นิพนธ์ต้นฉบับ

อิทธิพลของอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของหน้าวัวพันธุ์สุลต่าน

เยาวพรรณ สนธิกุล [1] และ สมปอง เตชะโต [2]

Abstract

Sontikul, Y. and Te-chato, S.

Plantlet regeneration and somaclonal variation in Anthurium cv. Sultan through embryogenesis

Songklanakarin J. Sci. Technol., May 2007, 29(Suppl. 2) : 237-246

Calli of anthurium cv. Sultan were cultured on liquid or solid MMS (modified Murashige and Skoog) medium. The solid medium was supplemented with 1.0-4.0 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in combination with 0.5 and 1.0 mg/l kinetin or 0.5, 0.75 and 1.0 mg/l TDZ (thidiazuron) with 0.5 and 1.0 mg/l BA (N^6-benzyladenine) for 16 weeks. The result showed that a cluster of embryogenic callus (1.3-1.5 cm) was formed on medium with 2.0 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l kinetin (90%) and developed into shoot and shoot with root (83.3% and 100%, respectively). The solid medium with 1.0 mg/l TDZ and 1.0 mg/l BA gave 66.67% embryogenic callus formation after culturing for 12 months. Liquid medium supplemented with 3.0 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA gave the best fresh weight of embryogenic callus (3.33 g). Regenerants obtained from BA and TDZ containing solid medium produced abnormal lanceolate leaves. Isozyme markers revealed different pattern of esterase activity in normal and abnormal leaves.

Key words : embryogenic callus, anthurium, isozyme, sultan, abnormal leaf

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาพืชศาสตร์ [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: stechato@yahoo.com

รับต้นฉบับ 21 เมษายน 2549 รับลงตีพิมพ์ 7 พฤศจิกายน 2549

บทคัดย่อ

เยาวพรรณ สนธิกุล และ สมปอง เตชะโต

พัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่และความปรวนแปรทางพันธุกรรมในหน้าวัวพันธุ์สุลต่าน โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนนิซิส

ว. สงขลานครินทร์ วทท. พฤษภาคม 2550 29(ฉบับพิเศษ 2) : 237-246

นำแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์สลต่านมาชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารแข็ง หรืออาหารเหลวสูตร MMS (modified Murashige and Skoog) โดยอาหารแข็งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 1-4 มก./ลิตร ร่วมด้วย Kinetin ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ลิตร หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (thidiazuron) ความเข้มข้น 0.5, 0.75 และ 1.0 มก./ลิตร ร่วมด้วย BA (N^6-benzyladenine) ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ลิตร ร่วมด้วย Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาด 1.3-1.5 ซม ได้ดี (90%) และสามารถพัฒนาเป็นยอด และต้นที่มีรากได้ดี (83.3% และ 100% ตามลำดับ) ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร เท่ากัน สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส 66.67% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 เดือน ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มก./ลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 0.5 มก./ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสสูงสุด 3.33 กรัม ต้นที่พัฒนาในอาหารแข็งเติม TDZ และ BA ข้างต้นให้ใบผิดปกติเกิดเป็นใบเรียว เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคไอโซไซม์พบว่าแถบเอนไซม์เอสเตอเรสที่ได้ต่างกับใบของต้นปกติ

ไม้ประดับสกุลหน้าวัวเป็นไม้ตัดดอกที่มีรูปร่างแปลกตา สีสันสวยงาม ออกดอกได้ตลอดทั้งปี มีความทนทานต่อสภาพอากาศที่ร้อนชื้นในประเทศไทยเป็นอย่างดี ดอกมีความแข็งแรงมีอายุการใช้งานนานกว่า 10 วัน จึงเป็นที่นิยมของตลาดทั้งในและต่างประเทศ ส่วนใบของหน้าวัวมีลักษณะแตกต่างกันไปหลายแบบ เช่น รูปหัวใจ รูปใบหอก รูปสามเหลี่ยม หรือใบประกอบแบบนิ้วมือ นิยมปลูกเลี้ยงเป็นทั้งตัดดอก และไม้กระถาง (วชิรพงศ์, 2545) หน้าวัว (*Anthurium* spp.) มี 2 ชนิดใหญ่ๆ แต่ละชนิดก็มีหลายพันธุ์ คือ *A. andraeanum* ส่วนใหญ่ใช้ตัดดอก เป็นที่นิยมในประเทศ โดยเฉพาะพันธุ์ที่มีสีสด เช่น พันธุ์ทรอปิคอล (Tropical) ส่วน *A. schzerianum* มีจานรองดอกสีแตกต่างกัน แต่ไม่นิยมปลูกเลี้ยงในเมืองไทย เพราะต้องการความเย็นและความชื้นสูงกว่า *A. andraeanum* ซึ่งมีปลีงอหรือเป็นเกลียว ปลูกเป็นไม้ตัดดอก และไม้กระถาง ทั้งนี้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 7 ได้มีการส่งเสริมให้ปลูกไม้ประดับสกุลหน้าวัวเป็นไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออก (สุรวิช, 2541) เพราะไม้ประดับสกุลหน้าวัวที่ใช้ตัดดอกกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดโลก โดยเฉพาะตลาดใหญ่ในเอเชีย เช่น ประเทศญี่ปุ่น มีความต้องการนำเข้าดอกหน้าวัวจากประเทศไทยในปริมาณมาก พันธุ์ที่นิยม ได้แก่ พันธุ์ซิมบา (Simba) สุลต่าน (Sultan) และแองเจิล (Angle) ซึ่งเน้นสีอ่อน เช่น สีเขียว สีชมพู เป็นส่วนใหญ่ ในจำนวนนี้พันธุ์สุลต่านเป็นพันธุ์ที่น่าสนใจมากที่สุดเนื่องจากดอกมีลักษณะเป็นแบบโอบาเกะ (obake) จานรองดอกรูปหัวใจขนาดใหญ่ สีชมพูอ่อน ขอบทางด้านโคนบริเวณหูจานรองดอกมีสีเขียว ร่องน้ำตาตื้น ปลีสีเหลือง ปลายสุดและช่วงโคนมีสีเขียวชี้ตั้งขึ้น ราคาต่อดอกสูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ใช่โอบาเกะ แต่การผลิตภายในประเทศขณะนี้ยังมีไม่เพียงพอ ดังนั้นการผลิตไม้ดอกในสกุลนี้นับเป็นธุรกิจที่น่าสนใจ

การผลิตดอกหน้าวัวในประเทศไทยยังประสบปัญหาการลงทุนสูง และปัญหาเรื่องต้นพันธุ์ซึ่งต้นพันธุ์ที่ขยายพันธุ์โดยวิธีปกติจะใช้เวลานาน ส่วนต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่าประมาณ 12-13 เดือน (Kuehnle and Sugii, 1992) แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่านการพัฒนากระบวนการออแกโนเจนนิซิสไม่สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ทันต่อความต้องการ จึงมีการพัฒนาการชักนำต้นอ่อน (somatic embryo) ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนนิซิส ซึ่งวิธีนี้จะสามารถร่นระยะเวลาได้ประมาณ 3-4 เดือน เนื่องจากเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเป็นแคลลัสที่มีการ

เจริญทั้ง 2 ทาง คล้ายการงอกของเมล็ด คือมีการพัฒนาของยอดและรากพร้อมกันโดยมีโปรแคมเบียมเชื่อมถึงกัน (Geier, 1982; Kuehnle and Sugii, 1992) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงสามารถนำไปผลิตเป็นเมล็ดเทียมทำให้ขนส่งได้สะดวกขึ้น มีการรายงานการชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสของหน้าวัวได้เป็นครั้งแรกโดย Kuehnle และ Sugii (1991) ในอาหารเติม BA (N^6-benzyladenine) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) จากนั้นได้มีการพัฒนาต่อมาโดยมีการใช้ฮอร์โมนในกลุ่มต่างๆ 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) Golden pothos (Zhang *et al*., 2005) เป็นต้น

ในการศึกษานี้เป็นการรายงานผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนนิซิส และความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดโดยกระบวนการดังกล่าว

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุพืช

การศึกษานี้ใช้หน้าวัวสายพันธุ์สุลต่านซึ่งเป็นชิ้นส่วนจากหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MMS (modified Murashige and Skoog) เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26±2°C ใช้ชิ้นส่วนของใบและข้อ เพาะเลี้ยงในอาหารโดยตรง และใช้ชิ้นส่วนเหล่านี้ในการศึกษาชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสต่อไป

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

เพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MMS ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ

ชนิดที่ 1 2,4-D ความเข้มข้น 1-4 มก./ลิตร และ Kinetin 0.5 และ 1.0 มก./ลิตร

ชนิดที่ 2 TDZ ความเข้มข้น 0.75 และ 1.0 มก./ลิตร และ BA 0.5 และ1.0 มก./ลิตร

เติมน้ำตาลซูโครส 3% และไฟตาเจล 0.17% ปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26±2°C บันทึกขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส จำนวนยอด และจำนวนรากเปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์หลังการเพาะเลี้ยง 16 สัปดาห์ โดยในแต่ละทรีตเมนต์ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้นส่วน

2. ศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคซัสเพนชั่น

นำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส 0.5 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันดังนี้คือ

ชนิดที่ 1 2,4-D เข้มข้น 1-4 มก./ลิตร และ Kinetin 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ลิตร

ชนิดที่ 2 2,4-D เข้มข้น 1-4 มก./ลิตร และ BA 0.5 และ 1.0 มก./ลิตร

อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3% และปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ขนาด 125 มล บรรจุอาหาร 15 มล วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วคงที่ 80 รอบ/นาที ที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26±2°C ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักสดแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยในแต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 10 ชิ้น

3. ศึกษาการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำชิ้นส่วนเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิด คือ

ชนิดที่ 1 MS หรือ 1/2 MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ชนิดที่ 2 MS หรือ 1/2 MS เติม IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มก./ลิตร

อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3% วุ้น Agar-agar ความเข้มข้น 0.75% และปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในขวด

4 ออนซ์ บรรจุอาหาร 15 มล ภายใต้ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วันอุณหภูมิ 26±2°C ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

4. ศึกษาผลของระยะเวลาการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และลักษณะผิดปกติ

นำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสวางเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมด้วย BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มก./ลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3% และไฟตาเจล 0.17% ปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26±2°C ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ลักษณะทางสัณฐานของต้นผิดปกติที่เกิดขึ้น หลังเพาะเลี้ยง 1, 3, 6, 9, 12, 15 และ 18 เดือน ตรวจสอบลักษณะผิดปกติด้วยเทคนิคไอโซไซม์โดยเก็บใบของต้นหน้าวัวที่มีลักษณะผิดปกติ และใบจากต้นที่ปกติแยกต้น มาสกัดเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักใบพืชในโกร่งเย็นจนละเอียด แล้วจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟปั่นเหวี่ยงด้วยไมโครเซนตริฟิวก์ที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟที่สะอาด แล้วแยกเอ็นไซม์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง ใช้ตัวกลางเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์แบบไม่ต่อเนื่อง ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบเอ็นไซม์ในระบบแอลฟาเอสเตอเรส (α-esterase; EST) ย้อมสีในที่มืด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที จนเห็นแถบไซโมแกรมชัดเจน ไม่เปลี่ยนแปลง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บันทึกผลทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของไซโมแกรม

ผลการทดลอง

1. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ และการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสหน้าวัวในอาหารแข็งสูตร MMS ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า การใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ลิตร ร่วมด้วย Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร ชักนำให้เกิดกลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาด 1.3-1.5 ซม ได้ดี (90%) และสามารถพัฒนาเป็นยอด และต้นที่มีรากได้ดี (83.3% และ 100% ตามลำดับ) (Table 1) ส่วนอาหารเติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มก./ลิตร มีการพัฒนาสร้างเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสสูง (66.67%) (Table 2) และพบว่ามีกลุ่มของเอ็มบริโอชุดที่สอง (secondary embryo) เกิดขึ้น (Figure 1)

Table 1. Effect of 2,4-D and kinetin on shoot and somatic embryo formation from calli initiated from nodal explants after 16 weeks of culture.

2,4-D -- (mg/l) --	Kinetin	Calli producing shoots with root (%)	Mean no. of shoots with root (per callus) ± SD	Calli producing shoots (%)	Mean no. of shoots (per callus) ± SD	Calli producing embryos (%)	Size of embryo callus *	Size of callus (cm) ± SD
1	0.5	100	6.8±1.3	22	0.4±0.5	60	2	1.15±0.12
1	1.0	100	8.7±1.9	87.5	3.0±1.2	50	1	1.29±0.05
2	0.5	100	7.4±2.7	83.3	2.0±1.1	90	5	1.37±0.11
2	1.0	100	8.0±4.0	83.3	3.3±3.8	40	3	1.51±0.14
3	0.5	100	7.65±2.4	50	1.3±1.6	100	6	1.45±0.14
3	1.0	80	4.9±2.7	40	2.0±2.1	70	4	1.49±0.13
4	0.5	77	5.65±3.2	55.5	1.4±1.0	60	3	1.28±0.11
4	1.0	100	8.05±4.9	50	0.8±0.3	100	6	1.35±0.22

*** Size of embryogenic callus**

Score	0	1	2	3	4	5	6
Size (mm)	0	1- 3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18

Table 2. Effect of TDZ and BA on shoot and somatic embryo formation from calli initiated from nodal explants after 16 weeks of culture.

TDZ -- (mg/l) --	BA	Calli producing shoots with root (%)	Mean no. of shoots with root (per callus) ± SD	Calli producing shoots (%)	Mean no. of shoots (per callus) ± SD	Calli producing embryos (%)	Size of callus (cm) ± SD
0.5	0.5	40	6.6	100	17±2.9	0	2.02±0.1
0.75	0.5	45	6.0	75	13±3.4	25	2.01±0.2
1.0	0.5	0	0	55	13±2.4	45	1.74±0.2
1.0	1.0	0	0	33.33	17±2.2	66.67	2.00±0.1

Table 3. Effect of 2,4-D and kinetin on shoot and somatic embryo formation from embryogenic callus after 8 week of culture in liquid MMS medium.

2,4-D	Kinetin -------mg/l-------	Fresh weight of embryogenic callus (g)	Remarks
1	0.1	2.26	-
1	0.5	2.71	-
1	1	0.99	-
2	0.1	2.32	-
2	0.5	2.42	-
2	1	1.59	-
3	0.1	1.35	-
3	0.5	1.80	-
3	1	1.25	-
4	0.1	1.02	-
4	0.5	1.5	-
4	1	0.65	Browning

2. การชักนำเอ็มบริโอเจนนิคซัสเพนชั่น

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า การเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ลิตร ร่วมกับ Kinetin 0.5 มก./ลิตร และการเติม 2,4-D เข้มข้น 3 มก./ลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มก./ลิตร ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสสูงสุด 2.71 กรัม (Table 3) และ 3.33 กรัม (Table 4) ตามลำดับ เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการเพิ่มปริมาณในสัปดาห์ที่ 8 หลังการเพาะเลี้ยง และเริ่มสร้างยอดรวมในสัปดาห์ที่ 12 หลังการเพาะเลี้ยง (Figure 2)

3. การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอโดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS และ MS แต่ละสูตรอาหารเติม NAA และ IBA พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาจากระยะรูปกลม หัวใจ ทอร์ปิโด และสร้างใบเลี้ยง (Figure 2) โซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS สามารถสร้างยอดและรากได้ 100% มีจำนวนรากเฉลี่ย 5 ราก ยาว 1.5 ซม. และใบมีความยาวเฉลี่ย 1.35 ซม (Table 3, Figure 3)

4. ผลของระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และลักษณะผิดปกติ

แคลลัสหน้าวัวพันธุ์สุลต่านที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MMS เติม TDZ ร่วมด้วย BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มก./ลิตร ทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 18 เดือน สร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงในช่วงเดือนที่ 3 (66.67%) เอ็มบริโอเริ่มงอกในเดือนที่ 6 หลังการเพาะ

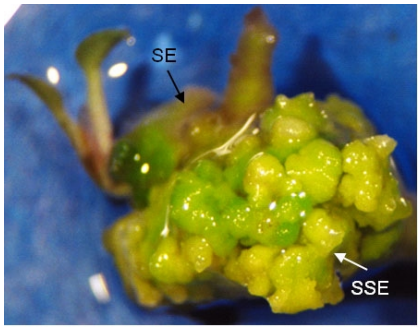

Figure 1. Somatic embryos (SE) germinated and developed into shoots subsequent to production of secondary somatic embryo (SSE) at the basal part.

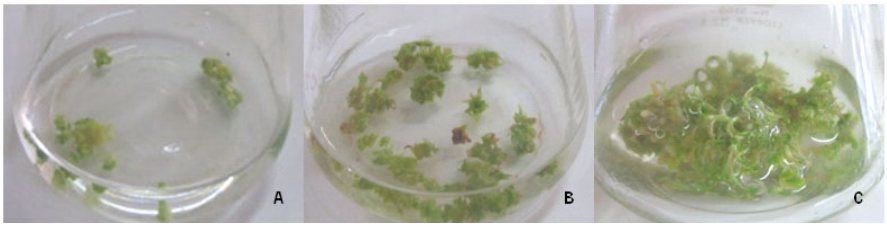

Figure 2. Somatic embryo obtained in suspension culture after (A) 4 weeks (B) 8 weeks and (C) 12 weeks.

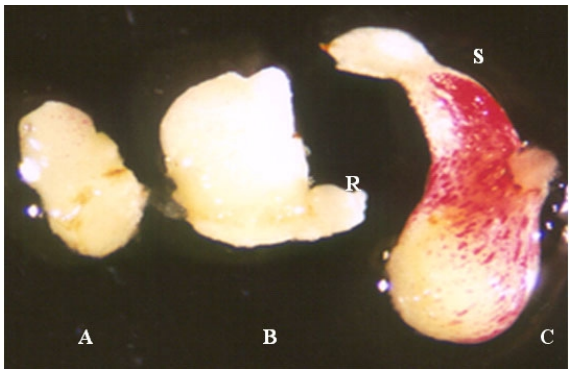

Figure 3. *Anthurium somatic* embryogenesis at various stage. A: torpedo embryo, B: heart shape with root (R) and C: mature embryo forming shoot (S)
[Color figure can be viewed in the electronic version]

เลี้ยง และพบอาการผิดปกติที่ส่วนของใบในเดือนที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (Table 4) ใบของต้นที่เจริญมีลักษณะเรียวเล็กคล้ายรูปหอก (Figure 4) เมื่อตรวจสอบเอ็นไซม์ในระบบแอลฟาเอสเตอเรสจากต้นที่ลักษณะใบเรียวยาวกับใบปกติ พบว่า ใบเรียวที่ได้มีรูปแบบของไซโมแกรมที่แตกต่างกับใบของต้นปกติ (Figure 5)

วิจารณ์ผล

การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส โดยการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิค-

Table 4. Effect of 2,4-D and BA on shoot and somatic embryo formation from culturing embryogenic callus in liquid MMS medium for 8 weeks.

2,4-D	BA	Fresh weight of embryogenic callus (g)	Remarks
------mg/l------			
1	0.5	1.94	-
1	1	1.36	-
2	0.5	2.14	-
2	1	1.44	-
3	0.5	3.33	-
3	1	1.42	-
4	0.5	2.18	-
4	1	1.21	Browning

Figure 4. Shoots developed into plantlets with roots on MMS medium supplemented with different kinds of auxins after 8 weeks of culture.

Figure 5. Lanceolate leaves botained from germinated embryo after culturing for 12 months on MMS medium with 1.0 mg/l TDZ and 1.0 mg/l BA.

[Color figure can be viewed in the electronic version]

แคลลัสขนาด 1.3-1.5 ซม. ได้ดีที่สุด 90% และสามารถพัฒนาเป็นยอด (83.3%) และต้นที่มีรากได้ดี (100%) ในขณะที่ Hamidah และคณะ (1997) ได้รายงานการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในหน้าวัว *A. scherzerianum* โดยต้องใช้ 2,4-D ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าการศึกษานี้ถึง 2 เท่า (4 มก./ลิตร) ส่วนการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ TDZ ร่วมกับ BA นั้นมีรายงานว่าการใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เกิด MNC (meristematic nodular callus) (ธัญญาพร, 2547) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มก./ลิตร ในการศึกษานี้สามารถชักนำให้เกิดโซมาติคเอ็มบริโอ โดยมีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงสุดที่ 66.67% เนื่องจาก TDZ และ BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ซึ่งจะส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีน ส่งเสริมการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (สมพร, 2541; Houssa *et al.*, 1990) ชนิดของไซโตไคนินที่ใช้ร่วมกันก็มีผลต่อความสามารถในการชักนำหรือการเพิ่มปริมาณแคลลัส หลังการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลา 6 เดือน โซมาติคเอ็มบริโอมีการพัฒนาเป็นต้นที่ปกติและสามารถพบต้นที่แสดงลักษณะใบผิดปกติเกิดเป็นใบเรียวได้ในเดือนที่ 12 หลังการเพาะเลี้ยง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่าแถบเอนไซม์ที่ได้ต่างกับต้นปกติ ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจ

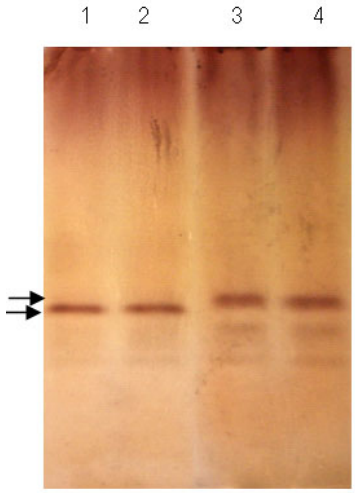

Figure 6. Zymogram of esterase obtained from lanceolated and normal leaves (lane 1,2: lanceolaated leaves, lane 3,4: normal leaves) (Arrows show different position of zymogram).

[Color figure can be viewed in the electronic version]

Table 5. Development of embryogenic callus culturing on 1/2 MS and MS medium supplemented with different kinds of auxin for 8 weeks.

Culture medium	Avg. no. of roots/shoot ± SD	Avg root length (cm)	Avg. no. of leafs/shoot ± SD	Avg leaf length (cm) ± SD	Chlorosis (%) ± SD	Calli Producing embryos (%)	Size of callus (cm) ± SD
1/2 MS	3.8±1.0	1.95±0.47	4.3±0.82	0.97±0.27	0	0	0
1/2 MS1IBA	5.7±1.57	1.26±0.35	4.7±1.34	1.2±0.25	20	20	0.08±0.19
1/2 MS1NAA	3±0.67	1.41±0.35	2.95±0.5	1±0.25	90	60	0.35±0.34
MS	5±1.56	1.51±0.44	5±0.67	1.35±0.35	0	0	0
MS1IBA	4.5±1.18	1.04±0.56	4.8±0.63	1.08±0.32	30	0	0
MS1NAA	2.2±0.63	0.83±0.20	2.32±0.82	0.73±0.18	80	0	0

Table 6. Percentage of somatic embryo formation and leaf morphology at different subculturing times.

Time of culture (months)	Observation		
	Somatic embryo (%)	Lanceolated leaves (%)	Normal leaves (%)
1	-	-	-
3	66.67	-	-
6	50	-	100
9	25	-	100
12	-	30	70
15	-	50	50
18	-	100	-

ผันแปรเนื่องจากปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมของพืช และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นสูงต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน Kuehnel และคณะ (1992) รายงานว่าในระยะแรกของการชักนำเอ็มบริโอเจนนิซิสในหน้าวัว *A. andraeanum* ลูกผสมจะเกิดได้เร็วหากใช้ออกซินความเข้มข้นสูง แต่หลังจากชักนำแล้วควรลดความเข้มข้นให้ต่ำลงหรือไม่ใช้เลย นอกจากนี้ชนิดของไซโตไคนินที่ใช้ร่วมก็มีผลต่อความสามารถในการชักนำหรือการเพิ่มปริมาณแคลลัส และลักษณะทางสัณฐานของโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้ (Bhansali *et al.*, 1990) เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการเพิ่มปริมาณได้ดีโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MMS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 0.5 มก./ลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 3 มก./ลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มก./ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้น้ำหนักสดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสสูงสุด 2.71 และ 3.33 กรัม ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลวภายใต้การเขย่าเลี้ยง ทำให้เซลล์มีการกระจายตัว สามารถรับธาตุอาหารและอากาศอย่างเพียงพอ ทำให้โซมาติคเอ็มบริโอที่ได้มีความแข็งแรง และมีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง นอกจากนี้แล้วยังสามารถเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน (สมปอง, 2539; Finer and Nagasawa, 1998) การงอกของโซมาติคเอ็มบริโอเป็นไปได้ดีในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถสร้างยอดและรากได้ 100% สอดคล้องกับการชักนำการเกิดพืชต้นใหม่ในพลูนางฟ้า และสับปะรด (Zhang *et al.*, 2005; Sripaoraya *et al.*, 2003) ต้นหน้าวัวที่ได้มีจำนวนรากเฉลี่ย 5 ราก ยาว 1.5 ซม และใบมีความยาวเฉลี่ย 1.35 ซม. ในขณะที่หน้าวัวบางสายพันธุ์สามารถพัฒนาได้ดีในอาหารสูตร 1/2 MS ทั้งนี้ขึ้นกับพันธุ์ (Martin *et al.*, 2003) ดังนั้นการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในหน้าวัวจึงควรเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร หรือการเติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร เท่ากัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และทำการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร MMS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำการงอกของเอ็มบริโอต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย และภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

ธัญญาพร สุสานนท์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว (*Anthurium* spp.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วชิรพงศ์ หวลบุตตา. 2545. คู่มือคนรักต้นไม้ "หน้าวัว". กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน. 95 หน้า.

สมปอง เตชะโต. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 284 หน้า.

สมพร ณ นคร. 2541. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth regulator; PGRs). คณะวิชาพืชศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตนครศรีธรรมราช.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2541. การปลูกไม้ดอกสกุลหน้าวัว เอกสารเผยแพร่ลำดับที่ 56. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

Bhansali, R.R., Driver, J.A. and Durzan, D.J. 1990. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. Plant Cell Reports 9: 280-284.

Finer, J.J. and Nagasawa, A. 1998. Development of embryogenic culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15:125-136.

Geier, T. 1982. Anthurium. **In** Handbook of Plant Cell and Tissue Culture (eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y.P.S. Bajaj) Vol. 5, pp. 228-252. New York: McGraw-Hill.

Hamidah, M., Debergh, P.D., Ghani, A. and Karim, A. 1997. Somatic embryogenesis and plant re-

generation in *Anthurium scherzerianum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 189-193.

Houssa, C., Jacqmara, A. and Bernier, G. 1990. Activation of replicon origin as a possible target to cytokin in shoot meristems of Sinapis. Planta 181:324-326.

Hsia, C. and Korban, S.S. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus culture of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 1-6.

Kuehnle, A.R. and Sugii, N. 1991. Callus induction and plantlet regeneration in tissue culture of *Hawiian anthuriums*. HortScience 26: 919-921.

Kuehnle, A.R. and Sugii, N. 1992. Update on anthurium somatic embryogenesis research. **In** Proc. 5th Hawaii Anthurium Industry Conf., Hawaii Inst. Trop. Agr. and Human Res. (eds. K.M. Delate and C.H.M.Tome). USA: Honolulu. pp. 15-16.

Kuehnle, A.R., Chan, F.C. and Sugii, N. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. Plant Cell Reports 11: 438-442.

Martin, K.P., Joseph, D., Madassery, J. and Philip, V.J. 2003. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 39: 500-504.

Sripaoraya, S., Marchant, R., Power, J.B. and Davey, M.R. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 39: 450-454.

Zhang, Q., Chen, J. and Henny, R.J. 2005. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, petiole and stem explants of Golden pothos. Plant Cell Rep. 23: 587-595.