บทนำ

พื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพื้นที่ลาดเอียง หรือภูเขาอยู่มากว่า 50% พื้นที่ดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อการพังทะลายของหน้าดินอันเนื่องมาจากการกัดเซาะของน้ำฝนที่รุนแรงมาก ทำให้หน้าดินเกิดความเสียหายเป็นจำนวนมากมายมหาศาล (Vietmeyer, 1996) การแก้ปัญหาที่ผ่านมาเป็นการปลูกพืชต่าง ๆ เพื่อป้องกันการชะล้าง หรือพังทะลายของหน้าดิน และการปลูกพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจขวางแนวลาดชัน อย่างไรก็ตามพืชที่ปลูกมีระบบรากไม่ดี ทำให้การยึดเกาะดินไม่ดีจึงยังคงทำให้หน้าดินเกิดความเสียหาย

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีพระราชดำริของโครงการ/กิจกรรมนี้กับหม่อมราชวงศ์แชมแจ่มจรัส รัชนี คณะทำงานโครงการพัฒนาหญ้าแฝกเพื่อเป็นพืชเศรษฐกิจโครงการหลวงณ ศาลาเริง วังไกลกังวล อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2546 สรุปประเด็นสำคัญของพระราชดำริดังนี้ **ให้ทุกหน่วยงานและหน่วยราชการที่มีศักยภาพในการขยายพันธุ์ให้ความร่วมมือกับกรมพัฒนาที่ดินในการผลิตหญ้าแฝกที่มีคุณภาพ แจกจ่ายกลุ่มเป้าหมายที่ต้องการให้พอเพียง และหากดำเนินการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องหมั่นหมุนเวียนกลับมาเริ่มจากต้นแม่พันธุ์เพราะหากขยายพันธุ์หลายช่วงต่อเนื่องกันมากเกินไปจะทำให้กล้าหญ้าแฝกอ่อนแอได้ ควรพิจารณาให้การสนับสนุนงบประมาณการผลิตหญ้าแฝกให้เพียงพอ**

เนื่องจากหญ้าแฝกเป็นที่ทราบกันในประเทศไทยว่าเป็นพืชมหัศจรรย์ ที่ใช้กันเพื่ออนุรักษ์ดินและน้ำ (Suebsiri, 1996) ทั้งนี้เพราะมีการแตกกอที่แน่น มีอายุยืน มีระบบรากที่กว้างและแผ่ลึก ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ประดิษฐ์หัตถกรรมต่าง ๆ (Vietmeyer, 1996) และยังใช้ผลิตเป็นหญ้าแฝกแผ่นอัดในปัจจุบัน

เทคโนโลยีการผลิตหญ้าแฝกที่เหมาะสมจำเป็นต้องอาศัยการขยายพันธุ์ที่เหมาะสม คุณภาพของต้นพันธุ์ที่ดี ตลอดจนเทคนิคการปลูก ระบบการปลูก และการจัดการที่เหมาะสม (Yoon, 1996) การขยายพันธุ์ที่ทำกันในปัจจุบันใช้วิธีการแยกกอ ซึ่งอาจเจอปัญหาเกี่ยวกับอายุทำให้โตช้า และอาจออกดอก ระบบรากไม่ค่อยดี นอกจากนี้ต้องมีแปลงขยายพันธุ์ขนาดใหญ่เพื่อเตรียมต้นสำหรับการปลูกจำนวนมาก การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทำได้ยาก เนื่องจากเมล็ดมีการพักตัวทำให้ต้องใช้วิธีการแก้การพักตัวซึ่งยุ่งยากและซับซ้อน อีกทั้งความมีชีวิตและอัตราการงอกของเมล็ดหญ้าแฝกต่ำ และแม้ว่าจะได้นำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่นับว่าสามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น แต่ต้นทุนในการผลิตยังสูง (Sayamanonta,1996) ดังนั้นยังไม่สามารถที่จะนำผลการศึกษาที่ได้มาใช้ในทางปฏิบัติอย่างจริงจัง การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านมาประสบปัญหาเกี่ยวกับการขนส่งต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปยังพื้นที่เป้าหมาย กล่าวคือสิ้นเปลืองเนื้อที่และราคาค่าขนส่ง จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมในหญ้าแฝกซึ่งเป็นเครื่องมือในการขยายพันธุ์แทนการใช้เมล็ดจริงมาก่อน วัสดุดังกล่าว (เมล็ดเทียม) เป็นส่วนที่สามารถขยายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพราะไม่กินเนื้อที่ในการขนส่ง การเตรียมต้นเพื่อปลูกในพื้นที่จริงก็ทำได้ง่ายและสะดวก การเจริญและพัฒนาการของต้นกล้ามีความสม่ำเสมอสูงมาก ที่

สำคัญคือต้นกล้าที่ได้มีระบบรากแก้ว ดังนั้นการแผ่กระจายของรากทั้งแนวลึกและแนวกว้างเป็นไปได้ดีกว่าวัสดุปลูกอื่น ๆ จากการใช้เทคโนโลยีเซลล์พืชเพื่อการขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยวิธีการผลิตเมล็ดเทียมคาดว่ามีประโยชน์มาก

การตรวจเอกสาร

ในปี พ.ศ. 2536 มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝกภายใต้โครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ 4 โครงการ ดำเนินการโดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น กรมส่งเสริมการเกษตร และกรมพัฒนาที่ดิน (คณะทำงานวางผังแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝก, 2536) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่เผยแพร่อย่างเป็นทางการมากนัก Sayamanonta (1996) รายงานการใช้หญ้าแฝกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับการแยกกอที่โครงการพัฒนาดอยตุงว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการแตกกอเร็วกว่าต้นที่ได้จาการแยกกอ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝกใช้วัสดุพืชเริ่มต้นที่เป็นช่อดอกเสียส่วนใหญ่ (Prasertsongskun, 2003) ชิ้นส่วนดังกล่าวมีทั้งส่วนที่เป็นเซลล์ร่างกายและเซลล์เพศปนกัน ดังนั้นต้นที่ได้อาจมีการปะปนของเซลล์ทั้งสองทำให้มีความสม่ำเสมอน้อย Prasertsongskun (2003) รายงานการเกิดต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากช่อดอกอ่อน ผ่านเซลล์ซัสเพนชั่น อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานการชักนำรากเพื่ออนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก และไม่ได้รายงานถึงพันธุกรรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงว่าต้นที่ได้มาจากเซลล์สืบพันธุ์หรือเซลล์ร่างกาย โดยทฤษฎีเทคโนโลยีเซลล์พืช พบว่า เซลล์ซัสเพนชั่นโดยเฉพาะเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นเป็นเครื่องมือที่วิเศษทั้งในการขยายพันธุ์พืชจำนวนมาก และการปรับปรุงพันธุ์ สำหรับการขยายพันธุ์นั้นสามารถที่จะชักนำต้นอ่อนจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว จากนั้นใช้วิธีการหุ้มด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดเทียมทำให้ได้เมล็ดนับแสนจากฟลาสค์ขนาด 125 มล. เพียง 1 ฟลาสค์ หากมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงโดยใช้ถังหมัก (bioreactor) ที่สามารถควบคุมอาหารและสภาพแวดล้อมก็จะได้เมล็ดจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง

มีรายงานการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอเจนิซิสทั้งโดยตรงและผ่านการสร้างแคลลัสจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้ไดแคมบา (Di) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (Kackar *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1992; Wang, 1990; Te-chato *et al.*, 2002) ความเข้มข้น 1 มก/ล มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการชักนำแคลลัสเริ่มแรกในกุหลาบ (Murali *et al.*, 1996) ความเข้มข้น 1-2.5 มก/ล ส่งเสริมการสร้างแคลลัสและร่นระยะเวลาการสร้างแคลลัสในปาล์มน้ำมันได้ 15-30 วัน เมื่อลดความเข้มข้นลงเป็น 0.1 มก/ล สามารถชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสได้สูงสุด (Te-chato *et al.*, 2002) และเนื่องจาก Di มีความจำเพาะต่อการชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ดังนั้น Di น่าจะเป็นสารควบคุมที่มีประสิทธิภาพในการชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนหญ้าแฝกได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถที่จะชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นเพื่อการผลิตเมล็ดเทียมหญ้าแฝกที่มีประสิทธิภาพ การผลิตเมล็ดเทียมเป็นการค้านั้นมีรายงานในแครอท ซึ่งมีพื้นฐานการศึกษาจาก Fujimura และ Komamine (1979a, b; 1980) Komamine และคณะ (1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิต

เมล็ดเทียมในกล้วยไม้ซิมบิเดียม (Corrie and Tandon, 1993) ข้าวบาร์เลย์ (Datta and Potrykus, 1989) สำหรับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวยืนต้น เช่นปาล์มน้ำมันก็มีการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมจากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นเช่นเดียวกัน (Duval, *et al.*, 1995) แต่เนื่องด้วยปัญหาการงอกที่ไม่มีประสิทธิภาพ และการกลายพันธุ์ที่สูงในพืชนี้จึงทำให้อุตสาหกรรมเมล็ดเทียมปาล์มน้ำมันยังไม่เป็นรูปธรรม นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดเทียมเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษา (Gray *et al.*, 1987, 1995; Senarathna *et al.*, 1990; Janick *et al.*, 1989; Takahata *et al.*, 1993) และพัฒนาระบบการหุ้มห่อ (encapsulate/seed coat) (Dainty *et al.*, 1986; Tay *et al.*, 1993) เพื่อให้เมล็ดดังกล่าวเหมือนกับเมล็ดพันธุ์พืชปกติ

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของหญ้าแฝก คงมีเพียงช่อดอกอ่อนเท่านั้น (Prasertsongskun, 2003) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตอบสนองที่จำเพาะของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนมีปัญหาอย่างไร นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการใช้ Di ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ ในบ้านเราเลย ขณะนี้ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีความก้าวหน้าในการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์/โปรโตพลาสต์ของพืชในสกุล *Garcinia* และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยเฉพาะปาล์มน้ำมันจากการใช้ Di พบว่า สามารถที่จะร่นระยะเวลาการชักนำแคลลัส (Te-chato *et al.*, 2002) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซัสเพนชั่น และป้องกันการกลายพันธุ์ โดยการดัดแปลงสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เพาะเลี้ยง (Te-chato, 1998) ตลอดจนการให้สภาพเครียดที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการงอกของต้นอ่อนที่ได้ วิธีการและขั้นตอนดังกล่าวเป็นประโยชน์มาต่อการวิจัยเพื่อผลิตเมล็ดเทียมในหญ้าแฝก

วัสดุ อุปกรณ์

<u>วัสดุพืช</u>

ใช้หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 เป็นตัวอย่างพืชในการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ นำใบอ่อนหญ้าแฝกมาชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซัสเพนชั่นและเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอจำนวนมาก

<u>วัสดุสารเคมี</u>

1. สารเคมีที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร MS
2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D, BA, 2-iP) ผงวุ้นแอลจีเนท
3. สารอินทรีย์ประกอบเชิงซ้อน อะดินินซัลเฟต

<u>อุปกรณ์</u>

อุปกรณ์การตัด ย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด

ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องเขย่าเลี้ยง ไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การชักนำแคลลัสเริ่มต้นจากชิ้นส่วนใบอ่อน

ในกิจกรรมดังกล่าวจะได้ทดลองในหญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 โดยศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เพื่อส่งเสริมกระบวนการสร้างแคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส นอกกจากนี้ศึกษาและระยะพัฒนาการทางสรีรวิทยาของต้นแม่ที่จะใช้เป็นแหล่งใบอ่อนมาเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง จากปัจจัยทั้งหมดข้างต้นจะได้ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพื่อศึกษาในปีที่ 2 ต่อไป นอกจากนี้จะได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณและดูแลรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตให้น้อยที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงการกลายพันธุ์ที่อาจเกิดขึ้น

2 การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และทำเมล็ดเทียม

เป็นการศึกษาต่อเนื่องจาก 1 เมื่อได้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแล้ว การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพคือการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เรียกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น ในขั้นต้นอาจต้องมีการทดสอบเบื้องต้นถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตว่าที่ใช้ในตอนต้นนั้นมีประสิทธิภาพดีหรือเปล่า จากนั้นก็จะได้ศึกษาการ synchronise ซึ่งเป็นการคัดแยกขนาดของเซลล์ในซัสเพนชั่นด้วยวิธีการกรองด้วยกระชอนสเตนเลส หรือไนลอนเมช ขนาดช่องต่าง ๆ กัน นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วต่าง ๆ และสภาพแวดล้อมต่าง ๆ กัน เพื่อดูการพัฒนาของเซลล์/กลุ่มเซลล์ต้นอ่อน แล้วทำการเพลทเซลล์หรือต้นอ่อนในอาหารส่งเสริมการงอก ซึ่งโดยทั่วไปเป็นสูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในอันที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะได้มีการดัดแปลงสภาพแวดล้อมในการชักนำการงอก/ยับยั้งการงอก เช่นการทำ dehydration/desiccation การให้อุณหภูมิต่ำ ตลอดจนการให้สภาพเครียดออสโมติค หรือสารอาหาร ตลอดจนสารชะลอ/ยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น กรดแอบซิซิค (ABA), มาลิคไฮดราไซด์ (MH) เป็นต้น เพื่อทำให้งอกได้เร็วหรือชะลอการงอก (พักตัวเหมือนเมล็ดพันธุ์ปกติ) อย่างมีประสิทธิภาพ กิจกรรมสุดท้ายในปีนี้เป็นการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารที่จะใช้เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม (เช่นโซเดียมอัลจีเนท ไคโตแซน เป็นต้น) เพียงชั้นเดียวหรือสองชั้นมาหุ้มต้นอ่อนในระยะสุดท้ายที่พร้อมจะงอก (ทอร์ปิโด) รวมทั้งการการดัดแปลงสภาพแวดล้อมข้างต้นที่ศึกษา (การ dehydration/desiccation ฯลฯ) และการเติมสารควบคุมการงอก (ABA, MH) ลงในส่วนผสมของเมล็ดเทียมเพื่อวัตถุประสงค์ที่จำเพาะด้วย นอกจากนี้อาจพัฒนาออกแบบเครื่องมือที่ใช้ผลิตเมล็ดเทียมในระดับห้องปฏิบัติการ

3 การผลิตเมล็ดเทียมจากต้นอ่อนที่เพิ่มปริมาณอย่างต่อเนื่องในถังหมัก

ในปีนี้จะนำผลสำเร็จที่ได้จาก 2 ซึ่งเป็นการผลิตเมล็ดเทียมในระดับห้องปฏิบัติการมาประยุกต์สู่ระดับเชิงการค้า ซึ่งกิจกรรมส่วนใหญ่เป็นการติดตั้งและการใช้งานถังหมัก การหาปริมาณเอ็มบริโอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงในถังหมัก การเก็บรวบรวมต้นอ่อนในระที่

สมบูรณ์มาเพื่อผลิตเมล็ดหญ้าแฝกเทียมอย่างต่อเนื่อง ศึกษาการงอกและดัดแปลงส่วนผสมของเปลือกหุ้มเมล็ดให้เหมาะสมต่อการงอก

4 สถิติที่ใช้ในการศึกษา

ทุกการศึกษาข้างต้นวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยเปรียบเทียบจากเปอร์เซ็นต์ของพัฒนาการ หรือใช้แผนการทดลองที่ง่ายที่สุด คือสุ่มตลอด (completely randomize design, CRD) ในแต่ละการศึกษาจะได้ศึกษาปัจจัยแต่ละปัจจัยแยกกัน เพราะมีความเป็นอิสระแก่กัน ไม่มีความสัมพันธ์กัน

ผลการศึกษา

1. การชักนำแคลลัส/เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อน

1.1 <u>ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต</u>

จาการทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปออกซิน 3 ชนิดคือ ไดแคมบา 2,4-D และ ปิคลอแรมต่อการสร้างแคลลัสเริ่มแรกพบว่าคงมีเพียง 2,4-D เท่านั้นที่ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้างแคคลัสคือ 3 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร (ตารางที่ 1) ไดแคมบาที่ทดสอบก็ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่ใช้ต่ำเกินไป (0.25-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หากใช้ความเข้มข้นสูงใกล้เคียง 2,4-D อาจส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการชักนำแคลลัสเริ่มต้น หรือเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหญ้าแฝกโดยใช้ไดแคมบามาก่อนเลย ดังนั้นไดแคมบาจึงเป็นออกซินที่ไม่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงหญ้าแฝก นอกจากนี้การเตรียมต้นกล้าในเรือนกระจกเพื่อปรับสภาพทางสรีรวิทยาของต้นแม่ก็ไม่มีผลต่อการชักนำแคลลัส การเลี้ยงทั้งใน 2 สภาพคือในเรือนกระจก และแปลงปลูกให้ผลการสร้างแคลลัสได้ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม 2,4-D ยังคงให้การสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด

ตารางที่ 1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากการชักนำจากใบอ่อนหญ้าแฝกในสูตรอาหาร MS เป็นเวลา 75 วัน

ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก/ล)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ขนาดแคลลัส (ซม)	พัฒนาการของแคลลัส
2,4-D	1	0	0	-
	2	0	0	-
	3	30.00	0.08±0.07	Slow growing
	4	66.67	1.53±0.007	Fast growing
	5	0	0	-
ปิคลอแรม	1	0	0	-
	2	0	0	-
	3	0	0	-
	4	0	0	-
	5	0	0	-
ไดแคมบา	0.1	0	0	-
	0.25	0	0	-
	0.5	0	0	-
	0.75	0	0	-
	1.00	0	0	-

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ชักนำการสร้างแคลลัสคือ ความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ทั้งสองความเข้มข้นให้แคลลัสที่มีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบอย่างเห็นได้ชัด แคลลัสที่พัฒนาในสูตรอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้แคลลัสที่โตช้า (slow growing callus) ในขณะที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรส่งเสริมการสร้างแคลลัสที่โตเร็ว (fast growing callus) (ตารางที่ 1) แคลลัสดังกล่าวสร้างในที่มืด เมื่อย้ายไปเลี้ยงในสภาพการให้แสงต่ออีกเป็นเวลา 30 วัน ชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 15% (ตารางที่ 2) การไม่สร้างแผลกับชิ้นส่วนใบส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีกว่าการไม่สร้างแผล อัตราการสร้างแคลลัสในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงสุด 66% แคลลัสที่ได้เป็นแบบโตเร็วในขณะที่ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้อัตราการสร้างแคลลัสรองลงมา (30%) แต่แคลลัสที่สร้างเป็นแบบโตช้า

อย่างไรก็ตามการสร้างแผลร่วมกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้นของ ต่ำ 1 และสูง 5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างแคลลัสแบบโตเร็วได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 พัฒนาการของแคลลัสจากการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน และที่สว่างเป็นเวลา 30 วัน)

พัฒนาการ	การตอบสนอง (%) (±SD)	ขนาด Embryogenic callus (มม)
Embryogenic callus	15.48±1.69	2.0±0
Fast growing	38.09±6.73	-
Slow growing	46.42±2.53	-

ตารางที่ 3 ผลของการสร้างแผลและความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสจากการชักนำจากใบอ่อนหญ้าแฝกบนอาหารสูตร MS เติมวุ้น phytagel 0.17% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มก/ล)	การสร้างแผล	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (±SD)	ขนาดของแคลลัส (ซม) (±SD)	พัฒนาการของแคลลัส
1	สร้าง	16.25±5.30	0.32±0	Fast growing
	ไม่สร้าง	0	0	-
2	สร้าง	0	0	-
	ไม่สร้าง	0	0	-
3	สร้าง	-	-	-
	ไม่สร้าง	30	0.08±0.07	Slow growing
4	สร้าง	-	-	-
	ไม่สร้าง	66.7	1.53±0.07	Fast growing
5	สร้าง	25.0±35.36	0.45±0.32	Fast growing
	ไม่สร้าง	0	0	-

- ไม่ได้ทำการทดลอง

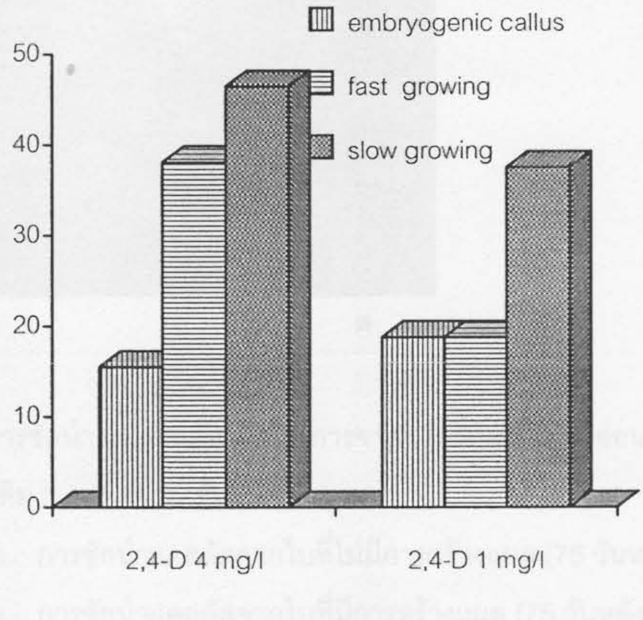
การดูแลหรือย้ายเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้อัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัสต่ำ พัฒนาการของแคลลัสเพื่อให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่ำเช่นเดียว

กัน การย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเหลือ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงขึ้นเป็น 18% ขนาดของแคลลัสกก็โตกว่าด้วย (ตารางที่ 4 รูปที่ 1) แคลลัสแบบต่างๆ ที่พัฒนาในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D แสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 4 พัฒนาการของแคลลัจากการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่สว่าง) เป็นเวลานาน 60 วัน

พัฒนาการ	เปอร์เซ็นต์ (±SD)	ขนาด Embryogenic callus (mm^2) (±SD)
Embryogenic callus	18.75±12.5	3.33±1.15
Fast growing	18.75±12.5	-
Slow growing	37.5±14.43	-

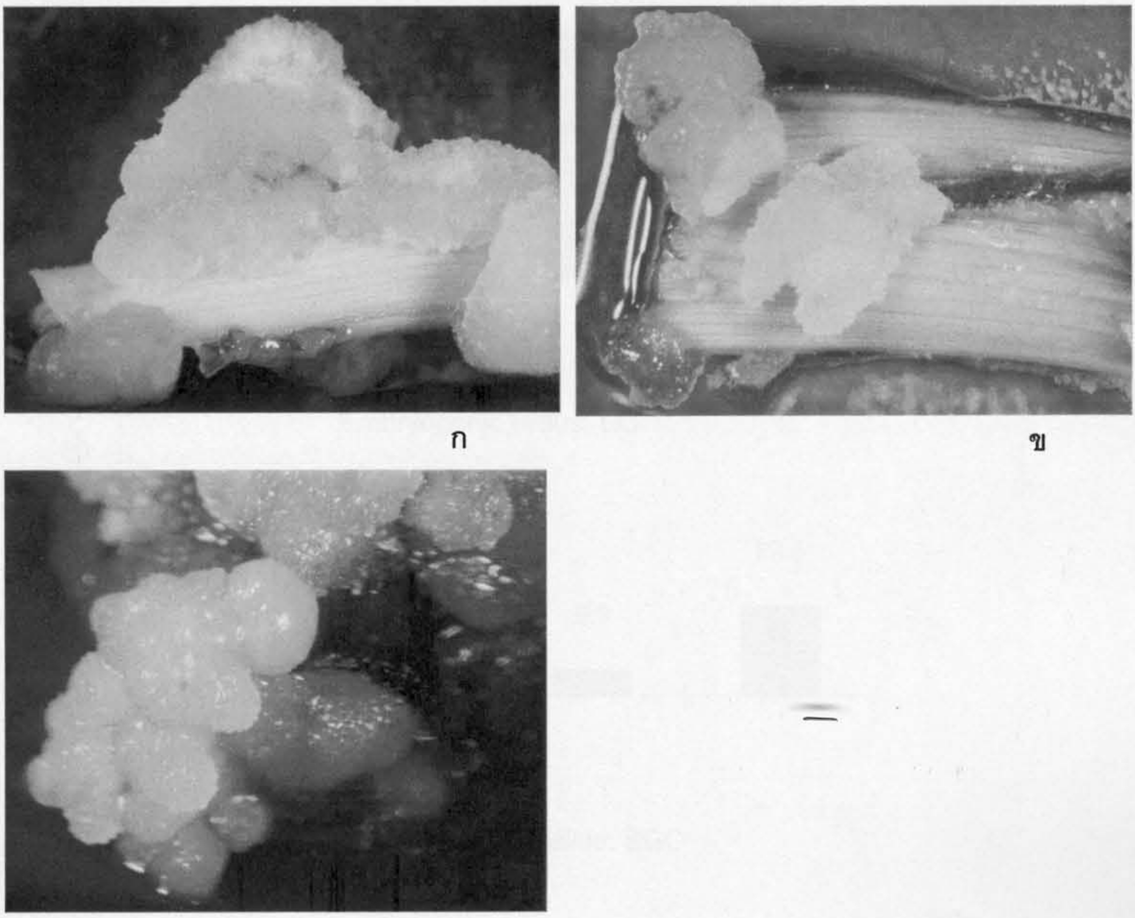
การสร้างแคลลัส (%)



รูปที่ 1 พัฒนาการของแคลลัส (%) ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร(ที่สว่าง) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 60 วันและในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน และที่สว่างเป็นเวลา 30 วัน

การใช้ไซโตไคนินเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับออกซินในระดับความเข้มข้นต่างๆ ส่งเสริม หรือช่วยเพิ่มการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคคลัสสูงขึ้นโดยเฉพาะ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ให้การสร้างสูงถึง 29.5% (รูปที่ 3) อย่างไรก็ตามการใช้ BA ร่วมด้วยส่งเสริมให้การแบ่งเซลล์เป็นไปอย่างรวดเร็ว แคลลัสมีขนาดใหญ่ แคลลัสบางส่วนมีโครงสร้างเป็นเส้นยาวคล้ายราก



รูปที่ 2 การชักนำแคลลัสและพัฒนาการจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนหญ้าแฝกในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ

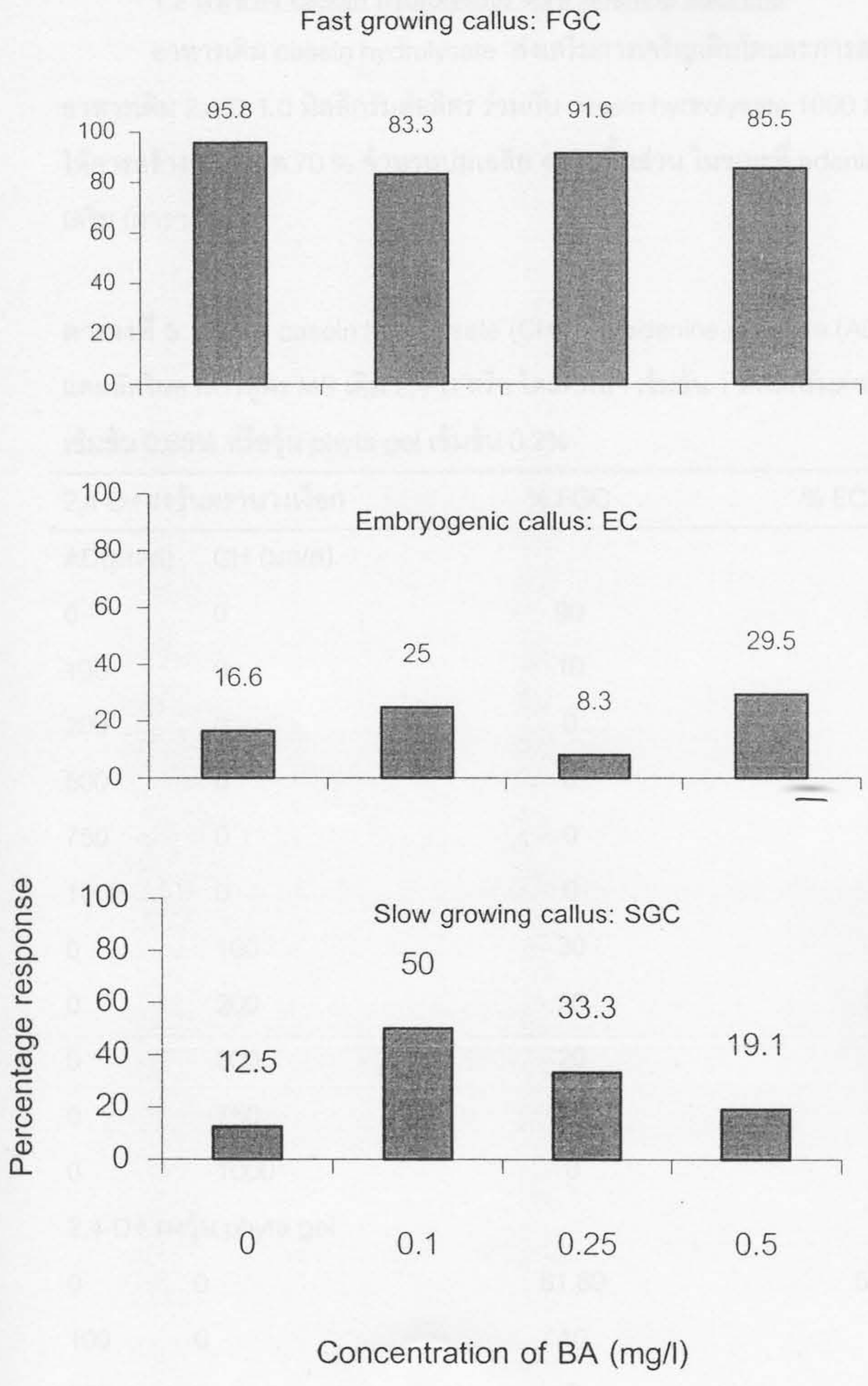
ก. การชักนำแคลลัสจากใบที่ไม่มีการสร้างแผล (75 วันหลังการเพาะเลี้ยง)

ข. การชักนำแคลลัสจากใบที่มีการสร้างแผล (75 วันหลังการเพาะเลี้ยง)

ค. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติคเอ็มบริโอ (30 วันหลังย้ายเลี้ยง)

FGC=fast growing caallus; SGC=slow growing callus;

EC=embryogenic callus



รูปที่ 3 ผลของ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างแคลลัสแบบต่างๆ ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

1.2 <u>ผลของ casein hydrolysate หรือ adenine sulphate</u>

อาหารเติม casein hydrolysate ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างปมในแคลลัส โดยอาหารเติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casein hydrolysate 1000 มก/ล ในวุ้น phytagel ให้การสร้างปมสูงสุด 70 % จำนวนปมเฉลี่ย 4 ปม/ชิ้นส่วน ในขณะที่ adenine sulphate ไม่ส่งเสริม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของ casein hydrolysate (CH) หรือ adenine sulphate (AD) ต่อพัฒนาการของแคลลัสในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D หรือ ไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้นตรานางเงือก เข้มข้น 0.65% หรือวุ้น phyta gel เข้มข้น 0.2%

2,4-D+ผงวุ้นตรานางเงือก		% FGC	% EC (nodule calli)
AD(มก/ล)	CH (มก/ล)		
0	0	90	30 (1.33)
100	0	10	0
200	0	0	0
500	0	0	0
750	0	0	0
1000	0	0	0
0	100	30	10 (1.0)
0	200	20	30 (1.33)
0	500	20	20 (1.0)
0	750	30	30 (1.0)
0	1000	0	10 (1.0)
2,4-D+ ผงวุ้น phyta gel			
0	0	81.89	55.56 (2.6)
100	0	10	50 (1.6)
200	0	0	10
500	0	0	0
750	0	0	0
1000	0	0	0

ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนปม หรือต้นอ่อนระยะรูปกลม

ตารางที่ 5 (ต่อ)

2,4-D+ ผงวุ้น phyta gel		% FGC	% EC (nodule calli)
AD(มก/ล)	CH (มก/ล)		
0	100	70	50 (2.0)
0	200	70	70 (2.71)
0	500	40	40 (3.5)
0	750	60	70 (2.14)
0	1000	80	70 (4.0)
ไดแคมบา + ผงวุ้นตรานางเงือก			
0	0	83.33	50 (1.67)
100	0	33.33	50 (1.33)
200	0	0	0
500	0	0	0
750	0	0	0
0	100	50	50 (1.33)
0	200	33.33	16.67 (4.0)
0	500	33.33	16.67 (2.0)
0	750	33.33	33.33 (2.5)
0	1000	50	33.33 (2.5)

ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนปม หรือต้นอ่อนระยะรูปกลม

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ไดแคมบา+ผงวุ้น phyta gel		% FGC	% EC (nodule calli)
AD (มก/ล)	CH (มก/ล)		
0	0	66.67	33.33 (2)
100	0	0	0
200	0	0	0
500	0	0	0
750	0	0	0
1000	0	0	0
0	100	33.33	33.33 (2.0)
0	200	100	66.67 (1.75)
0	500	16.67	16.67 (1.0)
0	750	33.33	20.0 (1.0)
0	1000	50	40 (1.5)

ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนปม หรือต้นอ่อนระยะรูปกลม

ดังนั้นสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัสหญ้าแฝก คือ สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 1000 มก/ล อย่างไรก็ตามต้นอ่อนที่พัฒนาจากสูตรอาหารที่ดัดแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโตข้างต้นไม่สามารถที่จะงอกเป็นต้นกล้าที่ปกติ คงมีเพียงการเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่องในอาหารเหลวที่ย้ายเลี้ยงเป็นช่วงเวลาที่แน่นอน จึงตั้งสมมติฐานว่าต้นอ่อนน่าจะมีการสร้างเอทธิลีนที่เป็นตัวยับยั้งการงอกดังนั้นในการศึกษาต่อไปเป็นการใช้สารที่มีกิจกรรมยับยั้งการสร้างเอทธิลีนเปรียบเทียบกับสารควบคุมและสารเติมที่เหมาะสมที่ผ่านมา

1.3 <u>ผลของ 2,4-D, AgNO3, 2-iP และ casein hydrolysate</u>

อาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate 500 มก/ล ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างปมในแคลลัส ให้การสร้างปมสูงสุด 67.5 % จำนวนปมเฉลี่ย 3.02 ปม/ชิ้นส่วนในขณะที่ $AgNO_3$ และ 2-iP ไม่ส่งเสริม แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ (ตารางที่ 6)

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 6 ผลของ 2,4-D, $AgNO_3$, isopentenyl adenine (2-iP) และ casein hydrolysate (CH) ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์

2,4-D	$AgNO_3$	2-iP มก/ล	CH	โนดูลาร์แคลลัส (%)	จำนวนปม/แคลลัส	อัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัส (%)
0	0	0	0	0	0	1.25
1	4	0.1	0	0	0	0
1	8	0.1	0	0	0	0
1	12	0.1	0	0	0	0
1	16	0.1	0	0	0	0
1	0	0	0	20.72	2.54	48.5
2	0	0	0	42.5	2.97	60
3	0	0	0	27.5	1.79	50
1	0	0	500	35	2.73	55
1	0	0	1000	30	1.67	47.5
2	0	0	500	47.5	3.45	70
2	0	0	1000	47.5	4.18	67.5
3	0	0	500	67.5	3.02	85
3	0	0	1000	27.5	2.12	70

1.4 **ผลของน้ำตาล**

เมื่อทำการย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 500 มก/ล และเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ sucrose, lactose, fructose, manitol และ sorbitol ความเข้มข้น เท่ากันคือ 3% พบว่า น้ำตาล lactose ให้อัตราการสร้างปมสูงสุด 45% และจำนวนปมเฉลี่ย 5.62 ปม/ชิ้นส่วน รองลงมาคือ sucrose ให้อัตราการสร้างปม 42.5% อย่างไรก็ตามอาหารเติม fructose ให้จำนวนปมเฉลี่ยสูงสุด 8 ปม/ชิ้นส่วน (ตารางที่ 7) จึงทำการศึกษาการเติมน้ำตาล 2 ชนิดร่วมกันคือ lactose ร่วมกับ sucrose โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1.5% และlactose เข้มข้น 2 หรือ 2.5% ร่วมกับ fructose เข้มข้น 1 หรือ 0.5% พบว่า การใช้ lactose ร่วมกับ sucrose ส่งเสริมการสร้างปมสูงสุด 65% และจำนวนปมเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 8.58 ปม/ชิ้นส่วน อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาล lactose ร่วมกับ fructose ให้จำนวนปมเฉลี่ยสูงกว่า (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 3% ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Carbon source	% of nodule calli	number of nodules/callus
Sucrose	42.50	2.41
Glucose	30.00	2.25
Lactose	45.00	5.62
Fructose	17.50	8.00
Manitol	25.00	1.70
Sorbitol	20.00	2.00

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลร่วมกันต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Carbon source	% of nodule calli	number of nodules/callus
1.5% Sucrose +1.5% Lactose	65.00	8.58
2% Lactose + 1% Fructose	52.50	11.49
2.5% Lactose + 0.5% Fructose	55.00	10.68

1.5 **ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัส**

เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเติมไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ คือ KN, BA และ 2-iP ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล พบว่า อาหารเติม BA 1 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 1 มก/ล ให้อัตราการสร้างปมสูงสุด 90.91 % จำนวนปมเฉลี่ยสูงสุด 2.71 ปม/ชิ้นส่วน (ตารางที่ 9) และเมื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ของแคลลัส โดยนำแคลลัสมา 0.3 กรัมละลายน้ำกลั่นปริมาตร 25 มล และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo พบว่า เซลล์ในระยะรูปกลม และระยะรูปหัวใจใกล้เคียงกันในอาหารเติม BA 1 หรือ 2 มก/ล (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 ผลของไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Cytokinin (mg/l)				Fast growing callus (%)	Nodular calli (%)	No of nodule	Rooted calli (%)	No of root
BA	KN	2-iP	TDZ					
1	-	-	-	41.48	90.91	2.71	0	0
2	-	-	-	25.00	75.00	1.83	0	0
-	1	-	-	87.50	2.50	1.00	5.00	1.00
-	2	-	-	33.34	0	0	2.50	0.50
-	-	1	-	95.00	20.00	1.36	7.50	(0.67)
-	-	2	-	35.00	12.50	1.00	0	0
-	-	-	1	60.00	12.50	2.00	15.00	1.33
-	-	-	2	78.82	14.24	1.25	23.96	1.30

ตารางที่ 10 จำนวนต้นอ่อนระยะรูปกลม และรูปหัวใจในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Cytokinin (mg/l)				The number of globular embryos/g.fr.wt.	The number of heart shape-embryos/g.fr.wt.
BA	KN	2-iP	TDZ		
1	-	-	-	34.5	25.6
2	-	-	-	42.0	25.8
-	1	-	-	0	0
-	2	-	-	0	0
-	-	1	-	10.0	10.0
-	-	2	-	10.0	10.0
-	-	-	1	12.0	10.0
-	-	-	2	10.0	0

และเมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก/ล เป็นเวลา 3 เดือน ทำการชั่งน้ำหนักสดเปรียบเทียบกัน พบว่า ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากัน คือ 0.415 กรัม/ชิ้นส่วน ดังนั้นจึงเลือกอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 มก/ล ในการย้ายเลี้ยงเพื่อชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น และเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และศึกษาพัฒนาการของเอ็มบริโอ ให้มีการงอกหรือพัฒนาเป็นต้นต่อไป เช่น อาจจะเพิ่มความเข้มข้นของ BA หรือปัจจัยอื่น ๆ เช่น การเติม ABA, PEG หรือ GA_3

2 การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และทำเมล็ดเทียม

2.1 <u>การชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลลซัสเพนชั่น</u>

ย้ายเอ็มบริโอแคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 มก/ล ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิตร ปริมาตร 35 มิลลิลิตร โดยใช้แคลลัสน้ำหนักสดเริ่มต้น 0.5 กรัม เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 500-1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ โดยการดูดเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2 <u>ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและการคัดแยกขนาด</u>

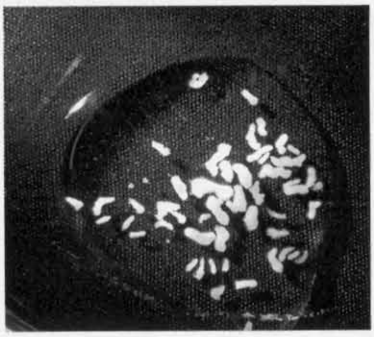
ในการศึกษานี้คัดแยกเซลล์ซัสเพนชั่นที่ผ่านการกรองด้วยตะแกรง 2 ขนาด แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 1000 มก/ล เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ จึงย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือน บันทึกพัฒนาการของเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า การกรองแยกขนาดของเซลล์โดยกรองขนาดใหญ่ มีแนวโน้มการพัฒนาของเซลล์ดีกว่าการใช้กรองขนาดเล็ก และการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ให้เซลล์พัฒนาในระยะรูปกลมสูงสุด 4.87% อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ให้ผลใกล้เคียงกัน (4%) และไม่พบการพัฒนาเป็นโครงสร้างของราก (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของขนาดของซัสเพนชั่นเซลล์เริ่มต้นต่อการเจริญและพัฒนาการในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์

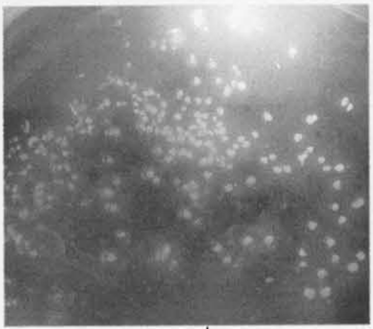
Time of culture & size of sieve	% of globular shape	% of heart-torpedo shape	% of rooted calli
1 week			
Small size	4.26	0	1
Large size	0.58	0	3
2 weeks			
Small size	2.82	0	3.36
Large size	4.87	0	2.02
3 weeks			
Small size	0.71	0	0
Large size	1.64	0	1.11
4 weeks			
Small size	0	0	0
Large size	4.00	0	0

ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น อย่างน้อย 4 สัปดาห์ อาจส่งเสริมให้เซลล์มีพัฒนาการที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้น และการกรองแยกขนาดของเซลล์ด้วยกรองขนาดใหญ่มีแนวโน้มในการพัฒนาของเซลล์ดีกว่า หรืออาจไม่ต้องมีการกรองแยกขนาดก็ได้ ซึ่งจากการสังเกตการย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเพิ่มปริมาณ (สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ casein hydrolysate เข้มข้น 1000 มก/ล) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการค่อนข้างดี อย่างไรก็ตามเซลล์ที่พัฒนาในขณะนี้อยู่ในระยะรูปกลม และพบบางเซลล์ที่คาดว่ามีการพัฒนาต่อในระยะหัวใจ (รูปที่ 4) เนื่องจากการเปลี่ยนรูปร่างค่อนข้างยาวขึ้น จึงทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่เป็นสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งประสบผลสำเร็จในการชักนำให้มีการงอกของเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามในหญ้าแฝก พบว่าต้นอ่อนไม่งอกหรือพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ แต่มีการพัฒนาเป็นรากแทน ดังนั้นในการศึกษาต่อไป อาจศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งเสริมพัฒนาการของต้นอ่อนในเซลล์ซัสเพนชั่นต่อไป เช่น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินบางชนิด เช่น BA หรือ TDZ การเติม ABA, PEG หรือ GA3

ซึ่งในขณะนี้กำลังศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 สัปดาห์) และศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (0, 1, 2, 3, 4 มก/ล) ร่วมกับ อาหารสูตรเพิ่มปริมาณ ต่อพัฒนาการของเซลล์ซัสเพนชั่น และเพื่อให้การผลิตเมล็ดเทียมประสบผลสำเร็จมีการงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ จึงได้มีการชักนำการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้ปลายยอดขนาด 3-5 มิลลิเมตรเป็นวัสดุพืชเริ่มต้นสำหรับการหุ้มห่อทำเมล็ดเทียม เสริมการใช้ต้นอ่อนที่ชักนำในเซลล์ซัสเพนชั่น



การกรองคัดแยกขนาดโซมาติคเอ็มบริโอ



เอ็มบริโอรูปกลมที่มีความสม่ำเสมอสูง

พัฒนาการเข้าสู่ระยะรูปหัวใจ

รูปที่ 4 การกรองคัดแยกเซลล์ซัสเพนชั่นเพื่อนำไปใช้ทำเมล็ดเทียมในระยะต่างๆ และส่งเสริมการงอกที่เหมาะสม

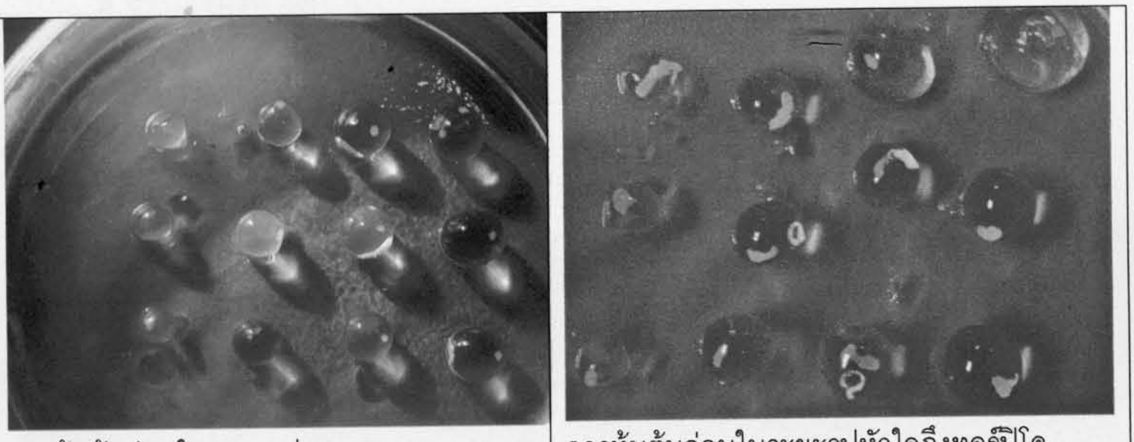
2.3 **<u>การทำเมล็ดเทียมหญ้าแฝก</u>**

โดยการนำโซมาติคเอ็มบริโอ และปลายยอดอ่อนหญ้าแฝกมาห่อหุ้มด้วยแอลจิเนทบีท วิธีการเตรียมโซมาติคเอ็มบริโอและยอดอ่อนมีดังนี้คือ นำแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นชนิดละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้มาหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตชนิดต่างๆ ในกรณีของปลายยอดอ่อนได้จากการตัดปลายยอดไปต้นอ่อนที่ชักนำได้ในหลอดทดลองไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำโซมาติคเอ็มบริโอ และปลายยอดมา embed ในวุ้น Wako ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน บันทึกผลการงอกในระดับห้องปฏิบัติการบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือในสภาพที่ไม่มีอาหาร พบว่า เมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอสูญเสียความสามารถในการงอก มีการพัฒนากลับมาเป็นแคลลัสใหม่ไม่ว่าจะเป็นการหุ้มต้นอ่อนในระยะใด (รูปที่ 5) ส่วนเมล็ดเทียมที่ได้จากการหุ้มยอดอ่อน (รูปที่ 6) นั้นสามารถงอกได้ 100%

หลังจากเพาะในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และพัฒนาให้ต้นกล้าที่แข็งแรงในเวลา 2 สัปดาห์ต่อมา (รูปที่ 7) และวุ้น Wako ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โซมาติกเอ็มบริโอจะมีการพัฒนาเป็นแคลลัสมากที่สุด (89.78 %) (ตารางที่ 12) และการ embed ที่มีลักษณะกลมเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นอื่นๆ ดังรูป

ตารางที่ 12 ผลของโซเดียมแอลจิเนตจากบริษัท Wako ความเข้มข้นต่างๆ ต่อพัฒนาการของต้นอ่อนที่หุ้มเป็นเมล็ดเทียม และลักษณะของบีดที่ได้จากการหุ้ม

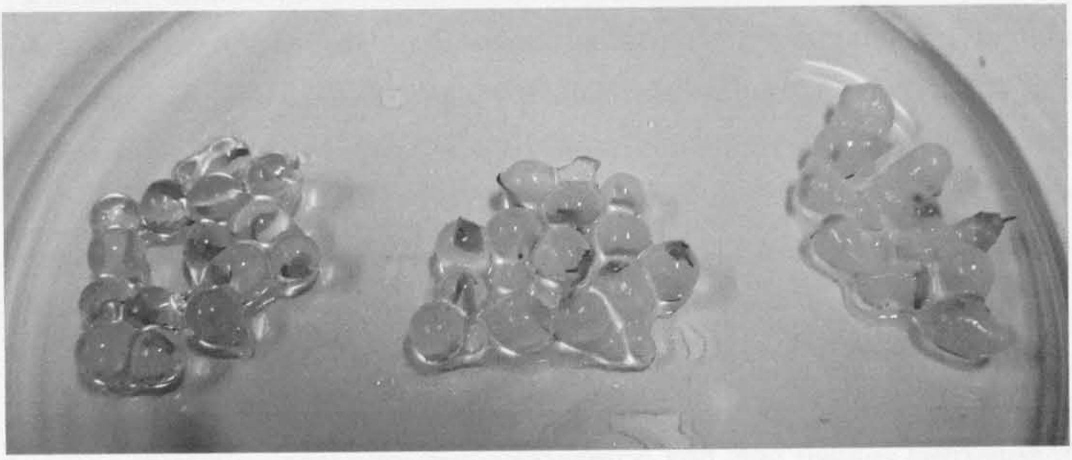
ความเข้มข้น (%)	การสร้างแคลลัส (%)	หมายเหตุ
1	52.65	วุ้นมีลักษณะเหลว
2	89.78	วุ้นมีลักษณะกลม
3	49.27	วุ้นกลม และเหนียวเล็กน้อย
4	43.74	วุ้นแข็ง และเหนียวมาก



การหุ้มต้นอ่อนในระยะรูปกลม

การหุ้มต้นอ่อนในระยะรูปหัวใจถึงทอร์ปิโด

รูปที่ 5 การหุ้มโซมาติคเอ็มบริโอในระยะต่างๆ ด้วยโซเดียมแอลจิเนทเข้มข้น 2%



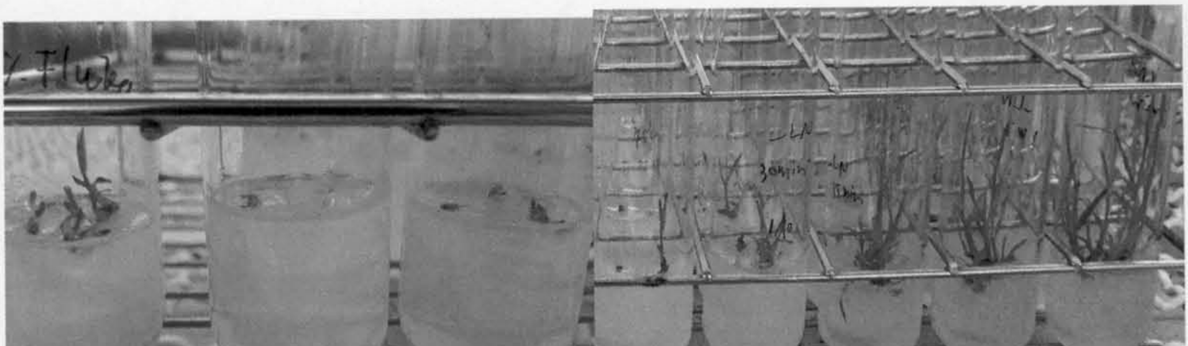
ก ข ค

รูปที่ 6 ลักษณะของเมล็ดเทียมจากการหุ้มปลายยอดขนาด 3-5 มิลลิเมตรด้วยโซเดียมแอลจิเนต (บริษัท Wako) ความเข้มข้นต่าง ๆ

ก ความเข้มข้น 2%

ข ความเข้มข้น 3%

ค ความเข้มข้น 4%



ก ข

รูปที่ 7 การเพาะเมล็ดเทียมในห้องปฏิบัติการบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ก) หลังจากเพาะเป็นเวลา 2 สัปดาห์

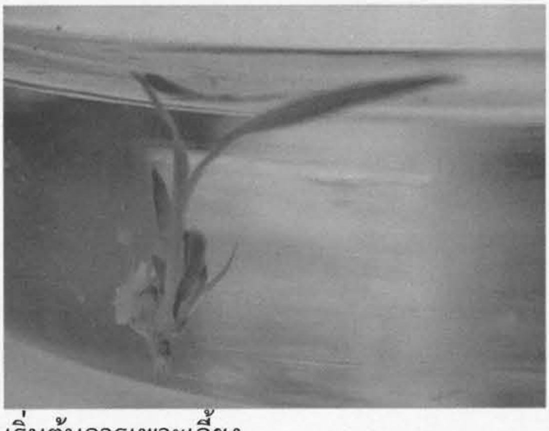
ข) หลังจากเพาะเป็นเวลา 4 สัปดาห์

แม้ว่าสามารถที่จะชักนำต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นจำนวนมากก็ตาม แต่เมื่อนำต้นอ่อนระยะต่าง ๆ มาหุ้มด้วยแอลจิเนตเพื่อผลิตเมล็ดเทียม พบว่า ไม่สามารถที่จะงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความซับซ้อนของการงอกที่ต้องการปัจจัยบางประการเช่น การลดความชื้น หรือน้ำตาลที่เกี่ยวกับสภาวะเครียดอันเนื่องมาจากแรงดันออสโมติค หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นอ่อนเอง ในขณะที่การใช้ปลายยอดให้ผลสำเร็จในอัตราสูงกว่าและให้อัตราการงอกหลังจากผลิตเป็นเมล็ดเทียมถึง 100% ดังนั้นการใช้ปลายยอดเป็นแหล่งวัสดุพืชเพื่อผลิตเมล็ดเทียมมีศักยภาพสูงมาก จึงได้พัฒนาวิธีการเพิ่มยอดจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นเพื่อนำปลายยอดมาทำเมล็ดเทียมต่อไป

2.4 การเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย

เป็นการประยุกต์การเพาะเลี้ยงในฟลาสค์ขนาด 250-500 มิลลิลิตร โดยในขั้นต้นเป็นการเติมอาหารให้หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์เพื่อส่งเสริมการเจริญและพัฒนายอดรวมอย่างต่อเนื่อง ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มยอดรวมเริ่มต้นขนาดเล็ก 3-5 มิลลเมตร ภายในมีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด 3-5 ยอด อาหารเหลวที่ใช้เริ่มแรก 30-35 มิลลิลิตร อาหารที่เติมให้ใหม่ 15-20 มิลลิลิตร ทุกช่วงเวลา 3-4 สัปดาห์เป็นเวลา 6 เดือน หลังจากเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 80-100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 เดือน ตรวจนับจำนวนยอดรวมที่พัฒนาในแต่ละช่วงเพื่อดูความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์จำนวนมากเชิงพาณิชย์

กลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมากสามารถที่จะพัฒนาให้ยอดขนาดเล็ก ๆ จำนวน 4-5 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (รูปที่ 8) ที่ฐานของยอดมีการพัฒนาเป็นกลุ่มตายอดขนาดเล็ก และหลุดออกมาจากกลุ่มยอดรวมเดิมและพัฒนาให้เป็นกลุ่มยอดรวมใหม่จำนวนมากนับร้อยหลังจากเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโดยไม่มีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 เดือน (รูปที่ 9) เพื่อลดปัญหาการย้ายเลี้ยงบ่อยครั้งและเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนยอดจึงได้ดัดแปลงการเพาะเลี้ยงเลียนแบบไบโอรีแอคเตอร์ ทำในฟลาสค์ขนาด 500 มิลลิลิตร มีการให้อาหารเป็นช่วงเวลา และดูดอาหารออกเมื่อครบเวลาการย้ายเลี้ยง (3-4 เดือน) จากนั้นจึงค่อยเติมอาหารใหม่โดยใช้ปั๊มไฟฟ้า สำหรับอัตราการเพิ่มปริมาณยอดรวมด้วยวิธีการนี้แสดงในตารางที่ 13 อุปกรณ์และเครื่องมือแสดงในรูปที่ 10



เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง

เพิ่มปริมาณ 4-5 เท่า ในเวลา 3 สัปดาห์

เพิ่มปริมาณโดยการแตกกอหรือยอดแขนงหลัง
จากเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

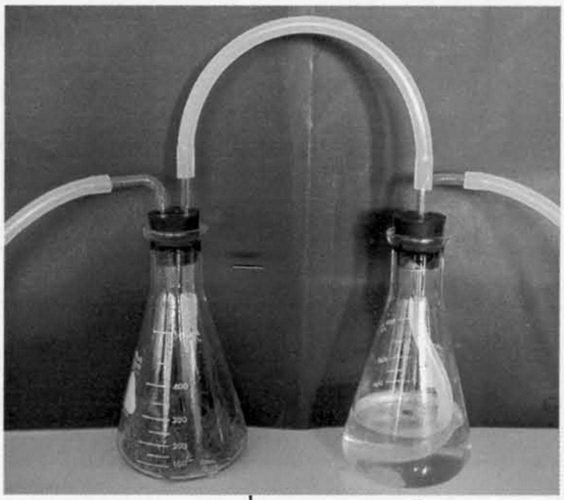
รูปที่ 8 การเพิ่มปริมาณของยอดรวมจำนวนมากในอาหารเหลวจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จากกลุ่มตายอดเพียงหนึ่ง ภายในเวลา 2 เดือน (8 สัปดาห์)

รูปที่ 9 การเพิ่มปริมาณยอดหญ้าแฝกจำนวนมากจากการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ batch culture เป็นเวลา 3-4 เดือน

ตารางที่ 13 อัตราการเพิ่มปริมาณยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างต่อเนื่องในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย

เวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	จำนวนกลุ่มตายอด	จำนวนยอด(รวม)	จำนวนยอดทั้งหมด
0	1	0	0
4	1	5	5
8	4	20	25
12	6	120	125
16	9	1,080	1,205
20-24	ไม่สามารถนับได้	1,200-1,500	1,500-1,700

กรเติมอาหารให้อย่างต่อเนื่อง 3-4 เดือน



ดูดอาหารเก่าออกเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่

รูปที่ 10 การออกแบบการเพาะเลี้ยงยอดหญ้าแฝกอย่างง่าย และต่อเนื่องโดยการลดขั้นตอนการย้ายเลี้ยง และเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างยอดจำนวนมาก