บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไม้ประดับสกุลหน้าวัวเป็นไม้ตัดดอกที่มีรูปร่างแปลกตา สีสันสวยงาม ออกดอกได้ตลอดทั้งปี ใบของหน้าวัวมีลักษณะแตกต่างกันหลายแบบ เช่น รูปหัวใจ รูปใบหอก รูปสามเหลี่ยม หรือใบประกอบแบบนิ้วมือ นิยมปลูกเลี้ยงเป็นทั้งไม้ตัดดอก และไม้กระถาง (วชิรพงศ์, 2545) หน้าวัวมี 2 ชนิด คือ *Anthurium andraeanum* และ *A. scherzerianum* ส่วนใหญ่หน้าวัวพันธุ์ตัดดอกจัดอยู่ในกลุ่ม *A. andraeanum* ซึ่งเป็นที่นิยมภายในประเทศ โดยเฉพาะพันธุ์ที่มีสีสด เช่น ทรอปิคอล แคนแคน และคาซิโน ส่วนพันธุ์ในกลุ่ม *A. scherzerianum* มีจานรองดอกสีแตกต่างกัน พันธุ์เหล่านี้ปลีงอ หรือเป็นเกลียว ปลูกเป็นไม้ตัดดอก และไม้กระถาง เช่น ซาโมรา ฟันนี่ และอารินอส แต่ไม่นิยมปลูกเลี้ยงในประเทศไทย เพราะต้องการความเย็นและความชื้นสูงกว่า *A. andraeanum* หน้าวัวนับว่าเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ และทำรายได้สูงเมื่อเทียบกับดอกไม้ชนิดอื่น ๆ ที่ปลูกในพื้นที่ที่เท่ากัน คือ 140,000 บาท/ไร่/ปี รองลงมาคือ เบญจมาศ 72,924 บาท/ไร่/ปี จำหน่ายประมาณดอกละ 5-10 บาท (นิรนาม, 2547) ทั้งนี้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 7 ได้มีการส่งเสริมให้ปลูกไม้ประดับสกุลหน้าวัวเป็นไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออก (สุรวิช, 2541) เพราะไม้ประดับสกุลหน้าวัวที่ใช้ตัดดอกกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดโลก โดยเฉพาะตลาดใหญ่ในเอเชีย เช่นประเทศญี่ปุ่น มีความต้องการนำเข้าดอกหน้าวัวจากประเทศไทยในปริมาณมาก พันธุ์ที่นิยม ได้แก่ พันธุ์ ซิมบา สุลต่าน และ แองเจิล ซึ่งเน้นสีอ่อน เช่นสีเขียว สีชมพูเป็นส่วนใหญ่ ในจำนวนนี้พันธุ์ สุลต่าน นับว่าเป็นพันธุ์ที่น่าสนใจมากที่สุด เนื่องจากดอกมีลักษณะเป็นแบบโอบาเกะ จานรองดอกรูปหัวใจขนาดใหญ่ สีชมพูอ่อนขอบทางด้านโคนบริเวณหูจานรองดอกมีสีเขียว ร่องน้ำตาตื้น ปลีสีแดง ปลายสุดและช่วงโคนมีสีเขียวชี้ตั้งขึ้น ราคาต่อดอกสูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ใช่โอบาเกะ แต่การผลิตภายในประเทศในขณะนี้ยังมีไม่เพียงพอ ดังนั้นการผลิตไม้ดอกในสกุลนี้นับเป็นธุรกิจที่น่าสนใจ

การผลิตดอกหน้าวัวในประเทศไทยยังประสบปัญหาการลงทุนสูง และปัญหาเรื่องต้นพันธุ์ ซึ่งต้นพันธุ์ที่ขยายพันธุ์โดยทั่วไปใช้การเพาะเมล็ด ตัดยอด แยกหน่อ และตัดต้นชำ วิธีเหล่านี้จะใช้เวลานาน ได้ต้นพันธุ์น้อย โดยเฉพาะจากการเพาะเมล็ด นอกจากใช้เวลานานแล้ว

พันธุ์ที่ได้อาจไม่ตรงตามสายพันธุ์ และต้นที่ได้มีราคาแพงไม่เหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณเพื่อการค้า ดังนั้นการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงน้อย ทำให้ต้นพืชที่ได้มีลักษณะเหมือนเดิมและปลอดโรค ต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวในระยะแรกจะใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่าวิธีขยายพันธุ์โดยทั่วไปประมาณ 12-13 เดือน (Kuehnle and Sugii, 1992) แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวในระยะแรกนี้ส่วนใหญ่เป็นการพัฒนาโดยกระบวนการออแกโนเจนนิซิสทำให้ได้จำนวนต้นพันธุ์ที่น้อย ไม่สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ทันต่อความต้องการ ต่อมาจึงมีการพัฒนาการชักนำต้นอ่อน (somatic embryo) ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนนิซิสซึ่งวิธีนี้จะสามารถร่นระยะเวลาได้ประมาณ 3-4 เดือน เนื่องจากเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเป็นแคลลัสที่มีการเจริญทั้ง 2 ทาง คล้ายการงอกของเมล็ด คือมีการพัฒนาของยอดและรากพร้อมกัน โดยมีโปรแคมเบียมเชื่อมถึงกัน (Geier 1982b; Kuehnle and Sugii, 1992) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงสามารถนำไปผลิตเป็นเมล็ดเทียมทำให้ขนส่งได้สะดวกขึ้น มีการรายงานการชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสของหน้าวัวได้เป็นครั้งแรกโดย Kuehnle และ Sugii (1991) ในอาหารเติมฮอร์โมน BA (N^6-benzyladenine) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) จากนั้นก็ได้มีการพัฒนาต่อมาโดยมีการใช้ฮอร์โมนในกลุ่มต่าง ๆ เช่น 2,4-D ร่วมกับ Kinetin (Kuehnle and Sugii, 1992; Hamidah *et al*., 1997) และการใช้ TDZ (thidiazuron) ร่วมกับ BA (ธัญญาพร, 2547) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ (Hsia and Korban, 1996) สับปะรด (Sripaoraya *et al*., 2003) พลูนางฟ้า (Zhang *et al*., 2005) และ *Iris hollandica* (Fidalgo *et al*., 2005) เป็นต้น

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในหน้าวัวเพื่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตลอดจนการตรวจสอบความผิดปกติทางสัณฐานและชีวเคมีของต้นหน้าวัวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การตรวจเอกสาร

หน้าวัว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *A. andraeanum* Linn. และ *A. scherzerianum* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบอเมริกาใต้ มีความทนทานต่อสภาพอากาศที่ร้อนชื้นในประเทศไทยได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศ นิยมปลูกเลี้ยงเป็นไม้ตัดดอก และไม้กระถาง ทั้งนี้ขึ้นกับลักษณะของแต่ละสายพันธุ์ นอกจากความสวยงามของดอก และใบแล้ว ยังมีความ

คงทน มีอายุการปักแจกันได้หลายวัน แต่ในปัจจุบันยังประสบปัญหาเรื่องต้นพันธุ์ ดังนั้นการปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคการผลิต และการขยายพันธุ์หน้าวัวในตลาดจึงมีความสำคัญต่อการขยายตัวของตลาดต่อไปในอนาคต

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวมีการรายงานเป็นครั้งแรกโดย Pierik และคณะ (1974) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงคัพภะ และชิ้นส่วนใบอ่อน พบว่าการใช้ใบอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นจะให้ปริมาณแคลลัสได้ดี โดยเนื้อเยื่อบริเวณเส้นกลางใบสร้างแคลลัสได้ดีกว่าเนื้อเยื่อบริเวณขอบใบ ต่อมา Pierik และคณะ (1979) รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะ และชิ้นส่วนต่างๆ คือ ใบอ่อน ก้านใบ จานรองดอก และก้านช่อดอก พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) โดยใช้ธาตุอาหารหลักที่มีความเข้มข้นเพียงครึ่งเดียว และเติม BAP [6-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine] ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 12 – 16 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดี และจากการศึกษาของสมปอง และคณะ (2545) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบ ใบ จานรองดอก และปลีดอก ของหน้าวัวพันธุ์ทรอปฟิกานา บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MMS (modified Murashige and Skoog) เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตรเท่ากัน สามารถชักนำแคลลัสเฉลี่ยในทุกชิ้นส่วนได้ดีที่สุด โดยชิ้นส่วนก้านใบสามารถสร้างแคลลัสได้สูงสุด 82% รองลงมาคือชิ้นส่วนของแผ่นใบ (57%) ปลีดอก (55%) และจานรองดอก (18%) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวในระยะแรกเป็นการชักนำกระบวนการออแกโนเจนนิซีส เกิดเป็นแคลลัสที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (meristemoid structure) มีโครงสร้างแน่นทึบ (compact callus) (สมปอง, 2539) ซึ่งกระบวนการนี้ใช้ระยะเวลาในการขยายพันธุ์นาน จึงมีการพัฒนาการชักนำต้นอ่อน (somatic embryo) ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนนิซิส เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ซึ่งเป็นแคลลัสที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด และราก สามารถเพิ่มปริมาณได้มากสามารถร่นระยะเวลาในการขยายพันธุ์ลงได้ (Kuehnle *et al*., 1992)

2. การชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

เอ็มบริโอเจนนิซิสเป็นกระบวนการพัฒนาของต้นอ่อนจากชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงในลักษณะเดียวกับการพัฒนาต้นอ่อนภายในเมล็ด ดังนั้นพัฒนาการในรูปแบบนี้จึงมีทั้งราก และยอดเกิดขึ้น

พร้อมกันเรียกเอ็มบริออยด์ หรือโซมาติกเอ็มบริโอ แคลลัสดังกล่าวมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง ภายในเซลล์ประกอบด้วยนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมมีความเข้มข้นสูง มีเม็ดแป้งจำนวนมาก และมีแวคิวโอลขนาดเล็ก (Cheema, 1989) สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมักมีการดัดแปลง เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน [NAA (α-naphthaleneacetic acid), 2,4-D และ IBA (indole-3-butyric acid)] และไซโตไคนิน (BA, TDZ และ kinetin) ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อให้เหมาะสมต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เนื้อเยื่อเจริญของชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เนื่องจากได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินซึ่งจะใช้ 2,4-D เป็นส่วนใหญ่เช่น ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซิสของไม้ดอกในสกุลคาร์เนชั่น คือ *Dianthus caryophyllus, D. barbatus* และ *D. chinensis* มีการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (Pareek and Kothari, 2003) ส่วนซัสเพนชั่นจากใบอ่อนของต้นกล้าสะเดาเทียมใช้ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการใช้ไคนิติน ความเข้มข้น 0.22 มิลลิกรัม/ลิตร ในการชักนำเอ็มบริโอ-เจนนิคแคลลัส (Te-chato and Rungnoi, 2000)

การชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในหน้าวัว *A. andraeanum* ได้มีการรายงานเป็นครั้งแรกโดย Kuehnle และ Sugii (1991) บนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D การเกิดเอ็มบริโอเจนนิซิส และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของหน้าวัวใช้ระยะเวลาเพียง 3-4 เดือน (Kuehnle *et al.*, 1992) ในระยะแรกของการชักนำเอ็มบริโอเจนนิซิสจะเกิดได้เร็วถ้าใช้ออกซินที่มีความเข้มข้นสูง แต่หลังจากชักนำแล้วควรลดความเข้มข้นให้ต่ำลง หรือไม่ใช้เลย ต่อมาได้มีรายงานการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ ที่มีผลในการส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส เช่น IBA (Hamidah *et al*., 1997) และ TDZ (ธัญญาพร, 2547) เป็นต้น ชนิดของไซโตไคนินที่ใช้ร่วมกับแคลลัสก็มีผลต่อความสามารถในการชักนำหรือการเพิ่มปริมาณแคลลัส และลักษณะทางสัณฐานของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้ (Bhansali *et al*., 1990) Hamidah และคณะ (1997) พบว่าการใช้ BA ร่วมกับการใช้ NAA ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอของหน้าวัวมากกว่าการใช้ NAA เพียงอย่างเดียว สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมักมีบทบาทที่เด่นชัดกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินโดยเฉพาะ 2,4-D มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการสร้างแคลลัส การแบ่งเซลล์ และการชักนำต้นอ่อน เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่ถ้าใช้ในระดับความเข้มข้นมากเกินไปจะส่งผลยับยั้งพัฒนาการของเอ็มบริโอบางชนิดเช่น carob (*Ceratonia siliqua* L.) (Carini *et al*., 1997) และ มะม่วงหิมพานต์ (Ananthakrishnan *et al*., 1998) ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ เช่น GA_3 (gibberellic acid) ความเข้มข้นต่ำช่วยเพิ่มปริมาณแคลลัส หากความเข้มข้นสูงเกิดอาการสีน้ำตาล (browning) ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ และไม่ส่งเสริมการพัฒนาของคัพภะ การใช้ NAA ความเข้มข้นต่ำมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส แต่ที่

ความเข้มข้นสูงจะส่งเสริมการสร้างแคลลัสและราก ส่วน BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ช่วยเพิ่มปริมาณแคลลัส และส่งเสริมความยืดยาวของลำต้นและราก การใช้ BAP ที่ความเข้มข้นสูงชักนำแคลลัสได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ แต่หากความเข้มข้นสูงมากเกินไปทำให้การเพิ่มปริมาณของแคลลัสช้า เกิดอาการสีน้ำตาล และไม่มีการสร้างราก (Ananthakrishnan *et al*., 1998)

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของหน้าวัวมีการดัดแปลงกันอย่างแพร่หลาย ขึ้นอยู่กับระยะพัฒนาการของเนื้อเยื่อ เนื่องจากแต่ละระยะต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน เช่น การพัฒนาเป็นแคลลัส พืชต้องการธาตุอาหารที่เพียงพอ โดยเฉพาะธาตุอาหารในรูปของแอมโม - เนียมอิออน และไนเตรทอิออน ซึ่งเนื้อเยื่อของพืชต้องการใช้ในการชักนำแคลลัส และการเจริญเติบโตของแคลลัส (Sinha and Mallick, 1991; Yan-Xiu *et al*., 1993) ส่วนการลดไนโตรเจน และการเพิ่มโพแทสเซียม ส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนนิซิส นอกจากนี้ความเข้มข้นของเกลือยังช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอด้วยเช่นกัน Hamidah และคณะ (1997) ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอหน้าวัว *A. scherzerianum* บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยลดธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง ยกเว้นแอมโมเนียมไนเตรท ลดเหลือ 2.5 mM เติม thiamine-HCl 1.18 µM myo-inositol 0.55 µM $Na_2FeEDTA$ 0.05 µM เติมน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ วุ้น Gelrite 0.18 เปอร์เซ็นต์ ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 18 µM พบว่าสามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบได้ 51 เปอร์เซ็นต์ Kuehnle และคณะ (1992) รายงานการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของหน้าวัว *A. andraeanum* บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง เติม myo-inositol 100 มิลลิกรัม/ลิตร $Na_2FeEDTA$ 25 มิลลิกรัม/ลิตร และ thiamine-HCl 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ วุ้น Gelrite 0.18 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนนิซิสได้ 47.7 % ส่วน Teng (1997) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัว *A. andraeanum* ในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง โดยเติม thiamine-HCl 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร pyridoxine-HCl 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร nicotinic acid 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร $Na_2FeEDTA$ 20 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เติมน้ำตาลซูโครส 0.7 เปอร์เซ็นต์ วุ้น Bacto agar 0.7 เปอร์เซ็นต์ ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมด้วย BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า ชิ้นส่วนสามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้ 185 ยอด

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส เช่น แหล่งของชิ้นส่วนพืช ชนิดของวุ้น และแหล่งคาร์โบไฮเดรตจำพวกน้ำตาลเป็นต้น จากการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนพืชที่ยังอ่อน มีความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว สามารถชักนำให้เกิด

เอ็มบริโอเจนนิซิสได้ง่าย เช่น รายงานของ Orunstrup และคณะ (1993) พบว่าการใช้ชิ้นส่วนคัพภะ ใบเลี้ยง ใบอ่อน ช่อดอกอ่อน และก้านดอก ของหญ้าเหลี่ยม (*Exacum affine*) สามารถชักนำเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ ส่วน Robacker (1993) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อน และชิ้นส่วนก้านใบของอุ่น พบว่าชิ้นส่วนของก้านใบสามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนของแผ่นใบ

ชนิดของวุ้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอ วุ้นเป็นสารที่ทำให้สารละลายแข็งตัว (gelling agent) สกัดได้จากสาหร่ายทะเล หรือเชื้อแบคทีเรีย จัดเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง หรือเป็นสารโพลีเมอร์สังเคราะห์ (มาลี, 2532) มีความสามารถในการแข็งตัวได้แม้ใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ (ประสาทพร, 2541) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้มีการนำวุ้นมาใช้เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงสามารถแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดี วุ้นที่นิยมใช้ คือ Agar-Agar, Phytagel, Agarose และ Bacto agar เป็นต้น วุ้นแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ทำให้มีความบริสุทธิ์ต่างกัน การนำไปใช้จึงต่างกัน เช่น Agarose เป็นวุ้นที่มีความบริสุทธิ์สูงสุด ผลิตจากสาหร่ายทะเลสกุล *Gracilaria* sp. เพียงสกุลเดียวจึงไม่เป็นพิษต่อพืช (Nairn *et al*., 1995) นิยมใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เป็นวุ้นที่มีราคาแพง (คำนูณ, 2539) ส่วน Phytagel นั้นเป็นวุ้นที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas elodea* มีลักษณะใส มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง (Bonga and Aderkas, 1992) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี เพราะพืชสามารถดูดน้ำ และธาตุอาหารได้อย่างเต็มที่ (Gabriela *et al*., 2001; Chaven *et al*., 1996; Saito and Suzuki, 1999; Cherreau *et al*., 1997) Bacto agar เป็นวุ้นที่มีองค์ประกอบของโซเดียม และทองแดงสูง เป็นพิษต่อพืช และยังไปดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินไว้ทำให้พืชไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง หรือมีลักษณะแคระแกร็นให้จำนวนยอดน้อย (Bonga and Aderkas, 1992; Ananad *et al*., 1999) สำหรับวุ้น Agar-Agar เป็นวุ้นที่ผลิตจากสาหร่ายทะเล 3 สกุล คือ *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp. และ *Pterocladia* sp. มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำ เป็นพิษส่งผลให้พืชมีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำ (Nairn *et al*., 1995) แต่เนื่องจากเป็นวุ้นที่มีราคาค่อนข้างต่ำ และหาซื้อได้ง่ายจึงทำให้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในทางการค้า (ราตรี และสมปอง, 2548) สำหรับการศึกษาชนิดของวุ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัว (*A. andraeanum*) นั้น จากการรายงานของ Kuehnle และคณะ (1992) พบว่าการใช้ Gelrite ความเข้มข้น 0.18 % ช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ Bacto agar ความเข้มข้น 0.7 % ราตรี และสมปอง (2548) เปรียบเทียบการใช้วุ้น Agar-Agar กับ Gelrite พบว่า Gelrite มีผลให้ยอดรวมเจริญเติบโตดี แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานพบว่าไม่มีความแตกต่างกันมาก ในทางการค้าจึงควรใช้ Agar-Agar เนื่องจากต้นทุนถูก และหาซื้อง่าย นอกจากนี้ยังมี

การศึกษาการใช้วุ้นในพืชหลายชนิด เช่น การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในมะม่วง (DeWald *et al*., 1989) พบว่าการใช้ Gelrite ส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ดี ส่วนการศึกษาในทานตะวัน พบว่า Agar-Agar และ Agarose ส่งเสริมการสร้างยอดรวมดีกว่าการใช้ Phytagel (Berrios *et al*., 1999) และจากการศึกษาการใช้ Bacto agar และ Gelrite ใน *Fraxinus angustifolia* พบว่า ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารเติม Gelrite นั้น สร้างยอดมากกว่าการใช้ Bacto agar เป็นสองเท่า (Tonon *et al*., 2001) จากรายงานข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าวุ้นแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน มีประสิทธิภาพที่ต่างกันในพืชแต่ละชนิด ดังนั้นชนิดของวุ้นจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ควรมีการศึกษา และทดสอบประสิทธิภาพให้เหมาะสมก่อนการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3. การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสและเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

การชักนำแคลลัสให้เป็นต้นอ่อน และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่นั้น พืชจะต้องการธาตุอาหารที่ลดลง บางครั้งต้องเปลี่ยนรูปของธาตุอาหารที่ใช้ เช่น การเปลี่ยนรูปของแอมโมเนียมไนเตรทเป็นโพแทสเซียมไนเตรท นอกจากนี้ยังต้องมีการลดความเข้มข้นของออกซินลง หรืออาจไม่ใช้เลย แต่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน อย่างไรก็ตามการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินสามารถส่งเสริมการเกิดรากเพื่อให้พืชตั้งตัวได้ดีใน *A. andraeanum* มีการใช้ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (Malhotra *et al*., 1998) และจากรายงานของ Yu และ Peak (1995) ทำให้ทราบว่าการใช้ IBA มีส่วนส่งเสริมให้หน้าวัวตั้งตัวได้ดีกว่าการใช้ IAA และ NAA นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ Zeatin ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (Soczek and Hempel, 1989) และการเติมสารประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต เช่น น้ำมะพร้าว (Muralidharan *et al*., 1989) และอะดีนีนซัลเฟต (ราตรี และสมปอง, 2548; ธัญญาพร, 2547) ว่ามีผลส่งเสริมการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ในหน้าวัวอีกด้วย สำหรับพืชอื่น ๆ มีรายงานว่าการใช้สารดังกล่าวให้ผลในการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้เช่นเดียวกัน เช่น ยูคาลิปตัส (Muralidharan *et. al*., 1989) อะโวคาโด (Perán-Quesada *et al*., 2004) และมะม่วงหิมพานต์ (Ananthakrishnan *et al*., 1998) นอกจากนี้มีเอ็มบริโอของพืชหลายชนิดที่สามารถชักนำการงอกได้โดยไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น *Sequoia sempervirens* (Bourgkard and Favre, 1988) และ *Magnolia macrophylla* (Markle and Watson-Pauley, 1993) เป็นต้น วิธีการเหล่านี้สามารถนำมาปรับใช้เพื่อการพัฒนาให้เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในหน้าวัวสามารถงอกเป็นต้นกล้าได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

4. การตรวจสอบเอนไซม์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

การตรวจสอบพันธุ์พืชโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีการหนึ่งที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ต้องใช้ระยะเวลานานในการศึกษา และลักษณะดังกล่าวอาจแปรผันไปเนื่องจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างพันธุกรรมของพืชกับสภาพแวดล้อม เพื่อกำจัดปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการนำวิธีการทางชีวเคมีมาใช้ศึกษาชนิด ตำแหน่ง และรูปแบบของเอนไซม์ในพืช (เพิ่มพงษ์, 2531) ไอโซไซม์ (Isozyme) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นตัวเดียวกันจึงเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิต (Merkert and Moller, 1959) ไอโซไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ต่างกันเรียงตัวเป็นสายโพลีเปปไทด์ ลำดับกรดอะมิโนนี้แปรมาจากรหัสพันธุกรรมบนสายนิวคลีโอไทด์ จึงสามารถใช้การจำแนกรูปแบบเอนไซม์ในการศึกษาทางพันธุกรรม โดยไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ย่อมมีประจุไฟฟ้ารวม ขนาด และรูปร่างโมเลกุลไม่เหมือนกัน จึงอาศัยหลักการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในการแยกความแตกต่างของโมเลกุลในเอนไซม์ (วิไลวรรณ และอมรรัตน์, 2533) โดยชักนำการเคลื่อนที่ของเอนไซม์บนตัวกลาง เมื่อนำตัวกลางมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบเคมีที่จำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์จะเกิดแถบสีบนตัวกลาง เรียกไซโมแกรม (zymogram) (ธีระ และวัชรินทร์, 2543) ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันอาจมีรูปแบบโมเลกุลของเอนไซม์ และคุณสมบัติบางประการที่ต่างกัน โดยมีสาเหตุจากพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (มนตรี และคณะ, 2542) ความแตกต่างของโมเลกุลในเอนไซม์นี้เป็นอีกรูปแบบหนึ่งของการศึกษาทางพันธุกรรม ในพืชมีการใช้เทคนิคนี้เป็นดัชนีระบุความแปรผันทางพันธุกรรม สายพันธุ์ การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ และวินิจฉัยโรคพืชต่างๆ (พรรณี, 2543)

การประยุกต์ใช้ไอโซไซม์พบในงานทดลองหลายลักษณะ ดังรายงานของ ชินวัฒน์ และเกศิณี (2542) ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในการแยกไอโซไซม์เพื่อจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่ 19 พันธุ์ โดยใช้สีย้อม 2 ระบบคือ PER (peroxidase) และ ACP (acid phosphatase) จากการวิเคราะห์แผนภาพไซโมแกรมด้วยเอนไซม์ PER พบว่าสามารถจำแนกลิ้นจี่ออกได้ 14 กลุ่ม เมื่อนำกลุ่มเดียวกันไปแยกต่อด้วยเอนไซม์ ACP ทำให้สามารถจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่ออกจากกันได้ทั้งหมด ส่วน พสุ และพิมพ์ใจ (2548) ศึกษารูปแบบของไอโซไซม์เพื่อจำแนกพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน [*Paphiopedilum concolor* (LindI.) Pfitzer]โดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ คือ EST (esterase), GOT (glutamate oxaloacetate transaminase), LAP (leucine aminopeptidase) และ MDH (malate dehydrogenase) การใช้เทคนิคการตรวจสอบไอโซไซม์ด้านการปรับปรุงพันธุ์นั้น วิทยา (2541) ศึกษาระบบเอนไซม์ 5 ระบบ คือ PER, EST, MDH, ADH (alcohol dehydrogenase) และ PGI

(phosphoglucoisomerase) ที่เหมาะสมในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในมังคุด พบว่า ระบบเอนไซม์ PER ให้แถบเอนไซม์คมชัด แยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ส่วนธัญญาพร (2547) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในหน้าวัวโดยใช้เอนไซม์ 7 ระบบ คือ PER, EST, ACP, ADH, LDH (lactate dehydrogenase), MDH และ SKDH (shikimate dehydrogenase) พบว่าการใช้เอนไซม์ระบบ EST ให้การติดสี และการกระจายตัวของแถบเอนไซม์ดีที่สุด

5. การตรวจสอบโปรตีนในพืช

โปรตีนเป็นโมเลกุลที่ควบคุมหน้าที่การทำงานหลักต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งสามารถแสดงออกทางสัณฐาน เช่น ใบ ดอก ผล และลักษณะลำต้น เป็นต้น สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีรูปแบบของโปรตีนที่จำเพาะ โปรตีนของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับยีนที่ถอดรหัสออกมาในรูปของ mRNA และการแปรรหัสออกมาเป็นโปรตีน แต่ละระยะพัฒนาการของพืชมีการสร้างโปรตีนที่แตกต่างกัน ดังนั้นการตรวจสอบความแปรผันของโปรตีนจึงสามารถบอกพัฒนาการของพืช หรือแหล่งของชิ้นส่วนของพืชได้ และเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อยืนยันลักษณะทางสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างพันธุกรรมของพืชกับสิ่งแวดล้อม (เกศิณี, 2528) วิธีการที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนคือการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีประจุในสนามไฟฟ้าผ่านเจลซึ่งทำหน้าที่เป็น Molecular sieve การเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นกับขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน (อภิชาติ, ม.ป.ป.) การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ของ Laemmli (1970) เป็นวิธีการที่นิยมใช้ และมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยทำให้อยู่ในรูปของ Slab gel มีหลักการ คือ SDS ซึ่งเป็น Detergent ที่มีประจุเป็นลบจะไปเกาะกับโปรตีนทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ และยังทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยไปทำลาย non covalent interaction ในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้ macromolecule เกิด unfolding ของโครงสร้าง จากนั้น 2-Mercaptoethanol จะทำลาย disulfide linkage ทำให้โปรตีนถูกย่อยเป็นองค์ประกอบย่อย SDS จะไปเกาะกับโพลีเปปไทด์ ในอัตราส่วน 1 SDS: 2 amino acids ทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบมากขึ้น เมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าระยะทางของการเคลื่อนที่จึงเป็นสัดส่วนกับน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเปปไทด์ สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากการเทียบค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (วัฒนาลัย และสรวง, 2536)

วิธีการทำ SDS-PAGE มีการดัดแปลง และนำไปใช้กันอย่างหลากหลาย เช่น Kong-ngern และคณะ (2005) ใช้วิธี SDS-PAGE ในการตรวจสอบโปรตีนที่ต้นข้าวสร้างขึ้นในสภาวะเครียดเกลือ และตรวจสอบการสร้าง Waxy protein ในเมล็ดข้าว (Prathepha *et al*., 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้ SDS-PAGE ตรวจสอบโปรตีนสะสมในเอ็มบริโอแครอท (*Daucus carota* L.) (Dodeman *et al*., 1998) และเนื่องจากในสิ่งมีชีวิตนั้นมีรูปแบบของโปรตีนที่จำเพาะ จึงสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชิ้นส่วน สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสของหน้าวัว
2. เพื่อเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสให้ได้จำนวนมาก และชักนำเป็นพืชต้นใหม่
3 เพื่อศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ตลอดจนลักษณะผิดปกติ ทางเนื้อเยื่อวิทยา เอนไซม์ และโปรตีน