บทที่ 4

บทวิจารณ์

ชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

การทดลองวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และข้อของหน้าวัวพันธุ์สุลต่านในหลอดทดลอง บนอาหารที่แตกต่างกัน 5 สูตร คือ MS, ½ MMS, MMS, WPM, LS และ VW เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำแคลลัส คือชิ้นส่วนข้อ สามารถชักนำเมอริส-เต็มมาติกโนดูลาแคลลัส ที่มีลักษณะเป็นปมแข็งมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด ได้สูงสุด 100 % เนื่องจากชิ้นส่วนข้อมีส่วนของตาข้าง และมีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญจำนวนมาก สอดคล้องกับการรายงานของธัญญาพร (2547) ซึ่งทดลองในหน้าวัวพันธุ์โซเน็ต พบว่า สามารถสร้างโนดู-ลาแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อได้ 100 % แต่ชักนำจากใบได้เพียง 86.6 % ในขณะที่ สมปอง และคณะ (2545) รายงานว่าชิ้นส่วนก้านใบของหน้าวัวพันธุ์ทรอปฟิกานา แชมเปญ และดวงสมรให้การสร้างแคลลัสเฉลี่ยทั้ง 3 สายพันธุ์สูงสุด 82 % รองลงมาคือชิ้นส่วนแผ่นใบ (57 %) ปลีดอก (55 %) และจานรองดอก (18 %) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากความสามารถในการสร้างแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนของหน้าวัวในแต่ละพันธุ์ไม่เท่ากันขึ้นกับพันธุกรรมของพืช (Pierik *et al*., 1974) โดยปกติชิ้นส่วนใบนั้นเมื่อวางเลี้ยงไปมักเกิดการออกซิเดชั่นสร้างสารสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสารประกอบพวกฟีโนล (phenolic compounds) ขึ้นที่บริเวณรอยตัด ไปขัดขวางการดูดซับน้ำ และธาตุอาหารของชิ้นส่วน ทำให้ชิ้นส่วนดังกล่าวมีการพัฒนาช้า (รังสฤษดิ์, 2541) สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสหน้าวัวจากการศึกษาครั้งนี้คืออาหารสูตร MMS ที่มีการดัดแปลงจากอาหารสูตร MS โดยมีการเติมอะดินีนซัลเฟต และลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก และธาตุเหล็กลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นเดิม Pierik และคณะ (1974) ศึกษาใน *A. andraeanum* และรายงานผลในทำนองเดียวกัน จึงอาจกล่าวได้ว่าการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก และการเติมอะดินีนซัลเฟต เป็นการส่งเสริมให้เกิดการสร้างแคลลัสมากขึ้น องค์ประกอบของธาตุอาหารในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกัน ทำให้ชิ้นส่วนของพืชมีความสามารถในการชักนำแคลลัสได้แตกต่างกัน Gamborg และ คณะ (1968) อ้างโดย Bhansali และ Singh (2000) รายงานว่าการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเกิดได้ดีในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้น

ของธาตุอาหารสูง เช่น MS และ WPM ส่วนการสร้างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสอาจเกิดได้โดยตรงที่เซลล์ผิวของพืชบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาวางเลี้ยง หรืออาจเกิดขึ้นภายหลังจากการพัฒนาเป็นแคลลัส (สมปอง, 2539) จากการศึกษานี้พบว่าลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารสูตร MS และ WPM มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ เกิดขึ้นบริเวณรอยตัดและที่บริเวณผิวของชิ้นส่วน เนื่องจากที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่พืชปล่อยออกมา และเซลล์บริเวณนี้ยังสามารถสัมผัสสารอาหารได้ดีกว่าเซลล์ที่อยู่ภายใน (มาลี, 2532) โดยที่ชิ้นส่วนเริ่มสร้างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อมาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เอ็มบริโอเริ่มมีสีซีดเหลือง และตายในที่สุด อาจเนื่องจากระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงนานเกินไป ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอ ดังนั้นการร่นระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงให้สั้นลง อาจช่วยเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ นอกจากนี้ปริมาณของออกซินที่ใช้อาจสูงเกินไป เกิดการยับยั้งพัฒนาการของเอ็มบริโอ ดังนั้นจึงควรมีการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในระยะแรกไปในอาหารที่ลดความเข้มข้นของออกซินลง หรือไม่ใช้เลย ซึ่งทำให้เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการพัฒนาได้ต้นอ่อนเร็วขึ้น และต้นที่ได้มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์

เมื่อนำแคลลัสที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอมาศึกษาเนื้อเยื่อโดยการทำสไลด์ถาวร แล้วย้อมสีแซฟรานิน และฟาสก์กรีน ทำให้สามารถจำแนกลักษณะของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้อย่างชัดเจน จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเกิดจากเซลล์บริเวณชั้นผิวของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น เซลล์ดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยสีฟาสก์กรีนเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงินเข้ม โดยเฉพาะไซโตพลาสซึม และนิวเคลียส ภายในเซลล์มีความเข้มข้นของไซโตพลาสซึมสูง นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง ซึ่งเทียมใจ (2541) รายงานเช่นเดียวกันว่าลักษณะดังกล่าวเป็นพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนนิคเซลล์ นอกจากนี้ภายในเซลล์ยังมีเม็ดแป้ง (starch grain) เป็นจำนวนมาก และมีแวคิวโอลขนาดเล็ก สอดคล้องกับรายงานของ Cheema (1989) ที่ทำการศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของ Himalayan poplar (*Poplus ciliata*) ประศาสตร์ (2538) อธิบายพัฒนาการของเอ็มบริโอไว้ดังนี้ เริ่มจากเซลล์บางเซลล์ของชิ้นส่วนพืชมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสสูงกว่าเซลล์อื่น ๆ จากนั้นเซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน จนมีลักษณะรูปกลม หัวใจ และตอร์ปิโด จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อเหล่านี้มีโปรแคมเบียมเชื่อมต่อกัน สอดคล้องกับพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในการเพาะเลี้ยงมะม่วงหิมพานต์ (Gogate and Nadgauda, 2003) และ ถั่วอัลฟัลฟ่า (Jorge *et al*., 1999) ในระยะรูปหัวใจต้นอ่อนจะมีการพัฒนาเห็นเป็นสองขั้วอย่างชัดเจน โดยที่เซลล์ส่วนบนเป็นส่วนของขั้วยอด และเซลล์ส่วนล่างเป็นซัสเพนเซอร์หรือจุดกำเนิดรากพร้อมที่จะ

พัฒนาเป็นต้นกล้า เมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายในเซลล์ของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่สุกแก่เต็มที่ส่วนใหญ่มีเม็ดกลมเล็ก ๆ ย้อมติดสีแดงของแซฟรานิน ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่สะสมภายในเซลล์ เช่นเดียวกับโซมาติกเอ็มบริโอของ *A. scherzerianum* (Geier, 1982) และ *A. andraeanum* (Matsumoto *et al*., 1996) ซึ่งพบว่ามีการสะสมของแป้ง และโปรตีนจำนวนมาก

เนื่องจากไอโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโต และการพัฒนาการของพืช ดังนั้นการตรวจสอบเอนไซม์โดยวิธีทางชีวเคมี หรือการใช้เทคนิคไอโซไซม์ ถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้เพื่อตรวจสอบเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสเปรียบเทียบกัน เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืช และระยะพัฒนาการของเนื้อเยื่อ ในการศึกษานี้ พบว่า เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสสูงกว่า เปอร์ออกซิเดส และแอซิดฟอสฟาเทส ส่วนเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสนั้นไม่พบในแคลลัสทั้งสองชนิด เมื่อพิจารณาไซโมแกรมของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เอสเทอเรสสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสได้ชัดเจนที่สุด ส่วนเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสนั้นพบเฉพาะในเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเท่านั้น เนื่องจากเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และเอสเตอเรส จัดเป็นพวกไลติกเอนไซม์ในกระบวนการเมทาบอลิซึมพบได้ในเนื้อเยื่อพืช การแสดงออกของไลติกเอนไซม์นี้แสดงถึงการมีกิจกรรมเมทาบอลิซึมสูงในระยะพัฒนาการของเอ็มบริโอ (Raghavan, 1997) เช่น พัฒนาการของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในระยะรูปกลมของแครอท พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสสูง (Nomura and Komamine 1986a, b) นอกจากนี้เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส ยังมีความเกี่ยวข้องกับการสุกของผลไม้ และการงอกของเมล็ด โดยทำงานในกระบวนการไฮโดรไลซีสของฟอสโฟโมโนเอสเตอร์ เมื่อพิจารณาระบบเปอร์ออกซิเดส พบว่า เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส สังเกตได้จากการติดสีเข้มปรากฏเพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ลักษณะของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้เช่นกัน สอดคล้องกับ Zhou และคณะ (1992) รายงานว่า ในโซมาติกเอ็มบริโอของผักกาดหอมมีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าเมอริสเต็มมาติกแคลลัส และมีแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพียงแถบเดียวที่เป็นเครื่องหมายของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

เนื่องจากรูปแบบของโปรตีนระหว่างพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเป็นผลมาจาก DNA ดังนั้นจึงสามารถใช้การตรวสสอบโปรตีนในการศึกษาระยะพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ (Jeyaretman *et al*., 1999) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการตรวจสอบโปรตีนของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส โดยใช้ SDS-PAGE พบว่า

เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสให้แถบของโปรตีนขนาด 39 และ 49 kDa ต่างจากเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส สอดคล้องกับการรายงานของ Pretová และคณะ (2001) ซึ่งพบว่ารูปแบบการพัฒนาของเอ็มบริโอทำให้มีโปรตีนที่จำเพาะปรากฏ หรือไม่ปรากฏ ในระยะพัฒนาการต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาการของเอ็มบริโอกำหนดโดยการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน โดยได้มีการศึกษาถึงกลไกการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขึ้น เช่นการสร้างโปรตีน และการตรวจสอบสารพันธุกรรมที่มีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด เพื่อใช้ยีนดังกล่าวในการปรับปรุงพันธุ์ ให้มีความสามารถในการสร้างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้

สารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ และเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส พบว่าชิ้นส่วนพืชสามารถสร้างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ในสัปดาห์ที่ 8 หลังการย้ายเลี้ยง เอ็มบริโอในระยะแรกมีลักษณะกลม สีเหลือง เมื่อวางเลี้ยงเป็นระยะเวลาหนึ่งเอ็มบริโอจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียว พร้อมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างอีกด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมักมีบทบาทที่เด่นชัดกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยเฉพาะ 2,4-D มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการสร้างแคลลัส การแบ่งเซลล์ และการชักนำต้นอ่อน เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่ถ้ามีการใช้ที่ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งผลในการยับยั้งการพัฒนาของเอ็มบริโอบางชนิด (Carini *et al.,* 1997; Ananthakrishnan *et al*., 1998) Kuehnle และคณะ (1992) ซึ่งได้รายงานการใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของหน้าวัว *A. andraeanum* ลูกผสม ในทำนองเดียวกันการศึกษานี้พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาด 1.6-1.8 เซนติเมตรได้ดีที่สุด ในขณะที่ Hamidah และคณะ (1997) ได้รายงานการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในหน้าวัว *A. scherzerianum* ต้องใช้ 2,4-D ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร ในการศึกษานี้ 2,4-D ร่วมกับ BA นั้นสามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาดเล็กเพียง 0.1-0.3 เซนติเมตร เช่นเดียวกับการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสหน้าวัว (*A. andraeanum*) ในระยะแรก ๆ ซึ่งรายงานโดย Kuehnle และ Sugii (1991) จากการศึกษาเมื่อย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสบนอาหารสูตรเดิม พบว่าในสัปดาห์ที่ 16 หลังการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสพัฒนาให้ต้นอ่อนขึ้นที่มีการเจริญ 2 ทาง คล้ายต้นอ่อนในเมล็ด ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย Kinetin ความเข้มข้น 1.0

มิลลิกรัม/ลิตร มีผลให้เกิดการสร้างต้นอ่อนมากที่สุด (100%) นั่นคือในระยะแรกของการชักนำเอ็มบริโอเจนนิซิสนั้นต้องการออกซินความเข้มข้นสูง แต่เมื่อมีการงอกแล้วความต้องการออกซินลดลง หรือไม่ใช้เลย สอดคล้องกับ Kuehnle และคณะ (1992) ที่รายงานการชักนำเอ็มบริโอเจนนิซิสในหน้าวัว *A. andraeanum* ลูกผสม ว่าจะเกิดได้เร็วถ้าใช้ออกซินที่มีความเข้มข้นสูง แต่หลังจากชักนำแล้วควรลดความเข้มข้นให้ต่ำลง หรือไม่ใช้เลย

ส่วนการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ TDZ ร่วมกับ kinetin หรือ BA ในการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้น 0.75 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการสร้างเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาด 0.7 - 0.9 เซนติเมตร ในขณะที่ ธัญญาพร (2547) รายงานว่าการใช้สารดังกล่าวที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ และ BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร อาจไปส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีนทำให้มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (สมพร, 2541) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า BA ส่งเสริมการสังเคราะห์ DNA และโปรตีน ดังนั้นจึงเป็นการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (Houssa *et al*., 1990) สำหรับ TDZ นั้นยังสามารถแสดงออกคล้ายฮอร์โมนในกลุ่มออกซินและชักนำให้พืชมีการสะสมแร่ธาตุที่จำเป็น เช่น โซเดียม ทองแดง และสังกะสี ได้อีกด้วย (Murch and Saxena, 1997) และยังไปกระตุ้นให้พืชสร้างออกซิน ไซโตไคนิน และ ABA ในชิ้นส่วนให้มีปริมาณสูงขึ้น (Iantcheva *et al*. 1999) ทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสมเกิดการสร้างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 16 หลังการย้ายเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีกลุ่มของ secondary somatic embryo เกิดขึ้นที่บริเวณผิวของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเดิมอีกด้วย

เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการเพิ่มปริมาณได้ดีโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MMS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลวภายใต้การเขย่าเลี้ยงทำให้สามารถสัมผัสธาตุอาหาร และอากาศได้อย่างทั่วถึง โซมาติกเอ็มบริโอที่ได้มีความแข็งแรง และมีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง นอกจากนี้แล้วยังสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน (สมปอง, 2539; Finer and Nagasawa, 1998) ในหน้าวัว *A. andraeanum* มีรายงานการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส (Pierik, 1975) และเพิ่มปริมาณยอดรวม (Leffring and Soede, 1979 อ้างโดย Teng, 1997) ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MMS เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin พบว่า kinetin ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ส่วนที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลในการยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอ โดยการเติม Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย 2,4-D ความเข้มข้นสูง 3.0 และ

4.0 มิลลิกรัม/ลิตร เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสจะมีสีน้ำตาล และตายในสัปดาห์ที่ 16 หลังการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสอาจได้รับ Kinetin ในปริมาณที่สูงเกินไป อาจเป็นพิษต่อพืช นอกจากนี้ kinetin อาจมีความเป็นพิษสูงกว่า BA ดังนั้นควรใช้ kinetin ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ

จากการศึกษานี้เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการเพิ่มปริมาณในสัปดาห์ที่ 8 หลังการเพาะเลี้ยง เริ่มสร้างยอดรวมในสัปดาห์ที่ 12 และโซมาติกเอ็มบริโองอกทั้งหมดที่ 16 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง เอ็มบริโอที่เกิดขึ้นเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดแตกต่างกัน ไม่แยกเป็นเอ็มบริโอเดี่ยว ๆ ทำให้สามารถงอกเป็นต้นได้ เมื่อทำการแยกเอ็มบริโอ พบว่า เอ็มบริโอตายที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์หลังการย้ายเลี้ยง เนื่องจากมีการสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้นจากบาดแผลระหว่างทำการแยก การที่อยู่รวมกลุ่มกันทำให้เอ็มบริโอสามารถงอกได้ปกติ อาจเป็นเพราะเอ็มบริโอมีการสร้างสารที่จำเป็นต่อการพัฒนา ในการศึกษาต่อไปจึงควรมีการพัฒนาเทคนิค และวิธีการที่สามารถแยกเป็นเอ็มบริโอเดี่ยว ๆ เพื่อให้เอ็มบริโอมีอัตราการงอกสูงขึ้น อย่างไรก็ตามต้นอ่อนส่วนใหญ่ที่พัฒนามาจากกลุ่มของเอ็มบริโอในอาหารเหลวจากการศึกษานี้มีลักษณะที่ไม่เหมาะสมต่อการนำออกปลูกอนุบาลนอกหลอดทดลอง พืชตั้งตัวได้ไม่ดี เมื่อนำออกปลูกมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ และมีพัฒนาการอย่างช้า ๆ จึงควรมีการย้ายต้นอ่อนในระยะแรก (มีใบ 2 ใบพร้อมราก) ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความแข็งแรงก่อนนำออกปลูก

การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

โซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงมีการพัฒนาจากระยะรูปกลม หัวใจ และสร้างใบ เอ็มบริโอมีการเจริญเป็นสองทาง คือส่วนที่เจริญเป็นยอด และส่วนที่เจริญเป็นราก ในพืชหลายชนิดสามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอได้ในสูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น พลูนางฟ้า (Zhang *et al*., 2005) สับปะรด (Sripaoraya *et al*., 2003) ยูคาลิปตัส (Muralidharan *et al*., 1989) *Sequoia sempervirens* (Bourgkard and Favre, 1988) และ *Magnolia macrophylla* (Markle and Watson-Pauley, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้คือ เอ็มบริโอสามารถงอกได้ดีในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการสร้างยอด และรากได้ 100 % โดยเริ่มงอกในสัปดาห์ที่ 5 หลังการเพาะเลี้ยง และเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมออกปลูกในสัปดาห์ที่ 8 หลังการย้ายเลี้ยง อย่างไรก็ตามการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินส่งเสริมการเกิดรากเพื่อให้พืชตั้งตัวได้ดี เช่น การใช้ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ใน *A. andraeanum* (Malhotra *et al*., 1998; Yu and Peak, 1995) ส่งเสริมให้หน้าวัวตั้งตัวได้ดีกว่าการใช้ IAA และ NAA (Yu and Peak, 1995) สอดคล้องกับการศึกษานี้

พบว่า IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ต้นอ่อนมีความสามารถในการตั้งตัวได้ดี รากมีการพัฒนาหลายลักษณะ คือ เป็นเส้นยาว สั้นกุด และรากแตกแขนง สอดคล้องกับรายงานของ Vyas และ Bansal (2004) ซึ่งพบว่ารากของเอ็มบริโอ semul (*Bombax ceiba*) มีรูปร่างหลายลักษณะ คือ เป็นเส้นตรง เป็นง่าม และแตกแขนง ทำให้ต้นอ่อนมีความสามารถในการตั้งตัวได้ดีขึ้น ส่วนการใช้ NAA ในการศึกษานี้พบว่ารากที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังมีอาการคลอโรซีสกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA เนื่องจากรากของต้นที่ชักนำในอาหารเติม NAA นั้นมีขนาดเล็ก ทำให้ดูดใช้ธาตุอาหารได้ไม่ดี หรืออาจเกิดจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นสูงเกินความต้องการ ส่งผลให้กระบวนการเมทาบอลิซึมผิดปกติ พืชเกิดคลอโรซีส และตายในที่สุด ดังนั้นในการนำไปใช้ควรลดความเข้มข้นของ IBA ลง ทั้งนี้การตอบสนองต่อชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นขึ้นกับความแตกต่างของพันธุกรรม และสายพันธุ์ (Pierik *et al*., 1974; สมปอง และคณะ, 2545)

โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนิยมใช้วุ้น Agar-Agar เนื่องจากมีราคาถูก และสามารถหาซื้อได้ง่าย แต่เป็นวุ้นที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำไม่เหมาะสมกับพืชบางชนิด จึงได้มีการนำ Phytagel มาใช้เนื่องจากมีความบริสุทธิ์สูงกว่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี เพราะมีองค์ประกอบของแร่ธาตุ สารอินทรีย์ องค์ประกอบของโพแทสเซียม และแมกนีเซียมในปริมาณสูง ส่งผลให้พืชสามารถใช้ธาตุอาหารได้อย่างเต็มที่ (Bonga and Aderkas, 1992) เช่นที่มีรายงานในพืชหลายชนิด ได้แก่ มะม่วง (DeWald *et al*., 1989) และ *Fraxinus angustifolia* (Tonon *et al*., 2001) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้วุ้น Agarose และ Bacto agar ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอีกด้วย การเลือกใช้วุ้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นกับชนิดของพืช และวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง เช่น การส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในหน้าวัว *A. andraeanum* พบว่า Phytagel ความเข้มข้น 0.18 % ช่วยส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าการใช้ Bacto agar ความเข้มข้น 0.7 % (Kuehnle *et al*., 1992) ส่วนการสร้างยอดใน *Fraxinus angustifolia* พบว่า ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารเติม Phytagel นั้นสร้างยอดมากกว่าการใช้ Bacto agar เป็นสองเท่า (Tonon *et al*., 2001) เนื่องจาก Bacto agar เป็นวุ้นที่มีองค์ประกอบของโซเดียม และทองแดงสูง เป็นพิษต่อพืช และยังไปดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินไว้ทำให้พืชไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง (Bonga and Aderkas, 1992) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า Agar-Agar และ Phytagel ส่งเสริมการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอได้ไม่แตกต่างกัน แต่ Agar-Agar สามารถส่งเสริมการสร้างยอดได้ดีกว่า สอดคล้องกับการศึกษาในหน้าวัวพันธุ์กระถางดอกสีแดง (ราตรี และสมปอง, 2548) และทานตะวัน (Berrios *et al*., 1999)

ซึ่งพบว่า Agar-Agar ส่งเสริมการสร้างยอดดีกว่าการใช้ Phytagel เนื่องจาก Phytagel มีองค์ประกอบของแร่ธาตุที่มากเกินไปอาจส่งผลให้หน้าวัวมีการเจริญเติบโตไม่ดี ดังนั้นในการนำไปใช้ควรเลือกใช้ผงวุ้นชนิด Agar-Agar เนื่องจากมีสารประกอบที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และยังมีราคาถูก สามารถหาซื้อได้ง่าย

ผลของระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และลักษณะผิดปกติ

เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเริ่มมีการงอกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 33.33 % และในเดือนที่ 6 หลังการเพาะเลี้ยง เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสงอกให้ต้นอ่อนมีลักษณะปกติ แต่เมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่า ต้นอ่อนที่ได้มีลักษณะผิดปกติเกิดเป็นใบเรียว 30 % และลักษณะดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน จะเกิดใบเรียวทั้งหมดในเดือนที่ 18 ของการย้ายเลี้ยง เนื่องจากการย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ในสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้พืชต้นใหม่ที่ได้มีความแปรปรวน ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากพิษของสารต่อการแสดงออก หรือเป็นผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคไอโซไซม์ในระบบเปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอซิดฟอสฟาเทส พบว่ามีเพียงระบบเอสเตอเรสที่มีการติดสีดีที่สุด สามารถแยกความแตกต่างของแถบเอนไซม์ระหว่างใบเรียว และใบของต้นปกติได้ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก TDZ และ BA อาจไปยับยั้งการสร้าง mRNA ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์เอนไซม์ ทำให้มีรูปแบบของเอนไซม์ลดลง มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะที่เกิดขึ้น จากการศึกษานี้พบว่าใบเรียวมีแถบเอนไซม์เอสเทอเรสน้อยกว่าใบปกติ การที่ชิ้นส่วนพืชสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน แสดงว่าพืชมีแนวโน้มที่จะเกิดการกลายพันธุ์ขึ้น ทั้งนี้ในหน้าวัวยังไม่มีรายงาน somaclonal ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ แต่มีการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์อื่น ๆ เช่น EMS (ethyl methanesulphonate) ทำให้สีของดอกเปลี่ยนแปลงไป (ธัญญาพร, 2547) ดังนั้นควรมีการศึกษาอย่างละเอียดในระดับ DNA ของลักษณะที่เกิดขึ้น โดยอาศัยเทคนิค RAPD (random amplify polymorphic DNA) ในการตรวจสอบ และสนับสนุนผลดังกล่าว หากเทคนิคการเพาะเลี้ยงในสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานานสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับ DNA ได้ ดังนั้นอาจใช้เทคนิคนี้ในการปรับปรุงพันธุ์ หรือการผลิตพืชพันธุ์ใหม่ต่อไป