที่อยู่ตามทะเบียนบ้าน	:	537/2 หมู่ 1 ตำบลทับช้าง อำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี 22180
เบอร์โทรศัพท์	:	0851101403
ที่อยู่ปัจจุบัน	:	537/2 หมู่ 1 ตำบลทับช้าง อำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี 22180
โทรศัพท์	:	0851101403
การศึกษา	:	พ.ศ. 2535-2540 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนบ้านทับช้าง จ.จันทบุรี
		พ.ศ. 2541- 2543 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบ้านทับช้าง จ.จันทบุรี
		พ.ศ. 2544-2546 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนสอยดาววิทยา จ. จันทบุรี
		พ.ศ. 2547 ระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณ(พืชไร่) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้