

ผลของอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำ ให้เกิดแคลลัสของสบู่ดำ

Effects of Culture Media and Explant Types on Callus Induction of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.)

วีรวรรณ ภมร^{1/} และ พรรณธิภา ณ เชียงใหม่^{1/*}

Weerawan Phamorn^{1/} and Pantipa Na Chiangmai^{1/*}

Abstract: This study aimed to evaluate the effects of two explant types; petioles and hypocotyls of physic nut (*Jatropha curcas* L.), and different concentrations of N⁶ benzyladenine (BA) and indole-3-yl-butyric acid (IBA) on inducing callus formation under aseptic condition. A MS medium supplemented with the growth regulators (such as MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA; Medium I and MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA; Medium II) was employed in this study. In both explant types, growth regulator concentrations and the interaction between these variables significantly affected the formation of callus. The fresh weight of calli induced from hypocotyls on Medium II were highest and the calli had compact characteristics. The weight of calli derived from hypocotyl explants was higher than those from petiole explants. Medium II induced more compact calli than Medium I in a culture both before and after the first callus subculturing at 30 days.

Keywords: Physic nut, *Jatropha curcas*, petiole, hypocotyl, callus induction

^{1/} คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ต. สามพระยา อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี 76120

^{1/} Faculty of Animal Science and Agricultural Technology, Silpakorn University, IT Campus, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand

*Correspondence, E-mail: pantipa@su.ac.th

บทคัดย่อ: การศึกษาอิทธิพลของชิ้นส่วนพืชจากสองชนิดได้แก่ ก้านใบและลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ N^6 benzyladenine (BA) และ indole-3-yl-butyric acid (IBA) ที่แตกต่างกันต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ โดยอาหารที่ใช้ในการชักนำแคลลัสคืออาหารสูตร MS ที่มีความแตกต่างของการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA (อาหารสูตรที่ 1) และ MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA (อาหารสูตรที่ 2) ตามลำดับ พบว่าอิทธิพลของทั้งชิ้นส่วนพืช ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และปฏิสัมพันธ์ระหว่างทั้งสองตัวแปรมีผลต่อการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยการชักนำแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ให้แคลลัสที่มีน้ำหนักสูงสุดและเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact) แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีน้ำหนักสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ชิ้นส่วนของก้านใบ และอาหารชักนำแคลลัสในอาหารสูตรที่ 2 จะทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่นมากกว่าอาหารสูตรที่ 1 ทั้งก่อนและหลังทำการเปลี่ยนอาหารนาน 30 วัน

คำสำคัญ: สบู่ดำ ก้านใบ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง การชักนำแคลลัส

คำนำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งซึ่งกำลังเป็นที่สนใจในหลาย ๆ ประเทศเพื่อใช้ประโยชน์ในการเป็นพืชพลังงาน อย่างไรก็ตามแม้ว่าการปลูกสบู่ดำจะพบกระจายอยู่ทั่วโลกแต่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำ จึงมีบางประเทศได้มีความพยายามในการเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพื่อเพิ่มผลผลิตสบู่ดำ โดยการนำเมล็ดพันธุ์ไปฉายรังสีแกมมาทำให้ได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงกว่าเดิม (กรมวิชาการเกษตร, 2549) นอกจากนี้วิธีการพัฒนาพันธุ์โดยการฉายรังสีแล้ววิธีการอื่นที่มีการนำมาใช้ในการพัฒนาพันธุ์ค่อนข้างน้อย การปรับปรุงพันธุ์โดยผ่านขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ ดังนั้นการศึกษาวิธีการ สูตรอาหาร รวมทั้งชนิดของชิ้นพืชที่เหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำพบว่าให้ผลการวิจัยที่หลากหลาย โดยมีรายงานว่าอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีการเติม 2mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) ร่วมกับ 0.5 mg/l 3-indoleacetic acid (IAA) เหมาะสมที่สุดในการ

ชักนำยอดจากปลายยอด (shoot tip) (Rajore and Betra, 2005) และเมื่อมีการชักนำให้เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ ได้แก่ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ก้านใบ (petiole) และใบ โดยประเมินร่วมกับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ zeatin, kinetin และ N^6 benzyladenine (BA) ที่แตกต่างกันทั้งแบบใช้เดี่ยวและใช้ร่วมกับ indole-3-yl-butyric acid (IBA) พบว่าส่วนของ hypocotyl และ petiole ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี BA และ IBA จะสามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้ดีกว่า zeatin หรือ kinetin และตำแหน่งของใบที่สามจะสามารถนำมาชักนำให้เกิดขึ้นได้สูงกว่าใบที่สี่ (Sujatha and Mukta, 1996) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการชักนำแคลลัสจากส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ด้วยเช่นกัน (Wei *et al.*, 2004)

การศึกษาศักยภาพการชักนำแคลลัสเป็นขั้นตอนแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สำคัญ และในสภาพแคลลัสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเรื่องอื่น ๆ ที่ต่อเนื่องได้หลากหลาย วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าคือการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต่างๆ เพื่อใช้ในการขยายปริมาณสบู่ดำและนำผลการศึกษาที่ได้ไปชักนำให้เกิดต้น ราก และใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการศึกษา 2 ปัจจัย โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) ศึกษา 5 ซ้ำ โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ ชนิดของชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส

โดยชนิดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ก้านใบ ของใบตำหน่งที่สามนับจากปลายยอด ที่ได้จากการปักชำของต้นสับดูต้า พันธุ์พื้นเมืองจังหวัดเพชรบุรี อายุ 1 ปี ซึ่งใบในตำหน่งดังกล่าวมีอายุน้อยแต่สามารถทนต่อการฟอกฆ่าเชื้อ (Sujatha and Mukta, 1996) สำหรับลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีวิธีการเตรียมโดยการนำเมล็ดสับดูต้ามาล้างด้วยน้ำสะอาดฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แล้วนำไปลงไฟ ขั้นตอนต่อมาคือการแช่เมล็ดสับดูต้าในน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อรวม 2 ครั้ง ได้แก่การแช่ในน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อที่ประกอบด้วยคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์รวมกับ Tween-20 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 10 นาที ตามด้วยการแช่ในน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อที่ประกอบด้วยคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์รวมกับ Tween-20 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนจะนำไปทำการลอกส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ทำการผ่าเมล็ดเพื่อแยกเอ็มบริโอออกมาวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ทำการวางเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เมื่อมีการงอกต้นอ่อนและสร้างใบจริงคู่แรก จึงทำการตัดส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพื่อใช้ในการชักนำแคลลัสสำหรับสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำแคลลัสมีทั้งหมด 2 สูตร ได้แก่

อาหารสูตรที่ 1 MS + 0.5 mg/IBA + 0.1 mg/IBA

อาหารสูตรที่ 2 MS + 1 mg/IBA + 0.5 mg/IBA

วิธีการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสทำได้โดยการตัดส่วนของก้านใบ (ประมาณ 0.5 เซนติเมตร) และลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาวางเลี้ยงบนอาหารทั้งสองสูตรเป็นเวลา 30 วัน ในสภาพการเลี้ยงที่ให้ช่วงแสง 12 ชั่วโมง

ต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นบันทึกผลเพื่อหาค่าเฉลี่ยใน 2 ลักษณะ ได้แก่ น้ำหนักสดต่อชิ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส (เฉลี่ยจากค่า 2 ทิศทาง) สังเกตลักษณะที่ปรากฏของแคลลัส จากนั้นทำการตัดแบ่งแคลลัสเพื่อทำการเปลี่ยนอาหาร (subculture) ในอาหารสูตรเดิมต่อเนื่องอีก 30 วัน แล้วทำการบันทึกข้อมูลลักษณะต่าง ๆ อีกครั้งหนึ่ง วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้การทดสอบ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบแต่ละลักษณะของกลุ่มทดลองด้วยวิธีการของดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป The SAS system (SAS, 1997)

ผลการศึกษา

การชักนำแคลลัสจากก้านใบ และลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตรเป็นเวลา 30 วัน

น้ำหนักของแคลลัสสับดูต้ามีความแตกต่างกันเนื่องจากอิทธิพลของสูตรอาหาร และชิ้นส่วนพืชที่ต่างกัน โดยแคลลัสที่ได้จากก้านใบและลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสสูตรที่ 2 ให้แคลลัสที่มีน้ำหนัก (2.598 กรัม/ชิ้น) สูงกว่าที่ชักนำได้ในอาหารสูตรที่ 1 (1.517 กรัม/ชิ้น) ขณะที่แคลลัสที่ชักนำจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงให้แคลลัสที่มีน้ำหนัก (3.054 กรัม/ชิ้น) สูงกว่าแคลลัสที่ชักนำจากก้านใบ (1.061 กรัม/ชิ้น) และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหาร ($P < 0.05$) โดยน้ำหนักแคลลัสที่ชักนำได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 (2.938 กรัม/ชิ้น) และอาหารสูตรที่ 2 (3.170 กรัม/ชิ้น) ไม่แตกต่างกัน ($P \geq 0.05$) แต่สูงกว่าการใช้ก้านใบในการชักนำแคลลัสในอาหารสูตรที่ 2 (2.026 กรัม/ชิ้น) และอาหารสูตรที่ 1 (0.096 กรัม/ชิ้น) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

สูตรอาหารและชนิดของชิ้นส่วนพืชมีผลต่อขนาดของแคลลัสเช่นเดียวกัน โดยแคลลัสที่ชักนำได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง (1.310 เซนติเมตร) สูงกว่าที่ชักนำได้จากก้านใบ (0.860 เซนติเมตร) ($P < 0.01$) และแคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารสูตรที่ 2 มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง (1.290 เซนติเมตร

Table 1 Average of the fresh weight of the calli induced from petiole and hypocotyl explants of physic nut in mediums for 30 days.

Explant types	Fresh weight of calli (g/piece)		Means
	Medium 1	Medium 2	
Petiole	0.096 ± 0.070 c	2.026 ± 0.229 b	1.061 B
Hypocotyl	2.938 ± 0.917 a	3.170 ± 0.905 a	3.054 A
Means ^{1/}	1.517 B	2.598 A	

F-test (Explant types)

**

F-test (Mediums)

**

F-test (Explant types x Mediums)

*

CV (%)

31.86%

*significant difference at the 0.05 level of probability.

**significant difference at the 0.01 level of probability.

^{1/}Means within the same row or column followed by different letter are significantly different at the 0.05 level of probability.

สูงกว่าที่ชักนำได้ในอาหารสูตรที่ 1 (0.880 เซนติเมตร) ($P < 0.01$) นอกจากนี้ขนาดของแคลลัสยังเป็นลักษณะที่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหาร ($P < 0.01$) โดยแคลลัสที่ได้ชักนำจากก้านใบในอาหารสูตรที่ 2 มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่แตกต่างจากที่ชักนำได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 (1.340 และ 1.380 เซนติเมตร ตามลำดับ) แต่มีค่าสูงกว่าที่ชักนำได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 (1.240) และที่ชักนำได้จากก้านใบในอาหารสูตรที่ 1 (0.380 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 1)

การชักนำแคลลัสจากส่วนของก้านใบและลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตรภายหลังทำการเปลี่ยนอาหารเป็นเวลา 30 วัน

ภายหลังทำการเปลี่ยนอาหารโดยการตัดชิ้นพืชให้มีขนาดเท่ากัน (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) เพื่อทำการเพิ่มปริมาณในอาหารสูตรเดิมอีกเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าแคลลัสที่ได้จากการชักนำส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง มีน้ำหนัก (2.144 กรัม/ชิ้น) สูงกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากก้านใบ (0.940 กรัม/ชิ้น) ($P < 0.01$)

ขณะที่อาหารสูตรที่ 2 ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักภายหลังการเปลี่ยนอาหาร (2.361 กรัม/ชิ้น) สูงกว่าที่ชักนำได้ในอาหารสูตรที่ 1 (0.723 กรัม/ชิ้น) และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหาร ($P < 0.05$) โดยพบว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 มีน้ำหนัก (3.224 กรัม/ชิ้น) สูงกว่าที่ชักนำได้ในอาหารสูตรที่ 1 และที่ชักนำได้จากก้านใบในอาหารสูตรที่ 2 (1.064 และ 1.498 กรัม/ชิ้น ตามลำดับ) และแคลลัสที่ชักนำได้จากก้านใบในอาหารสูตรที่ 1 พบว่ามีน้ำหนัก (0.382 กรัม/ชิ้น) ต่ำที่สุด (ตารางที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแคลลัสที่เกิดขึ้นจากการใช้ชิ้นส่วนของพืชและสูตรอาหารที่ต่างกัน พบว่าแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงภายหลังการเปลี่ยนอาหาร และเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง (1.630 เซนติเมตร) สูงกว่าที่ชักนำได้จากก้านใบ (1.110 เซนติเมตร) ($P < 0.01$) และการชักนำแคลลัสในอาหารสูตรที่ 2 ให้แคลลัสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง (1.740 เซนติเมตร) สูงกว่าที่ได้จากการชักนำในอาหารสูตรที่ 1 (1.000 เซนติเมตร) โดยไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างทั้งสองปัจจัย ($P \geq 0.05$) (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 2)

Table 2 Average of the diameter of the calli induced from petiole and hypocotyl explants of physic nut in mediums for 30 days.

Explant types	Average of diameter of calli (cm)		Means
	Medium 1	Medium 2	
Petiole	0.380 ± 0.083 c	1.340 ± 0.114 a	0.860 B
Hypocotyl	1.380 ± 0.130 a	1.240 ± 0.181 b	1.310 A
Means ^{1/}	0.880 B	1.290 A	

F-test (Explant types)

**

F-test (Mediums)

**

F-test (Explant types x Mediums)

*

CV (%)

12.19%

**significant difference at the 0.01 level of probability.

^{1/}Means within the same row or column followed by different letter are significantly different at the 0.05 level of probability.

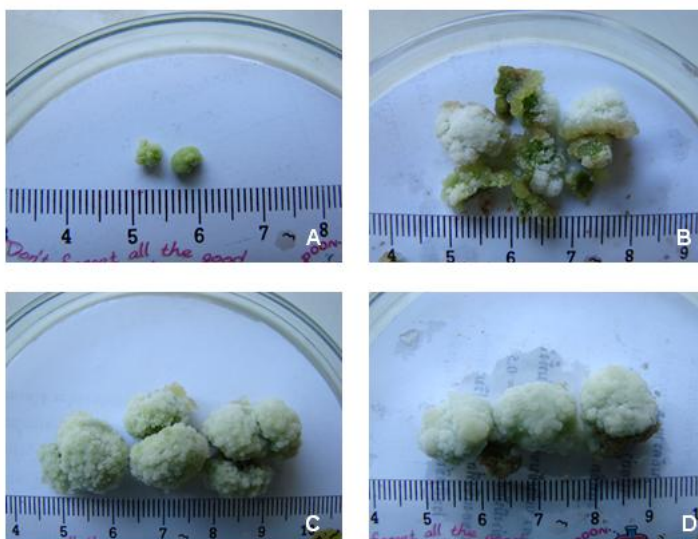


Figure 1 Calli induced from petiole and hypocotyl explants of physic nut in mediums at 30 days.

- A. Calli induced from petiole explants in Medium 1 : MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA.
- B. Calli induced from petiole explants in Medium 2 : MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA.
- C. Calli induced from hypocotyls explants in Medium 1 : MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA.
- D. Calli induced from hypocotyls explants in Medium 2 : MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA.

Table 3 Average of the fresh weight of the calli induced from petiole and hypocotyl explants in mediums after subculture for 30 days.

Explant types	Average of fresh weight of calli (g/piece)		Means
	Medium 1	Medium 2	
Petiole	0.382 ± 0.1329 c	1.498 ± 0.185 b	0.940 B
Hypocotyl	1.064 ± 0.1679 b	3.224 ± 1.032 a	2.144 A
Means ^{1/}	0.723 B	2.361 A	

F-test (Explant types)

**

F-test (Mediums)

**

F-test (Explant types x Mediums)

*

CV (%)

34.69%

*significant difference at the 0.05 level of probability.

**significant difference at the 0.01 level of probability.

^{1/}Means within the same row or column followed by different letter are significantly different at the 0.05 level of probability.

Table 4 Average of the diameter of the calli induced from petiole and hypocotyl explants of physic nut in mediums after subculture for 30 days.

Explant types	Average of diameter of calli (cm)		Means
	Medium 1	Medium 2	
Petiole	0.720 ± 0.084	1.500 ± 0.122	1.110 b
Hypocotyl	1.280 ± 0.084	1.980 ± 0.084	1.630 a
Means ^{1/}	1.000 b	1.740 a	

F-test (Explant types)

**

F-test (Mediums)

**

F-test (Explant types x Mediums)

ns

CV (%)

6.92%

**significant difference at the 0.01 level of probability.

^{1/}Means within the same row or column followed by different letter are significantly different at the 0.05 level of probability.

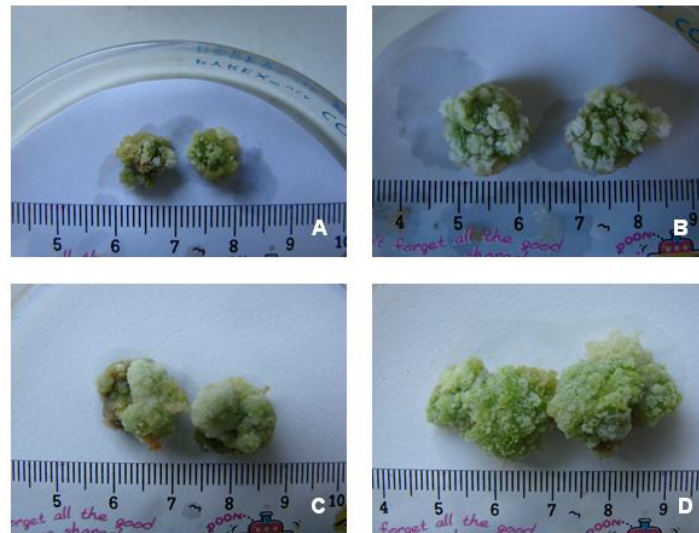


Figure 2 Size of the calli induced from petiole and hypocotyl explants of physic nut in mediums after subculture at 30 days.

- A. Calli induced from petiole explants in Medium
1 : MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA
- B. Calli induced from petiole explants in Medium
2 : MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA
- C. Calli induced from hypocotyl explants in Medium
1 : MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA
- D. Calli induced from hypocotyl explants in Medium
2 : MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA

วิจารณ์

ผลการศึกษาการชักนำแคลลัสในอาหารสองสูตรเป็นเวลา 30 วัน พบว่าชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีความสามารถในการสร้างแคลลัสที่มีน้ำหนักสูงกว่าที่ชักได้จากก้านใบ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสองประการคือการที่อายุของลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษามีอายุหลังงอกประมาณ 2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตสูง จึงส่งผลต่อการชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ส่วนของก้านใบที่มีอายุนานกว่า สอดคล้องกับการศึกษาโดยใช้ชิ้นส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยงซึ่งพบว่า

สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเช่นเดียวกัน (Wei *et al.*, 2004) และสาเหตุอีกประการหนึ่งคือการนำชิ้นส่วนของก้านใบจากแปลงปลูกมาทำการชักนำให้เกิดแคลลัสต้องผ่านการฟอกฆ่าเชื้อก่อน จึงอาจก่อให้เกิดความเสียหายกับเนื้อเยื่อพืชบางส่วนทำให้ความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสลดลง ขณะที่อาหารสูตร 2 (MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA) ให้น้ำหนักแคลลัสสูงกว่าในอาหารสูตร 1 (MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA) อาจเป็นผลมาจากการที่อาหารสูตร 1 มีความเข้มข้นของ BA และ IBA ต่ำกว่า ขณะเดียวกันมีงานวิจัยที่พบว่า การเติม MS medium ด้วย 0.5 mg/l BA และ

0.1 mg/l IBA เป็นสูตรที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นได้สูงสุดในสนุ่นดำ (Wei *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับความเข้มข้นของ BA และ IBA ที่พบว่าการชักนำต้นจากแคลลัสของก้านใบจะใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (0.44 และ 0.49 ไมโครโมล ของ BA และ IBA ตามลำดับ) ต่ำกว่าที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (2.22 และ 0.40 ไมโครโมล ของ BA และ IBA ตามลำดับ) (Sujatha and Mukta, 1996).

ที่ระยะการชักนำแคลลัสนาน 30 วัน พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารซึ่งชี้ให้เห็นว่าการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชที่มีสภาพสมบูรณ์มีอิทธิพลสูงไม่ต่างจากการเลือกใช้สูตรอาหารในการชักนำ สำหรับชิ้นส่วนของก้านใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ การใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจะมีความสำคัญในการชักนำแคลลัสอย่างยิ่ง

สำหรับอิทธิพลของสูตรอาหารและชนิดของชิ้นส่วนพืชพบว่า มีผลต่อขนาดของแคลลัส ซึ่งขนาดของแคลลัสความสัมพันธ์กับน้ำหนักของแคลลัสที่วัดได้ แต่เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารพบว่า แคลลัสที่ชักนำได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร 2 ซึ่งพบว่า มีน้ำหนักแคลลัสสูง (3.17 กรัม/ชิ้น) ไม่แตกต่างจากที่ชักนำได้ในอาหารสูตรที่ 1 (2.938 กรัม/ชิ้น) แต่พบว่า มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า (1.240 และ 1.380 เซนติเมตร ตามลำดับ) หรือกล่าวได้ว่า แคลลัสที่ชักนำได้ในอาหารสูตร 2 มีลักษณะแน่นกว่า (compact callus) และมีสีขาวอมเหลืองและสีเขียว ขณะที่แคลลัสที่ชักนำได้ในอาหารสูตร 1 จะมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวม ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อลักษณะแคลลัส

ภายหลังทำการเปลี่ยนอาหารและเพิ่มปริมาณในอาหารสูตรเดิมอีกเป็นระยะเวลานาน 30 วัน ยังคงพบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของชิ้นพืชและสูตรอาหาร โดยพบว่า น้ำหนักของแคลลัสที่ชักนำได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร 2 ยังคงลักษณะความดีเด่น โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับแคลลัสที่ชักนำได้ในอาหารสูตร 1 ซึ่งอาจเป็นผลจากลักษณะของแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์หนาแน่นมากกว่า

ขนาดของแคลลัสภายหลังการเปลี่ยนอาหารและเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า แคลลัสที่ได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีเส้นผ่านศูนย์กลาง (1.630 เซนติเมตร) มากกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากก้านใบ และแคลลัสที่ชักนำได้ในอาหารสูตรที่ 2 ให้ขนาดของแคลลัสใหญ่กว่าที่ชักนำได้ในอาหารสูตรที่ 1 (ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.740 และ 1.000 เซนติเมตร ตามลำดับ) โดยไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารที่มีผลต่อขนาดของแคลลัสภายหลังการชักนำ

จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นได้ชัดเจนถึงลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ว่า มีลักษณะหนาแน่นและมีน้ำหนักแคลลัสสูง ทั้งก่อนและหลังการเปลี่ยนอาหารนาน 30 วัน ซึ่งแคลลัสที่เป็นลักษณะหนาแน่นหรือเป็นแบบ compact จะมีความเหมาะสมในการชักนำให้พัฒนาเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (นิตยศรี และสัมพันธ์, 2548)

สรุป

การชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้ชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA ให้น้ำหนักแคลลัสสูงสุด และแคลลัสมีลักษณะที่เกาะกันหนาแน่น (compact callus) โดยชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ชิ้นส่วนของก้านในขณะเดียวกันอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA จะชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะหนาแน่นมากกว่าอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA โดยให้ผลการทดลองที่เหมือนกันทั้งก่อนและหลังทำการเปลี่ยนอาหาร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยทราย อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ต. สามพระยา อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2549. สับดูต้ากับน้ำมันดีเซล. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.doa.go.th/th/ShowArticles.aspx?id=1861> (20 สิงหาคม 2549).
- นิตยศรี แสงเดือน และ สัมพันธ์ คัมภีรานนท์. 2548. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 266 หน้า.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15(3): 473-497.
- Rajore, S. and A. Batra. 2005. Efficient plant regeneration *via* shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 14(1): 73-75.
- SAS. 1997. User's Guide: Statistics, Version 6.12 Edition. SAS. Inst. Cary. N.C.
- Sujatha, M. and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 44(2): 135-141.
- Wei, Q., W.-D. Lu, Y. Liao, S. L. Pan, Y. Xu, L. Tang and F. Chen. 2004. Plant regeneration from epicotyls explant of *Jatropha curcas*. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* 30(4): 475-478.
-