- 9 ม.ค. 2541
สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยทักษิณ
104096
B. 29716

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

มาณี แก้วชนิด
ปนัดดา พรหมจรรย์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณรายได้
ของมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ 2541

หนังสือนี้เป็นสมบัติของสำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยทักษิณ
หากตกอยู่กับผู้ใดโดยไม่ชอบธรรม
ผู้พบเห็นกรุณานำส่งสำนักหอสมุดด่วน จักเป็นกุศลยิ่ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยทักษิณที่ได้ให้เงินอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์เปลื้อง สุวรรณมณี ที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัย และตรวจแก้งานวิจัยฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ ผศ.ดร. สมภพ อินทสุวรรณที่กรุณาตรวจแก้บทคัดย่อและ Abstract และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาที่ให้การสนับสนุนและความสะดวกเกี่ยวกับสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ และขอขอบคุณผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามที่ให้ความร่วมมือด้วยดีมาตลอด ณ โอกาสนี้ด้วยความขอบคุณยิ่ง

มาณี แก้วชนิด
ปนัดดา พรหมจรรย์
กันยายน 2541

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบยาสูบในหลอดทดลอง สำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการถ่ายโอนยีนให้กับยาสูบต่อไปในอนาคต โดยการตัดแผ่นใบยาสูบจากต้นกล้าที่มีอายุ 30-35 วันมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BA/NAA เป็น 0.1/0.1, 0.1/0.5, 0.1/1.0, 0.5/0.1, 0.5/0.5, 0.5/1.0, 1.0/0.1, 1.0/0.5 และ 1.0/1.0 มก./ล. ตามลำดับ พบว่าแผ่นใบยาสูบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA/NAA 0.1/0.1 มก./ล. จะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์เฉลี่ย 5 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ สำหรับอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BA/NAA 0.5/0.1, 1.0/0.1 มก./ล. เนื้อเยื่อของแผ่นใบจะเจริญเป็นกลุ่มยอดเพียงอย่างเดียวเฉลี่ย 10 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อนำยอดเดี่ยวของเนื้อเยื่อใบยาสูบมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ที่ไม่มีส่วนผสมของฮอร์โมน พบว่ามีการสร้างรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ทั้งสองสูตร

Abstract

The objective of this research was to explore the most suitable culture medium for culture the leaf lamina of Tabacco (*Nicotiana tabacum*) in order to use for gene transformation by bacterium in the future research. Leaf laminar of *Nicotiana tabacum* were cut from leaf of seeding (30-35 days old) into small pieces (1 x 0.5 mm) and placed on various combinations of MS culture medium with hormone BA and NAA 0.1/0.1, 0.1/0.5, 0.1/1.0, 0.5/0.1, 0.5/0.5, 0.5/1.0, 1.0/0.1, 1.0/0.5 and 1.0/1.0 mg/l respectively. It was found that MS medium with BA/NAA at 0.1/0.1 mg/l was the most effective in inducing whole plant (average 5 plants / leaf lamina segment). Multiple shoots were regenerated in the culture medium with BA/NAA at 0.5/0.1, 1.0/0.1 mg/l (average 10 shoots / leaf lamina segment). Whole plant was achieved from the multiple shoot isolated, and transferred to both MS medium containing NAA 0.1 mg/l and hormone-free.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	
Abstract	
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญของปัญหา	
วัตถุประสงค์	
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	
ขอบเขตของการศึกษา	
ระยะเวลาที่ทำการวิจัย	
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	1
บทที่ 4 ผลการทดลอง	1
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	2
ข้อเสนอแนะ	2
เอกสารอ้างอิง	2
ภาคผนวก	2

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของ NAA และ BA ต่อการสร้างแคลลัส ยอด และรากจากชิ้นส่วนของแผ่นใบยาสูบ	17

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการเจริญของยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์	18
2	แสดงการเจริญของยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.5 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์	19
3	แสดงการเจริญของยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1.0 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์	19
4-5	แสดงการเจริญของแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.5 มก./ล. และ 1.0 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์	20
6-9	แสดงการเจริญของแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. ตามลำดับ และ NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1 เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์	21
10	แสดงยอดยาสูบที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์	22
11-12	แสดงรากยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม NAA 0.1 มก./ล. ตามลำดับ	23
13	แสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของแผ่นใบ	24

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเทคโนโลยีที่มีประโยชน์ต่อการผลิตพืชเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นด้านการขยายพันธุ์พืช หรือการปรับปรุงพันธุ์พืช และเป็นเทคนิคที่กำลังอยู่ในความสนใจซึ่งนับวันจะยิ่งเพิ่มความสำคัญมากยิ่งขึ้นในการนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อประโยชน์ที่เกี่ยวกับการศึกษาในขั้นสูง เช่น ด้านพันธุวิศวกรรม ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนที่ต้องการให้กับพืชที่เป็นเป้าหมาย หรือการสร้างพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคชนิดต่างๆ ก่อนที่จะมีการถ่ายโอนยีนที่ต้องการให้กับพืชเป้าหมายนั้นจะต้องมีการตรวจสอบการทำงานของยีนให้แน่ชัดก่อนว่าสามารถทำงานได้ดี เมื่อถูกนำเข้าเซลล์พืชเป้าหมายแล้ว รวมทั้งสามารถถ่ายทอดยีนดังกล่าว ให้กับรุ่นลูกต่อไปอีกด้วย ยาสูบเป็นพืชที่ได้รับความนิยมสูงมากในการนำมาใช้ในการทดลอง ติดตามดูการทำงานของยีน เนื่องจากยาสูบเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ จึงสามารถใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวถ่ายโอนยีนและมีวงชีวิตที่เหมาะสม ดังนั้นการศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ เพื่อให้ได้แบบแผนในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงใบยาสูบขั้นต้นและพัฒนาการของใบยาสูบ
2. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาใบยาสูบไปเป็นแคลลัส ยอด ราก และต้นยาสูบที่สมบูรณ์
3. เป็นแนวทางในการศึกษาขั้นพื้นฐานของการทดลองระดับสูงเช่น การถ่ายโอนยีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซินและไซโต-ไคนิน ต่อการสร้างแคลลัส ยอด และรากของยาสูบ
2. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยผ่านระบบ *Agrobacterium tumefaciens* ในยาสูบ
3. เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่น

ขอบเขตของการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้เป็นการหาระดับความเข้มข้นของ สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำใบยาสูบให้เกิดการพัฒนา เป็น แคลลัส ราก ยอด และต้นยาสูบที่สมบูรณ์

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย : ระยะเวลารวม 1 ปี

เริ่มการทดลองเดือนตุลาคม 2540

สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2541

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ยาสูบ (Tobacco)

ยาสูบมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nicotiana tabaccum* จัดอยู่ในตระกูล Solanaceae พวกเดียวกับมะเขือ พริก (สมภพ ,2525)

ยาสูบเป็นพวกไม้เนื้ออ่อน (herbaceous) มีระบบรากแก้ว (Tap root System) ตามธรรมชาติเป็นพืชข้ามฤดู (perennial) มีใบเป็นแบบ simple ขอบใบเรียบ มีรูปร่างหลายแบบ ส่วนดอกยาสูบจะเกิดบนช่อดอก (inflorescence) ซึ่งออกที่ส่วนยอดเป็นแบบ Terminal panicle แต่ละดอกเป็นดอกสมบูรณ์ รูปร่างแบบแตรปากกว้างเป็นพืชที่ผสมตัวเอง มีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ ม. เกษตร, 2525)

<u>พันธุ์ยาสูบ</u> ใบยาสูบในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด คือ พันธ์เวอร์จิเนีย, พันธุ์เบอร์เลย์, พันธุ์เตอร์กิจ และพันธุ์พื้นเมือง (ฝ่ายวางแผน และวิจัย ธ. ไทยพาณิชย์, 2528)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture)

หมายถึง การนำชิ้นส่วนพืช เช่น ใบ ดอก ตา เป็นต้น มาทำให้ปราศจากเชื้อโรค แล้วเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (Artificial medium) ซึ่ง ประกอบด้วยสารอินทรีย์ (พวกวิตามินต่างๆ) สารอนินทรีย์ น้ำตาล สารควบคุมการเจริญเติบโต ผงถ่าน ผงวุ้น เป็นต้น นำมารวมกัน แล้วนำมาทำให้ปลอดเชื้อ โดยวิธีการนึ่งด้วยความดันไอ อาหารสังเคราะห์จะมีชื่อแตกต่างกันออกไปตามชื่อของผู้ค้นพบและดัดแปลง (สมปอง, 2539)

แคลลัส (callus)

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาดต่างกัน รูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์จะมีเปอร์เซ็นต์ของแวคิวโอ (Vacuole) สูง แคลลัสที่เกาะตัวกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้าเป็นเซลล์เกาะกันหลวมๆ เรียกว่า friable callus ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ(Pigment) มีส่วนน้อยที่พบว่ามีสีเขียวเพราะมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองเพราะมีแคโรทีนอยด์และฟราโวนอยด์ สีม่วงเพราะมีแอนโทไซยานิน ซึ่งปริมาณและชนิดของรงควัตถุดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยของแสง (ประศาสตร์ , 2536)

แคลลัสจะมีลักษณะเป็นก้อนมีสี โครงสร้างแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ (สมปอง, 2539)

เนื้อเยื่อและอวัยวะของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ คือ แคมเบี่ยม คอร์เทค ไส้ ท่อลำเลียงอาหาร ไซเลมพาเรนไคมา (ประสาสตร์, 2536) และราก ลำต้น ใบ อวัยวะสะสมอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ (มาลี ,2532)

Skoog และ Miller (1975) แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเกิดรากและต้นในแคลลัสยาสูบ กล่าวคือถ้าอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินต่ำกว่าระดับปกติของการเจริญของแคลลัส จะทำให้การเกิดราก ถ้าอัตราส่วน เหมาะสมเกิดการแบ่งเซลล์ได้แคลลัสเรื่อย ๆ ถ้าอัตราส่วนสูงกว่าระดับปกติทำให้เกิดต้น โดยมากรากจะเกิดตรงผิวแคลลัส เรียกว่าเป็น เอ็กโซจีนัส ออริจิน (Exogenous Origin) นอกจากนี้ยังเป็นโมโนโพล่า (Monopolaorgan) คือ เกิดเป็นรากหรือต้นอย่างใดอย่างหนึ่ง (คำนูญ, 2532)

เซลล์พืชจำนวนหลายตระกูลที่มีความสามารถในการพัฒนาราก ยอด หรือต้นอ่อน ตลอดจนต้นพืชที่สมบูรณ์จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ในอาหารสังเคราะห์ ความสามารถดังกล่าวเรียกว่า ความสามารถในการเกิดสัณฐานของพืช (Morphogenetic capabilities of plant) ซึ่งควบคุมโดยชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยง โดยทั่วไปออกซินมีผลส่งเสริมการแบ่งเซลล์และชักนำราก ในขณะที่ไซโตไคนินมีผลส่งเสริมพัฒนาการของกลุ่มเซลล์ไปเป็นอวัยวะ อัตราส่วนหรือสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดมีผลต่อการเกิดพืชต้นใหม่ ดังนี้คือ

สัดส่วนของออกซินสูง ไซโตไคนินต่ำส่งเสริมการเกิดราก

สัดส่วนของออกซินต่ำ ไซโตไคนินสูงส่งเสริมการสร้างยอด

สัดส่วนของออกซิน และไซโตไคนินเท่ากันส่งเสริมการสร้างแคลลัส (สมปอง, 2537)

เมื่อนำชิ้นส่วนลำต้น ใบ ราก มาตัดวางเลี้ยงบนอาหารแข็งหรืออาหารวุ้น ชิ้นส่วนดังกล่าวจะถูกชักนำให้มีการแบ่งเซลล์บริเวณรอยตัดหรือบริเวณที่มีบาดแผลเพื่อซ่อมแซมตัวเอง สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำแคลลัสได้ดีในช่วงแรกคือ 2,4-D อย่างไรก็ตาม พืชบางพืชต้องการเนปธาลีนอะซีติคแอสิด (NAA)

แคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ในอาหารเติมสารควบคุมต่าง ๆ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ แคลลัสที่มีรูปร่างส่วนเปราะ (Friable callus หรือ Fragile callus) มีสีเหลืองหรือเหลืองครีม มีลักษณะโปร่ง มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว มองดูคล้ายฟองน้ำ กับแคลลัสที่มีโครงสร้างแน่นทึบ (Compact callus) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่มีรูปร่างเป็นก้อนกลมเข็ง อาจมีการสร้างคลอโรฟิลล์ทำให้เห็นสีเขียวเข้ม เมื่อตัดดูทางกายวิภาคพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ไปเป็นรูปร่าง เช่น ยอด หรือต้นอ่อน แคลลัสประเภทหลังจึงอาจเรียกชื่อตามรูปร่างที่

ปรากฏเช่น แคลลัสที่ชักนำจากปาล์มน้ำมัน และสะเดา มีลักษณะเป็นปมแข็ง ๆ เรียกแคลลัสประเภทนี้ว่า nodular callus หรือ meristematic nodular callus

ออร์แกโนเจนเนซิส (Organogenesis)

เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนพืชไปแล้วบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชมียอดขนาดเล็กๆ หรือ ราก หรือทั้งต้นทั้งราก ปรากฏให้เห็นจากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงโดยตรง หรืออวัยวะดังกล่าวพัฒนาจากที่มีการสร้างแคลลัสก่อได้ เรียกว่าเกิดออร์แกโนเจนเนซิส (คำนูญ, 2532) เนื่องจากในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ทำการเพาะเลี้ยงมีสารควบคุมการเจริญในรูปออกซิน และไซโตไคนิน สารทั้งสองตัวนี้ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมชักนำการสร้างรากและยอดได้โดยที่ออกซินเข้มข้นสูงส่งเสริมการสร้างราก ส่วนไซโตไคนินสูงส่งเสริมการสร้างยอด

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยการสร้างผ่านแคลลัส

แคลลัสพัฒนามาจากบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เซลล์บริเวณดังกล่าว มีการดูดซึมน้ำ ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ หลังจากนั้นเนื้อเยื่อเจริญมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็นกลุ่มแคลลัส เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ออกเป็นพืชต้นใหม่ได้ ชิ้นส่วนพืชที่มีการพัฒนาแบบนี้คือ ลำต้น ใบ ราก ละอองเกสร ไข่อ่อน เป็นต้น การชักนำต้นพืชใหม่โดยกระบวนการสร้างยอดประสบผลสำเร็จจากการใช้ออกซินในรูป NAA และไซโตไคนิน ในรูป BA ร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (สมปอง, 2539)

ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

1. **สารควบคุมการเจริญเติบโต** (plant growth regulators) โดยเฉพาะฮอร์โมนพืช เช่น ออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งจากการพัฒนาการของพืชจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มนี้ คือถ้าสัดส่วนของออกซิน ต่อไซโตไคนินสูง พืชจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนออกซินต่อไซโตไคนินต่ำจะพัฒนาไปเป็นต้น และหากอยู่ในสัดส่วนที่ปานกลางหรือสมดุลก็จะพัฒนาไปเป็นแคลลัส จากการศึกษาพืชหลาย ๆ ชนิด พบว่า ออกซินที่อยู่ในช่วง 0.01-10.0 mg/l และ Kinetin (ไซโตไคนินชนิดหนึ่ง) 0.1-10.0 mg/l

2. **ธาตุอาหาร** (nutrien) นอกจากธาตุที่เป็นส่วนประกอบทั่วๆไป ของสูตรอาหารแล้วพบว่าอาหารเสริมจำพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามีน แอสปาจีน อาร์จีนีน เพียวรีน และไพริมิดีน เป็นต้น เคซีน ไฮโดรไลเซต สารสกัดจากมอลล์ สารสกัดจากยีสและน้ำมะพร้าว มีส่วนช่วยในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส

3. แหล่งคาร์บอน (Carbon sourus) แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ คือน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแซคคาโรส ความเข้มข้น 2 - 4 %

4. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Environmental factor) เช่น แสง การเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องการความเข้มข้นของแสงต่ำหรือไม่ใช้เลย อุณหภูมิเหมาะสมประมาณ 25 ^{0}C นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

5. สถานะของอาหารที่ใช้เลี้ยง (media status) จากรายงานพบว่า แคลลัสที่ใช้เลี้ยงในอาหารแข็งเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลว ทั้งนี้เพราะพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารน้อยกว่า และตรงตำแหน่งที่ชิ้นส่วนของแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism wasters) ที่เซลล์ปล่อยออกมา (ประศาสตร์ , 2536)

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีมากมายหลายสูตร แต่สูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ สูตรอาหารมูราชิคและสกุค (Murashige and Skoog) มีชื่อย่อว่า MS องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงโดยทั่วไป แบ่งได้ 5 กลุ่ม คือ

1. สารอนินทรีย์ แบ่งได้ 2 กลุ่มย่อย ๆ คือ

1.1 **ธาตุอาหารหลัก**

เป็นธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมากได้แก่ C, H, O, N, P, K, S, Ca และ Mg

1.2 **ธาตุอาหารรอง**

เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ Fe, Cl, Co, Mn, Cu, Zn, Bo, Mo, Na และ I

2. สารประกอบคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่ใช้กันโดยทั่วๆ ไป คือ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นระหว่าง 2-8 % (น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร)

3. ไวตามิน ไวตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้กันมากได้แก่ ไธอามีน นิโคทินิคแอซิด ไพริดอกซิน กรดอะมิโนเชิงซ้อน และไบโอติน เป็นต้น

4. สารอินทรีย์อื่น ๆ ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ เป็นต้น

5. สารควบคุมการเจริญเติบโต ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ หากต้องการชักนำยอดควรใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภท ไซโตไคนิน สูงกว่า ออกซิน หากต้องการชักนำรากควรเลือกใช้ ออกซิน อัตราส่วนระหว่าง ออกซิน และ ไซโตไคนินนั้นมีความสำคัญมากจึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดพืชและชิ้นส่วนพืช ออกซินที่นิยมใช้ได้แก่ NAA, IAA และ 2,4-D เป็นต้น ไซโตไคนิน ที่นิยมใช้ได้แก่ BA, Kinetin, 2-ip และ Zeatin เป็นต้น (สมปอง, 2539)

จากการศึกษาและทดลองของนักวิทยาศาสตร์จนประสบผลสำเร็จ (ประศาสตร์ , 2536) โดยใช้ส่วนของใบพืชในตระกูล Solanaceae และพืชในตระกูลอื่น ๆ เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ใส่ฮอร์โมนเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ดังนี้

ตระกูล	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชิ้นส่วนที่ใช้เลี้ยง	สารควบคุมการเจริญเติบโต (ppm)
Araceae	*Anthurium andracanum*	ใบ	2,4 -D 0.4 PBA 3.2
Compositae (Asteraceae)	*Slevia buadiana*	ใบ, เมล็ด	2,4-D 53.7 Kin 9.3
Graminae	*Oryzo sativa*	ใบอ่อน	2,4-D 4.7
(Poaceae)	*Saccharum offcinalis*	ใบอ่อน, ช่อดอก	2,4-D 13.6
Labiatae	*Perilla frutescens*	ใบ	2,4-D 0.45
(Laminceae)			
Liliaceae	*Allium sativum*	ใบ	2,4-D 0.5
			IAA 11.7
			Kin 9.3
Passifloraceae	*Passiflora suberosa*	ใบ	NAA 5.4,BA 4.4
Rosaceae	*Pruns amygdalis*	ใบ,ช่อดอก	NAA 26.9,CW 10%
Rubiaceae	*coffea arabica*	ใบ	2,4-D 2.0, KN 2.0
Solanaceae	*Atropa belladonna*	ใบ, โปรโตพลาสต์	Kin 18.5
		ใบ	pCA 5.4
	Lycopersicon esculetum	ใบ	IAA 0.5 , BA 1.0
	Nicotiana Spp	ลำต้น, ใบ, ก้าน	2,4-D 0.45
	Solannum nigram	ใบ	IAA 10.0
		ใบ	BA 1.0
	Petunia hybride	ใบ, ราก, ลำต้น	2,4-D 4.5, BA 0.9
vitaceae	*Vitis Spp*	ดอก,ใบ	2,4-D 4.5 , BA 0.4

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีดังนี้
    - เครื่องชั่ง (Blance)
    - เครื่องวัดความเป็นกรด -ด่าง (pH meter)
    - หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
    - ตู้อบแห้ง (Hot air oven)
    - ตู้เย็น (Refrigerator)
    - เครื่องทำน้ำกลั่น
    - เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ขวดขนาดต่างๆ, ปิเปต, จานเพาะเชื้อ, กระบอกตวง, บิกเกอร์ , ขวดวัดปริมาตร เป็นต้น
    - ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet)
    - อุปกรณ์ตัดแยกเนื้อเยื่อพืช
    - เครื่องปรับอากาศ
    - ชั้นวางเลี้ยง
2. วัสดุพืช : ได้แก่ยาสูบพันธุ์พื้นเมือง
3. สารควบคุมการเจริญเติบโต
    - สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่ใช้ได้แก่ NAA (Naphtaline acetic acid)
    - สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ใช้ได้แก่ BA (6 Benzyladenine)
4. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่
    - เอทธิลแอลกอฮอล์ (Ethylalochol) 70 เปอร์เซนต์
    - สารละลายคลอรอกซ์

5. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog ,1962)

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี
แอมโมเนียมไนเตรท	NH_4NO_3
โปตัสเซียมไนเตรท	KNO_3
แคลเซียมคลอไรด์	$CaCl_2.2H_2O$
แมกนีเซียมซัลเฟต	$MgSO_4.7H_2O$
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4
บอริคแอสิด	H_3BO_3
ซิงค์ซัลเฟท	$ZnSO_4$
โปตัสเซียมไอโอไดด์	KI
โซเดียมโมลิบเดท	$Na_2MoO_4.H_2O$
คอปเปอร์ซัลเฟท	$CuSO_4.5H_2O$
โคบอลท์คลอไรด์	$CoCl_2.6H_2O$
โซเดียมเอทธิลีนไดอามีนเตทตราอาซีเดท	Na_2EDTA
เฟอรัสซัลเฟท	$FeSO_4$
ไกลซีน (Glycine)	
มายโอ-อิโนซิทอล (Myo-inositol)	
นิโคทินิคแอซิด (Nicotinic acid)	
ไพริดีอกซีนไฮโดรคลอริคแอซิด (Pyridoxine-HCL)	
ไทอามีนไฮโดรคลอริคแอซิด (Thiamine-HCL)	
ซูโครส (Sucrose)	

6. วิธีการ

6.1 การเตรียมเมล็ดพันธุ์

เลือกเมล็ดพันธุ์ที่แก่จัดนำมาผึ่งให้แห้ง แล้วกะเทาะเอาเมล็ดออกจากกระเปาะ โดยเด็ดที่ปลายของกระเปาะฝัก เคาะเมล็ดออก จะได้เมล็ดที่สะอาด ในการตัดกระเปาะต้องทำความสะอาดเครื่องมือ ภาชนะ และมือให้สะอาด เพื่อป้องกันเชื้อโรคที่อาจจะไปติดเมล็ดได้ หลังจากนั้น เอาไปแช่น้ำ ประมาณ 30 นาที เพื่อคัดเลือกเอาเมล็ดที่จม (เมล็ดที่สมบูรณ์จะจม) ตักเอาเมล็ดส่วนที่ลอยน้ำและสิ่งปนเปื้อนออก ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จนแน่ใจว่า เศษขยะอื่น ๆ ออกหมด จากนั้นนำเมล็ดที่จมมาแช่ใน 0.05 เปอร์เซนต์ ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) นาน 15- 20 นาที คนให้ทั่ว เพื่อป้องกันเชื้อโรค แล้ว

นำไปผึ่งตากลมจนแห้ง เก็บในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด โดยใช้ผ้าขาวบางอย่าง โปร่งห่อ แล้วใช้ผงถ่านวางไว้ หรือ ใส่ในโถดูดความชื้น เก็บภาชนะดังกล่าวที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซนเซียส

6.2 การเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบ

เมื่อต้องการใช้ก็นำเมล็ดยาสูบมาห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วผูกด้วยเส้นด้าย ให้แน่ใจว่าเมล็ดไม่สามารถออกมาได้ หลังจากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอกด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 1 นาที และคลอรอกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ นาน 20 นาที แล้วนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง เทคลอรอกซ์ทิ้งไปแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำเมล็ดที่ถูกหุ้มด้วยผ้าขาวบางวางบนจานแก้ว แกะด้ายที่ผูกไว้ออก ดูดน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ในจานแก้ว 5 ml หลังจากนั้นใช้หลอดหยด ดูดเมล็ดวางบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน โดยให้มีน้ำติดไปน้อยที่สุด ปิดฝาขวดให้แน่นนำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$2 ^{0}C

7. วิธีการทดลอง

7.1 การศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการสร้างแคลลัส ยอด และรากจากชิ้นส่วนแผ่นใบยาสูบ

วางเลี้ยงแผ่นใบยาสูบที่มีอายุ 30-35 วันในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ NAA 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1,0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักษ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 ^{0}C บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนแผ่นใบหลังจากวางเลี้ยงทุกสัปดาห์ ระยะเวลานาน 1 เดือน

7.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างราก

ตัดแยกต้นยาสูบซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอดเป็นเวลา 1 เดือน นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกับอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เลี้ยงภายใต้สภาพแสงและอุณหภูมิเหมือนการทดลองที่ 7.1 บันทึกผลการพัฒนาของต้นยาสูบในอาหารทั้ง 2 สูตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เมื่อต้นยาสูบมีรากซึ่งเป็นต้นกล้าสมบูรณ์ไปทำการอนุบาลและปลูกลงดิน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดหลังจากอนุบาลเป็นเวลา 2 สัปดาห์

บทที่ 4
ผลการทดลอง

หลังจากวางเลี้ยงแผ่นใบยาสูบในอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์พบว่า แผ่นใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสวนผสมของ BA/NAA เป็น 0.1/0.1, 0.5/0.1 และ 1.0/0.1 มก./ล. มีการเจริญขยายขนาดอย่างรวดเร็ว และเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดของแผ่นใบ เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA/NAA 0.1/0.1 มก./ล. ส่งเสริมการเกิดยอด ราก และเจริญเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ เฉลี่ยจำนวน 5 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 1) สำหรับอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA/NAA 0.5/0.1, 1.0/0.1 มก./ล. เนื้อเยื่อของแผ่นใบจะเจริญเป็นกลุ่มยอดเพียงอย่างเดียว เฉลี่ย 10 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งจะให้ยอดขนาดเล็ก เจริญช้า (ภาพที่ 2-3) สำหรับอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA/NAA ที่ความเข้มข้นอื่นๆ มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสเพียงอย่างเดียว แคลลัสที่ได้มีการพัฒนาช้า มีสีเหลืองปนเขียว เกาะกลุ่มกันแน่น (ภาพที่ 4-5) ยกเว้นอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA/NAA เป็น 0.1/0.5, 0.5/0.5, 1.0/0.5 มก./ล. และอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA/NAA 0.1/0.1 มก./ล. (ภาพที่ 6-9 ตามลำดับ) มีการเจริญและเพิ่มขนาดแคลลัสได้ดี แต่แคลลัสที่ได้จะมีสีน้ำตาล และตายถ้าไม่ทำการย้ายลงอาหารใหม่ **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 ผลของ NAA และBA ต่อการสร้างแคลลัส ยอด และรากจากส่วนของแผ่นใบยาสูบ

สารควบคุมการเจริญเติบโต		พัฒนาการของแผ่นใบ			
NAA (มก/ล.)	BA (มก/ล.)	การเกิดแคลลัส (%)	การเจริญของแคลลัส	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อ	จำนวนยอดที่เกิดรากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ
0.1	0.1	100	+++	5	5
0.1	0.5	100	+++	10	N
0.1	1.0	100	+++	10	N
0.5	0.1	100	+++	N	N
0.5	0.5	100	+++	N	N
0.5	1.0	100	++	N	N
1.0	0.1	100	+++	N	N
1.0	0.5	100	++	N	N
1.0	1.0	100	++	N	N

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส
+ หมายถึงเกิดแคลลัสน้อย
++ หมายถึง เกิดแคลลัสปานกลาง
+++ หมายถึง เกิดแคลลัสมากที่สุด
N หมายถึงไม่เกิดยอดและราก

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างราก

ตัดแยกยอดยาสูบเป็นยอดเดี่ยวๆ วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกับอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว วางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นยาสูบมีรากเกิดขึ้นในอาหารทั้ง 2 สูตร ยอดเดี่ยวๆ ที่แยกออกมามีการเจริญเติบโตดี (ภาพที่ 11-12)

เมื่อย้ายต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตรซึ่งมีรากสมบูรณ์ดีแล้วไปปลูกลงดินในสภาพความชื้นที่เหมาะสม เป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า ต้นยาสูบมีชีวิตรอดอยู่ได้ (ภาพที่ 13)

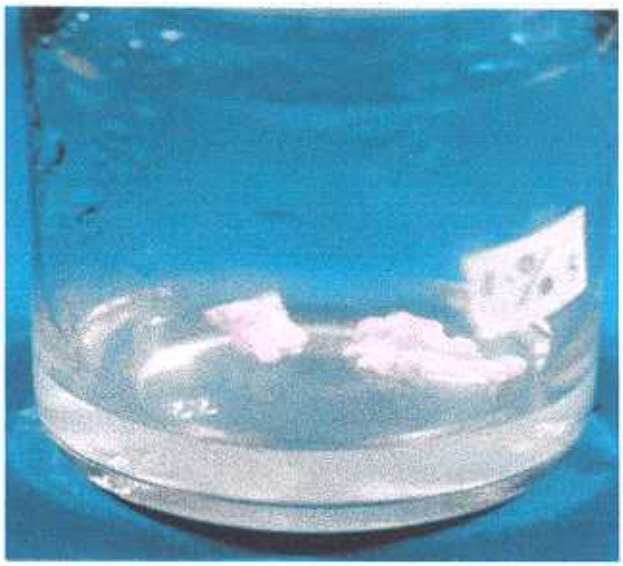
3. ผลของ NAA และ BA ต่อการสร้างยอดยาสูบ

เมื่อเลี้ยงยอดยาสูบในอาหารสูตร MS ที่มี BA/NAA เป็น 0.5/0.1 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงย้ายไปวางเลี้ยงในอาหารที่เติม BA/NAA 0.1/0.1 มก./ล. เพื่อชักนำยอดยาสูบพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยอดยาสูบที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 1 แสดงการเจริญของยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 2 แสดงการเจริญของยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.5 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 3 แสดงการเจริญของยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1.0 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4

ภาพที่ 5

ภาพที่ 4-5 แสดงการเจริญของแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.5 มก./ล. และ 1.0 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์

ว 199 ก
2541
ฉ. 2

สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยทักษิณ

ภาพที่ 6

ภาพที่ 7

ภาพที่ 8

ภาพที่ 9

ภาพที่ 6-9 แสดงการเจริญของแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. ตามลำดับ และ NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1 เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 10 แสดงยอดยาสูบที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1 มก./ล. เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 11

ภาพที่ 12

ภาพที่ 11-12 แสดงรากยาสูบที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม NAA 0.1 มก./ล. ตามลำดับ

ภาพที่ 13 แสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของแผ่นใบ

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงใบยาสูบในขวดทดลองเพื่อการศึกษา ควรทำการเพาะเลี้ยงแผ่นใบในอาหารสูตร MS เติม NAA ร่วมกับ BA อย่างละ 0.1 มก/ล. ซึ่งบริเวณรอยตัดของแผ่นใบเมื่อสัมผัสกับอาหารดังกล่าวสามารถดูดซึมอาหาร น้ำ และสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ดี สามารถชักนำให้แผ่นใบยาสูบสร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นยอด ราก และต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้เร็วกว่าสูตรอื่นๆ

ในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของแผ่นใบยาสูบโดยแผ่นแคลลัสอาจเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งสารดังกล่าวทั้งสองตัวนี้ในอัตราส่วนที่เหมาะสมสามารถชักนำการสร้างแคลลัส รากและยอดได้ดี โดยที่ออกซินสูงส่งเสริมการสร้างราก ไซโตไคนินสูงส่งเสริมการสร้างยอด สัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินเท่ากันส่งเสริมการสร้างแคลลัส (สมปอง, 2539)

ส่วนอาหารสูตรอื่นที่มีการพัฒนาเฉพาะแคลลัสเพียงอย่างเดียว เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานกว่า 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีการสะสมของเสียบางชนิดจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อ หรืออาจเป็นเพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงมีปริมาณลดลง หรืออาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยของแสง ซึ่งในการเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องการความเข้มแสงต่ำหรือไม่ใช้เลย (ประศาสตร์, 2536)

ในการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารสูตร MS เติม NAA ร่วมกับ BA เพื่อการขยายพันธุ์พืชชนิดอื่นเช่น ไม้ดอก ไม้ประดับ และพืชผักหลายชนิด ได้มีการรายงานการใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชในกลุ่มไม้เนื้ออ่อน (Herbaceous) หลายชนิด เช่น กุหลาบ (Robert et.al., 1990) สับปะรดประดับ (Lapade et.al., 1989) บล๊อกโคลี (อรุณีและสมปอง, 2535) และต้นกันยุง (ราตรีและสมปอง, 2539)

ในทำนองเดียวกันพบว่าในอาหารสูตรที่มี NAA ร่วมกับ BA ดังกล่าว สามารถชักนำให้เกิดต้นยาสูบจากแผ่นใบได้สำเร็จหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30-35 วัน เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและอาหารที่เติม NAA 0.1 มก/ล. ตามระยะเวลาข้างต้นพบว่ายาสูบมีการพัฒนารากและเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ อาจเนื่องมาจากความสมดุลย์ของสารควบคุมการจริญเติบโต ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างสารดังกล่าวได้แตกต่างกัน เมื่อได้รับจากอาหารที่เติมให้อีกยิ่งส่งเสริมการแบ่งเซลล์ มีการสร้างยอดและต้นได้เร็วและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ในทางตรงข้าม ในพืชที่มีการสร้างสารนี้จำนวนมากแล้วหากมีการให้จากภายนอกโดยการเติมลงไปในอาหารอีกจะเป็นการยับยั้งพัฒนาการของลักษณะดังกล่าวได้ ในกรณีของต้นยาสูบคาดว่าโดยกระบวนการเมตาโบลิซึมแล้วสามารถสร้างสารได้จำนวนมาก จึงไม่มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้จากภายนอก (ราตรีและสมปอง, 2539)

ข้อเสนอแนะ

1. อาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) ที่มีส่วนผสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA อย่างละ 0.1 มก./ล. เป็นสารอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแผ่นใบยาสูบให้มีการพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบ

2. ควรทดลองนำอาหารสูตรดังกล่าว (ตามข้อ 1) ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอื่นในตระกูลเดียวกับยาสูบ หรือทดลองกับพืชเศรษฐกิจอื่น เช่น ยางพาราต่อไป

เอกสารอ้างอิง

คณาจารย์ ภาควิชาพืชไร่ ,2535 พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน หน้า 72-75

คำนูญ กาญจภูมิ, 2532 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ไทยพาณิชย์ จำกัด, ธนาคาร ใบยาสูบ. กรุงเทพฯ ฝ่ายวิจัยและวางแผนธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด

ประศาสตร์ เกื้อมณี , 2536 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยเกษตรศาสตร์ 158 หน้า

พรทิพย์ ธนูทอง, 2528 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชากีฏาวิทยา และโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 114 หน้า

มาลี กาญจนภูมิ, 2532 หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ยุพา มงคลสุข, 2529 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เอกสารประกอบการอบรม ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 26 หน้า

ราตรี สุจารีย์ และสมปอง เตชะโต, 2539 การขยายพันธุ์ต้นกันยุงในหลอดทอลอง แก่นเกษตร 63-69.

สมปอง เตชะโต, 2536 บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาสงขลานครินทร์ 121 หน้า

สมปอง เตชะโต และอรุณ ม่วงงาม, 2537 เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสงขลา

สมปอง เตชะโต, 2539 เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากร-ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

สมภพ อินทสุวรรณ, 2525 พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ สงขลา หน้า 297-299

อรุณี ม่วงแก้วงาม และสมปอง เตชะโต, 2535 การขยายพันธุ์บรอคโคลีด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แก่นเกษตร 20 : 87-99

Lapade, A. G., A. M. Velux I. S. Santos. 1989. Cloning of queen variety pineapples (Ananas comosus (L) Merr) through the callus. 2nd Ascan S. & T Week. 40 : 87-103.

Robert, A.V., D. Lloyd, and K. C. Shart. 1990. In vitro procedures for the induction of Tetraploid in diploid rose. Euphytica 49 : 35-38.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock Solution)

ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะไม่เตรียมโดยการชั่งสารเคมีแต่ละครั้งที่เตรียม แต่จะเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) คือการรวมสารเคมีชนิดที่สามารถรวมกันได้โดยไม่ตกตะกอนไว้ด้วยกัน (ยุพา, 2529)

สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog) และวิธีการเตรียม

1. เกลืออนินทรีย์

Stock solution A เข้มข้น 50 เท่า	**กรัม / 1000 มิลลิลิตร**
NH_4NO_3	82.50
KNO_3	95.00
KH_2PO_4	08.50
H_3BO_3	00.31
$MnSO_4.4H_2O$	01.115
$ZnSO_4.7H_2O$	0.43
KI	0.0415
$Na_2MoO_4.6H_2O$	0.0125
$CuSO_4.5H_2O$	0.0125
$CoCl_2.6H_2O$	0.0125
Stock solution B เข้มข้น 100 เท่า	**กรัม / 500 มิลลิลิตร**
$MgSO_4.7H_2O$	18.5
Stock solution C เข้มข้น 100 เท่า	**กรัม / 500 มิลลิลิตร**
$CaCl_2.2H_2O$	22
Stock solution D* เข้มข้น 100 เท่า	**กรัม / 500 มิลลิลิตร**
Na_2 EDTA	1.865
$FeSO_4.7H_2O$	1.39

* ชั่ง sodium EDTA ใส่ลงไปในน้ำกลั่นละลายให้เข้ากันดีก่อน ชั่ง $FeSO_4.7H_2O$ ใส่ลงไปละลายให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซนเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้โซเดียมและเหล็กแลกที่กัน

2. สารประกอบอินทรีย์

Organic solution vitamins เข้มข้น 200 เท่า	กรัม / 250 มิลลิลิตร
MyO -inositol	5
Glycine	0.10
Nicotinic acid	0.025
Pyridoxin - HCL	0.025
Thiamin - HCL	0.005

3. **Stock solution ฮอร์โมน NAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

ชั่ง NAA 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1 N KOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

4. **Stock solution ฮอร์โมน BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

ชั่ง BA 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1 N KOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

5. **การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Media preparation for Plant tissuculture) ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร**

1. ดูดสารละลายจาก Stock solution A,B,C,D และ stock Organic solution vitamin
2. เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ เติมน้ำตาล Sucrose 30 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามความต้องการ
4. ปรับความเป็น กรด-ด่าง (pH) ให้ได้ 5.7 ด้วย HCl และ KOH
5. ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
6. เติมวุ้น 8 กรัม ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
7. แบ่งถ่ายใส่ขวด ๆ ละ 20 มิลลิลิตร ปิดฝาอย่าให้แน่นจนเกินไป
8. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 C° ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที
9. หลังจากนำขวดอาหารขึ้นมาจากหม้อนึ่ง ให้ปิดฝาขวดให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (วุ้นแข็ง) จึงนำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

สรุปขั้นตอนการเตรียมอาหาร

6. วิธีการเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

1. **เอทธิลแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์** เตรียมได้จากการใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ จำนวน 70 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 25 มิลลิลิตร
2. **คลอรอคซ์ 20 เปอร์เซนต์** ได้จากการใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 80 มิลลิลิตร แล้วเติมคลอรอคซ์ลงไป 20 มิลลิลิตร
3. **โซเดียมไฮโปคลอไรด์** มีชื่อทางการค้าว่า Clorox ในการเพิ่มประสิทธิภาพของ Sterilants ก่อนใช้สารพวกนี้อาจจุ่มชิ้นส่วนพืชลงใน 70 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ นานประมาณ 1 นาที เพื่อล้างเอาขี้ผึ้ง (Wax) ออกหรือใส่ Wetting agent พวกทีโพล (Teepol), ทวีน -20 ลงไปประมาณ 1-2 หยด เพื่อให้ Sterilants สัมผัสกับผิวของชิ้นส่วนพืชดียิ่งขึ้น

7. การฆ่าเชื้ออุลินทรีย์

1. การฆ่าเชื้อเครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ โดยนำเครื่องแก้วที่ต้องใช้ไปอบในตู้อบ (Hot air Oven) อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
2. การฆ่าเชื้อภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เช็ดตู้ย้ายเนื่อเยื่อด้วย 70% เอทธิลแอลกอฮอล์ แล้วเปิดแสงอุลตร้าไวโอเลต ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ก่อนทำการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) 1962

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี
แอมโมเนียมไนเตรท	NH_4NO_3
โปตัสเซียมไนเตรท	KNO_3
แคลเซียมคลอไรด์	$CaCl_2.2H_2O$
แมกนีเซียมซัลเฟต	$MgSO_4.7H_2O$
โปตัสเซียมโดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4
บอริคแอสิค	H_3BO_3
ซิงค์ซัลเฟท	$ZnSO_4$
โปตัสเซียมไอโอไดด์	KI
โซเดียมโมลิบเดท	$Na_2MoO_4.H_2O$
คอปเปอร์ซัลเฟท	$CuSO_4.5H_2O$
โคบอลท์คลอไรด์	$CoCl_2.6H_2O$
โซเดียมเอทธิลีนไดอามีนเตทตราอาซีเตท	Na_2EDTA
เฟอรัสซัลเฟท	$FeSO_4$
ไกลซีน (Glycine)	
มายโอ-อิโนซิทอล (Myo-inositol)	
นิโคทินิคแอซิด (Nicotinic acid)	
ไพริดือกซีนไฮโดรคลอริคแอซิค (Pyridoxine-HCL)	
ไทอามีนไฮโดรคลอริคแอซิค (Thiamine-HCL)	
ซูโครส (Sucrose)	