การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ

Callus and Shoot Induction from Endosperm of Immature Physic Nut Seed

วิกาญดา สายวงค์ใจ[1/] ธนียา เจติยานุกรกุล[2/] และ ธนะชัย พันธ์เกษมสุข[1/*, 3/]

Vikanda Sayvongjai[1/], Thaneeya Chetiyanukornkul[2/] and Tanachai Pankasemsuk[1/*, 3/]

[1/]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Plant Science and Soil Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200

[2/]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[2/]Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200

[3/]ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานการอุดมศึกษา, กรุงเทพฯ 10400

[3/]Postharvest Technology Innovation Center, Commission Higher, Education, Bangkok, Thailand 10400

**Corresponding author: Email: pankasemsuk@gmail.com*

(Received: 16 February 2016; Accepted: 16 May 2016)

Abstract: This study aimed to find out the medium formula to induce callus and shoot from endosperm of immature physic nut seed. The experiment was designed in CRD 5 treatments. Treatment 1; MS medium no additives of plant growth regulators, Treatment 2; MS medium supplemented with 0.4 mg/l NAA and 2 mg/l GA_3, Treatment 3; MS medium supplemented with 1 mg/l BA and 2 mg/l GA_3, Treatment 4; MS medium supplemented with 0.4 mg/l NAA and 1 mg/l BA, and Treatment 5; MS medium supplemented with 0.4 mg/l NAA, 1 mg/l BA, and 2 mg/l GA_3. A total of twenty explants were cultured in each treatment. All culture were incubated at 25 ±2 °C, darkness for 24 hrs. The results found only treatment 4 (MS medium supplemented with 0.4 mg/l NAA and 1 mg/l BA) could inducted callus three weeks after subculture, showed the highest percentage of callus as 70%, where all callus of other treatments were absence. The callus was friable yellow and had diameter 2.0 centimeter of callus as average level. After transferring the callus from treatment 4 to MS medium supplemented with 10 mg/l BA for shoot induction which incubated at 25 ±2 °C, under light condition of 16 hrs/day, it was found that the young shoots could develop at 18 weeks after subculture.

Keywords: Immature seed, endosperm, callus induction, plant regeneration

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 5 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต กรรมวิธีที่ 2 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 3 อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 4 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ กรรมวิธีที่ 5 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งหมดมี 20 ชิ้นส่วนในแต่ละกรรมวิธี เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดตลอดเวลา พบว่า ในกรรมวิธีที่ 4 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุดคิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ และแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) มีสีเหลือง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2 เซนติเมตร จัดอยู่ในระดับปานกลาง จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าสามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ ในระยะเวลา 18 สัปดาห์ หลังจากย้ายเนื้อเยื่อแคลลัส

คำสำคัญ: เมล็ดอ่อนสบู่ดำ เอนโดสเปิร์ม การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น

คำนำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชพลังงานที่มีศักยภาพ แต่ด้วยข้อจำกัดที่ผลผลิตเมล็ดต่อไร่ต่ำ เพียง 200 - 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปริมาณน้ำมันเพียงร้อยละ 35-40 โดยน้ำหนัก และการสุกแก่ของผลที่ไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งต้น ทำให้ความน่าสนใจในพืชชนิดนี้เริ่มลดลง จึงมีการวิจัยที่พยายามหาแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น เช่น การวิจัยปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำของ Piromya and Kermanee (2013) ได้รายงานว่า การใช้สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 5,000-6,000 ppm กับกิ่งชำสบู่ดำ ส่งผลให้ขนาดของใบและปากใบ ขนาดของช่อดอกและดอกเพศผู้มีขนาดใหญ่ขึ้น Na Chiangmai *et al*. (2014) รายงานว่า สามารถชักนำให้สบู่ดำต้นปกติกลายเป็นต้นสบู่ดำที่มีโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ (4n) โดยใช้สารโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ได้สำเร็จ นอกจากนี้การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอนโดสเปิร์มเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจ โดยมีรายงานการวิจัยพืชหลายชนิด เช่น ผลิตต้นทริพลอยด์มัลเบอร์รี่ (3n) (Thomas *et al*., 2000) การผลิตต้นสะเดา (*Azadirachta indica*) เพื่อใช้ประโยชน์ทางยาและเครื่องสำอาง (Chaturvedi *et al*., 2003) มีรายงานการผลิตต้นสบู่ดำที่มีลักษณะเป็นทริพลอยด์ (3n) ได้ โดยใช้เอนโดสเปิร์มของเมล็ดแก่ โดยต้นที่ได้มีขนาดปากใบใหญ่และความหนาแน่นของปากใบน้อยเมื่อเทียบกับต้นปกติ (Zhu *et al*., 2011) นอกจากนี้การผลิตพืช 3n จากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดแก่แล้วยังสามารถใช้เอนโดสเปิร์มจากเมล็ดอ่อนในการผลิตพืช 3n ได้อีกด้วย เช่น มัลเบอร์รี่ (Thomas *et al*., 2000) และสะเดา (Chaturvedi *et al*., 2003) ที่เลือกใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอนโดสเปิร์มจากเมล็ดอ่อน ซึ่งข้อดีของการใช้เอนโดสเปิร์มจากเมล็ดอ่อน เนื่องจากว่าเนื้อเยื่อที่ยังมีอายุน้อยของเอนโดสเปิร์มจากเมล็ดอ่อน ย่อมมีเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตจำนวนมาก ส่งผลต่อการเกิดเป็นยอดหรือรากได้ง่าย (รังสฤษดิ์, 2545) จึงเลือกใช้ชิ้นส่วนจากเอนโดสเปิร์มจากเมล็ดอ่อนของสบู่ดำในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำให้เกิดแคลลัส

ในการทดลองครั้งนี้ ใช้เมล็ดอ่อนสบู่ดำอายุ 60 วันหลังจากติดผล สายพันธุ์พื้นบ้านที่นิยมปลูกทั่วไปทางภาคเหนือ ซึ่งเมล็ดสบู่ดำมีลักษณะผลทรงกลม ขนาดของผลและเปลือกหนา โดยนำเมล็ดมาทำความสะอาดด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้ออีก 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox ที่ความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 และ 15 นาที ตามลำดับ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้ออีก 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ขั้นตอนสุดท้ายนำเมล็ดอ่อนจุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาผ่านเปลวไฟเป็นเวลาสั้น ๆ จากนั้นแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกและตัดเอาเฉพาะส่วนของเอนโดสเปิร์มให้ได้ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) เปรียบเทียบสูตรอาหารที่มีชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันทั้งสิ้น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต กรรมวิธีที่ 2 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 3 อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 4 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ กรรมวิธีที่ 5 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำขวดเพาะเลี้ยงเอนโดสเปิร์มในแต่ละกรรมวิธีวางไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดตลอดเวลาจนกระทั่งเริ่มพบการเกิดแคลลัส บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส (ดัดแปลงจาก Ling *et al*., 2008) บันทึกประเภทและสีของแคลลัสที่ปรากฏ

การชักนำยอดจากแคลลัสที่ได้จากการชักนำเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ

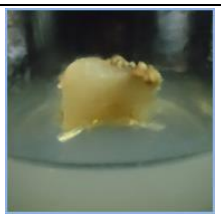
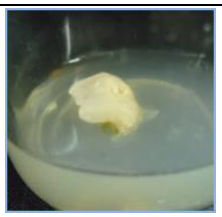
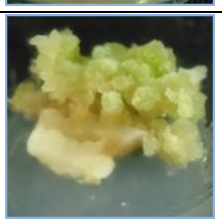
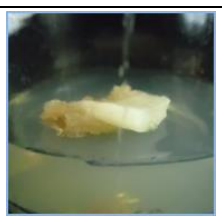
การชักนำยอดจากแคลลัสที่เกิดจากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองสูตรอาหารข้างต้นมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดัดแปลงจาก Chaturvedi *et al*., 2003) อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสงต่อเนื่อง 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะของแคลลัสทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 18 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกเฉพาะแคลลัสที่เกิดยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม (ดัดแปลงจาก Qin *et al*., 2004) อีก 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ นับจำนวนยอดที่เกิดใหม่ ความสูงยอด และ จำนวนใบต่อยอด

ผลการทดลอง

การชักนำให้เกิดแคลลัส

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ พบว่า ในกรรมวิธีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จากลักษณะ เนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลของชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มเกิดการขยายตัวขึ้น จากนั้นสัปดาห์ที่ 3 เกิดเป็นแคลลัสได้อย่างชัดเจน คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ จากเอนโดสเปิร์มจำนวน 20 ชิ้น (ตารางที่ 1) และแคลลัสที่เกิดขึ้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2 เซนติเมตร ให้ค่าคะแนนของขนาดแคลลัสในระดับปานกลาง และเป็นแคลลัสชนิดเกาะกันหลวม ๆ (friable callus) มีสีเหลือง (ภาพที่ 1a) แต่ไม่พบการพัฒนาของแคลลัสในกรรมวิธีที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและกรรมวิธีอื่น ๆ เลย หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ เนื้อเยื่อแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีขาวซีด เป็นสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ และเริ่มตายในที่สุด

Table 1 Effect of NAA, GA_3 and BA on callus formation at three weeks induced from endosperm explants of immature physic nut seed

Treatment	Week 3	Percentage of callus formation (%)[1/]	Diameter of callus formation (cm)[2/]	Type of callus [3/]	Color of callus [4/]
MS (Control)		0	-	-	-
MS+ 0.4 mg/l NAA + 2 mg/l GA_3		0	-	-	-
MS + 1 mg/l BA + 2 mg/l GA_3		0	-	-	-
MS + 0.4 mg/l NAA + 1 mg/l BA		70	2.0	F	Y
MS + 0.4 mg/l NAA + 1 mg/l BA + 2 mg/l GA_3		0	-	-	-

[1/] Mean calculated from 20 immature endosperm explants per treatment.

[2/] Diameter of callus formation: absence of callus (-), less than 1.0 cm (poor), 1.0-2.0 cm (average), more than 2.0 cm (good)

[3/] Type of or callus: friable callus (F)

[4/] Color of callus: yellow (Y)

การชักนำยอดจากแคลลัสที่ได้จากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ

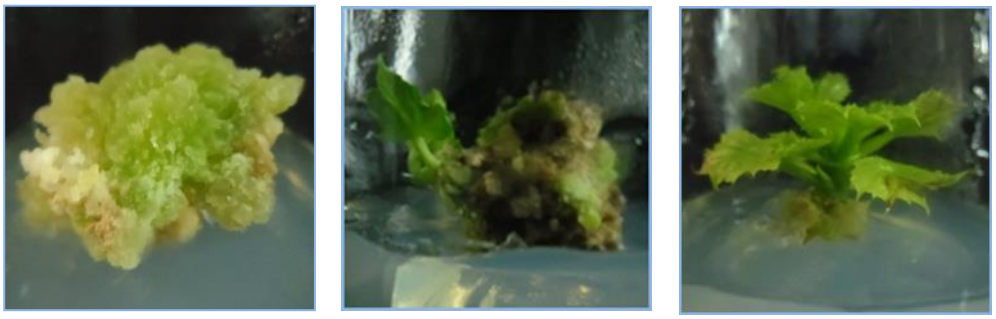
การชักนำยอดจากแคลลัสที่เกิดจากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า ในช่วง 1-3 สัปดาห์แรก แคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่นมากขึ้น (compact callus) จากเดิมที่อยู่ในลักษณะที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) และสีของแคลลัสที่มีลักษณะเป็นสีเหลือง มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมีสีเขียวอ่อนและเหลืองอ่อนปะปนกัน จากนั้นในสัปดาห์ที่ 4-6 ก้อนแคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น แคลลัสมีสีเขียวและมีสีขาวปนอยู่บริเวณผิวของก้อนแคลลัส สัปดาห์ที่ 7-9 ลักษณะของแคลลัสเกาะกลุ่มกันอัดแน่นมากขึ้น ผิวสีเขียวและสีขาวของแคลลัสเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยที่บริเวณผิวของแคลลัสมีจุดกำเนิดของตาสีเขียวเกิดขึ้น

หลังจากการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 10-12 มีการพัฒนาตายอดและเกิดเป็นใบที่มีก้านใบยืดยาวออกมา พบการเกิดยอดเพียง 1 ยอดต่อ 1 แคลลัสเท่านั้น ยอดมีความสูงยอดเฉลี่ย 0.6 เซนติเมตร และมีจำนวนใบต่อยอดเฉลี่ย 0.78 ใบต่อยอด (ภาพที่ 1b) นำเฉพาะส่วนของยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ยอดไม่มีการพัฒนาแตกเป็นยอดใหม่ แต่สามารถเจริญยืดยาวได้ดี โดยมีความสูงเฉลี่ย 2.7 เซนติเมตร และมีจำนวนใบต่อยอดเฉลี่ย 2.7 ใบต่อยอด (ภาพที่ 1c)

วิจารณ์

การชักนำให้เกิดแคลลัส

การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำโดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ให้ผลทำนองเดียวกับการศึกษาของ Phasitvilaitham and Pankasemsuk (2012) ได้รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชไม่สามารถชักนำชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดแก่ (mature seed) ของสบู่ดำให้เกิดเป็นแคลลัสได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยในพืชหลายชนิด เช่น มัลเบอร์รี (Thomas *et al*., 2000) สะเดา (Chaturvedi *et al.,* 2003) มะละกอ (Sun *et al*., 2011) ไม่สามารถชักนำชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนเกิดเป็นแคลลัส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชนิดและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ออกซินและไซโตไคนิน เมื่อมีการใช้ร่วมกันในปริมาณที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ตามผลการทดลองนี้ จากอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความ



(a) (b) (c)

Figure 1 Callus from endosperm of immature physic nut seed on MS medium supplemented with 0.4 mg/l NAA and 1 mg/l BA at three weeks after subculture (a), shoot from endosperm callus on MS medium supplemented with 10 mg/l BA (b), and shoot characteristics on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA combine 0.25 mg/l IBA at four weeks after subculture (c)

เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ในขณะที่กรรมวิธีอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำได้ แตกต่างจากการวิจัยของ Phasitvilaitham and Pankasemsuk (2012) ที่รายงานว่าสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดแก่ของสบู่ดำเกิดแคลลัสได้ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติมสารในกลุ่มออกซินเพียงกลุ่มเดียวได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ Miyashita *et al*. (2009) พบว่า การใช้ออกซินเพียงอย่างเดียว (IBA หรือ NAA) ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ต่ำ แต่ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างออกซินและไซโตไคนินที่มีการใช้ร่วมกันระหว่าง BA, NAA หรือ IBA ชักนำแคลลัสได้ดีกว่าร่วมกับ TDZ และงานวิจัยของ Sun *et al*. (2011) ได้ศึกษาการใช้ฮอร์โมนพืชร่วมกันระหว่าง 2,4-D, Kn และ NAA ให้ผลการชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ร่วมกับ 2,4-D, Kn และ BA โดยกลุ่มไซโตไคนินนั้น ไคเนตินส่งผลให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่า BA และ 2,4-D มีส่วนสำคัญต่อการชักนำแคลลัสได้ดีในกลุ่มออกซิน แต่งานวิจัยของ โสภณ และคณะ (2558) พบว่า การเลือกใช้ BAP ร่วมกับ NAA หรือการใช้ 2,4-D เพียงชนิดเดียว ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จากนั้นในการทดลองครั้งนี้ การใช้จิบเบอเรลลิน (GA_3) ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนเมล็ดอ่อนของสบู่ดำ แต่จิบเบอเรลลินมีบทบาททำให้ปล้องยาวขึ้นหลังจากการสร้างยอด มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและการงอกของเมล็ด แต่จิบเบอเรลลินนั้นมีผลปิดกั้นการเกิดอวัยวะ (เทิดศักดิ์, 2554) ถึงแม้ว่าจากผลการทดลองนี้ การใช้จิบเบอเรลลินร่วมกับออกซินและไซโตไคนินไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

การเกิดยอดจากแคลลัสที่ได้จากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ

การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสที่เกิดจากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินเพียงชนิดเดียวใช้ระยะเวลาของการเกิดยอดประมาณ 18 สัปดาห์ พบการเกิดยอดเพียง 1 ยอดต่อ 1 แคลลัสเท่านั้น ยอดมีความสูงยอดเฉลี่ย 0.6 เซนติเมตร และมีจำนวนใบต่อยอดเฉลี่ย 0.78 ใบต่อยอด เป็นไปตามที่ศิวพงศ์ (2546) กล่าวว่า อาหารที่เติม BA ความเข้มข้นเพียงอย่างเดียวกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ ทำให้เกิดการแตกยอดของเนื้อเยื่อ ในการศึกษาต่อไปจึงควรมีการหาอัตราส่วนของ BA หรือเพิ่มแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมพัฒนาการของแคลลัสไปเป็นพืชต้นใหม่ โดยหลังจากช่วงอายุ 18 สัปดาห์ ต้องมีการเปลี่ยนสูตรอาหารโดยใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับฮอร์โมนพืชสองชนิดคือ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงสามารถทำให้ยอดหรือต้นใหม่ของสบู่ดำมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น แต่ยังให้จำนวนยอดได้ไม่มาก

ขณะที่การทดลองของ มยุรี (2553) ได้นำส่วนยอดของสบู่ดำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.25-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างยอดได้ 5.25 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งไม่ได้เกิดจากการชักนำยอดของแคลลัส แต่จากการทดลองนี้ สัดส่วนของ BA และ IBA ดังกล่าว ไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดรวมจากส่วนยอดที่เกิดจากแคลลัส ในวิจัยของ Sun *et al*. (2011) ใช้ Thidiazuron มีประสิทธิภาพการเกิดยอดได้มากกว่า BA ด้วย ส่วนการวิจัยของ Thomas *et al*. (2000) กล่าวว่าชนิดและความเข้มข้นสาร BAP หรือ TDZ ในกลุ่มไซโตไคนินเพียงชนิดเดียวส่งผลต่อการชักนำให้เกิดเป็นยอดที่ไม่แตกต่างกัน แต่สามารถชักนำให้เกิดเป็นยอดใหม่ได้ ให้ผลสอดคล้องกับ Chaturvedi *et al*. (2003) ได้กล่าวไว้เช่นกันว่า BAP, kinetin, TDZ ทั้งชนิดและระดับของความเข้มข้นนั้น ทำให้เกิดยอดใหม่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่การเปลี่ยนสูตรอาหารโดยลดระดับความเข้มข้นของ BAP ลง ทำให้ส่วนยอดใหม่ยืดยาวและมีจำนวนข้อปล้องเพิ่มมากขึ้นได้ แสดงให้เห็นว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินส่งผลต่อการเจริญเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่ใช้มีความแตกต่างกันอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปอีกทางหนึ่งได้ เป็นที่น่าสังเกตว่า การใช้ฮอร์โมนจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของยอดที่ได้ ควรมีการศึกษาในส่วนนี้เพิ่มเติมต่อไป

สรุป

อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน (NAA) ร่วมกับ ไซโตไคนิน (BA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดได้ในระยะเวลา 18 สัปดาห์ จากอาหารสูตร MS ที่เติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์. 2554. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดอกเสี้ยวขาว (*Bauhinia variegate* L.). รายงานวิจัย. สาขาวิชาเทคโนโลยีและพัฒนาการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่, เชียงใหม่. 36 หน้า.

มยุรี แก้วภู่. 2553. การขยายพันธุ์สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซีนและออรีซาลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 112 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีตั๊ะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สถาบันราชภัฏอุดรธานี. อุดรธานี. 187 หน้า.

โสภณ บุญธรรม ธีรยุทธ ตู้จินดา ณัฐา โพธาภรณ์ และประสาทพร สมิตะมาน. 2558. การชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ Rathu Heenati/KDML105//Chai Nat 1. วารสารเกษตร 31(2): 145-153.

Chaturvedi, R., M.K. Razdan and S.S. Bhojwani. 2003. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. Journal of Plant Physiology 160: 557-564.

Ling, A.P.K., S.T. Yeo, J.A. Gansau and S. Hussein. 2008. Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revolute*. African Journal of Biotechnology 7(23): 4279-4284.

Miyashita, T., T. Ohashi, F. Shibata, H. Araki and Y. Hoshino. 2009. Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 98: 291-301.

Na Chiangmai, P., Y. Pootaeng-on, P. Meetum, N. Jankomon, D. Muangnoi and D. Kitthip. 2014. Mutation induction in physic nut (*Jatropha curcas* L.) by colchicine treatments. Silpakorn University Science and Technology Journal 8(2): 28-39.

Phasitvilaitham, M. and T. Pankasemsuk. 2012. Endosperm culture of *Jatropha curcas* L. Chiang Mai University Journal of Natural Sciences 11(1): 97-102.

Piromya, R. and P. Kermanee. 2013. Occurrence of tetraploidy in colchicine-treated physic nut

(*Jatropha curcas* Linn.). Kasetsart Journal (Natural Science) 47: 23-29.

Qin, W., W.D. Lu, L. Yi, S.L. Pan, Y. Xu, L. Tang and F. Chen. 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. Journal Plant Physiology and Molecular Biology 30: 475-478.

Sun, D.Q., X.H. Lu, G.L. Liang, Q.G. Guo, Y.W. Mo and J.H. Xie. 2011. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104: 23-29.

Thomas, T.D., A.K. Bhatnagar and S.S. Bhojwani. 2000. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L.) by endosperm culture. Plant Cell Reports 19: 395–399.

Zhu, X., J. Liu, X. Zheng, Y. Xu and F. Chen. 2011. Regeneration of plantlets mature endosperm of *Jatropha curcas* L. and analysis of their stomata. Chi. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences 17(3): 353-358.