สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อิทธิพลของ สารประกอบฟีนอลลิคต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

นาย ณรงค์ ด่านวิเศษกาญจน

นาย ธวัฒน์ เทพชนะชัยชาญ

นาย ธีระ แซ่ซือ

โครงการนิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2536

ปพ.
ณ211อ
2535

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

612522090

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS TO TISSUE CULTURES OF MANGO

(MANGIFERA INDICA L.)

Mr. Narong Danwisedkanjana

Mr. Thawat Thepchanachaichan

Mr. Thera Sae Soe

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

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology ladkrabang

1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ อิทธิพลของ สารประกอบฟีนอลลิคต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

โดย นาย ณรงค์ ด่านวิเศษกาญจน

นาย ธวัฒน์ เทพชนะชัยชาญ

นาย อิระ แซ่ซือ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้การสนับสนุนโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

---------- หัวหน้าภาค

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

---------- กรรมการ

(รศ. ดร. ดุษฎี อณะบริพัฒน์)

---------- กรรมการ

(อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ : อิทธิพลสารประกอบฟีนอลลิค ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

นักศึกษา : นายณรงค์ ด่านวิเศษกาญจน
นายธวัฒน์ เทพชนะชัยชาญ
นายธีระ แซ่ซือ

อาจารย์ที่ปรึกษา : อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี

ภาควิชา : ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา : 2535

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ และตาของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ (Mangifera indica L.) ในอาหารสูตร MS และ 1/2 MS ที่อัตราส่วนฮอร์โมน NAA และ KIN ต่างๆ พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่เนื้อเยื่อใบ และตา จะกลายเป็นสีน้ำตาล ภายในเวลา 15 วัน และตายไปในที่สุด จากการศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ จากใบมะม่วงพันธุ์เดียวกันพบว่า ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้สูงสุดเพียง $3x10^3$ เซลต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title : The Effect of Phenolic Compounds to Tissue Cultures of Mango (Mangifera indica L.)

Name : Mr.Narong Danwisedkanjana

: Mr.Thawat Thepchanachaichan

: Mr.Thera Sae Soe

Special Project Advisor : Mr.Pana Lohasupthawee

Department : Applied Biology

Academic Year : 1992

ABSTRACT

Leaf and nodal tissues of mango (Mangifera indica L.) were cultured on MS and 1/2 MS medium at various hormone combinations of NAA and KIN . The result showed that they not only got no callus formation but also became browning and then died gradually within 15 days. For the protoplast isolation from leaf tissue, the highest concentration of protoplasts was 3×10^3 cells/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาและเรียบเรียงโครงงานปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลงได้ด้วยการช่วยเหลือให้คำแนะนำปรึกษา และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จาก อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการทำโครงงานปัญหาพิเศษนี้ และทำให้การศึกษาครั้งนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนทำให้โครงงานพิเศษเรื่องนี้สำเร็จลงได้ทุกท่าน ตั้งแต่คุณป้าเชื่อม ที่ช่วยเหลือในการหาใบมะม่วงน้ำดอกไม้ พี่ เพื่อน และน้อง ๆ ที่เป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือมาตลอด และโครงงานพิเศษเรื่องนี้จะสำเร็จมาเป็นรูปเล่มไม่ได้ถ้าขาดผู้ช่วยเหลือที่ดีในการพิมพ์คือ คุณ สิริวัฒน์ เพิ่มพูนอนันตชัย ซึ่งผู้เขียนขอขอบคุณอย่างจริงใจ

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนขอมอบส่วนดีการศึกษาครั้งนี้ให้แก่ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้ซึ่งเป็นที่เคารพรัก และเป็นกำลังใจสำคัญของผู้เขียนตลอดมา

คณะผู้จัดทำ

5 / มีนาคม / 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก.
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข.
กิตติกรรมประกาศ	ค.
สารบัญตาราง	ง.
สารบัญรูป	จ., ฉ.
บทที่ 1 บทนำ	1-1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	2-1
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	3-1
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	4-1
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	5-1
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของใบมะม่วง	4-1
2	แสดงอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของตามะม่วง ในอาหารเหลว	4-9
3	แสดงอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของตามะม่วง ในอาหารแข็ง	4-11
4	แสดงจำนวนและลักษณะโปรโตพลาสต์มะม่วง ที่ได้จากการย่อยในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น mannitol ต่าง ๆ ที่เวลาใด ๆ	4-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงการเจาะใบมะม่วงด้วยอุปกรณ์เจาะกระดาษ ก่อนชั้นย้ายลงอาหาร	3-6
2	แสดงการเตรียมสารละลายเอนไซม์ อาหาร ที่มีความเข้มข้น manitol ต่าง ๆ และใบมะม่วงที่ผ่านการพลาสตโมไลซิสแล้วก่อนจะเริ่มการย่อย	3-7
3	แสดงเครื่องกรอง MILLIPORE พร้อมทั้งเครื่องปั๊มสุญญากาศ ในการกรองจุลินทรีย์ออกจากเอนไซม์	3-8
4	แสดงความแตกต่างของใบมะม่วงที่เลี้ยงในอาหาร MS ในสูตรอาหารต่าง ๆ ณ. วันที่ 10	4-3
5	แสดงความแตกต่างของใบมะม่วงที่เลี้ยงในอาหาร MS ในสูตรอาหารต่าง ๆ ณ. วันที่ 15	4-4
6	แสดงความแตกต่างของใบมะม่วงที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน NAA และ KIN ในวันที่ 1 และวันที่ 30 ของการทดลอง	4-5
7	แสดงความแตกต่างของอาหารสูตร MS เสริมด้วยฮอร์โมน NAA และ KIN ที่ใช้เลี้ยงใบมะม่วง ที่วันที่ 1 และวันที่ 30 ของการทดลอง พบว่า ที่วันที่ 30 ของการทดลอง อาหารที่ใช้เลี้ยงจะมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น เนื่องจากใบมะม่วงปล่อยสารพวกฟีนอลลิคลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง	4-6
8	อิทธิพลของฮอร์โมน KIN ต่อการเกิดสารประกอบฟีนอลลิคในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน NAA เดียวกัน พบว่าในอาหารที่เสริมด้วย 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร KIN จะเกิดสีน้ำตาล	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	มากกว่าในอาหารที่เสริมด้วย 2.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอาหารสูตรเดียวกัน ในวันที่ 1 ของการทดลอง	4-7
9	แสดงใบมะม่วงอายุ 7 วัน (ขณะใบสีน้ำตาล) ในอาหาร MS น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยง 1 สัปดาห์ สังเกตว่าสารสีน้ำตาล เกิดจากบริเวณก้านใบมากกว่าบริเวณอื่น	4-8
10	แสดงความแตกต่างของตามะม่วงที่แช่ ascorbic acid ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารแข็ง	4-13
11	แสดงโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกใบมะม่วงที่ mannitol 0.4 โมลาร์ นาน 18 ชั่วโมง	4-15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

มะม่วงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Mangifera indica L. ตามที่เป็นที่ทราบกันแล้วว่า พันธุ์มะม่วงมีทั้งพันธุ์สำหรับกินสุก และมะม่วงมันสำหรับกินดิบ สำหรับมะม่วงกินสุกในเมืองไทยเรามีมะม่วงกินสุกอยู่หลายพันธุ์ ขณะเดียวกันต่างประเทศเขาก็มีมะม่วงกินสุกจำนวนมากเช่นกัน ต่างประเทศเขาไม่มีมะม่วงมัน เพราะมะม่วงส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม " อินเดีย " (Indian type) ซึ่งมีน้ำยางที่เป็นอันตรายต่อคนเป็นอย่างมากจึงต้องรอผลสุกถึงกินได้ ชาวต่างประเทศไม่รู้จักมะม่วงกินดิบหรือมะม่วงมัน แต่ในอนาคตการส่งออกของไทยจะมีปริมาณขึ้น เนื่องจากประเทศไทยมีการประชาสัมพันธ์มะม่วงมันมากขึ้น ไทยจึงมีโอกาสในการขยายส่วนแบ่งตลาดมากขึ้น

การศึกษาในระดับเซล และการเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเนื่อเป็นแหล่งข้อมูล ในการปรับปรุงพันธ์มะม่วงโดยวิธีพันธุกรรม เพราะการศึกษาในระดับพันธุกรรมของมะม่วง จำเป็นต้องมีแหล่งเซลที่ปราศเชื้อปนเปื้อน และสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนเนซิส เนื่อให้เซลมีจำนวนมาก ในการศึกษาปัจจัยต่างๆ ของเซลมะม่วง ดังนั้น อุปสรรคสำคัญในการศึกษาเซลมะม่วงคือ ทำอย่างไรจึงจะชักนำให้เซลมะม่วงเกิดการแบ่งตัวแบบเอมบริโอเจนเนซิส เนื่อเลี้ยงเป็นสารละลายเซลแขวนลอยได้ (Litz และ คณะ,1984) แต่แคลลัสนั้นเป็นแบบ pseudobubil ซึ่งมีลักษณะไม่เหมาะสมต่อการคัดเลือก การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ การศึกษาในโครงงานครั้งนี้จึงเป็นส่วนหนึ่งของความพยายามที่จะหาความเป็นไปได้ในการชักนำให้เนื้อเยื่อมะม่วงส่วนอื่น นอกจากเอมบริโอให้เกิดแคลลัส

วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นได้ในการเลี้ยงแคลลัสมะม่วงจากเนื้อเยื่อใบและตามะม่วง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลง

2. เพื่อศึกษาอุปสรรคในการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะม่วง และ เสนอแนะวิธีการแก้ไขใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร MS และ1/2MS ปริมาณสารควบคุมการเจริญ NAA และ KIN ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ

3. เพื่อศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาในระดับโปรโตพลาสต์ของเซลมะม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2

ตรวจเอกสาร

ในทางพฤกษศาสตร์จัดมะม่วงอยู่ในวงศ์ อะนาคาร์ดิอาซีอี (Anacar-diaceae) ซึ่งประกอบด้วยพืชประมาณ 60 สกุล (genus) 400 ชนิด (species) พืชวงศ์นี้ส่วนมากอยู่ในเขตร้อน นอกจากมะม่วงแล้วมีไม้ผลร่วมวงศ์ที่รู้จักกันดี เช่น มะม่วงหิมพานต์ มะกอก เป็นต้น

มะม่วงเป็นพืชที่เก่าแก่ที่มีความสำคัญมากที่สุด ประมาณว่า ประชากรโลกมากกว่า 1ใน 5 ใช้มะม่วงประกอบอาหาร มีประเทศต่างๆ ในโลกปลูกมะม่วงเป็นการค้าอย่างน้อย 87 ประเทศ ปีหนึ่ง ๆ โลกผลิตมะม่วงได้มากกว่า 14 ล้านตัน ประเทศที่ผลิตมะม่วงได้มากที่สุดคือ อินเดีย และน้อยลงตามลำดับ ดังนี้ (วิจิตร, 2529)

ประเทศ	เปอร์เซ็นต์การผลิต
อินเดีย	62.2
เม็กซิโก	4.5
บราซิล	4.4
ปากีสถาน	4.0
อินโดนีเซีย	3.2
ฟิลิปปินส์	2.7
ไทย	2.7
ไฮติ	2.4
จีน	2.1
บังคลาเทศ	1.3
ประเทศอื่น ๆ รวม	10.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การส่งออกมะม่วงของประเทศไทย

การส่งออกมะม่วงของประเทศไทย เท่าที่มีรายงานจากกรมศุลกากรพบว่าประเทศไทย มีการส่งมะม่วงออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศครั้งแรกในปี 2513 เป็นปริมาณ 2,589.31 ตัน มูลค่า 33 ล้านบาท แต่ก็ไม่มีรายงานว่าส่งไปประเทศใดบ้าง จนกระทั่งปี 2517 จึงมีรายงานเป็นครั้งแรกว่าส่งมะม่วงไปจำหน่ายใน 4 ประเทศคือ มาเลเซีย สิงคโปร์ ฮ่องกงและญี่ปุ่น รวมทั้งสิ้น 2,548.57 ตัน มีมูลค่า 8.74 ล้านบาท ดังตาราง หลังจากนั้น ประเทศญี่ปุ่นก็มิได้มีการสั่งเข้ามะม่วงจากประเทศไทยอีกเลย ส่วนอีกสามประเทศนั้นก็ยังคงมีการนำเข้ามะม่วงจากประเทศไทยอย่างสม่ำเสมอมาโดยตลอดและกลายเป็นลูกค้าที่สำคัญของประเทศไทยจนกระทั่งปัจจุบัน เมื่อพิจารณาปริมาณและมูลค่าการส่งออกของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2518-2529 จาก ตารางดังกล่าว จะเห็นว่าทั้งปริมาณและมูลค่าการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะมีเพียงบางปีเท่านั้นเช่น ในปี 2518, 2527 และ 2526 ที่ปริมาณและมูลค่าลดลงจากปีก่อนหน้า อย่างไรก็ตาม การส่งออกในปัจจุบันก็เพิ่มขึ้นอย่างมาก ดังจะเห็นว่าในปี 2529 สามารถส่งออกได้เป็นปริมาณทั้งสิ้น 9,384.83 ตัน มูลค่า 53.85 ล้านบาท นับได้ว่าเป็นปริมาณการส่งออกสูงที่สุดตั้งแต่มีการส่งออกมะม่วง ทั้งนี้เป็นเพราะประเทศลูกค้าเดิมคือมาเลเซียได้สั่งเข้ามะม่วงจากประเทศไทยเพิ่มขึ้นเป็นปริมาณถึง 6,426.31 ตัน ในขณะเดียวกันก็ได้มีการขยายตลาดมะม่วงในต่างประเทศได้กว้างขวางยิ่งขึ้น กล่าวคือ ในปี 2529 ประเทศไทยสามารถส่งมะม่วงไปจำหน่ายในต่างประเทศ โดยมีประเทศลูกค้ารวมทั้งสิ้น 24 ประเทศ ซึ่งประกอบด้วย มาเลเซีย สิงคโปร์ ฮ่องกง ญี่ปุ่น บรูไน บาร์เรน คูเวต โอมาน ซาอุดิอาระเบีย การ์ต้า จอร์แดน เดนมาร์ก ฝรั่งเศส เยอรมันตะวันตก เนเธอร์แลนด์ แคนนาดา สวิสเซอร์แลนด์ อังกฤษ เบลเยี่ยม ออสเตรเลีย สวีเดน นอร์เวย์และสหรัฐอเมริกา จะเห็นว่ามีการขยายตลาดไปยังแถบยุโรป ตะวันออกกลางและอเมริกามากขึ้น ซึ่งแต่เดิมนั้นประเทศลูกค้ามะม่วงของประเทศไทยก็จะมีเฉพาะในแถบเอเชียเท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศมาเลเซีย สิงคโปร์ และฮ่องกงนั้นถือว่าเป็นประเทศลูกค้าหลัง ไม่เฉพาะแต่มะม่วงเท่านั้น ยังรวมไปถึงสินค้าประเภทผักและผลไม้อื่น ๆ อีกด้วย ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ามะม่วงของประเทศลูกค้าหลักทั้งสามดังกล่าวนั้น ตั้งแต่ปี 2517-2529 จะมีสัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนมากกว่าร้อยละ 90 ทุกปี จึงกล่าวได้ว่า ถึงแม้จะมีการขยายตลาดมะม่วงที่ไกลออก

ตารางแสดง ปริมาณและมูลค่าการส่งออกมะม่วงของประเทศไทยระหว่างปี 2511-2529

ปี	ปริมาณการส่งออก (ตัน)	% การเปลี่ยนแปลงปริมาณการส่งออก	มูลค่าการส่งออก (ล้านบาท)	% การเปลี่ยนแปลงมูลค่าการส่งออก
2513	2,589.31	-	5.44	-
2514	2,663.33	2.86	5.45	0.17
2515	2,818.17	5.81	7.51	37.70
2516	2,452.01	-12.99	8.40	11.81
2517	2,548.57	3.94	8.74	4.11
2518	1,195.87	-53.47	6.19	-29.19
2519	2,337.63	97.12	9.31	50.32
2520	1,302.43	-44.28	6.35	-31.77
2521	3,171.12	58.93	13.82	4.11
2522	3,266.24	3.00	19.39	40.32
2523	3,274.68	0.26	19.44	0.29
2524	3,062.70	-6.47	21.15	8.80
2525	4,117.69	34.45	32.54	53.82
2526	2,538.08	-38.36	20.88	-35.85
2527	3,174.94	25.09	31.26	49.72
2528	8,311.50	161.78	57.17	82.91
2529	9,384.83	12.91	53.85	-5.81

ที่มา : (Department of Customs, Foreign Trade Statistics of Thailand, December, 1970-1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปได้มากขึ้น แต่แหล่งรองรับผลผลิตมะม่วงของประเทศไทยก็ยังคงเป็นประเทศมาเลเซีย สิงคโปร์และฮ่องกงอยู่เช่นเดิม เหตุผลสำคัญที่ทำให้ประเทศไทยต้องพึ่งตลาดในแถบเอเชียเป็นหลัก ก็เพราะว่ามะม่วงเป็นผลไม้ซึ่งมีการเน่าเสียได้ง่าย การขนส่งไปตลาดที่อยู่ใกล้จะช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากการเน่าเสียได้บ้าง และการขนส่งยังเสียค่าใช้จ่ายถูกกว่าตลาดที่อยู่ไกล ทำให้มะม่วงของไทยมีราคาไม่สูงนัก พอที่จะแข่งขันเรื่องราคากับมะม่วงของประเทศที่เป็นคู่แข่ง (รังสรรค์, 2531)

พันธุ์มะม่วงไทย

มะม่วงไทยแบ่งออกตามประโยชน์ที่ใช้ได้ 3 ประเภท คือ มะม่วงดินสุก มะม่วงมัน มะม่วงสำหรับแปรรูป ประเทศไทยมีพันธุ์มะม่วงมันเป็นจำนวนมาก ซึ่งประเทศอื่น ไม่มี

มะม่วงกินสุกพันธุ์สำคัญ ได้แก่ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ ทองดำ พิมเสนแดง อกร่อง แรด ตับเป็ด

มะม่วงมันพันธุ์สำคัญ ได้แก่ พิมเสนมัน เขียวเสวย สายฝน หนองแซง แรด ทองดำ

มะม่วงแปรรูปที่สำคัญ ได้แก่ แก้ว สามปี เป็นต้น

มะม่วงน้ำดอกไม้

มะม่วงน้ำดอกไม้ มีหลายสายพันธุ์ ส่วนมากมีนิสัยในการออกดอกทะวาย พันธุ์ที่เป็นทะวาย จะมีทรงพุ่มเตี้ย ออกดอกง่ายระยะเวลาตั้งแต่แตกดอกอ่อนจนถึงออกดอกสั้น เช่น ตัดแต่งกิ่งกลางเดือนตุลาคม พอครบ 6 วัน สามารถออกดอกทัน เป็นต้น (สภาพปลูกบางเขน) ขนาดและน้ำหนักผลได้มาตรฐานโลก คือสามารถผลิตให้มีน้ำหนัก 3 ผลต่อกิโลกรัม ได้ไม่ยากนัก คุณภาพของเนื้อผลดีมาก รสหวานอร่อย เนื้อละเอียด ไม่มีเสี้ยน และ ตลาดต่างประเทศรู้จักดี

สำหรับข้อเสียหรือจุดอ่อนของพันธุ์น้ำดอกไม้ก็มีเช่นกัน เช่น สีสรร ทรงผลอาจยาวไปหน่อย ฯลฯ แต่เราอาจปรับปรุงพันธุ์ให้ดีได้โดยนำเอาลักษณะดีต่างๆ ที่เราต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มเข้าไป

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีข้อดีคือ

1. มีรูปทรงดี สีสวย มีสีเหลืองทอง หรือเหลืองนวลสดุดตา
2. คุณภาพผลค่อนข้างสม่ำเสมอทั้งขนาด น้ำหนัก และคุณภาพอื่นๆ
3. รสหวาน เย็น ตรงกับรสนิยมของชาวต่างประเทศ
4. มีกลิ่นหอมเล็กน้อย ไม่ฉุน
5. เนื้อมาก ละเอียด และเมล็ดลีบ
6. เลี้ยงค่อนข้างง่าย

นอกจากนี้ยังได้เปรียบในแง่ของการผลิตและราคาคือ

1. เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะทะวาย สามารถบังคับให้ออกก่อนฤดูกาลหรือนอกฤดูกาลได้โดยใช้สารเคมี
2. ทรงพุ่มค่อนข้างเตี้ยสะดวกในการปฏิบัติดูแลรักษาและปลูกได้จำนวนต้นต่อพื้นที่มาก
3. ให้ผลตอบแทนเร็ว เพียง 1-2 ปี ก็อาจให้ผลผลิตบ้างแล้ว

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นับตั้งแต่ทฤษฎีเซล (cell theory) ตั้งขึ้นมาโดย Schwann และ Schleiden ในปี ค.ศ. 1839 โดยมีใจความว่า สิ่งมีชีวิตทั้งหลายประกอบด้วยอนุภาคเล็กๆ ซึ่งเรียกว่า " เซล " นักวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ได้พยายามเลี้ยงเนื้อเยื่อของสัตว์และคน โดยสามารถทำให้เนื้อเยื่อของสัตว์และคนมีชีวิตอยู่ และมีการเจริญเติบโตได้สำเร็จ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเนื้อเยื่อสัตว์และคนนั้น ก็ถูกจำกัดเพียงมีการเจริญเติบโตเท่านั้น ไม่สามารถที่จะชักนำให้เนื้อเยื่อเหล่านี้พัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ ได้

สำหรับด้านพืชนั้น ได้มีการค้นคว้าภายหลังจากการค้นคว้าทางด้านสัตว์ ในปี 1902 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Haberlandt คิดว่าเนื้อเยื่อพืชซึ่งประกอบด้วยเซลน่าจะนำมาเลี้ยงให้มีชีวิต และเจริญเติบโตได้เหมือนเนื้อเยื่อของสัตว์ การทดลองค้นคว้าเกี่ยวกับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้เริ่มขึ้นนับตั้งแต่นั้นมา และประสพความสำเร็จก้าวหน้าไปรวดเร็วกว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อของสัตว์และคนมาก

การทดลองค้นคว้าส่วนใหญ่ในระยะแรก ๆ นั้น ความสำเร็จจำกัดอยู่เพียงสามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชมีชีวิตรอดอยู่ในอาหารเทียมได้ หลังจากที่ White ได้พบสูตรอาหารใหม่ที่สมบูรณ์ และเหมาะสมที่จะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุดในสมัยนั้น ซึ่งให้ชื่อว่า " White's medium " ความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ขยายกว้างขวางขึ้น กล่าวคือ เนื้อเยื่อสามารถมีชีวิตรอด มีการเจริญต่อไปและสามารถพัฒนาเป็นต้นและ/หรือรากใหม่ได้การค้นคว้าทางด้านธาตุอาหารอันเป็นองค์ประกอบและปัจจัยสำคัญ ได้มีการปรับปรุงขึ้นเรื่อยๆ ตามวิวัฒนาการความรู้ที่มนุษย์ได้มีความเข้าใจพืชมากขึ้น ปัจจุบันมีสูตรอาหารที่ได้ดัดแปลงไปจากสูตรอาหารของ White มากมายหลายสูตรด้วยกัน ซึ่งแต่ละสูตรอาจมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสารประกอบเคมีที่ใช้ หรือความเข้มข้นหรือปริมาณที่ใช้ เป็นต้น ทำให้การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประสพความสำเร็จอย่างกว้างขวางตามมา

นอกจากสูตรอาหารที่เป็นปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้สำเร็จแล้ว ในปี 1957 Skoog และ Miler ได้พบว่า การพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็นต้นหรือรากขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของฮอร์โมน 2 กลุ่ม คือ อ๊อกซิน (auxins) และ ไซโตคินิน (cytokinins) โดยพบว่า หากอัตราส่วนของอ๊อกซินต่อไซโตคินินสูงกว่าอัตราสมดุลย์แล้ว เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส (callus) และราก แต่ในทางตรงข้าม ถ้าอัตราของอ๊อกซินและไซโตคินินต่ำกว่าอัตราสมดุลย์ เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอด ถ้าอัตราของสาร 2 กลุ่มนี้สมดุลย์ เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอดและราก ผลจากการค้นคว้าเรื่องฮอร์โมนนี้ ทำให้ ความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่กระจายกว้างขวางยิ่งขึ้นทุกที ๆ

การทดลองค้นคว้าได้เริ่มมาตั้งแต่ปี 1902 ก็จริงอยู่ งานส่วนใหญ่เป็นงานค้นคว้าในห้องปฏิบัติการ เพิ่งจะนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างและจริงจังเมื่อประมาณ 20 ปีที่ผ่านมานี้เอง

ความเจริญก้าวหน้าทางเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชได้ลึกซึ้งมากยิ่งขึ้นทั้งทางด้านสรีระ กายภาพ และพฤติกรรมของพืช สามารถที่จะนำความรู้นี้ไปใช้ควบคุมการทำงานและพฤติกรรมของพืชบางอย่างได้ เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้กว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์ดีให้ได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันสั้นได้สำเร็จ ทำให้อุตสาหกรรมกล้วยไม้ตัดดอกแผ่ขยายได้อย่างรวดเร็ว

ประโยชน์จากเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว จากความสำเร็จในการเลี้ยงส่วนของพืช เนื้อเยื่อ เซล รวมทั้งโปรโตพลาสต์ จึงได้มีผู้สนใจที่จะนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์ (pure science) และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ (applied science) การใช้ประโยชน์จากเทคนิคนี้ นอกจากจะใช้ประโยชน์ในงานวิจัยแล้วยังใช้ประโยชน์ในทางการค้าอีกด้วย

สำหรับทางด้านการเกษตรนั้น เทคนิคตการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางใน 4 สาขาด้วยกัน คือ

1. การขยายสายพันธุ์ (clonal propagation) คือ การขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศแบบหนึ่งจากชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งของพืช ทำให้ได้ต้นพืชที่ตรงตามพันธุ์เดิมทุกประการในปริมาณมากภายในเวลาจำกัด

2. การปรับปรุงพันธุ์ (crop improvement)

2.1 การสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมต่างจากปกติ เช่น กล้วยไม้ ต้นที่มีโครโมโซม 3 ชุด จะให้ดอกดกกว่าต้นที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ

2.2 การตัดเอาไข่ที่ยังอ่อนมาเลี้ยงหรือไข่ที่เพิ่งผสมมาเลี้ยงจะทำให้ประสพความสำเร็จ

2.3 การถ่ายละอองเกสรและผสมเกสรในหลอดแก้ว

2.4 การแยกความแปรปรวนของเซล ในพืชบางชนิดเนื้อเยื่อที่อยู่ติดกัน

2.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี หรือการใช้สารเคมี เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลชิชิน

2.6 การผสมพันธุ์โดยใช้โปรโตพลาสต์ เช่น สามารถทำให้พืชชนิดหนึ่งที่ใช้ไนโตรเจนในอากาศไม่ได้ (non-fixating crop) กลายเป็นพืชที่ใช้ไนโตรเจนในอากาศได้ (fixating crop) โดยการรวมโปรโตพลาสต์ของพืชที่ใช้ไนโตรเจนในอากาศไม่ได้เข้ากับพืชที่ใช้ไนโตรเจนในอาหกาศได้

3. การผลิตพืชปราศจากโรค (disease-free plants)

4. การเก็บรักษาพืช (plant preservation) การเก็บรักษาโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะใช้เนื้อที่และแรงงานน้อยและปลอดภัย ซึ่งอาจทำได้โดยการเลี้ยงในหลอดแก้ว และคอยเปลี่ยนอาหารอยู่เรื่อยๆ หรือจะเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำเพื่อให้มีการเจริญเติบโต อันมีผลทำให้มีการเปลี่ยนอาหารน้อยลง นอกจากนี้ อาจเก็บเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ โดยเนื้อเยื่อไม่ตาย

การเจริญและการพัฒนาของเนื้อเยื่อ

ความสามารถของเซลที่พร้อมจะมีการเจริญเติบโตไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (Totipotency) การเปลี่ยนแปลงนี้นอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระ เคมี และกายวิภาค(anatomy) ของเซลแล้ว ยังมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ(amorphology)

โดยหลักการแล้วเซลพืชจะมีลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่ครบสมบูรณ์ ซึ่งสามารถเจริญไปเป็นทั้งต้นได้ แต่การเจริญและการพัฒนานี้ไม่เกิดกับเซลที่ยังอยู่ในต้นพืชทุกเซล ทั้งนี้เพราะความสัมพันธ์ของเซลที่มีต่อกันในต้นพืช

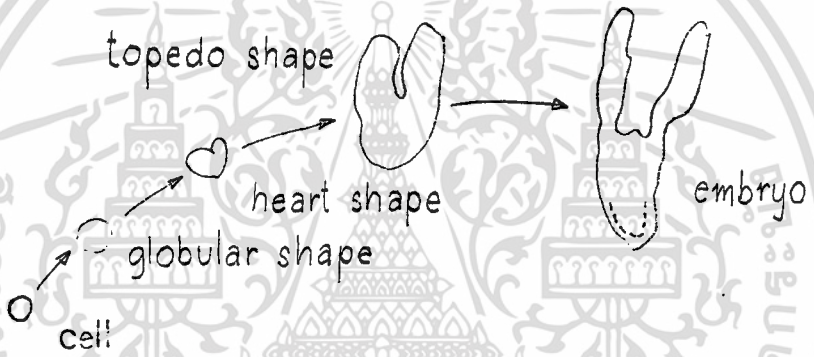
การเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลพาเรนไคมาไปเป็นยอด ราก ใบ และ/หรือ ดอกนั้น เกิดขึ้น 2 กระบวนการ คือ

1. Organegenesis คือ การเกิดเป็นยอด ราก และ/หรือ ส่วนอื่น ๆ โดยการรวมตัวของกลุ่มเซลพาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกันเป็น meristematic cell ซึ่งเซลมีขนาดเล็ก แวคิวโอ (vacuole) เล็กและไซโตพลาสเข้มข้นมีการแบ่งตัวในอัตราสูง กลุ่มเซลเหล่านี้อาจจะเรียก " Meristemoids " ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นจุดเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของยอดหรือการเกิดยอด ราก หรือส่วนอื่น ๆ เกิดขึ้นเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน ขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อหรือเซลได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญไปเป็นอะไร

2. Embryogenesis คือ การเกิดยอด ราก และ/หรือส่วนอื่น ๆ โดยเซลจะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนการพัฒนาของไข่ หลังได้รับการผสม กล่าวคือ เซลจะแบ่งตัวและเจริญเป็น Poembryo, Globular shaped embryoed, Heart shaped embryo, Torpedo shaped embryo จนกระทั่งเป็น embryo ซึ่งจะเจริญไปเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยปลายข้างหนึ่งของ embryo จะเจริญเป็นยอด อีกข้างหนึ่งเป็นราก



ข้อแตกต่างของ organogenesis และ embryogenesis

1. การเชื่อมต่อสำหรับระหว่างยอดและราก (Shoot-root connection) ในการเกิด organogenesis นั้น การเกิดรากและยอดเป็นกระบวนการเกิดที่เป็นอิสระต่อกัน ฉะนั้น การเกิดยอดและรากอาจจะไม่ติดต่อกันก็ได้ รากอาจจะเกิดบริเวณหนึ่ง ส่วนยอดอาจจะเกิดอีกบริเวณหนึ่ง แม้ว่าจะเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัสด้วยกัน แต่ในบางครั้งการเกิดยอดและรากอาจจะใกล้กันมากจนเชื่อมติดต่อกันได้ หรือ เนื้อเยื่อส่วนที่เป็นต้นสามารถเกิดเป็นรากทำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ได้ แต่ embryogenesis นั้นยอดและรากจะต้องต่อกัน เพราะยอดและรากพัฒนามาจากเซลเดียวกัน

2. Polarity การเกิดเป็นยอดหรือรากในแคลลัสนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหรือสิ่งมากระตุ้นให้เกิดเป็น meristematic cell ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากก็ได้ ฉะนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงเชื่อว่าเซลที่เกิด Organogenesis นั้นไม่มี polarity เซลที่เกิดขึ้น embryogenesis นั้นมี bipolar เพราะส่วนหนึ่งของเซลจะเกิดเป็นยอด ส่วนอีกด้านหนึ่งจะเกิดเป็นรากแน่นอน

3. การเชื่อมต่อระหว่างท่อน้ำ ท่ออาหาร (vascular bundle connection) ท่อน้ำ-ท่ออาหาร ของรากและยอด ที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการ organogenesis อาจจะต่อหรือไม่ต่อถึงกันก็ได้ แต่มักจะต่อถึงท่อน้ำ-ท่ออาหาร ที่มีอยู่และในชิ้นส่วน แต่ท่อน้ำ-ท่ออาหาร ของรากและยอดที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการ embryogenesis จำเป็นต้องต่อถึงกัน

การศึกษาการเกิดแคลลัสในมะม่วงมีดังนี้

Rao และคณะ(1981) ศึกษาการชักนำให้ใบเลี้ยงมะม่วงเกิดแคลลัส แต่มิได้ระบุแน่นอนว่าเป็นโมโนเอ็มบริโอ หรือพอลิเอ็มบริโอในอาหาร MS น้ำมะพร้าว 15เปอร์เซ็นต์ น้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ และวิตามินต่าง ๆ พบว่าอาหารที่มีฮอร์โมนไคเนติน 11.5ไมโครโมล และ NAA 27 ไมโครโมล อุณหภูมิ 22-26 องศาเซลเซียส ในที่มืด จะเกิดแคลลัสมีลักษณะสีดำเกิด ขึ้นภายใน 2-3 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้นี้นำมาถ่ายลงในอาหารใหม่ แต่ไม่เกิดการแตก ยอดหรือราก และ ไม่แสดงลักษณะเจริญต่อ

Litz และคณะ(1982) ศึกษาการชักนำให้เอ็มบริโอของมะม่วงพวกพอลิเอ็มบริโอให้เกิดแคลลัส โดยเอ็มบริโอได้หลังจากการผสม 40-60 วัน เอ็มบริโอจะอยู่กันเป็นกลุ่ม แยกให้เป็นเอ็มบริโอให้ลงในอาหาร MS ที่มีสารอนินทรีย์หลักลดลงครึ่งหนึ่งโดยเพิ่มน้ำตาลซูโครส 0.18 โมล กลูตามีน 2.7 มิลลิโมล แอสคอบิก 0.5 มิลลิโมล และ น้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ไม่เกิดแคลลัส

Litz และคณะ (1984) ทำการทดลองเช่นเดียวกันที่เคยทำในปี 1982 แต่ใช้ 2-4D เปอร์เซ็นต์(Maheshwari และRangaswamy, 1958)เมื่อย้ายแคลลัสมะม่วงลงในอาหารเหลวจะเจริญได้เร็วกว่าในอาหารแข็ง มะม่วงที่มีการศึกษาแล้วเกิดแคลลัสนี้ มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอลิเอ็มบริโอ		ไมโนเอ็มบริโอ
น้ำดอกไม้	Ono	Irwin
Arematic	Paris	Ruby
Cambodiand	Sabre	Tommy Atkins
Chino	Stringless Peach	
Heart	Tuehau	
Jame Saigon	Turpentine	
Kensington	Mikongensis	

หลังจากการเลี้ยง 3-4 เดือน เอมบริโอที่เจริญนี้จะมีขนาด 5-6 เซนติเมตร เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะเกิดการงอกซึ่งจะเกิดขึ้นเอง และเนื่องจากการขยายขนาดจะทำให้เกิดการช้ำ สีดำคล้ำ และตายในระหว่างการงอก

ตัแปรสำคัญต่อการเลี้ยงแคลลัสมะม่วง

Cultivar การขยายพันธุ์มะม่วงผ่านจาก somatic embryogenesis มีปัจจัยหลายปัจจัยจะทำให้เกิดหรือไม่เกิด มะม่วงที่เป็น polyembryonic จะพร้อมเจริญมากกว่า monoembryonic และในพวก polyembryonicเองก็ยังมีความแตกต่างกันระหว่างจำนวนเอ็มบริโอของแต่ละชนิดอีกด้วย

Explant การใช้ nucellus หรือ nucellar-derived embryos เป็นส่วนที่เหมาะในการนำมาใช้ในการทดลองมากที่สุด ได้มีการพยายามเลี้ยง (explants)ส่วนอื่น ๆ ของมะม่วงมาแล้ว แต่ก็ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากลักษณะความอ่อนของเซลของ nucellus จะมีความพร้อมทางพันธุกรรมมากกว่าเซลส่วนอื่น ๆ ของมะม่วง ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องทราบช่วงที่เหมาะสมที่สุดในการย้าย nucellus จากรังไข่ ในมะม่วงที่เป็น monoembryonic การแยก zygotic embryo ออกจากถุง embryo sac จะทำได้ยาก polyembryonic จะใช้ส่วนที่เป็น nucellus หรือ nucellan embryosในการชักนำให้เกิดแคลลัสก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะในการเลี้ยง

ส่วนประกอบของอาหารมีส่วนสำคัญ โดยลดองค์ประกอบที่เป็นสารอินทรีย์หลัก (major salt) และเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ฮอร์โมนที่ทำให้เกิดแคลลัส คือ 2-4D และการเติม reducing agent ascorbic acid Activated charcoal จะเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิด Somatic embryogenesis การย้ายอาหารบ่อยมีความจำเป็นอย่างยิ่ง และแคลลัสจะเจริญได้ดีในอาหารเหลวมากกว่าอาหารแข็ง

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การปรับปรุงพันธุ์ของมะม่วงในระดับพันธุวิศวกรรม จำเป็นต้องประสบความสำเร็จในการชักนำให้เซลมะม่วงเกิดเอมบริโอเจนนิกก่อน และสามารถเลี้ยงเซลในรูปของเซลแขวนลอยได้ เพื่อเป็นข้อมูลปฐมภูมิในการศึกษาและพัฒนาในขั้นประยุกต์ต่อไป เช่น การแลกเปลี่ยนเจรัมพลาสต์ หรือโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น จึงขึ้นอยู่กับการอยู่รอดของเซลที่จะนำมาเลี้ยงเป็นเซลแขวนลอย แม้ว่าเท่าที่ผ่านมา Litz และคณะ (1952) สามารถชักนำให้เอมบริโอของมะม่วงเกิดแคลลัสแบบซูโดบูบิลได้ แต่แคลลัสนี้ก็ยังไม่เหมาะสำหรับการศึกษาที่เกี่ยวกับการคัดเลือกและแยกเซลโปรโตพลาสต์ (วิจิตร,2529)

การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้รับความสนใจมาตั้งแต่ ค.ศ.1892 โดย Klercher ใช้ใบมีดโกนตัดเซลพืชให้ส่วนที่เป็นโปรโตพลาสต์แยกตัวออกมาเมื่อแช่ในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูง ต่อมา Cooking (1960) ได้ทดลองใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับการใช้สารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูง ช่วยในการแยกโปรโตพลาสต์สามารถพิสูจน์ได้ว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากผลมะเขือเทศ สร้างผนังเซลขึ้นมาใหม่ได้ (อ้างโดยประสาทพร,2528) Takebe และคณะ (1975) ได้พัฒนาการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้วิธีกลร่วมกับการใช้เอนไซม์ จนสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ไม่จำกัดจำนวน ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ต่อมา Upadhya (1975) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบมันฝรั่ง S. tuberosum L. CV. Seeglinde และเพาะเลี้ยงจนได้แคลลัส (callus) และ ได้กล่าวว่า โปรโตพลาสต์ที่สามารถแบ่งเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้จะมีการเพิ่มขนาด และมีการจัดเรียงตัวของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และไซโตพลาสมิกสแตรนด์ (cytoplasmicstrand) เกิดขึ้นก่อนการแบ่งเซล นอกจากนั้นยังกล่าว สารประกอบแอมโมเนียมในอาหารที่ใช้เลี้ยงไซโตพลาสต์ เช่น แอมโมเนียมไนเตรตหรือ แอมโมเนียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นต่ำสุด 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นพิษต่อการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยทำให้โปรโตพลาสต์ตายภายใน 2-3 วัน สารประกอบแอมโมเนียมมีความจำเป็นต่อการแบ่งเซล และนิยมใช้ในระยะการเลี้ยงแคลลัสเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์มากขึ้น Shepard และ Totten (1977) ได้รายงานเป็นครั้งแรกถึงความสำเร็จในการพัฒนาต้นมันฝรั่งจากการแยก และเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของมันฝรั่งพันธุ์รัสเซท เบอร์แบงค์ (Russet berbank) และชี้ให้เห็นถึงปัจจัยของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ว่า ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม อายุพืชและปัจจัยที่เหมาะสมในระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น ชนิดของแสง ความเข้มแสง ระยะเวลาการให้แสง ตลอดจนอุณหภูมิและความชื้น จากรายงานของ Shepard และTotten (1977) ทำให้มีการศึกษาวิจัยถึงปัจจัยเหล่านี้มากขึ้น (grun Chu.1978; David, 1981) การทดลองของ Sharon และ Grun (1986) ซึ่งได้ทำการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มันฝรั่ง 9 โคลน (clone) พบว่าความแตกต่างของโคลนพืชมีผลต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้

การศึกษาเกี่ยวกับการรวมโปรโตพลาสต์ Binding (1966) ทดลองใช้หลอดแก้วดูดโปรโตพลาสต์ให้มากขึ้น พบว่าสามารถทำให้โปรโตพลาสต์รวมตัวกันได้เอง (spontaneous-fusion) ต่อมาได้มีผู้ใช้สารเคมีหลายชนิดกระตุ้นให้เกิดการรวมของโปรโตพลาสต์ในปริมาณมากๆ ได้ เช่น NaO_3, PEG (polyethylene glycol), PVA (polyvinyl alcohol)และแคลเซียมไอออน เป็นต้น ในการทดลองมักใช้สารเคมีหลายชนิดร่วมกัน เช่นใช้ PVA 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ หรือเดกแตรนซัลเฟต (dextran sulphate) ซึ่งมีประสิทธิภาพกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์รวมกันได้สูง จากการทดลองของ Kameya (1983) พบว่าผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่สูงแม้จะเพิ่มอัตราการรวมของโปรโตพลาสต์ แต่ขณะเดียวกันก็ทำให้สัดส่วนของโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตลดลงด้วยเช่นกัน ไอออนของสารประกอบที่มีผลทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการรวมตัวของโปรโตพลาสต์ ได้แก่ แคลเซียมอิออนและมักนีเซียมไอออน ในขณะที่แมงกานีสไอออน โซเดียมไอออนและโปตัสเซียมไอออนไม่สามารถชักนำให้เกิดการรวมของโปรโตพลาสต์ได้ สารเคมีที่มีผู้นิยมใช้กันมากที่สุด ได้แก่ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,540 ถึง 6,000 ร่วมกับการใช้สารละลายที่มีความเป็นกรดเป็นด่างสูงและแคลเซียมไอออน บทบาทของ PEG ต่อการรวมโปรโตพลาสต์ยังไม่มีคำตอบที่แน่ชัด แต่เข้าใจว่าจะไปมีผลต่อสารประกอบประเภทฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มโปรโตพลาสต์ ได้มีการทดลองใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นให้เกิดการรวมของโปรโตพลาสต์แทนการใช้สารเคมีโดย Senda และคณะ (1980) ใช้ไมโครอิเลคโทรด (microelectrodes) ที่เป็นแก้วจุ่มลงไปในส่วนผสมของโปรโตพลาสต์ โดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 5-12 ไมโครแอมป์ นาน $2x10^{-3}$ - $4x10^{-3}$ วินาที สามารถรวมโปรโตพลาสต์ได้ Zimmermann และ Scheurich (1981) ทดลองใช้กระแสไฟฟ้าสลับ 1 โวลต์นาน 10^{-3} - 10^{-3} วินาที พบว่าทำให้การรวมตัวของโปรโตพลาสต์ดีขึ้น Senda และคณะ (1982) ได้ดัดแปลงวิธีการนี้ โดยเติมแคลเซียมไอออนและสารพอลิเมอร์หลายตัวที่ทำให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอน (agglutination) และพบว่า ช่วยทำให้โปรโตพลาสต์รวมตัวกันได้มากยิ่งขึ้น

อัตราการรวมตัวของโปรโตพลาสต์และอัตราส่วนการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์จะขึ้นอยู่กับชนิดของโปรโตพลาสต์ เช่น ในบางครั้งโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบจะอ่อนแอต่อสภาพที่มีความเป็นกรดเป็นด่างสูง และอ่อนต่อสภาพที่มีสนามไฟฟ้าที่มีความหนาแน่นมากกว่า 40 โวลท์ต่อตารางเซนติเมตร (Kameya, 1983) ปัจจุบันมีผู้นิยมใช้กระแสไฟฟ้ารวมโปรโตพลาสต์จากพืชต่าง ๆ และใช้ในการถ่ายทอด (tran-fection) สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเข้าไปในโปรโตพลาสต์ของยาสูบ กับโปรโตพลาสต์จากรากแครอท และรายงานการถ่ายทอด RNA ของ TMV เข้าไปในโปรโตพลาสต์ของยาสูบและ cowpea โดยใช้เครื่องมือที่มีอิเลคโทรดทำด้วยแก้วเคลือบทอง ให้กระแสไฟฟ้าไหลแบบต่อเนื่องนาน 20 นาที Gilmour และคณะ (1989) ได้ทดลองรวมโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลแขวนลอยของ Medicaga sative และ Medigo borealis โดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 40 โวลต์ต่อตารางเซนติเมตร นาน 1-4 นาที ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก แม้ว่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้กระแสไฟฟ้าในการรวมโปรโตพลาสต์จะประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวาง แต่เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองมีราคาสูงมาก

การจำแนกลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์นั้น ส่วนมากมักอาศัยลักษณะพิเศษของเซล พ่อ-แม่ มาช่วยในการสังเกตลักษณะของเซลล์ลูกผสม เช่น ลักษณะเผือกขาวในยาสูบ (Melchers Labib, 1974) เมื่อนำโปรโตพลาสต์จากเซลสายพันธุ์นี้มารวมกัน ลูกผสมที่ได้จะมีความสามารถในการสร้างเม็ดสีได้เช่นเดียวกับพืชปกติ นอกจากนั้นการทดลองกับแครอทและพิทูเนีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลที่เหมาะเฉพาะเซลเผือกเท่านั้น พวกที่มีสีเขียวจะไม่สามารถเจริญได้ พบว่าหากมีกลุ่มเซลสีเขียวเจริญขึ้นในอาหารดังกล่าว ก็แสดงว่าเป็นกลุ่มเซลที่ได้จากการรวมตัวของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากเซลเผือกและเซลสีเขียว เป็นต้น หากเซลพ่อ-แม่ ไม่มีลักษณะพิเศษที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกเซลลูกผสมได้ วิธีการที่นิยมใช้กันในปัจจุบันได้แก่ การสังเกตขนาดของเซลลูกผสม โดยที่ลูกผสมที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าเซลปกติ แต่อาจมีข้อผิดพลาดได้เช่นกัน ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาด้านอื่นประกอบด้วย เช่น การนับจำนวนโครโมโซมของลูกผสม การวิเคราะห์ isozyme และการตรวจสอบโดยวิธี DNA-DNA hybridization เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ มักใช้เมื่อทำการเลี้ยงลูกผสมให้เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ใหม่แล้ว (Reinert และ Binding, 1986) ซึ่งทำให้ขาดข้อมูลเบื้องต้นในการเจริญเติบโตของเซลลูกผสม ในบางการทดลองจึงนิยมกระตุ้นให้พืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างไปจากเดิม เช่น ลักษณะการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะบางชนิด ดังรายงานของ Wullems และคณะ (1980) ทดลองกระตุ้นให้เซลพืชต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกันมากขึ้น สารปฏิชีวนะที่ใช้ได้ผลในการคัดเลือกเซลลูกผสม ได้แก่ streptomycin, kanamycin และ cycloheximide เป็นต้น

หลังจากสามารถแยกลูกผสมที่ต้องการออกมาได้แล้ว ขั้นตอนสำคัญของการผลิตพืชโดยการรวมโปรโตพลาสต์ก็คือ การเลี้ยงเซลลูกผสมนั้นให้เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ ซึ่งมักประสบปัญหาเกี่ยวกับการรักษาสมดุลของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงไม่เพียงพอต่อการขับสารต่าง ๆ ของเซลลูกผสมออกมา เนื่องจากเซลลูกผสมที่ได้มีปริมาณน้อยเกินไป รวมทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เซลลูกผสมที่ได้รับความกระทบกระเทือนจากการใช้สารเคมีในการกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันขึ้น อาจทำให้สูญเสียความสามารถในการสร้างส่วนต่าง ๆ เช่น ยอดและรากเพื่อเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป Kaoและ Michaylux (1975) จึงได้ใช้วิธีการเลี้ยงเซลลูกผสมในปริมาณอาหารน้อย ๆ และ ลดปริมาณเซลลงมาเหลือ $2-4x10^3$ เซลต่อมิลลิลิตร ใน 8-P medium พบว่า ประสบความสำเร็จค่อนข้างสูง เรียกวิธีการนี้ว่า microdrop culture ซึ่งเป็นวิธีการที่มีแนวโน้มที่จะใช้กันมากในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3. อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดมีจำนวนหลังจุดทศนิยมของหน่วยกรัม 4 ตำแหน่ง กระบอกตวง ปิเปตต์ บีกเกอร์ แท่งแก้วคน เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง เตาไมโครเวฟ ขวดสีชาพร้อมฝา และหม้อนึ่งความดัน

3.2 เครื่องมือสำหรับใช้ในการย้ายชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ มีดผ่าตัดและจานแก้ว

3.3 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารในสูตร Murashige และSkoog (1962)

3.4 สารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA(naphthalene acetic acid) และ ไคเนติน (kinetin, 6-furfuryl amino purine)

3.5 แหล่งที่มาของใบมะม่วงและตามะม่วง

ตัวอย่างใบมะม่วงน้ำดอกไม้ (Mangifera indica L.) อายุ 15-20 วัน หลังการแตกช่อใหม่ จากฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ลักษณะสีเขียวอ่อน มันเป็นเงา ช่อที่ผ่านการแยกออกเก็บไว้ใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

3.6 การฟอกเชื้อ

3.6.1 การฟอกฆ่าเชื้อใบมะม่วง

การฟอกฆ่าเชื้อใบมะม่วง ใช้วิธีเช็ดใบมะม่วงด้วยสำลีชุบสารละลายที่โรยเชื้อลดแรงตึงผิวแล้วจึงล้างน้ำสะอาดออกทันที แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 5 วินาที จึงย้ายลงในน้ำยาคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ที่หยด TWEEN-20 5-6 หยดฟอกฆ่าเชื้อโดยการเขย่านาน 30 นาที เพื่อเพิ่มการสัมผัสน้ำยาคลอรอกซ์กับผิวใบ ทำการฟอก 2 ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จนหมดกลิ่นน้ำยาคลอรอกซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การฟอกฆ่าเชื้อตามะม่วง

การฟอกฆ่าเชื้อตามะม่วง ใช้แปรงอ่อน ชุบสารละลายลดแรงตึงผิว ทีโพล ถูตามข้อที่เกิดตา แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 10 วินาที จึงย้ายลงในน้ำยาฟอกคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ที่หยด TWEEN-20 5-6 หยด เขย่านาน 30 นาที ทำการฟอก 2 ครั้ง แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จนหมดกลิ่นน้ำยาคลอรอกซ์

เมื่อฟอกฆ่าเชื้อเสร็จเรียบร้อยแล้ว จึงนำไปหั่นให้ได้ขนาดที่ต้องการ แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่เตรียมไว้

3.7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและตาของมะม่วง

3.7.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบมะม่วง

ใบมะม่วงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแห้งหมาดๆ คีบด้วยปากคีบแล้วเจาะด้วยเครื่องเจาะกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้วมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วย้ายลงอาหารแข็งและอาหารเหลว MS ที่มีส่วนฮอร์โมน ดังนี้

NAA KIN	4 (มก./ล.)	5 (มก./ล.)	6 (มก./ล.)
2 (มก./ล.)	1	2	3
2.5 (มก./ล.)	4	5	6
3 (มก./ล.)	7	8	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 1 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 4 ต่อ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 5 ต่อ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 6 ต่อ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 4 ต่อ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 5 ต่อ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 มีความเข้มข้นของออร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 6 ต่อ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 4 ต่อ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 5 ต่อ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ KIN เท่ากับ 6 ต่อ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารสูตรละ 5 ซ้ำ สังเกตผล และ บันทึกผลการทดลองทุกวัน

3.7.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามะม่วง

กิ่งอ่อนมะม่วงที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อแล้ว นำตัดตาข้างเป็นรูปตัว v แบ่งตามะม่วงที่ได้ส่วนหนึ่งแช่ในสารละลาย ascorbic acid ส่วนหนึ่งไม่ต้องแช่สารละลาย ascorbic acid แล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS และ 1/2 MS (สารอนินทรีย์หลักลดลงครึ่งหนึ่ง) มีสัดส่วนฮอร์โมนดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NAA KIN	4 (มก./ล.)	5 (มก./ล.)	6 (มก./ล.)
2 (มก./ล.)	1	2	3
2.5 (มก./ล.)	4	5	6
3 (มก./ล.)	7	8	9

สูตรอาหารละ 5 ซ้ำ สังเกตผลการทดลองบันทึกผลทุกวัน

นำเนื้อเยื่อใบและตาของมะม่วงไปเพาะในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ ในช่วง 23-27 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 700 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.3 ขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์จากใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ขั้นที่ 1 นำใบมะม่วงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วย้ายใบลงในอาหาร MS ที่มี แมนิทอล 0.5 โมลาร์ เพื่อให้เกิดการพลาสโมไลซิส ทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมงในตู้ปลอดเชื้อ (Holten LamiAir model TL)

ขั้นที่ 2 เตรียมอาหาร 1/2 MS (สารอินทรีย์หลักลดลงครึ่งหนึ่ง) แมนิทอล 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 โมลาร์อย่างละ 5 ซ้ำ เตรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสและเพกติเนส ผสมกันแล้วนำมากรองโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ เพื่อแยกจุลินทรีย์ออก

ใช้ปากคีบใบมะม่วงที่ผ่านการพลาสโมไลซิสแล้วประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดอาหาร 1/2 MS ที่มีสารละลายเอนไซมเซลลูเลสและเพกติเนสพร้อมทั้งสารรักษาแรงดันออสโมซิสความเข้มข้นต่างๆกันโดยบ่มไว้นาน 9 ชั่วโมง หลังจากบ่ม 9 ชั่วโมง จึงตรวจหาโปรโตพลาสต์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายรูปลักษณะโปรโตพลาสต์ และตรวจวัดต่อทุก 9 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 ในชั่วโมงที่ 9,18,24 นำมาเหวี่ยงปั่นที่ 700 รอบต่อนาที นาน 4 นาที แล้วล้างโปรโตพลาสต์ โดยดูดส่วนใสด้านบนออกแล้วเติม 1/2 MS ที่มีแมนิทอลเฉพาะแต่ละตัวอย่าง เหวี่ยงปั่นซ้ำ ทำ 3 ครั้ง เพื่อล้างเอนไซม์ออก นำส่วนล่างของหลอดมาเลี้ยงในอาหารเหลว 1/2 MS ของแต่ละระดับแมนิทอล ในจานอาหารปิดขอบจานอาหารโดยพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ แล้วตรวจหาโปรโตพลาสต์ด้วยใช้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนับจำนวนเซลด้วย Haemacytometer คำนวณความเข้มข้นเซลต่อปริมาตรที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 1 รูปแสดงการเจาะใบมะพร้าวด้วยอุปกรณ์เจาะกระดาษ ก่อนชั่นย้ายลงเอาทาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2 รูปแสดงการเตรียมสารละลายเอนไซม์ อาหาร 1/2 MS ที่มีความเข้มข้น mannitol ต่างๆ และใบมะม่วงที่ผ่านการพลาสโมไลซิสแล้ว ก่อนจะเริ่มการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 รูปแสดงเครื่องกรอง MILLIPORE พร้อมทั้งเครื่องปั๊มสูญญากาศ ในการกรองจุลินทรีย์ออกจากเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ตารางที่ 1

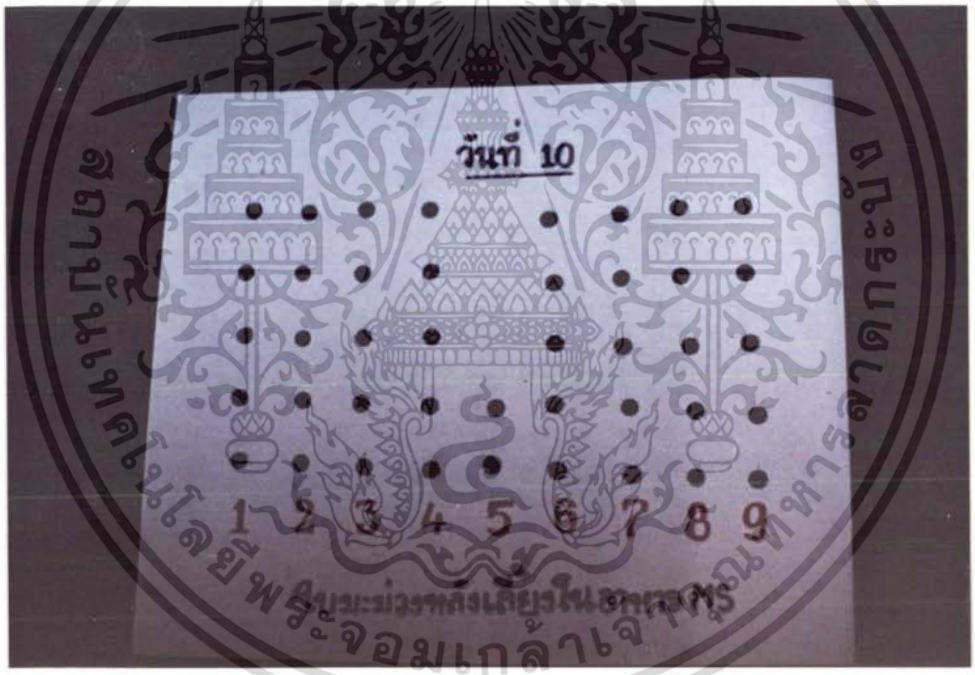
อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการพัฒนาของใบมะม่วง

อาหารสูตร MS ร่วมด้วย		เวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของใบ
NAA (มก./ล.)	KINETIN (มก./ล.)		
4	2.0	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัดเกิน 60%
	2.5	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด ตายหมด
	3.0	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลปนสีเหลืองตามขอบตัด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด ตายหมด
5	2.0	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด มีสีเขียวปน ประมาณ 50%
	2.5	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด ตายหมด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด ตายหมด
	3.0	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด เกิน 60%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสูตร MS ร่วมด้วย		เวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของใบ
NAA (มก./ล.)	KINETIN (มก./ล.)		
6	2.0	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด มีสีเขียวปนประมาณ 60%
	2.5	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัด
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัดเกิน 80%
	3.0	10	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัดเกิน 60%
		15	ไม่มีแคลลัส ใบมีสีน้ำตาลตามขอบตัดและปล่อยสารสีน้ำตาล ตายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงความแตกต่างของใบมะม่วงที่เลี้ยงในอาหาร MS ในสูตรอาหารต่าง ๆ ณ. วันที่ 10 หลังลงอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 แสดงความแตกต่างของใบมะม่วงที่เลี้ยงในอาหาร MS ในสูตรอาหารต่างๆ ณ.วันที่ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 แสดงความแตกต่างของใบมะม่วงที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน NAA และ KIN ในวันที่ 1 และวันที่ 30 ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 แสดงความแตกต่างของอาหารสูตร MS เสริมด้วยออร์โมน NAA และ KIN ที่ใช้เลี้ยงใบมะม่วง ที่วันที่ 1 และวันที่ 30 ของการทดลอง พบว่า ที่วันที่ 30 ของการทดลอง อาหารที่ใช้เลี้ยงจะมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น เนื่องจาก ใบมะม่วงปล่อยสารพวกฟีนอลลิคลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 8 อิทธิพลของฮอร์โมน KIN ต่อการเกิดสารประกอบฟีนอลลิคในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน NAA เดียวกัน จะพบว่า ในอาหารที่เสริมด้วย 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร KIN จะเกิดสีน้ำตาลมากกว่าในอาหารที่เสริมด้วย 2.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอาหารสูตรเดียวกัน ในวันที่ 1 ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 9 แสดงใบมะม่วงอายุ 7 วัน (ขณะใบสีน้ำตาล) ในอาหาร MS น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยง 1 สัปดาห์ สังเกตว่าสารสีน้ำตาลเกิดจากบริเวณก้านใบมากกว่าบริเวณอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการพัฒนาการของตามะม่วง ในอาหารเหลว

อาหารสูตร 1/2 MS น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว ร่วมด้วย		ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะตามะม่วง	
			แช่กรดแอสคอร์บิก 1 กรัมต่อลิตร นาน 30 นาที	ไม่แช่กรดแอสคอร์บิก
NAA (มก./ล.)	KINETIN (มก./ล.)			
4	2.0	1	*	*
		2	***	***
	2.5	1	*	*
		2	***	***
	3.0	1	*	*
		2	***	***
5	2.0	1	*	*
		2	***	***
	2.5	1	*	*
		2	***	***
	3.0	1	*	*
		2	***	***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสูตร 1/2 MS น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว ร่วมด้วย		ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะตามะม่วง	
			แช่กรดแอสคอร์บิก 1 กรัมต่อลิตร นาน 30 นาที	ไม่แช่กรดแอสคอร์บิก
NAA (มล./ล.)	KINETIN (มล./ล.)			
6	2.0	1	*	*
		2	***	***
	2.5	1	*	*
		2	***	***
	3.0	1	*	*
		2	***	***

* เกิดสีน้ำตาลเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ *** เกิดสีน้ำตาลเกิน 90 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการพัฒนาการของตามะม่วง ในอาหารแข็ง

อาหารสูตร 1/2 MS น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็ง ร่วมด้วย		ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะตามะม่วง	
			แช่กรดแอสคอร์บิก 1 กรัมต่อลิตร นาน 30 นาที	ไม่แช่กรดแอสคอร์บิก
NAA (มก./ล.)	KIN (มก./ล.)			
4	2.0	1	*	*
		2	**	**
	2.5	1	*	*
		2	**	**
	3.0	1	*	*
		2	**	**
5	2.0	1	*	*
		2	**	**
	2.5	1	*	*
		2	**	**
	3.0	1	*	*
		2	**	**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสูตร 1/2 MS น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็ง ร่วมด้วย		ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะตามะม่วง	
			แช่กรดแอสคอรร์บิก 1 กรัมต่อลิตร นาน 30 นาที	ไม่แช่กรดแอสคอร์บิก
NAA (มล./ล.)	KINETIN (มล./ล.)			
6	2.0	1	*	*
		2	**	**
	2.5	1	*	*
		2	**	**
	3.0	1	*	*
		2	**	**

* เกิดสีน้ำตาลเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ** เกิดสีน้ำตาลเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ แต่น้อยกว่าน้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 แสดงความแตกต่างของตามะม่วงที่แช่ ascorbic acid ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนและลักษณะโปรโตพลาสต์มะม่วงที่ได้จากการย่อยในสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้น manitol ต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น manitol (โมลาร์)	เวลาย่อยที่ (ชั่วโมง)	โปรโตพลาสต์ (เซลต่อมิลลิลิตร)	ลักษณะที่สังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์
0.25	9	–	พบเศษใบ
	18	100	มีขนาดเล็กติดกับเศษใบจำนวนมาก
	24	–	พบเศษใบจำนวนมาก
0.30	9	20	พบเศษใบจำนวนมาก
	18	1000	มีขนาดเล็ก ติดกับเศษใบจำนวนมาก
	24	–	–
0.40	9	60	มีเศษใบติดอยู่
	18	3000	โปรโตพลาสต์ขนาดกลมใหญ่
	24	–	พบเศษใบ
0.50	9	–	พบเศษใบ
	18	1540	โปรโตพลาสต์ติดกับเศษใบ
	24	–	–
0.60	9	10	โปรโตพลาสต์ขนาดเล็ก
	18	–	พบเศษใบ
	24	–	พบเศษใบ
0.70	9	–	พบเศษใบ
	18	–	พบเศษใบ
	24	–	พบเศษใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 11 โปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกใบมะม่วงที่ manitol 0.4 โมลาร์ นาน 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

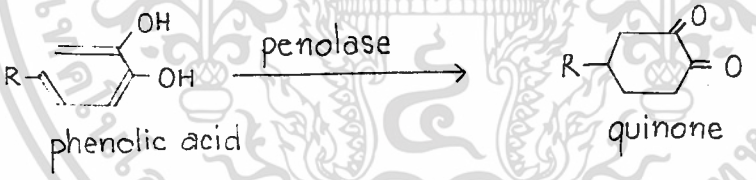
การชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบและตามะม่วง

การเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบและตามะม่วงบนอาหารแข็งสูตร MS และ 1/2MS ตามลำดับ โดยใช้สัดส่วนฮอร์โมนระหว่าง NAA 4.0,5.0,6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติก 2.0, 2.5,3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายังไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อของใบและตามะม่วงได้ เนื่องจากประสบปัญหาการเกิดสีน้ำตาลอย่างรวดเร็วภายในเวลาอันสั้นเพียง 1-2 วัน ซึ่งจะเกิดสีน้ำตาลตามรอยตัดของใบและตามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (พบว่าปริมาณสารสีน้ำตาลจะสูงขึ้น (ตารางที่ 1)) ทั้งนี้เนื่องจากสาร phenolic compound ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อเกิดกระบวนการออกซิเดชัน โดยการทำงานของเอนไซม์ phenolic oxidase ทำให้สาร phenolic compound มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารพอลีเมอร์ (ตารางที่ 3,4) ซึ่งเป็นสารสีน้ำตาลหรือดำ (สัมพันธ์, 2526) การเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพอาหารเหลวจะเกิดสีดำมากกว่าสภาพอาหารแข็ง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสภาพอาหารเหลวซึ่งเลี้ยงบนเครื่องเขย่าทำให้เนื้อเยื่อได้รับออกซิเจน มีผลส่งเสริมการเกิดกระบวนการออกซิเดชันของเนื้อเยื่อมากขึ้น จึงทำให้เกิดสีน้ำตาลมีปริมาณมากขึ้น จากการทดลองใช้ ascorbic acid ลงในอาหาร 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถลดการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อได้เล็กน้อย อาจเนื่องจากการใส่ ascorbic acid ลงในอาหารซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ ทำให้ ascorbic acid บางส่วนสลายไปด้วยความร้อน ปริมาณ ascorbic acid จึงไม่เหมาะสม ทำให้ลดการเกิดสีน้ำตาลได้เล็กน้อย แต่จากรายงาน การใช้ ascorbic acid พบว่ามีผลสามารถลดการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อลงได้ เช่น การแช่เนื้อเยื่ออินทผาลัมใน ascorbic acid เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ก่อนการเลี้ยง การแช่เนื้อเยื่อ Strelitzja reginae เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสารละลาย ascobic acid จะช่วยทุเลาการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อได้ (Zic และ Halevy, 1983) การที่ ascorbic acid สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อได้เนื่องจากเป็นสาร antioxidant จึงมีผลลดการเกิดกระบวนการออกซิเดชันองเนื้อเยื่อ

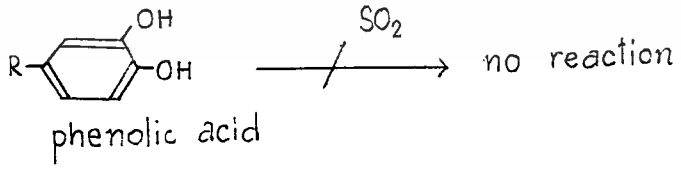
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ asscorbic acid ที่ทำหน้าที่เป็น antioxidant แล้ว ควรมีการเติม antioxidant ตัวอื่นในการช่วยลดสารสีน้ำตาลด้วย เช่น cysteine, dithiothreitol (DTT), polyvinylpyrrolidone (PVP), activated charcoal(Christopher,1983) และพวกซัลไฟด์ต่าง ๆ(โปแตสเซียมซัลไฟต์, โปแตสเซียมไบซัลไฟต์, โพแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ซัลไฟด์ยังมีบทบาทในการยับยั้งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymeatic browning reaction) ปฏิกิริยานี้ส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับผักและผลไม้ ซึ่งเมื่อถูกหั่นหรือตัดและพื้นผิวสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยน phenolic compound ซึ่งไม่มีสีไปเป็นสาร O-quinone ที่มีสี ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ phenolase เอนไซม์นี้มีอยู่ทั่วไปในผักและผลไม้สด ส่วนเอนไซม์อื่น ๆ เช่น tyosinase, catecholase, phenoloxidase และ asscorbinase ก็ให้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน สารมีสีที่เกิดขึ้นสามารถ polymerize และถูกออกซิไดซ์ต่อจนมีสีน้ำตาลเข้ม ปฏิกิริยาแสดงในดังรูป



เมื่อเติมสารซัลไฟต์ลงไปจะเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ เป็นผลทำให้เอนไซม์หมดสภาพไป ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้



ปฏิกิริยาระหว่างสาร phenolic compound กับเอนไซม์ phenolase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามการใช้ antioxidant มิใช้เป็นการแก้ไขการเกิดสารสีน้ำตาลทั้งหมด ต้องมีการพิจารณาถึงอาหารที่ใช้ว่าควรอยู่ในสภาพอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ อุปกรณ์ที่สะอาด และระยะเวลาของผิวเนื้อเยื่อที่สัมผัสอากาศก่อนลงอาหารควรน้อยที่สุด

การตัดใบมะม่วงและตามะม่วงจากต้นเดียวกัน พบว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากการตัดครั้งแรกจะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่าที่ตัดในครั้งที่ 2 และ 3 เพราะการตัดเนื้อเยื่อมาเลี้ยงทำให้เนื้อเยื่อได้รับความกระทบกระเทือน และโอกาสที่จะปนเปื้อนของเชื้อซึ่งเข้าทางรอยที่ตัดเนื้อเยื่อค่อนข้างสูง ซึ่งสภาพความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อและช่วงเวลาขณะทำการตัดเนื้อเยื่อมีผลต่อการอยู่รอดของเซล จึงทำให้เนื้อเยื่อที่ตัดในครั้งที่ 2 และ 3 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลต่ำกว่าครั้งแรก

การที่เนื้อเยื่อมะม่วงไม่สามารถพัฒนาจนเป็นแคลลัสและเอมบริออยนั้น ตั้งอยู่บนสมมุติฐานดังนี้

1.การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปจะพบว่า เนื้อเยื่อมีการปลดปล่อยสารประเภท phenolic ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงเป็นสารพอลีเมอร์เป็นฉนวนลดการซึมผ่านของสารอาหารเข้าไปภายในเซล ขณะเดียวกันก็จะผลิต phenolic ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อ (Butcher,1977)และ การเลี้ยงแครอท พบว่าเซลมีการปลดปล่อยสาร phenylacetic acid และ p-OH benzoic acid ซึ่งเป็นสารยับยั้งกระบวนการเกิดเอ็มบริออย (Fridborg และคณะ, 1978) สำหรับการเลี้ยงเซลมะม่วงในงานวิจัยนี้พบว่า เซลมีการปลดปล่อยสารซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเซล อีกทั้งผิวเซลของมะม่วงและใบมะม่วงประกอบด้วย คิวติเคิล มันเป็นเงา สารอาหารจึงซึมผ่านเข้าสู่ผิวเซลที่อยู่ภายในเซล และลดพื้นที่การซึมผ่านของอาหารมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวทั้งหมดของเนื้อเยื่อ

2.ลักษณะกายภาพของเซลมะม่วง มีศักยภาพไม่เหมาะต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับเซล(morphogenetic potential) ทั้งนี้เพราะนิวเคลียสของเซลมะม่วงมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่จะรับเข้าสู่เซล และ สารอาหารที่นำเข้าสู่เซลอาจมีความซับซ้อนทางชีวเคมีมากกว่าพืชพวกไม้ผุ่ม และพืชล้มลุก จากการทดลองในการชักนำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดเอ็มบริโอเจนเนซิสในพืชพวกไม้ยืนต้น ตั้งแต่ปี 1975 จนถึง1984 ประสบความสำเร็จเพียง 16 แฟมาลี่ ได้แก่ Vitis vinifera (Mullin และคณะ, 1975) Ribrum rubrum (Zatyko และคณะ, 1975) ส้ม และ แอปเปิล (FAO, UN. Rome, 1980) เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่จะนิยมชักนำการเกิดแคลลัสโดยใช้เอ็มบริโอซึ่งได้จากหลังการผสมเกสร 40-60 วัน

ผลของแมนิทอลต่อเซลโปรโตพลาสต์ เมื่อทำการแยกโปรโตพลาสต์ แรงดันออสโมติกต่อเซลจะเพิ่มขึ้นเพราะผนังเซลหลุดออกไป ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์จึงต้องมีการควบคุมแรงดันออสโมติกทั้งขณะทำการแยกและขณะทำการเลี้ยง แม้แต่ในขั้นตอนการย้ายเซลหรือเซลที่ผ่านขั้นตอนการพลาสโมไลซิสแล้วแรงดันออสโมติก ก็ยังส่งผลต่อเมแทบอลิซึมและการเจริญของโปรโตพลาสต์รวมถึงการเปลี่ยนแปลงภายในเซลเอง ปริมาณ DNA ที่หนาแน่นและการสังเคราะโปรตีนจะลดลง ปัจจัยทั้งสองนี้ก็ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกรวมไปถึงเซลบโปรโตพลาสต์ที่สังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตเองได้ ก็จะช่วยลดการควบคุมแรงดันออสโมติกของอาหารด้วยเช่นกัน จากการทดลองของ Premecz และคณะ (1978) พบว่าสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนของใบยาสูบ ก็มีผลต่อการเพิ่มหรือลดแรงดันออสโมติกด้วย

การลดแรงดันออสโมติกปกติจะใช้น้ำตาล แมนิทอล ซอล์บิทอล กลูโคส หรือซูโครส ในสารละลายเอนไซม์ ในขั้นการแยกและในขั้นการเลี้ยง น้ำตาลแต่ละตัวก็จะมีสมบัญที่แตกต่างกันไป แมนิทอล และซอล์บิทอล จะนิยมใช้กันมากที่สุด แมนิทอลจะเฉื่อยต่อการซึมผ่าน และการเมแทบอลิซึมของเซลโปรโตพลาสต์ ส่วนน้ำตาลเฮกซิทอล จะใช้เป็นส่วนผสมหรือใช้เดี่ยวๆ ก็ได้ โปรโตพลาสต์ส่วนมากจะจมในสารละลายน้ำตาลเฮกซิทอล และลอยในสารละลายซูโครส น้ำตาลที่จะใช้ในการควบคุมแรงดันออสโมติกควรเฉื่อยต่อเมแทบอลิซึม การใช้น้ำตาลที่เมแทบอลิซึมได้กับน้ำตาลที่ยากต่อการเมแทบอลิซึมในสัดส่วนที่ พอเหมาะจะเป็นประโยชน์ต่อเซล (Lu และคณะ, 1981) การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารที่มีกลูโคส และ ซูโครส จะเป็นอันตรายต่อเซลในการย้ายอาหารในที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แรงดันออสโมติก มีผลต่อความเสถียร การรอดชีวิต และการเจริญในขั้นต่อๆ ไป ของเซล

แรงดันออสโมติกที่เหมาะสมต่อเซลพืชจะมีน้ำตาลในช่วง 0.3-0.7 โมลาร์ขณะเดียวกันต้องมีการควบคุมเกลือแร่ที่มีอยู่ในอาหาร ขณะทำการย่อยด้วยเอนไซม์และในการเลี้ยงจะไปลดความเข้มข้นของน้ำตาล ทำให้เกลือแร่ซึมผ่านเข้าเซลโปรโตพลาสต์ ทำให้ยากต่อการรักษารูปร่างของเซล และเกลือแร่ในอาหารยังสามารถไปลดปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์ได้ด้วย ควรหลีกเลี่ยงการใช้เกลือเป็นตัวควบคุมแรงดันออสโมติก แต่อย่างไรก็ตาม แคลเซียมคลอไรด์ไม่ควรเกิน 0-1-0.5 มิลลิโมล เพราะยังจำเป็นในช่วงการพลาสโมไลซิส ด้วยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะม่วง สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1.ส่วนตามะม่วงจะเกิดสีน้ำตาลได้เร็วกว่า ส่วนใบมะม่วงในช่วงเวลาเดียวกันในอาหารชนิดเดียวกัน

2.การเลี้ยงตามะม่วงในอาหารเหลวจะช่วยเร่งการปลดปล่อยสารสีน้ำตาล เนื่องจากการเขย่าฟลาสก์ในอาหารเหลวช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เปลี่ยน phenolic compound เป็นสารสีน้ำตาลได้เร็วขึ้น

3.ascorbic ที่ใส่ลงในอาหาร 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลได้เพียงเล็กน้อย ส่วนการแช่ตามะม่วงในสารละลาย ascorbic acid 1 กรัมต่อลิตร นาน 30 นาที ก่อนย้ายลงอาหาร ให้ผลไม่แตกต่างกันกับการไม่แช่ ascorbic acid ซึ่งย้ายอาหารทันทีหลังการตัดเนื้อเยื่อตา ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ ascorbic acid ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัว anti-oxidant ไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเกิดสารสีน้ำตาล และ เวลาในการแช่ยังน้อยเกินไป เนื้อเยื่อยังดูดซับไม่เพียงพอ การทดลองในขั้นต่อไปควรเพิ่ม ascorbic acid ในแต่ละขั้นตอนมากขึ้น และเพิ่มเวลาแช่ตามะม่วงในสารละลาย ascorbic acid มากขึ้น

4.สารควบคุมการเจริญ KINETIN ที่ความเข้มข้นมากกว่า 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลโดยตรงต่อลักษณะใบมะม่วงทำให้เกิดสีน้ำตาลปนเหลือง ขณะที่ความเข้มข้น KINETIN ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังคงมีส่วนสีเขียวของใบมะม่วง ส่วนสารควบคุมการเจริญ NAA ที่ช่วงความเข้มข้น 4, 5, 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังไม่ให้ผลกระทบต่อใบมะม่วงชัดเจนนัก

5.ข้อเสนอแนะในการลดสารสีน้ำตาลของใบมะม่วง คือ ในการทดลองเลี้ยงใบมะม่วงร่วมกับการเลี้ยงเอ็มบริโอส้มในขวดอาหารเดียวกัน โดยตั้งสมมุติฐานที่ว่า ascorbic acid คือ วิตามินซี ซึ่งมีมากในพวกส้ม เพื่อให้เอ็มบริโอส้ม ผลิตสาร antioxidant ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phenolic compound ซึ่งจะช่วยลดการผลิตสารพอลิเมอร์ที่จะยับยั้งการซึมผ่านของสารอาหาร และ pheolic compound เช่น phenylacetic acid และ p-OH benzoic acid ซึ่งการยับยั้งการเกิดเอ็มบริออย (Fridborg และ คณะ, 1978) การเลี้ยงเอ็มบริโอลัสร่วมด้วยอาจช่วยยืดอายุการอยู่รอดของเซลมะม่วง

6.การทดลองเลี้ยงพืชไม้พุ่มเล็ก เช่น Pancy และ Cosmos ในสูตรอาหาร MS ปกติมีสารควบคุมการเจริญ NAA 0.1, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร KINETIN 0.1, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ภายใน 10 วัน ซึ่งแสดงว่า พืชชั้นสูงมีศักยภาพในการเกิดแคลลัสได้ยากกว่าพืชล้มลุกและไม้พุ่ม ในอาหาร MS

7.ความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้คือ 3×10^3 เซลต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารรักษาแรงดันออสโมติก คือ 0.4 โมล แมนิทอล

8.เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยจำเป็นต้องเหวี่ยงปั่นเพื่อล้างเอนไซม์ให้หมด เพื่อไม่ให้เป็นพิษต่อเซลโปรโตพลาสต์ในขั้นตอนการเลี้ยงซึ่งต้องล้างอย่างน้อย 2-3 ครั้ง ทำให้เซลโปรโตพลาสต์ที่ได้สูญเสียไปในระหว่างการเหวี่ยงปั่น หรืออาจจะกล่าวได้ว่า การเหวี่ยงปั่นที่ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ยังไม่ใช่ความเร็วที่เหมาะสมต่อขั้นตอนในการล้างโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

MURASHIGE AND SKOOG MEDIA (1962)

MACRONUTRIENT	mg/l
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170

MICRONUTRIENT	mg/l
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.7H_2O$	6.9
$ZnSO_4.H_2O$	6.14
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025

IRON	mg/l
Sodium EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.28

Organic components	mg/l
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine	0.5
Thiamine	0.1
sucrose	30 gm/l
pH	5.6

Reference:

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ปิเปตสารละลายจากสต็อกอาหารตามปริมาตรที่กำหนดใน ตาราง ก. ลงในขวดวัดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นกรองประมาณ 400 มิลลิลิตร

2. ละลายอาหารส่วนที่เป็นของแข็งเช่น น้ำตาล, Myo-Inositol, ascorbic acid แล้วเทลงในขวดวัดปริมาตร ให้มีปริมาตรประมาณ 800 มิลลิกรัม เติมสารควบคุมการเจริญ เช่น NAA, BA, KINETIN

3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. นำไปปรับพีเอช ให้ได้ 5.7-5.8 ด้วย NaOH หรือ HCL

5. ในกรณีที่เป็นอาหารแข็ง ให้นำอาหารที่ปรับพีเอชแล้ว มาอุ่นในไมโครเวฟเตือด แล้วเติมวุ้นพร้อมทั้งคนให้วุ้นละลาย แล้วจึงแบ่งใส่ขวดอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Binding, H. Regeneration and verschmelzung nackter laumosprotoplasten. Z. Pflanzenphysiol. 53: 305-321. 1966.

Binding, H., Nehls, R., Kock, R., Finger,J., and Mordh D., Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the Dicotyledoneae class, Z. Pflanzenphysiol., 101, 119, 1981.

Butcher, D.N. Secondary product in tissue cultures, pp. 680–690. In J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Spirnger - Verlag, Berlin., 1977.

David, A. E. Disease resistance : Incorporation into sexually incompatible somatic hybrid of the genus Nicotiana. Science 213 : 907-909. 1981.

Fridborg, G., M. Pedersen, L. Landstrom and T. Eriksson. The effect of activated charcoal on tissue cultures:adsorption of metabolites inhibiting morphogensis. Physiol. Plant. 43a: 104-106. 1978.

Food and Agricultural Organization of the U.N. FAO Production Yearb. FAO, U.N Romme. 1979.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gilmour, D. M., Davey and E.C. Cocking. Production of somatic Hybrid tissue following chemical fusion of protoplasts from albino cell suspention of Medicago sativa and Medicago borealis Plant Cell Report 8 : 29-32. 1989.

Grun, P. and L. Chu. Development of plants from protoplasts of solanum (solanaceae). Amer. J. Bot. 65 : 538. 1970.

Jones, H., A. Karp and M.G.K. Jones. Icolation, culture, and regeneration of plant from potoplast. Plant Cell Reports 8 : 307-311. 1989.

Kameya, T. Studies on plant cell fusion by dextran : Effects of pH, inorganic salts and electrical stimulus. Cytologia. 48 : 873-878. 1983.

Kao, K.N. and M.R. Michayluk. Nutrition requirements for growth of Vicia hajastana cell and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126 : 105-110. 1975.

Litz, R.E. In vitro somatic embryogenesis from jaboticaba Myrciaria cauliflora D.C. Berg. callus. HortScience 19(1): 62-64. 1984.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lu, C. Y., Vasil, V., Vasil, I. K. Isolation and culture of protoplastsof Panicum maximum Jacq. (Guinea Grass) -somatic embryogenesis and plantlet formation, Z. Pflanzenphysiol., 104, 311, 1981.

Maheshwari, P. and Rangaswamy, N.S. Polyembryony and in vitro culture of embryos of Citurs and Mangifera. Indian J. Hortic. 15 : 272-282. 1958.

Melchers, G. and G. Labib. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplast. I. Selection of light resistant hybrids of " hapoid " light sensitive varietiers of tobacco. Molec. Gen. Genet. 135 : 277-294. 1974.

Mullins, M.G. and C. Srinivasan. Somatic embryos and plantlets freom an ancientclone of the grapevine (cv. Cabernet - Sauvignon) by apomixis in vitro. J. Expt. Bot. 27 : 1022-1030. 19776.

Nehls, R. Isolation and regeneration of protoplast from Solanum nigrum L. Plant Sci. 12 : 183-187. 1978.

Premecz, G., Ruzicska, P., Olah, T., and Farkas, G. L., Effect of " osmotic stress " on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco protoplasts, Planta, 141,33,1978.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reinert, J. and H. Binding. Differentiation of Protoplast and of Transfromed Plant Cell. Springer - Verleg Berlin, Heidelberg 156 p. 1986.

Reinert, J. and H. Binding. Results and Problems in Cell Differentiation. Springer -Verlag Berlin, Heidelberg 157 p. 1986.

Schumann, U., H. Koblitz and Z. Opatmy. Plant recovery from longterm callus cultures and from suspension culture derived protoplasts of Solanum plureja . Biochem. Physiol. Pflanz. 175 : 670-675. 1980.

Senda, M., H. Morikawa, H. Katagi, T. Takada and Y. Yamada. Effect of temperature on membrane fludity and protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 57 : 33-36. 1980.

Sharon, R. and P. Grun. Isolation, culture, and regeneration of leaf mesophyll protoplasts of selected clones of Solanum . Potato Research 29 : 451-462. 1986.

Shepard and R.E. Totten. Mesophyll cell protoplast of potato. Isolation, proliferation and plant regeneration. Plant Physiol. 60 : 313-316. 1977.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shepard, J.F. and Tolten, R.E., Mesophyll cell protoplasts of potato, proliferation, and plant regeneration, Plant Physiol., 60, 313, 1979.

Tavazza, T. and G. Ancora. plant regeneration from mesophyll protoplasts in commercial potato cultivars (Primura, Kennebec, Spunta and Desiree). Plant Cell Report 5 : 243-245 1986.

Upadhya, M.D. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of potato (Solanum tuberosum L.). Potato Res. 18 : 438-455. 1975.

Uijtewaal, R.A., L.C.J.M. Suurs and E. Jacobsen. Protoplast Fusion of monohaploid (2n=x=12) potato clone: Identification of somatic hybrids using malate dehydrogenase as a biochemical marker. Plant ci. 51 : 277-284. 1987.

Wullems, G.J., L. Molendijk and R.A. Schilperoort. The expression of tumor markers in intraspecific somatic hybrids of normal and crown gall cellfrom Nicotiana tabacum . Theor. Appl. Genet. 56 : 203-208. 1980.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zatyko J.M., I. Simon, and C.S. Szabo. Induction of polyembryony in cultivated ovules of red currant. Plant Sci. Lett. 4 : 281-283. 1975.

Zic, M. and A.H. Halevy. Control of oxidative browning and in vitro propagation of Strelitzia reginae. HortScience 18 : 434 - 436. 1983.

Zimmermann, U. and P. Scheurich. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 1514 : 26-32. 1981.

ทานตะวัน พูลสวัสดิ์. การชักนำให้เกิดแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนร่าอายุ 5 ปี. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ. 2530.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. หลักสรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2526.

ดร. ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. 1-3, 85-88 หน้า มกราคม 2524.

รังสรรค์ โนชัย " การวิเคราะการส่งออกมะม่วงของประเทศไทย " คณะเศรษฐศาสตร์ มหาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2531.

ผศ. วิจิตร วังใน " เอกสารประกอบการบรรยายเรื่อง มะม่วง " ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2529.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้