

การเกิดและการเจริญเติบโตของแคลลัสของข้าวโพด หวานพันธุ์ Super sweet โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Callus Induction and Growth of *Zea mays*. L var. *saccharata*
(Super sweet corn) through Tissue Culture

ทนง พรประดับเกียรติ และไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา¹

Tanong Pronpradupkait and Paiboolya Gavinlertvatana

ABSTRACT

Callus induction of *Zea mays* var. *saccharata* (super sweet) on Murashige and Skoog (1962) medium containing 1 or 3 mg/l 2, 4-D was found. Tissue explants from root tip and mesocotyl were suitable for callus formation. The induction and growth of callus was better in medium containing 1 mg/l 2, 4-D and 10% coconut milk than medium containing 3 mg/l 2, 4-D and coconut milk. Callus from root tip which was cultured in medium containing 1 or mg/l 2, 4-D grew at a greater extent under condition of light than in the dark. In contrast, callus from mesocotyl which was cultured in medium containing 1 mg/l 2, 4-D grew better under condition of dark than in the light. Nevertheless, callus grew better in the dark in medium which was supplemented with %coconut milk.

The increasing percentage of callus growth was greater in medium containing 3 mg/l 2, 4-D and 10%coconut milk or in coconut milk free-medium.

Root formation occurred in callus which was cultured in medium containing 1 or 3 mg/l 2, 4-D. The higher percentage of root formation was observed in medium containing 1 mg/l 2, 4-D than in medium containing 3 mg/l 2, 4-D.

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวโพดหวานพันธุ์ Super sweet ในสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) ที่มี 1 หรือ 3 mg/l ของ 2, 4-D พบว่าเนื้อเยื่อจากปลายรากและ mesocotyl มีความเหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสในอาหารที่มี 1 หรือ 3 mg/l ของ

2, 4-D แต่ 1 mg/l ของ 2, 4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าวในอาหาร จะทำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัสดีกว่าในอาหารที่มี 3 mg/l ของ 2, 4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าว แคลลัสที่ได้จากปลายรากในอาหารที่มี 1 หรือ 3 mg/l ของ 2, 4-D ในที่มีแสงจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าในที่มีมืด ส่วนแคลลัสที่ได้

¹ ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จาก mesocotyl ในอาหารที่มี 1 mg/l ของ 2, 4-D ในที่นี้จะเจริญเติบโตดีกว่าในที่ที่แสง แต่ในทางตรงกันข้าม หากในอาหารที่มี น้ำมะพร้าวในที่ที่แสงแคลลัสจะเจริญเติบโตดีกว่า ในที่มืด

ในอาหารที่มี 1 mg/l ของ 2, 4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าวจะมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโตของแคลลัสมากกว่าในอาหารที่มี 3 mg/l ของ 2, 4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าวหรือในอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าวร่วมอยู่ด้วย

รากสามารถเกิดขึ้นได้จากแคลลัสเมื่อเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 1 หรือ 3 mg/l ของ 2, 4-D เปอร์เซนต์การเกิดรากในอาหารที่มี 1 mg /l ของ 2, 4-D อย่างเดียวหรือร่วมกับน้ำมะพร้าว

กํานํ้า

การชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวยังประสบความสำเร็จน้อยกว่าในพืชใบเลี้ยงคู่ (1977) แต่อย่างไรก็ตาม แคลลัสสามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วได้ในพืชหลายชนิด ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเมื่อใช้อาหารที่มีความสมดุลของเกลือแร่ น้ำตาล วิตามิน auxin และ cytokinin ในอาหารที่มี auxin เพียงอย่างเดียวก็อาจเพียงพอต่อการเกิดแคลลัส แต่บางครั้งอาจต้องเติมสารประกอบที่ได้ตามธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าวน้ำผลไม้, yeast extract ด้วย ซึ่งจะช่วยให้กระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ขึ้น (Murashige, 1977) การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวโพดประสบความสำเร็จในระยะแรกจากการเลี้ยงส่วนของ endosperm (Straus, and Lorue, 1954; Straus 1954, 1960) ที่มีอายุน้อยในอาหารที่ไม่มี auxin ทั้งนี้เนื่องจากว่า endosperm คงจะมี endogenous auxin ได้แก่ IAA อยู่ในปริมาณเพียงพอต่อการเกิดแคลลัส

และอาจมีสารเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆที่ช่วยให้เกิดแคลลัสได้โดยไม่ต้องการ auxin จากภายนอก อย่างไรก็ตาม การเกิดแคลลัสจาก endosperm ก็ยังมีความจำกัดอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพด (Sheridan, 1975) ระยะต่อมาแคลลัสสามารถเกิดขึ้นได้จากส่วนของ somatic tissue ต่างๆเช่น จากส่วนของ scutellum (Green, and Phillip, 1975) จากส่วนของปลายราก (Mott and Cure, 1978) ส่วนของลำต้นในระยะต้นอ่อน (Green, et al, 1974; Sheridau, 1975) ส่วนของข้อของ coleoptile ในระยะต้นอ่อน (Johnson and Holden, 1974) และจากส่วนของ mesocotyl (Lonz, Harms and Potrykus, 1977; Mott and cure, 1978) อาหารที่ใช้เป็นอาหารแข็งที่มี auxin รวมอยู่ด้วย โดยเฉพาะ 2, 4-D เป็น auxin ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเกิดแคลลัส (Reinert and Bajaj, 1977) ในการเกิดแคลลัสจากส่วนของ somatic tissue นอกจากจะพบว่า มีขีดจำกัด โดยขึ้นอยู่กับการเกิดแคลลัสจาก endosperm แล้ว (Sheridan 1975) ยังขึ้นอยู่กับการปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น สูตรอาหารที่เหมาะสม สภาพแวดล้อมและชนิดของเนื้อเยื่อ (Murashige, 1974)

เนื่องจากข้าวโพดจัดเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ ได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะที่ดี ให้ผลผลิตต่อไร่สูง มีคุณภาพดี และทนทานต่อโรคมาโดยตลอด ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตต่อไร่ของเกษตรกรและให้มีคุณภาพตามความต้องการของตลาด ในปัจจุบันมีการนำประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชมาใช้ทางด้านการเกษตรกันอย่างกว้างขวางและประสบผลสำเร็จมาแล้ว ทั้งวิธีการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วใน

ระยะเวลาสั้น วิธีการที่ปราศจากโรค การเกิด การกลายพันธุ์ได้พันธุ์ใหม่ขึ้นมา การสร้างต้น เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์โดยวิธี anther และ pollen culture ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวโพดหวานเพื่อชักนำให้ เกิดแคลลัสรวมทั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส ซึ่งอาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการใช้ในการ ปรับปรุง พันธุ์ข้าวโพดพันธุ์ดีโดยใช้เทคนิคของการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวโพดโดยวิธีดังกล่าว ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 นำเมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์ Supersweet จากผักสดมาทำความสะอาดด้วย ผงซักฟอก แล้วนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงแช่ในน้ำยา clorox 10% เป็นเวลา 15 นาทีล้างน้ำยาออกจากเมล็ด ด้วยน้ำกลั่นทันท่วงทีแล้วประมาณ 2 ครั้ง นำ เมล็ดข้าวโพดมาผ่าและตัดเอาส่วนของ embryo ออกในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ นำ embryo มา เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) เมื่อต้นอ่อนที่ได้จากการ เลี้ยง embryo มีอายุ 7-9 วัน จึงตัดต้นอ่อน ออกเป็นส่วนปลายรากยาวประมาณ 1 ซม. ส่วน แผ่นใบขนาด 0.5×1 ซม. ส่วนกาบใบที่ม้วน ตัวอยู่ยาวประมาณ 0.5 ซม. และ mesocotyl ขนาดยาวประมาณ 0.5 ซม. (ภาพที่ 1) มา เลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตรอาหาร MS โดยมี 3 mg/l ของ 2, 4-D หรือ 1 mg/l ของ 2, 4-D และ 10% (v/v) นามะพร้าว เพื่อเป็นการ ทดลองเบื้องต้นสำหรับเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการ เกิดแคลลัส

การทดลองที่ 2 เมื่อทราบถึงเนื้อเยื่อส่วนที่ เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสคือ ปลายราก และ mesocotyl จึงนำเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อนที่มี อายุ 7-9 วันจากการเลี้ยง embryo ดังอธิบาย

ในการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS โดยมี 1 หรือ 3 mg/l ของ 2, 4-D (MS_1 หรือ MS_3) และ 1 หรือ 3 mg/l ของ 2, 4-D ที่มี 10% (v/v) นามะพร้าว (MSC_1 MSC_3) แล้วเลี้ยงไว้ในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิ 27-30 °C ทั้งในที่มืดและที่แสง

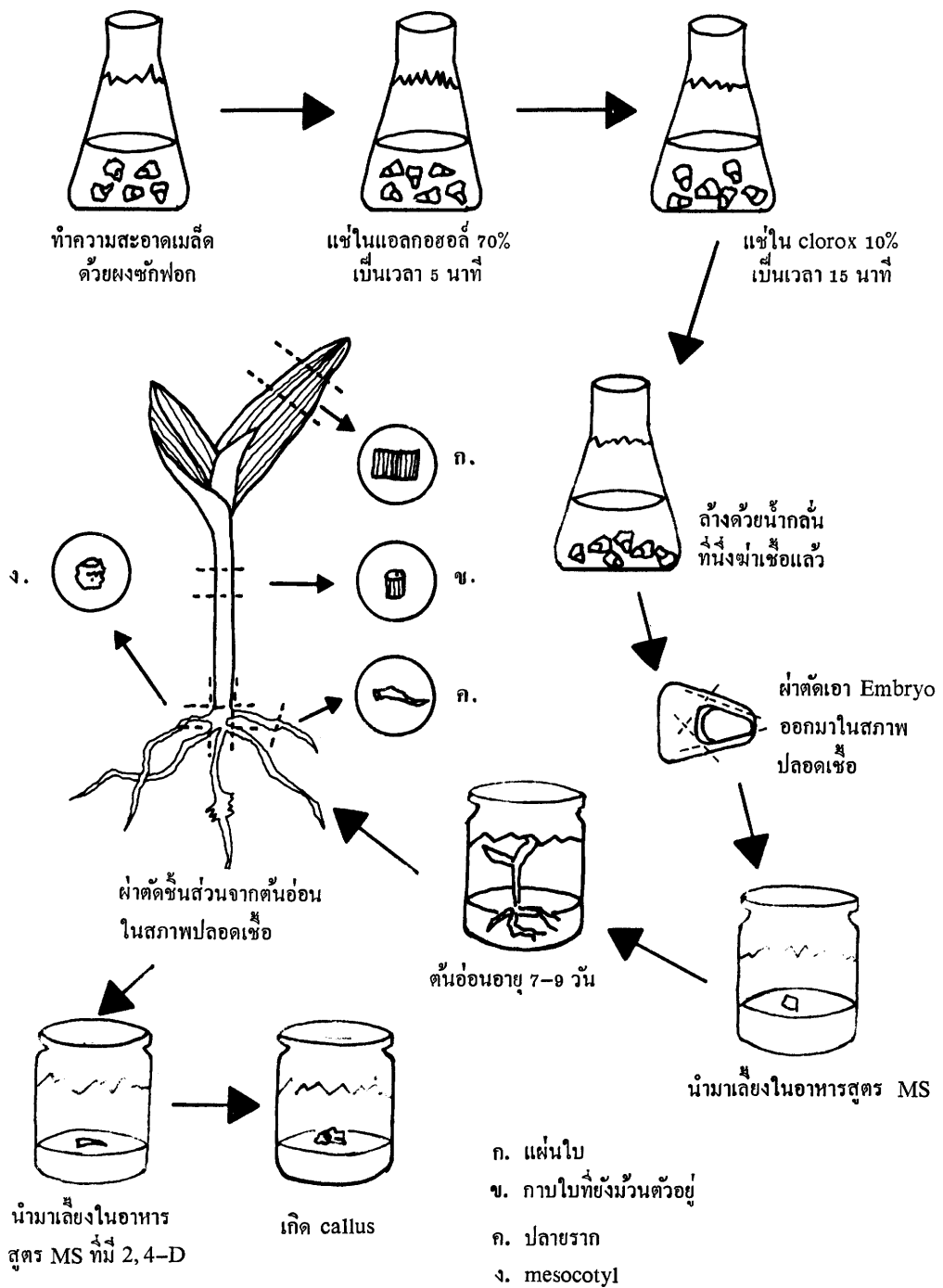
สูตรอาหารแข็งที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเนื้อ เยื่อของข้าวโพดหวาน ทั้งการทดลองที่ 1 และ การทดลองที่ 2 มีน้ำตาล 20 gm/l วุ้น 8gm/l โดยปรับให้มีความเป็น pH เป็น 5.6 โดย 1 N KOH หรือ 1 N HNO_3 บรรจุในขวดแก้วรูปทรง กระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. ยาว 3 ซม. ปิดปากขวดด้วย aluminium foil และ ได้นำมาเชื้อโรคแล้วด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ แคลลัสในสูตรอาหารต่างๆ ทั้งในที่มืดและที่ แสงของการทดลองที่ 2 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ทำโดยให้แผ่นกะแนเทียบ ปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้น

ผล

เมื่อนำส่วน ปลายราก แผ่นใบ กาบใบที่ ยังม้วนตัวอยู่และ mesocotyl มาเลี้ยงบนอาหาร แข็งสูตร MS ที่มี 3 mg/l ของ 2, 4-D หรือ 1 mg/l ของ 2, 4-D และ 10% (v/v) นามะพร้าว (การทดลองที่ 1) พบว่าเนื้อเยื่อจาก ส่วนปลายรากและ mesocotyl สามารถเกิด แคลลัสได้ หลังจากเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อจากแผ่นใบและกาบใบ ที่ยังม้วนตัวอยู่ไม่สามารถเกิดแคลลัสได้ เมื่อ เลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่เนื้อเยื่อ จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเปลี่ยนสีน้ำตาลเข้ม ทว่าทงส่วนเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์โดยไม่เกิดแคลลัส เนื้อเยื่อจากปลายรากและ mesocotyl จะเกิดขยายขนาดขึ้น (enlargement)

ภาพที่ 1 แสดงการเลี้ยงและผ่าตัดชิ้นส่วนของข้าวโพด



พร้อมกับมีแคลลัสเกิดขึ้นที่ผิวหน้าของเนื้อเยื่อ
แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อนหรือสีครีม

หลังจากแคลลัสเกิดขึ้นได้จากการเลี้ยง
ปลายรากและ mesocotyl จากการทดลองที่ 1
จึงนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี 1
หรือ 3 mg/l ของ 2, 4-D (MS_1 หรือ MS_3)
และ 1 หรือ 3 mg/l ของ 2, 4-D ที่มี 10%
(v/v) นํามะพร้าว (MSC_1 หรือ MSC_3) ทั้ง
ในที่มืดและที่แสง แคลลัสสามารถเกิดขึ้นได้
ในสูตรอาหาร 4 สูตร ทั้งในที่มืดและที่แสง
หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (การทดลอง
ที่ 2)

การเจริญเติบโตของแคลลัสที่ได้จากการ
เลี้ยงส่วนปลายรากและ mesocotyl ในอาหาร
4 สูตรทั้งในที่มืดและที่แสง (การทดลองที่ 2)
พบว่าการเจริญเติบโตโดยเฉลี่ยคะแนนของ
แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงปลายรากในที่แสงใน
สูตรอาหาร $MS_1 = 2.6$, $MS_3 = 2.2$, MSC_1
 $= 1.8$ และ $MSC_3 = 1.2$ คะแนน เมื่อเลี้ยง
เป็นเวลา 4 สัปดาห์และ $MS_1 = 4.6$, $MS_3 =$
 4.2 , $MSC_1 = 4.4$ และ $MSC_3 = 1.3$ คะแนน
เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยสูตรอาหาร
 MS_1 จะมีคะแนนมากที่สุดและ MSC_3 มี
คะแนนน้อยที่สุด ส่วนการเจริญเติบโตของ
แคลลัสในที่มืดในสูตรอาหาร $MS_1 = 2.8$, MS_3
 $= 2.0$, $MSC_1 = 2.5$ และ $MSC_3 = 1.6$ คะแนน
เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์และใน $MS_1 = 3.2$,
 $MS_3 = 3.3$, $MSC_1 = 4.2$ และ $MSC_3 = 1.6$
คะแนนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์โดย MSC_1
จะมีคะแนนมากที่สุดและ MSC_3 มีคะแนนน้อย
ที่สุด

คะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตของแคลลัส
ที่ได้จาก mesocotyl ในที่ที่แสงพบว่าในสูตร
อาหาร $MS_1 = 3.0$, $MS_3 = 3.8$, $MSC_1 = 3.4$
และ $MSC_3 = 2.2$ คะแนน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา
4 สัปดาห์ และ $MS_1 = 3.2$, $MS_3 = 4.0$, MSC_1

$= 4.0$ และ $MSC_3 = 2.6$ คะแนน เมื่อเลี้ยงเป็น
เวลา 8 สัปดาห์ โดยสูตรอาหาร MS_1 และ
 MSC_1 จะมีคะแนนมากที่สุด และ MSC_3 มี
คะแนนน้อยที่สุดส่วนการเจริญเติบโตในที่มืด
พบว่าสูตรอาหาร $MS_1 = 3.8$, $MS_3 = 3.2$,
 $MSC_1 = 1.3$ และ $MSC_3 = 2.6$ เมื่อเลี้ยงเป็น
เวลา 4 สัปดาห์ และ $MS_1 = 4.0$, $MS_3 = 3.8$
 $MSC_1 = 2.5$ และ $MSC_3 = 2.8$ เมื่อเลี้ยงเป็น
เวลา 8 สัปดาห์โดยสูตรอาหาร MS_1 จะมี
คะแนนมากที่สุดและ MSC_1 จะมีคะแนนน้อย
ที่สุด

การเจริญเติบโตของแคลลัสเมื่อเลี้ยงเป็น
เวลา 8 สัปดาห์จะเห็นว่าแคลลัสที่ได้จากปลาย
รากที่เลี้ยงในที่ที่แสงในสูตรอาหาร MS_1 , MS_3
และ MSC_1 จะมีการเจริญเติบโตดีกว่าสูตร
 MSC_3 ส่วนในที่มืดแคลลัสเจริญเติบโตได้ดี
ที่สุดในสูตรอาหาร MSC_1 รองลงมาคือ ใน
สูตรอาหาร MS_1 และ MS_3 และน้อยที่สุดคือ
ในสูตรอาหาร MSC_3 สำหรับแคลลัสที่ได้จาก
mesocotyl ในที่ที่แสง การเจริญเติบโตของ
แคลลัสในสูตรอาหาร MS_3 และ MSC_1 ดีที่สุด
รองลงมาคือ ในสูตรอาหาร MS_1 และน้อยที่สุด
คือ ในสูตรอาหาร MSC_3 ส่วนในที่มืดสูตร
อาหาร MS_1 และ MS_3 การเจริญเติบโตของ
แคลลัสดีที่สุด รองลงมาคือในสูตรอาหาร
 MSC_3 และ MSC_1 ตามลำดับ

เปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโต
ของแคลลัสที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้งสองที่เลี้ยงใน
อาหารทั้ง 4 สูตรทั้งในที่มืดและที่แสงจาก 4
ถึง 8 สัปดาห์ เมื่อคิดเทียบการให้คะแนนเฉลี่ย
ของการเจริญเติบโตของแคลลัสเมื่อเลี้ยงเป็น
เวลา 4 สัปดาห์ ในแต่ละสูตรอาหารเป็น 100
เปอร์เซ็นต์ พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยง
ปลายรากในที่ที่แสงในสูตรอาหาร $MS_1 = 76.9$,
 $MS_3 = 90.9$, $MSC_1 = 144.4$ และ $MSC_3 =$
 8.3 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดในสูตรอาหาร MS_1

= 14.2, $MS_3 = 65.0$ $MSC_1 = 68.0$ และ $MSC_3 = 0$ เปอร์เซนต์ ส่วนแคลลัสที่ได้จาก mesocotyl ในที่มืดแสงในสูตรอาหาร $MS_1 = 6.6$, $MS_3 = 5.2$, $MSC_1 = 17.6$ และ $MSC_3 = 18.1$ เปอร์เซนต์ ในที่มืดในสูตรอาหาร $MS_1 = 5.2$, $MS_3 = 18.7$ $MSC_1 = 92.8$ และ $MSC_3 = 7.6$ เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 1)

แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงปลายรากและ mesocotyl สามารถเกิดรากได้โดยแคลลัสที่ได้จะเกิดเป็นรากหลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ รากยังสามารถเกิดขึ้นได้จาก mesocotyl เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ รากที่เกิดขึ้นเหล่านี้ จะเกิดการขยายขนาดและมีแคลลัสเกิดขึ้นบนรากหรือเมื่อรากสัมผัสกับผิวหน้าของอาหารที่มี 2,4-D อยู่ ส่วนรากที่สัมผัสจะเกิดแคลลัสได้ดี

เปอร์เซนต์การเกิดรากจากจำนวนแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งปลายรากและ mesocotyl ในสูตรอาหารทั้งในที่มืดและที่มืดแสงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่าแคลลัสที่ได้จากปลายรากในสูตรอาหาร $MS_1 = 100\%$, $MS_3 = 20\%$, $MSC_1 = 60\%$ และ $MSC_3 = 20\%$ ในที่มืดแสงและ $MS_1 = 33.3\%$, $MS_3 = 16.6\%$, $MSC_1 = 83.3\%$ และ $MSC_3 = 16.6\%$ ในที่มืด ส่วนแคลลัสที่ได้จาก mesocotyl ในสูตรอาหาร $MS_1 = 25\%$, $MS_3 = 16.6\%$, $MSC_1 = 20\%$ และ $MSC_3 = 0$ ในที่มืดแสงและ $MS_1 = 20\%$, $MS_3 = 20\%$, $MSC_1 = 16.6\%$ และ $MSC_3 = 50\%$ ในที่มืด (ตารางที่ 2)

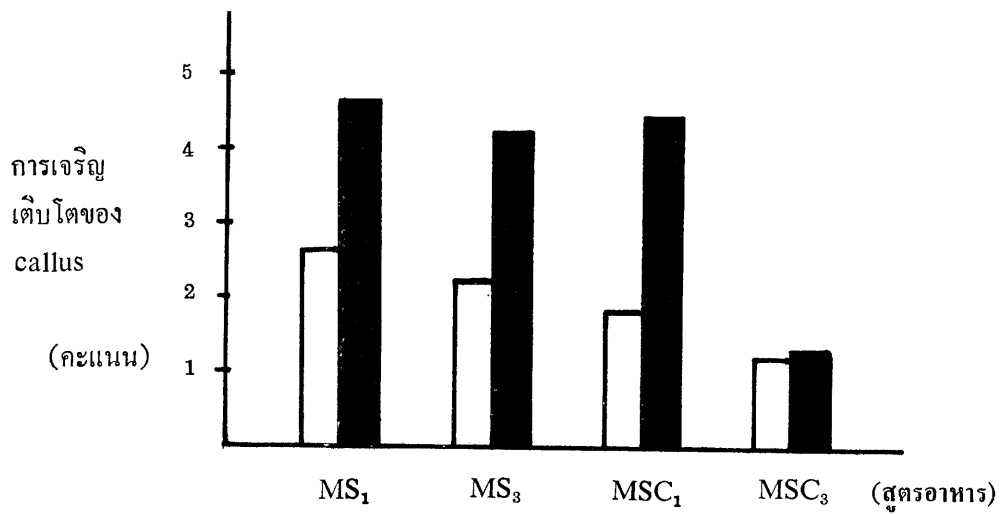
วิจารณ์

จากการนำปลายราก แผ่นใบ กาบใบที่ยังม้วนตัวอยู่ และ mesocotyl ของข้าวโพดมาเลี้ยงบนอาหารที่มี 1 หรือ 3 mg/l ของ 2,4-D (การทดลองที่ 1) พบว่าเนื้อเยื่อที่สามารถก่อให้เกิดแคลลัสคือ ส่วนปลายราก และ

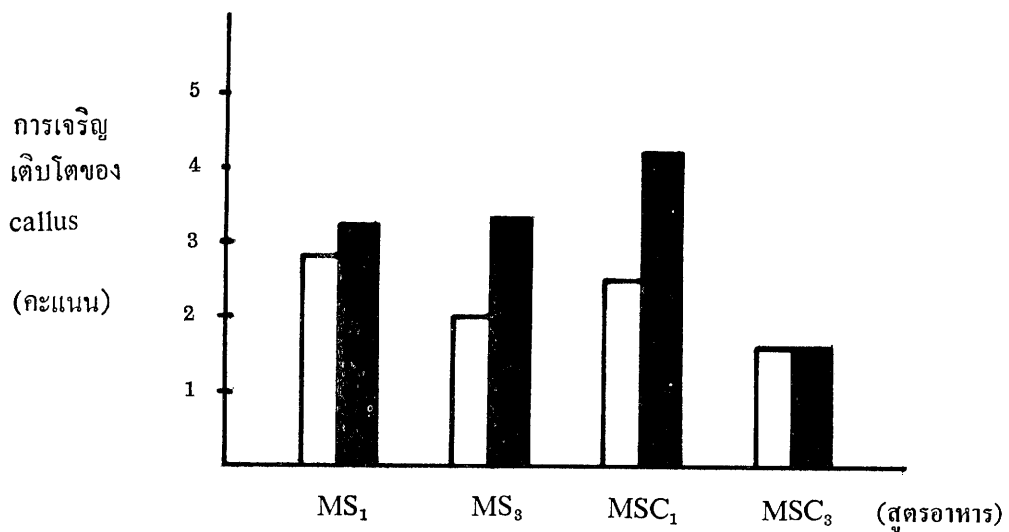
mesocotyl ส่วนเนื้อเยื่อจากแผ่นใบและกาบใบที่ยังม้วนตัวอยู่ไม่เกิดแคลลัส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้มีส่วนสัมพันธ์กับสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ และเนื่องจากว่าชนิดของเนื้อเยื่อ และอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับผลสำเร็จ (Murashige, 1974) ฉะนั้นอาหารที่ใช้จึงเหมาะสมกับปลายรากและ mesocotyl มากกว่าแผ่นใบและกาบใบที่ยังม้วนตัวอยู่

เมื่อนำเนื้อเยื่อจากส่วนปลายรากและ mesocotyl มาเลี้ยงบนอาหารที่มี 1 หรือ 3mg /l ของ 2,4-D อย่างเดียวหรือที่มี 10% (v/v) นิยามะพรวผสมอยู่ ทั้งในที่มืดและที่มืดแสง (การทดลองที่ 1 และ 2) สามารถเกิดแคลลัสได้เนื่องจาก 2,4-D เป็น Synthetic auxin ที่มีประสิทธิภาพที่สุดต่อการเกิดแคลลัส (Reinert and Bajaj 1977) 2,4-D เป็น auxin ที่มีประสิทธิภาพที่สุดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในจำพวกพืชใบเลี้ยงเดี่ยว Galston และคณะ (Reinert and Bajaj, 1977) อธิบายถึงผลของการเลี้ยงเนื้อเยื่อของธัญพืช (cereal plant) ว่า 2,4-D จะมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในกลุ่มของ auxin ที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชเหล่านี้สูงกว่าในพืชใบเลี้ยงคู่ทั่วไป นอกจากนั้น 2,4-D ที่ใช้มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชเหล่านี้สูงกว่าในพืชใบเลี้ยงคู่ทั่วไป นอกจากนั้น 2,4-D ยังถูกโดยทำลายเซลล์พืชได้ช้ากว่า auxin อื่นๆ (Gamborg and Wetter, 1975; Murashige, 1974, 1977, Reinert and Bajaj, 1977)

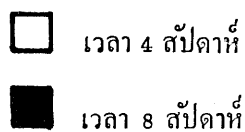
เนื้อเยื่อทั้งสองที่เลี้ยงในอาหารที่มี 1 หรือ 3mg/l ของ 2,4-D และ 1mg/l ของ 2,4-D ที่มีนิยามะพรวผสมอยู่จะก่อให้เกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัสดีกว่าอาหารที่มี 3 mg/l ของ 2,4-D และนิยามะพรวผสม เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ อาจเป็นเพราะว่าในอาหาร

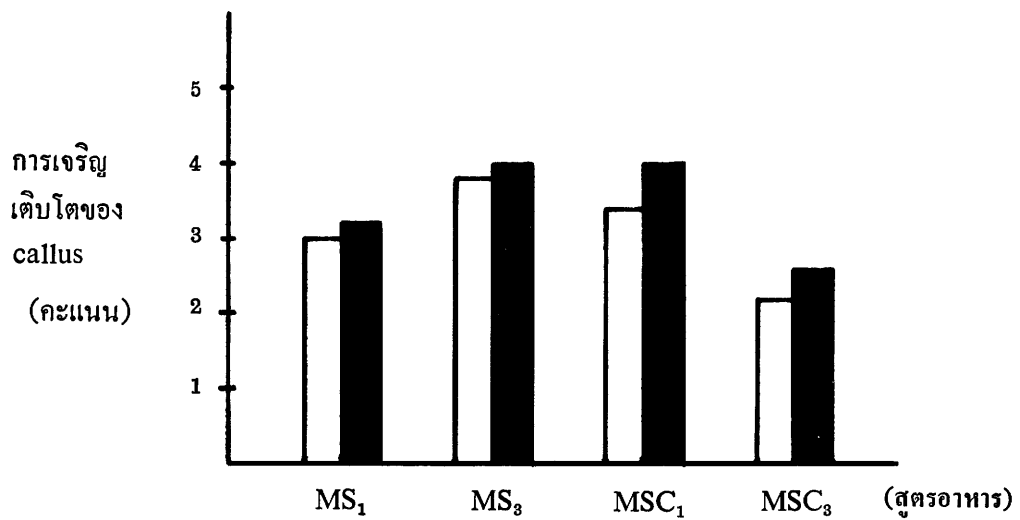


ภาพที่ 2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ callus ที่ได้จากการเลี้ยงส่วนปลายรากในอาหารสูตรต่างๆ ในที่มีแสงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ โดยเทียบเป็นคะแนน

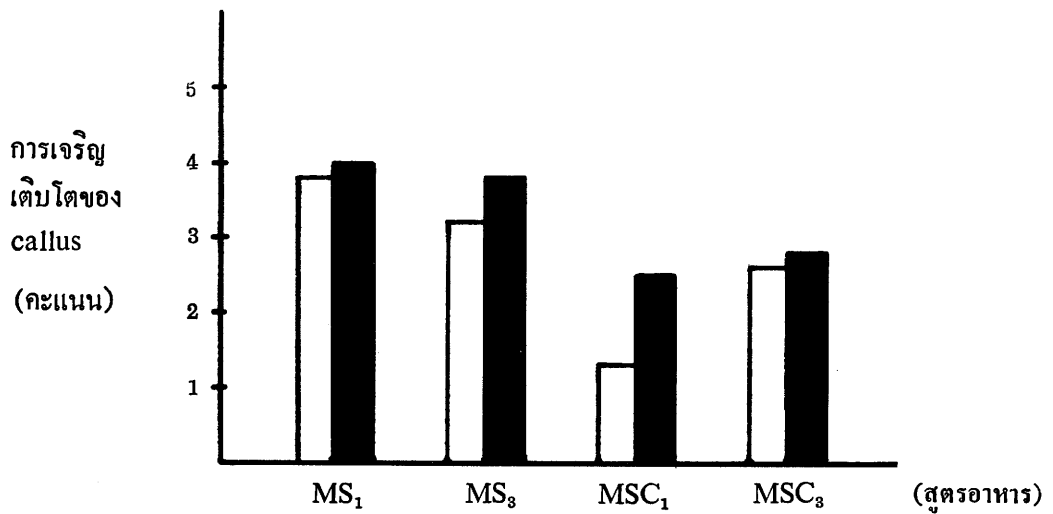


ภาพที่ 3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ callus ที่ได้จากการเลี้ยงส่วนปลายรากในอาหารสูตรต่างๆ ในที่มืดเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ โดยเทียบเป็นคะแนน

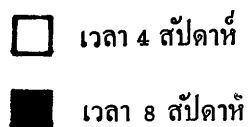




ภาพที่ 4 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ callus ที่ได้จากการเลี้ยงส่วน mesocotyl ในอาหารสูตรต่างๆ ในที่มีแสงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ โดยเทียบเป็นกะแนม



ภาพที่ 5 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ callus ที่ได้จากการเลี้ยงส่วน mesocotyl ในอาหารสูตรต่างๆ ในที่มีมืดเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ โดยเทียบเป็นกะแนม



ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสที่ได้จากปลายรากและ mesocotyl ในสูตรอาหารต่างๆ ทั้งในที่มืดและที่แสงจาก 4 ถึง 8 สัปดาห์ (เมื่อคิดเทียบให้คะแนนเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของแคลลัส เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ในแต่ละสูตรอาหารเป็น 100 เปอร์เซ็นต์)

ชิ้นส่วนพืช ที่ใช้เลี้ยง	สภาพในการ เลี้ยงเนื้อเยื่อ	เปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของแคลลัส			
		MS + 1 mg/l ของ 2, 4-D (MS ₁)	MS + 3mg/l ของ 2, 4-D (MS ₃)	MS + 1mg/l ของ 2, 4-D + 10%(v/v) cw (MSC ₁)	MS + 3mg/l ของ 2, 4-D + 10%(v/v) cw (MSC ₃)
ปลายราก	ที่แสง	76.9	90.9	144.4	8.3
	ที่มืด	14.2	65.0	68.0	0
mesocotyl	ที่แสง	6.6	5.2	17.6	18.1
	ที่มืด	5.2	18.7	92.3	7.6

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของแคลลัสจากจำนวนแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงปลายรากและ mesocotyl ในสูตรอาหารต่างๆ ทั้งในที่มืดและที่แสงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชิ้นส่วนพืช ที่ใช้เลี้ยง	สภาพในการ เลี้ยงเนื้อเยื่อ	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก			
		MS + 1mg/l ของ 2, 4-D (MS ₁)	MS + 3mg/l ของ 2, 4-D (MS ₃)	MS + 1mg/l ของ 2, 4-D + 10%(v/v) cw (MSC ₁)	MS + 3mg/l ของ 2, 4-D + 10%(v/v) cw (MSC ₃)
ปลายราก	ที่แสง	100	20	60	20
	ที่มืด	33.3	16.6	83.3	16.6
mesocotyl	ที่แสง	25	16.6	20	0
	ที่มืด	20	20	16.6	50

ที่มี 1 หรือ 3mg/1 ของ 2,4-D และ 1mg/1 ของ 2,4-D ที่ใช้น้ำมะพร้าวผสมมีความเหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัสมากกว่าในอาหารที่มี 3mg/1 ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าว

เมื่อดูเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งสองทั้งในที่มืดและที่แสงจาก 4 ถึง 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 1) ในอาหารที่มี 1mg/1 ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าวผสมมีเปอร์เซ็นต์สูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารซึ่งเป็น Cytokinin-like activities (Shan and Steward, 1952) อยู่เป็น growth-promoting factors ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย Cytokinin ที่ช่วยในด้านเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ (Culler and Wilson, 1954; Skoog and Miller, 1957) และอาจมีผลทางด้าน synergistic ต่อ 2,4-D ที่มีอยู่ในอาหารโดยที่ทำให้เซลล์ดูดซึม 2,4-D อยู่ในรูปแบบประโยชน์มากกว่า (Oi Lim Lau and Yang, 1973) หรืออาจช่วยให้ 2,4-D เข้าทำงานได้ดีกว่า (Imaseki et al. 1976) หรือการเจริญเติบโตของแคลลัสจะถูกกระตุ้นโดยสาร cytokinin-like activities หลังจากเกิดแคลลัสโดยการชักนำของ 2, 4-D (Reinert and Bajaj, 1977) ส่วนในอาหารที่มี 3mg/1 ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าวผสมจะมีเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโตน้อยกว่าเมื่อเทียบกับอาหารที่มี 3mg/1 ของ 2,4-D หรือ 1mg/1 ของ 2,4-D ที่ใช้น้ำมะพร้าวอาจจะมีผลเนื่องจากความเกี่ยวข้องกันระหว่างความเข้มข้นของ 2,4-D กับ cytokinin like-activities ในน้ำมะพร้าวโดยที่ 2,4-D ในความเข้มข้นต่ำจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่าในความเข้มข้นของ 2, 4-D ที่สูง ดังนั้นในอาหารที่มีความเข้มข้น 3mg/1 ของ 2,4-D จึงไม่จำเป็นที่น้ำมะพร้าว

ผสมอยู่ด้วย เพราะความเข้มข้น 3mg/1 ของ 2, 4-D นี้ 2, 4-D อาจจะทำหน้าที่เหมือน cytokinin หรือเข้าใจว่าการสังเคราะห์ cytokinin ในแคลลัสที่ 3mg/1 ของ 2,4-D มีปริมาณมากกว่าที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสโดยไม่ต้องอาศัย cytokinin-like activities จากน้ำมะพร้าว

การเจริญเติบโตของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งสองในอาหารในสภาพที่มืดและที่แสงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงปลายรากในอาหารที่มี 1 หรือ 3mg/1 ของ 2,4-D และแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยง mesocotyl ในอาหารที่มี 1mg/1 ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าว ในที่ที่แสงจะเจริญเติบโตดีกว่าในที่มืด (ภาพที่ 2,3,4,5) แสดงว่าแสงมีส่วนช่วยให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเช่นเดียวกับการทดลองของ Straus (1954) ส่วนแคลลัสที่ได้จากปลายรากที่เลี้ยงในอาหารที่มี 1 หรือ 3mg/1 ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าวและแคลลัสจาก mesocotyl ในอาหารที่มี 3mg/1 ของ 2,4-D และ 3mg/1 ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าวการเจริญเติบโตของแคลลัสไม่แตกต่างกันทั้งในที่มืดและที่แสงซึ่งจากรายงานของ Sheridan (1957) แคลลัสที่ได้จาก stem section ของข้าวโพดที่เลี้ยงในอาหารของ Linsmaier และ Skoog (LS) ที่มี 4mg/1 ของ 2,4-D การเจริญเติบโตของแคลลัสไม่แตกต่างกันทั้งในที่มืดและที่แสง Lonz และคณะ (1977) พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยง mesocotyl ในสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (MS) ที่มี 2-2.5 mg/1 ของ 2,4-D การเจริญเติบโตของแคลลัสก็ไม่แตกต่างกันในที่มืดและที่แสงในอาหารที่มี 1mg/1 ของ 2,4-D แคลลัสจาก mesocotyl ในที่มืดจะเจริญเติบโตดีกว่าในที่ที่แสงซึ่งตรงข้ามกับแคลลัสที่ได้จากปลายรากอาจจะเป็นว่าชนิดของเนื้อเยื่อมีส่วนเกี่ยวข้องกับสภาพ

หมดและที่แสงโดยมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน และผลของแสงและความมืดต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารที่มี 1 หรือ 3mg/l ของ 2,4-D และ 1 หรือ 3mg/l ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าวทำให้ผลต่างกันเนื่องจากสูตรอาหารที่ใช้มีความแตกต่างกัน (Murrashige, 1974)

แคลลัสที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้งสองที่เลี้ยงในอาหารที่มี 1 หรือ 3mg/l ของ 2,4-D และ 1 หรือ 3mg/l ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าวยังสามารถเกิดเป็นรากได้ทั้งในสภาพมืดและที่แสง เนื่องจากความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้อยู่ในระดับที่สามารถกระตุ้นให้เกิดเป็นรากได้ หรืออัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin ในแคลลัสอยู่ในระดับสูงซึ่งskoog และ Miller (1957) ได้อธิบายถึงอัตราส่วนของสารทั้งสองที่มีผลต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อว่าถ้าอัตราส่วนอยู่ในระดับสูงจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดเป็นแคลลัสและราก ถ้าอัตราส่วนอยู่ในระดับต่ำจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดเป็นต้น รากที่เกิดขึ้นจะเกิดขยายขนาดขึ้นและมีแคลลัสเกิดขึ้นบนรากก็เนื่องจากผลของ 2,4-D ที่มีอยู่ในอาหาร โดยจะยับยั้งการขยายตัวของรากและชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสอีก เมื่อดูเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากจำนวนแคลลัสที่ได้ (ตารางที่ 2) จะเห็นว่าในอาหารที่มี 1mg/l ของ 2,4-D หรือที่น้ำมะพร้าวจะมีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าในอาหารที่มี 3mg/l ของ 2,4-D หรือที่น้ำมะพร้าวอาจเป็นเพราะว่าที่ 1mg/l ของ 2,4-D มีความเหมาะสมต่อการเกิดรากดีกว่าที่ 3mg/l ของ 2,4-D

สำหรับรากที่เกิดจากเนื้อเยื่อ mesocotyl เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D แล้วเกิดเป็นราก เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ อาจเนื่องจากว่าเนื้อเยื่อที่ตัดมายังมีส่วนของ meristem ซึ่งจะเจริญเป็นจุดกำเนิดของราก (root initiation)

หรือมีจุดกำเนิดรากรวมอยู่ด้วยเมื่อเลี้ยงบนอาหารจะเจริญกลายเป็นรากและต่อมาจะเกิดขยายขนาดแล้วมีแคลลัสเกิดขึ้นบนรากเนื่องจากผลของ 2,4-D ในอาหารนั่นเอง

สรุป

1. เนื้อเยื่อข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่มี 1 หรือ 3mg/l ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าว คือส่วนปลายราก mesocotyl

2. ในอาหารที่มี 1 หรือ 3mg/l ของ 2,4-D และ 1mg/l ของ 2,4-D ที่น้ำมะพร้าวผสมอยู่จะก่อให้เกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัสดีกว่าอาหารที่มี 3mg/l ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าว

3. การเจริญเติบโตของแคลลัสที่ได้จากปลายรากในอาหารที่มี 1 หรือ 3 mg/l ของ 2,4-D ในที่มืดจะดีกว่าในที่แสงและแคลลัสที่ได้จาก mesocotyl ในอาหารที่มี 1 mg/l ของ 2,4-D ในที่มืดจะดีกว่าในที่แสง ส่วนในอาหารที่มี 1mg/l ของ 2,4-D และน้ำมะพร้าวในที่แสงจะดีกว่าในที่มืด

4. ในอาหารที่น้ำมะพร้าวใช้ร่วมกับ 1mg/l ของ 2,4-D เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของแคลลัสจะเพิ่มขนมากกว่าเมื่อใช้ร่วมกับ 3 mg/l ของ 2,4-D และในอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าว น้ำมะพร้าวไม่มีความจำเป็นต้องใช้ร่วมในอาหารที่มี 3mg/l ของ 2,4-D

5. รากที่เกิดขึ้นในอาหารที่มี 1mg/l ของ 2,4-D หรือร่วมกับน้ำมะพร้าวเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจะมีมากกว่าในอาหารที่มี 3 mg/l ของ 2,4-D หรือร่วมกับน้ำมะพร้าว

เอกสารอ้างอิง

Culter, V.M.S. and K.S. Wilson.
1954. Effects of coconut endosperm and other growth stimulants upon

- the development *in vitro* of embryo of *Cocos nucifera*. *Bot. Gaz.* 115 : 234-240.
- Davidonis, G. H., R. H. Hamilton and R. O. Mumma. 1978. Metabolism of 2, 4-Dichlorophenoxy-acetic acid in soybean root callus and differentiated soybean root cultures as a function of concentration and tissue age. *Plant Physiol.* 62:80-80
- Einset, J. W. 1977. Two effects of cytokinin on the auxin requirement of tobacco callus cultures. *Plant Physiol.* 59 : 45-47.
- Green, C.E., R.L. Phillip and R.A. Kleese. 1974. Tissue cultures of maize (*Zea mays* L.) : Induction, maintenance and organic growth factors. *Crop Science.* 14 : 54-57.
- Green, C.E. and R.L. Phillip. 1975. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science.* 15 : 417-421.
- Gamborg, O.L. and L.R. Wetter. 1975. Plant tissue culture method. Ottawa, Ontario, 1-40.
- Imaseki, H.K., K. Sodawara and A. Watanabe. 1976. Action of plant hormones in ethylene production. *9th Int. Conf. on plant growth substances.* 157-159.
- Johnson, J.W. and D.J. Holden. 1974. Ultrastructure of callus tissue of *Zea mays*. *Can. J. Bot.* 52 : 251-254.
- Lonz, H., C.T. Harms, and I. Potrykus. 1977. Callus cultures of maize and oat with respect to plant regeneration. Friedelberg - Mierchen -Inst. Switzerland. 235-237.
- Mott, R.L. and W.W. Cure. 1978. Anatomy of maize tissue culture. *Physiol. Plant.* 42 : 139-145.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol* 25 : 135-166.
- Murashige, T. 1977. Current status of plant cell and organ cultures. *Hort-Science.* 12(2) 127-130.
- Oi-Lim Lau and S.F. Yang. 1973. Mechanism of a synergistic effect of kinetin on auxin-induced ethylene production. *Plant Physiol.* 51 : 1011-1014.
- Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. 1977. Plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 144-159.
- Straus, J. and C.D. Larue. 1954. Maize endosperm tissue growth *in vitro*. I. Cultural requirements. *Ann. J. Bot.* 41 : 687-694.
- Straus, J. 1954. Maize endosperm tissue growth *in vitro*. II. Morphology and Cytology. *Am. J. Bot.* 41 : 833-839.
- Straus, J. 1960. Maize endosperm tissue growth *in vitro*. III. Development of a synthetic medium. *Am. J. Bot.* 47 : 641-647.
- Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Sym. Soc. Exp. Biol.* 11 : 118-131.

- Shantz, E.M. and F.C. Steward. 1952. Coconut water factor; the growth promoting substances in coconut milk. *J. Ann. Chem. Soc.* 74 : 133-135.
- Sheridan, W. F. 1975. Tissue culture of maize I. Callus induction and growth. *Physiol. Plant.* 33 : 151-156.
- Torrey, J. G. 1977. Cytodifferentiation in cultured cell and tissues. *Hort-Science*, 12(2) 138-139.
- White P. R. 1951. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 2 : 231-240.