บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงใบอ่อนหญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 โดยการสร้าง และไม่สร้างแผลในอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) เติมออกซินชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ ในที่มืด หลังจากชักนำแคลลัสได้แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ดัดแปลงโดยการเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ ตลอดจนไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง 2,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียสเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น กรองแยกขนาดเซลล์และหุ้มห่อต้นอ่อนโดยใช้วุ้นแอลจิเนต (จากบริษัท Wako) ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปทดสอบความงอกในหลอดทดลอง นอกจากนี้ยังได้ชักนำยอดรวมจำนวนมากและใช้ยอดขนาด 3-5 มิลลิเมตร มาหุ้มเพื่อผลิตเมล็ดเทียมด้วย

จากการศึกษาพบว่า 2,4-dichlorophhenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด ในขณะที่ออกซินชนิดอื่นๆ ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ การสร้างแผลส่งเสริมการสร้างแคลลัสแบบโตเร็ว (fast growing callus: FGC) เมื่อใช้ 2,4-D เข้มข้นต่ำ (1 มิลลิกรัม/ลิตร) หรือสูง (5 มิลลิกรัม/ลิตร) การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นไปได้ส่งในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเป็น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เติม casein hydrolysate 500-1000 มิลลิกรัม/ลิตร หรือเติม benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นชักนำได้ในอาหารสูตรเดียวกัน แต่ปราศจากวุ้น เซลล์ขนาดใหญ่ในซัสเพนชั่นให้การเพิ่มต้นอ่อนระยะรูปกลม 4.87% สูงกว่าเซลล์ขนาดเล็ก เมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอด้วยวุ้นแอลจีเนต (จากบริษัท Wako) ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสม การหุ้มต้นอ่อนทุกระยะส่งเสริมการสร้างแคลลัส ส่วนเมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มปลายยอดงอกได้ 100% ดังนั้นการผลิตเมล็ดเทียมจำนวนมากที่มีประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการได้จากการหุ้มปลายยอดด้วยวุ้นโซเดียมแอลจิเนต เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยอดจำนวนมากนั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย ใช้สูตรอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% α-naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร

Abstract

Young leaf segments of vetever cv. Songkhla 3 in forms of wound and non wound were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various kinds and concentrations of auxins under dark condition. After callus induction phase it was transferred to culture on MS medium modified by complex addenda and cytokinins. The cultures were maintained under 2,000 lux illumination, 14 h photoperiod at 26±4°C in order to induce embryogenic callus. The callus was again brought to liquid culture medium for induction of embryogenic cell suspension. The cells/clumps/somatic embryos in suspension were synchronised and encapsulated by algenate bead (Wako Company) at various concentrations to form artificial seeds. The seeds were germinated *in vitro*. In addition, multiple shoots were also induced from apex culture. Excised single shoot was trimmed to size of 3-5 mm, encapsulated by algenate bead and then germinated in the same way as somatic embryo does.

The results revealed that 4 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) promoted the best percentage callus induction whereas the other auxins could not induce callus. Wound leaf segments enhanced fast growing callus (FGC) in low (1 mg/l) and high (5 mg/l) concentration of 2,4-D containing medium. Embryogenic callus formed in culture medium with decrement 2,4-D to 1 mg/l in the presence of 500-1000 mg/l casein hydrolysate or 1 mg/l benzyladenine (BA). Embryogenic cell suspension was successfully established in the above medium without gelling agent. Large clumps/fraction in the suspension promoted the higher proliferation of globular embryos (4.87%). Artificial seeds were optimised by encapsulating somatic embryos with 2% algenate. Artificial seeds in term of encapsulating somatic embryos lost their germination but callus formation was observed. While encapsulating shoot apex germinated to normal seedling at 100%. So, artificial seed production was optimised by encapsulating shoot apex with 2% algenate. Mass propagation of the shoot was routinely carried out in simple bioreactor in MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.5 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 mg/l BA.