

การชักนำไซมาติคเอ็มบริโอในหญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash)

Somatic Embryo Induction in Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides* Nash) var. Songkhla 3

ลัดดาวัลย์ มุสิกะปาละ^{1/} และ สมปอง เตชะโต^{1/}
Laddawan Moosikapala^{1/} and Sompong Te-chato^{1/}

Abstract: Somatic embryo induction and maturation of vetiver grass var. Songkla 3 was carried out using calli established from young leaf. The calli were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various kinds and concentrations of plant growth regulators. MS supplemented with 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzyladenine (BA) at the same concentration (1 mg/l) gave the highest ratio (90.91%) and highest number of somatic embryo at globular stage (2.71 nodules/callus) and heart shape stage (2.56%). MS medium with reduced concentration (1/4MS) gave green spot on somatic embryo. Culturing embryogenic callus in solid medium for a week followed by MS liquid medium with 1 mg/l 2,4-D and 1,000 mg/l casein hydrolysate gave the highest somatic embryo from heart to torpedo shape at 26.79%

Keywords: Vetiver grass, somatic embryo, torpedo shape, 2,4-D, casein hydrolysate

^{1/}ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

^{1/}Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

บทคัดย่อ: นำใบอ่อนหญ้าแฝกจากต้นที่ดูแลในเรือนกระจกมาชักนำแคลลัส และส่งเสริมพัฒนาการไซมาติคเอมบริโอ โดยทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของธาตุอาหาร พบว่า อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ร่วมกับ BA (benzyladenine) ความเข้มข้น 1 มก./ล. เท่ากัน ส่งเสริมพัฒนาการของไซมาติคเอมบริโอระยะรูปกลมสูงสุด 90.91% จำนวนปมเฉลี่ยสูงสุด 2.71 ปม/ชิ้นส่วน รูปหัวใจสูงสุด 2.56% ส่วนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบธาตุอาหารเป็น 1/4 MS ชักนำให้เกิดไซมาติคเอมบริโอที่มีจุดสีเขียว การเพาะเลี้ยงเอมบริโอเจเนติกแคลลัสในอาหารแข็งเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ CH (casein hydrolysate) เข้มข้น 1,000 มก./ล. ส่งเสริมพัฒนาการของไซมาติคเอมบริโอระยะรูปหัวใจ-ทอริปีโดสูงสุด 26.79%

คำสำคัญ: หญ้าแฝก ไซมาติคเอมบริโอ ไซมาติคเอมบริโอระยะทอริปีโด 2,4-D casein hydrolysate

คำนำ

หญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides* Nash) มีรากแผ่กระจายลึก ลักษณะเป็นร่างแห ทำให้มีการนำมาใช้ในการอนุรักษ์ดินและน้ำ (Vietmeyer and Ruskin, 1993) นอกจากนี้รากของหญ้าแฝกยังสามารถใช้เป็นวัตถุติดในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ประดิษฐ์หัตถกรรมต่าง ๆ (Vietmeyer, 1996) เนื่องจากหญ้าแฝกบางชนิดไม่มีดอก ชนิดที่มีดอกก็ไม่สามารถขยายพันธุ์โดยเมล็ดเนื่องจากมีความงอกต่ำและสูญเสียความงอกได้เร็ว ในสภาพธรรมชาติ เมล็ดทั่วไปจะทิ้งให้แก่คารวงและจะค่อยหลุดร่วงไปโดยที่ส่วนใหญ่ได้สูญเสียความสามารถในการงอกไปแล้ว เมล็ดที่เหลืออยู่ก็แทบจะไม่มีโอกาสที่จะงอกได้นอกจากจะไปตกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมทันที เนื่องจากการงอกของเมล็ดหญ้าแฝกมีความอ่อนไหวต่อบัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ จึงสูญเสียความสามารถในการงอกได้ง่ายเมื่อประสบกับสภาพความแห้งแล้ง ลมแรง และแดดจัดแม้เพียงช่วงระยะเวลาสั้น ๆ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2541) ดังนั้นการขยายพันธุ์โดยทั่วไปทำโดยการแยกหน่อและแยกต้นแยกหน่อเพื่อปลูกในพื้นที่เป้าหมายโดยสำนักงานพัฒนาที่ดินเขตต่าง ๆ อย่างไรก็ตามยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยเพิ่มปริมาณได้มากในระยะเวลาสั้น สำหรับงานวิจัยหญ้าแฝกในสภาพปลอดเชื้อนั้นยังมีน้อยและเป็นการชักนำพืชต้นใหม่ผ่านการสร้าง compact callus

หรือกระบวนการ organogenesis จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ดอก (Nanakom *et al.*, 1998), ชิ้นส่วนใบ (Mucciarelli *et al.*, 1993; Leupin *et al.*, 2000) และจากยอด (crown) (Leupin *et al.*, 2000) และยังไม่มียางานการชักนำผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อน (embryogenesis) ซึ่งเป็นการเลือกหนึ่งในการเพิ่มปริมาณต้นให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น และยังใช้เป็นวัสดุเริ่มต้นที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ในการสร้างเมล็ดเทียม การปรับปรุงพันธุ์ หรือการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ต่อไป ในรายงานนี้จึงเป็นการศึกษาปัจจัยขั้นต้นในการชักนำและส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการของ embryogenic callus และเซลล์แขวนลอยของหญ้าแฝกได้แก่ ความเข้มข้นของธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต อาทิ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), dicamba, BA (benzyladenine), KN (kinetin), 2-iP (2-isopropanol), TDZ (thidiazuron), GA₃ (gibberellic acid) น้ำตาล PEG (polyethyleneglycol) กรดอะมิโนเชิงซ้อน (CH: casein hydrolysate) และ AD (adenine sulphate)

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้แคลลัสหญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากต้นในแปลงปลูกของคณะทรัพยากรธรรมชาติ โดยนำใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อ

ก่อนการเพาะเลี้ยง โดยล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 60 วินาที และสารละลายคลอริกซ์เข้มข้น 20% (มีสารออกฤทธิ์ไฮโปคลอไรท์ 1.01%) เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 5x5 มม. วางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มก./ล. ในที่มีดเป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำแคลลัสมาศึกษาการชักนำให้เป็นต้นอ่อน

การชักนำไซมาติคเอ็มบริโอ

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปอ่อนมาแบ่งให้มีขนาดประมาณ 3x3 มม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 1.0 มก./ล. CH หรือ AD ความเข้มข้น 0, 100, 200, 500, 750, 1,000 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3% วุ้นไฟต้าเจล 0.17% ในขวดขนาด 4.5x8.5 ซม. (เส้นผ่านศูนย์กลาง x ความสูง) ขวดละ 4 ชิ้น ในที่มีแสง 14 ชม./วัน อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบพัฒนาการของแคลลัส โดยดูการสร้างปมหรือโครงสร้างของต้นอ่อน

ในการส่งเสริมพัฒนาการของไซมาติคเอ็มบริโอ นั้นทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ โดยนำกลุ่มแคลลัสที่มีเอ็มบริโอในระยะรูปกลม มาตัดแยกให้มีขนาดประมาณ 3x3 มม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA, KN, TDZ หรือ 2-iP ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก./ล. วุ้นทรานนาจ็อก เข้มข้น 0.75% ในขวดฝาเกลียวขนาด 2.5x9.5 ซม. ขวดละ 2 ชิ้น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขวด ในที่มีแสง 14 ชม./วัน อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบพัฒนาการของแคลลัส ในการสร้างปมหรือโครงสร้างของต้นอ่อน ศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารสูตร MS (1/4, 1/2, 3/4 หรือ 1MS) นอกจากนี้ เพาะเลี้ยง embryogenic cell ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ CH เข้มข้น 1,000 มก./ล. เป็นปริมาตร 30 มล./ขวด โดยใช้ปริมาณแคลลัส 0.3 กรัม เพาะเลี้ยงใน

ห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที แต่ละอายุทำการเพาะเลี้ยง 4 ขวด เปรียบเทียบอายุของแคลลัสที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ทำการกรองคัดแยกขนาด และมีการเติม BA และตรวจสอบพัฒนาการในการสร้างปมหรือโครงสร้างของต้นอ่อนหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของ CH หรือ AD ร่วมกับ 2,4-D หรือ dicamba ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของแคลลัส พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D และ CH ส่งเสริมพัฒนาการของแคลลัสดีกว่าอาหารที่เติม 2,4-D และ dicamba หรืออาหารที่เติม AD ร่วมกับ 2,4-D หรือ dicamba โดยอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ CH เข้มข้น 1000 มก./ล. มีการสร้างเอ็มบริโอระยะรูปกลม สูงสุด 70% จำนวนปมเฉลี่ย 4 ปม/ชิ้นส่วน (ตารางที่ 1)

การเพาะเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ คือ KN, BA, TDZ และ 2-iP ที่มีความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก./ล. พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ให้พัฒนาการของแคลลัสดีกว่าสารชนิดอื่น ๆ คือมีลักษณะเป็นปมหรือโครงสร้างของต้นอ่อนในระยะรูปกลม (ภาพที่ 1A) โดย BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล. ให้อัตราการสร้างปมสูงสุด 90.91% จำนวนปมเฉลี่ยสูงสุด 2.71 ปม/ชิ้นส่วน (ตารางที่ 2) ส่วน 2,4-D ร่วมกับ KN, 2-iP หรือ TDZ ส่งผลให้แคลลัสมีลักษณะยาวหรือมีโครงสร้างของราก (ภาพที่ 1B) และเมื่อตรวจนับจำนวนแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นไซมาติคเอ็มบริโอ โดยนำแคลลัสมา 0.3 กรัมแช่น้ำกลั่นปริมาตร 25 มล. และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo พบว่า มีเซลล์ในระยะรูปกลม และระยะรูปหัวใจใกล้เคียงกันในอาหารที่เติม BA 1 หรือ 2 มก./ล. (ตารางที่ 3)

Table 1 Effects of casein hydrolysate, adenine sulphate in combination with 1 mg/l 2,4-D or dicamba on percentage of callus forming nodule and number of nodule after 4 weeks of culture.

Additives (mg/l)	Nodular calli (%)	
	2,4-D	dicamba
0 (Control)	55.56 (2.6)	33.33 (2)
100 CH	50 (2.0)	33.33 (2.0)
200 CH	70 (2.71)	66.67 (1.75)
500 CH	40 (3.5)	16.67 (1.0)
750 CH	70 (2.14)	20.0 (1.0)
1,000 CH	70 (4.0)	40 (1.5)
100 AD	50 (1.6)	0
200 AD	10	0
500 AD	0	0
750 AD	0	0
1,000 AD	0	0

Note: number in parenthesis is the number of nodules.

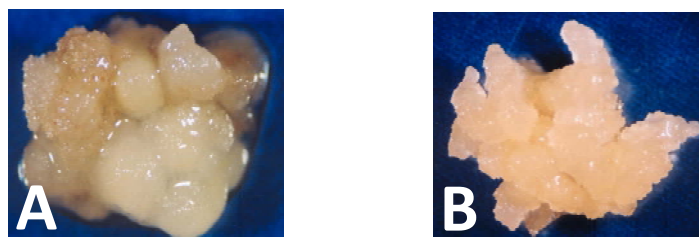


Figure 1 Nodular callus (A) and rooting callus (B) on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and various cytokinins after 4 weeks of culture.

Table 2 Effects of cytokinin in combination with 1 mg/l 2,4-D on somatic embryo formation and number of somatic embryos per callus clump after 4 weeks of culture.

Cytokinin (mg/l)		Nodular calli (%)	Number of nodules/callus	Rooting calli (%)	Number of roots/callus
BA	1	90.91	2.71	0	0
	2	75.00	1.83	0	0
KN	1	2.50	1.00	5.00	1.00
	2	0	0	2.50	0.50
2-iP	1	20.00	1.36	7.50	0.67
	2	12.50	1.00	0	0
TDZ	1	12.50	2.00	15.00	1.33
	2	14.24	1.25	23.96	1.30

Table 3 Numbers of globular and heart shape embryos appeared on the media containing various cytokinins in combination with 1 mg/l 2,4-D after 4 weeks of culture.

Cytokinin (mg/l)		Number of globular shape embryos	Number of heart shape embryos
BA	1	3.45	2.56
	2	4.20	2.58
KN	1	0	0
	2	0	0
2-iP	1	1.00	1.00
	2	1.00	1.00
TDZ	1	1.20	1.00
	2	1.00	0

เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก./ล. เป็นเวลา 3 เดือน แล้วทำการชั่งน้ำหนักสดเปรียบเทียบพบว่า แคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากัน คือ 0.415 กรัม/ชิ้นส่วน อย่างไรก็ตามเมื่อย้ายเลี้ยงไซมาติคเอมบริโอที่มีลักษณะรูปหัวใจ-ทอริปโดไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าไซมาติคเอมบริโอไม่มีการพัฒนาต่อไปเป็นยอดแต่มีโครงสร้างของรากเกิดขึ้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมให้มีการงอกของไซมาติคเอมบริโอ โดยลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลง จากการศึกษพบว่า แคลลัสยังคงมีโครงสร้างของรากใกล้เคียงกับเมื่อใช้ 2,4-D 1 มก./ล. ส่วนการสร้างปมก็มีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 4) นอกจากนี้การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ ได้แก่ NAA ร่วมกับ BA (ความเข้มข้น 0.1-1.0 มก./ล.), GA₃ (0.5-4

มก./ล.) หรือ PEG (0.5-10%) พบว่า แคลลัสยังคงมีโครงสร้างของรากสูงและเกิดอาการสีน้ำตาลและตายเป็นส่วนใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น (ไม่แสดงข้อมูล) การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารสูตร MS เป็น ¼ MS นั้นพบว่าแคลลัสมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นและมีจุดสีเขียว (4.17%) แต่พบการเกิดสีน้ำตาลค่อนข้างสูง (ตารางที่ 5, ภาพที่ 2) ทำนองเดียวกันอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ ให้แคลลัสที่มีความแข็งแรง และมีจุดสีเขียวมากกว่าอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA (ตารางที่ 6, ภาพที่ 3) และเมื่อทำการปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยลดความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับการเติม TDZ พบว่า การพัฒนาของ embryogenic callus ลดลง โดยมีการสร้างปมลดลงและมีการเกิดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 7)

Table 4 Effects of various concentrations of 2,4-D in combination with 1 mg/l BA on somatic embryo formation and number of somatic embryos per callus clump after 5 weeks of culture.

2,4-D (mg/l)	Nodular calli (%)	Number of nodules/callus	Rooting calli (%)	Number of roots/callus
0.1	2.5	1	7.5	0.88
0.5	38.75	1.51	7.5	0.88
1.0	38.75	2.06	8.75	1

Table 5 Effects of various strengths of MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 2,4-D on somatic embryogenesis after 4 weeks of culture.

strength of MS medium	Nodular calli (%)	Number of nodules/callus	Browning (%)	Callus	
				Characters	color
1/4	18.06	1.68	33.33	very compact	yellow with green spots
1/2	12.50	1.00	13.89	compact	yellow
3/4	9.72	1.75	19.44	compact	yellow
1	8.34	1.33	36.11	friable	yellow

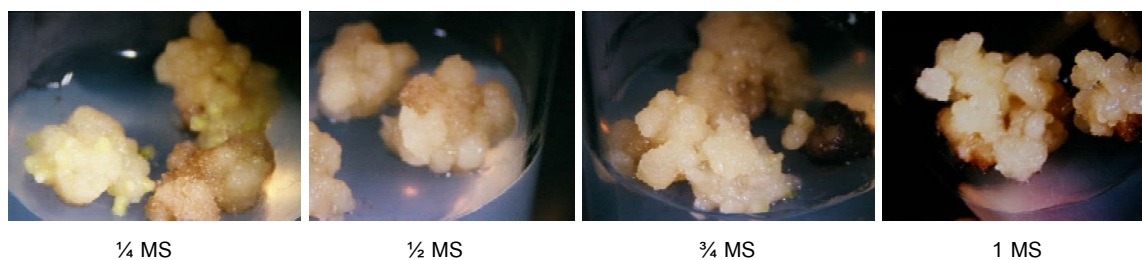


Figure 2 Nodular calli on various strengths of MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 2,4-D after 4 weeks of culture.

Table 6 Effects of various concentrations of BA or TDZ supplemented with 1 mg/l 2,4-D on somatic embryogenesis after 4 weeks of culture.

2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)	TDZ (mg/l)	Nodular calli (%)	Number of nodules/callus	Browning (%)
1	0	0	36.25	1.59	0.00
1	1	0	53.00	2.76	26.00
1	2	0	73.75	2.92	17.50
1	3	0	45.00	2.17	37.94
1	4	0	51.5	1.88	38.75
1	0	0.1	23.75	0.93	9.75
1	0	0.25	18.75	0.68	29.17
1	0	0.5	36.25	1.43	26.25
1	0	1	33.25	1.27	28.50

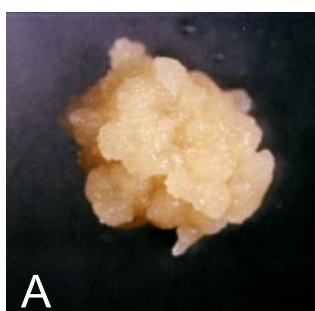


Figure 3 Nodular callus cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l BA and 1 mg/l 2,4-D (A) 0.1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l TDZ (B) after 4 weeks of culture.

Table 7 Effects of various concentrations of 2,4-D in combination with 0.5 mg/l TDZ on somatic embryogenesis after 4 weeks of culture.

2,4-D (mg/l)	TDZ (mg/l)	Nodular calli (%)	Number of nodules/callus	Rooting calli (%)	Number of roots/callus	Browning (%)
0.1	0	20.00	0.73	12.50	0.43	33.75
0.5	0	15.00	0.46	3.75	0.20	6.25
1.0	0	33.75	1.10	0.0	0.00	11.25
0.1	0.5	21.75	0.94	1.25	0.05	53.75
0.5	0.5	20.00	0.90	0.00	0.00	37.50
1.0	0.5	28.75	0.73	0.00	0.00	16.25

ในส่วนของการพัฒนาการของไซมาติคเอ็มบริโอในอาหารเหล่านั้น พบว่า การกรองแยกขนาดของเซลล์ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตหรือพัฒนาการของเซลล์ การไม่กรองแยกขนาดเซลล์ให้พัฒนาการดีกว่า ซึ่งจากการย้ายเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ CH เข้มข้น 1,000 มก./ล. พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโต และพัฒนาการค่อนข้างดี กลุ่มเซลล์พัฒนาให้เอ็มบริโอในระยะรูปกลม และพบบางกลุ่มเซลล์ที่มีการพัฒนาต่อในระยะหัวใจ (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตามเมื่อย้ายเอ็มบริโอในระยะดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่มีการงอกหรือพัฒนาเป็นต้น แต่มีการพัฒนาเป็นรากแทน และจากการศึกษาการเติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ 2,4-D

การเติม BA ความเข้มข้น 3 มก./ล. ให้พัฒนาการของเซลล์ในระยะรูปกลมและระยะรูปหัวใจ หรือทอริปีโด สูงสุด 13% และ 12.6 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวต่ำกว่าการไม่เติม BA (ตารางที่ 8)

จากการเปรียบเทียบอายุของ embryogenic callus ที่ย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ CH เข้มข้น 1,000 มก./ล. เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เป็นระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า embryogenic callus ที่ย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีพัฒนาการดีที่สุดโดยอยู่ในระยะรูปหัวใจ-ทอริปีโด 26.79% หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 9)

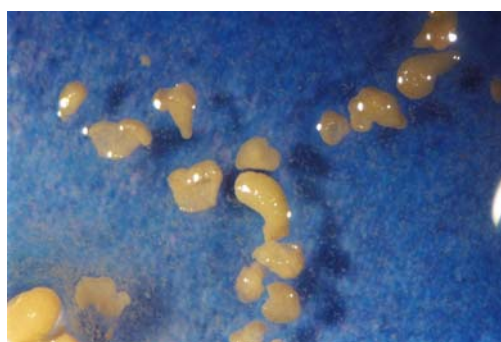


Figure 4 Embryos at various stages of development after 4 weeks of culture in liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 1,000 mg/l CH.

Table 8 Effects of various concentrations of BA on development of somatic embryo after 4 weeks of culture in liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 1,000 mg/l CH.

BA (mg/l)	Globular shape embryos (%)	Heart-torpedo shape embryos (%)
0	19.15	13.11
1	9.54	12.54
2	4.53	7.02
3	13.0	12.60
4	4.14	11.60

Table 9 Effects of ages of embryogenic calli on development of somatic embryos in liquid MS medium with 1 mg/l 2,4-D and 1,000 CH at various times of culture.

Age (weeks)	Globular-shape embryos (%)				Heart-torpedo-shape embryos (%)			
	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk
1	0	6.02	5.04	1.07	0.65	1.83	8.8	26.79
2	4.09	2.3	0	0	4.94	16.61	9.69	9.13
3	0	0.44	0	0	4.94	11.42	15.22	9.09
4	0.13	0.15	0	0	12.58	11.25	7.74	9.79

วิจารณ์

จากการศึกษาอาหารสูตร MS ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน 2 ชนิด คือ 2,4-D หรือ dicamba พบว่า อาหารเติม 2,4-D ส่งเสริมการสร้างปมของแคลลัสสูงกว่า dicamba การเติม 2,4-D ร่วมกับ CH ส่งเสริมการสร้างปมของแคลลัสสูงกว่า AD ดังนั้นการชักนำไซมาติคเอ็มบริโอในระยะเริ่มต้นส่งเสริมได้ด้วยการเติมออกซินในรูป 2,4-D สอดคล้องกับการรายงานของ Wang *et al.* (2003) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 22.6 μ M ส่งเสริมการสร้าง embryogenic callus จาก caryopsis และ mature embryo ของ wheatgrass สูงสุด 3.1% Pareek and Kothari (2003) รายงานการใช้อาหารเหลวที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล. ซึ่งให้อัตราการ

สร้างไซมาติคเอ็มบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนใบของไม้ดอก *Dianthus* สูงสุด 85% ในขณะที่ Te-chato *et al.* (2003) รายงานว่า อาหารเติม dicamba 1 มก./ล. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของแคลลัสปาล์มน้ำมัน แสดงให้เห็นว่าพืชต่างชนิดกันมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

การสร้างไซมาติคเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่มักจะสร้างในอาหารเติมหรืออาหารที่ลดความเข้มข้นของสารควบคุมลง หรือผ่านการย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ซึ่ง Suzuki *et al.* (2002) ประสบความสำเร็จในการชักนำเอ็มบริโอจากแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบจากนอกหลอดทดลองของ lily of the Nile (*Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*) ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และชักนำการงอกเป็นพืช

ต้นใหม่ได้ในอาหารที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งภายใต้การให้แสงที่ความเข้มแสง $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ในขณะที่ Sahrawat and Chand (2004) รายงานว่าอาหารสูตร MSB ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลักและรองของสูตร MS และวิตามินและกรดอะมิโนของสูตร B5 ที่เติม NAA เข้มข้น $0.11 \mu\text{M}$ ร่วมกับ BA เข้มข้น $8.8 \mu\text{M}$ ส่งเสริมให้เอมบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยง coleoptile ของข้าวบาร์เลย์มีการพัฒนาเป็นต้นได้ Wang *et al.* (2003) ชักนำให้เกิดต้นจาก embryogenic cell ในสภาพแขวนลอย โดยย้ายกลุ่มเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น $9.1 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม KN เข้มข้น $0.9 \mu\text{M}$ ส่วน Ipekci and Gozukirmizi (2003) ชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอจากชิ้นส่วนใบของ *Paulownia elongata* ได้สูงสุดถึง 69.8% ในอาหารสูตร MS ที่เติม CH เข้มข้น 500 มก./ล. และ TDZ เข้มข้น 10 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจาก TDZ เพื่อส่งเสริมพัฒนาการของเอมบริโอและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

การปรับความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นแนวทางหนึ่งในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของแคลลัส Leupin *et al.* (2000) รายงานการเติม 2,4-D ร่วมกับ BA ว่าช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ compact callus ในหญ้าแฝกพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างดอก ทำนองเดียวกันในการศึกษานี้เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ พบว่า การเติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1-2 มก./ล. ส่งเสริมการสร้างปมและพัฒนาในระยะรูปหัวใจ-ทอริปโดสูงกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการย้ายเลี้ยงโซมาติคเอมบริโอที่มีลักษณะรูปหัวใจ-ทอริปโดไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าโซมาติคเอมบริโอไม่มีการพัฒนาต่อไปเป็นยอด แต่มีโครงสร้างของรากเกิดขึ้น จึงได้ศึกษาการปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยลดความเข้มข้นของ 2,4-D และเพิ่มความเข้มข้นของไซโตไคนิน จากการศึกษา พบว่าแคลลัสยังคงมีโครงสร้างคล้ายรากมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ส่วนแคลลัสที่มีโครงสร้างคล้ายปมมีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้มีการเติมสารชนิดอื่นเพื่อส่งเสริมให้มีการพัฒนาของโซมาติคเอมบริโอซึ่งมีรายงานความสำเร็จใน *Dianthus* 3 ชนิดในอาหารสูตร MS ที่เติม CH เข้มข้น 200 มก./ล. แล้วส่งเสริมให้งอกเป็นพืชต้นใหม่ในอาหารที่เติม GA_3 เข้มข้น 1 มก./ล. (Pereek and Kothari, 2003) และมีการเติม NAA ในการเลี้ยง *Dianthus caryophyllus* (Yantcheva *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า การเติม NAA ร่วมกับ BA (ความเข้มข้น 0.1-1.0 มก./ล.), GA_3 (0.5-4 มก./ล.) หรือสร้างความสำเร็จโดยเติม PEG (0.5-10%) ส่งเสริมแคลลัสที่มีโครงสร้างคล้ายรากสูง มีสีน้ำตาล และตายเป็นส่วนใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น (ไม่แสดงข้อมูล) นอกจากนี้การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารสูตร MS เป็น 1/4 พบว่าแคลลัสมีลักษณะแข็งเพิ่มขึ้นและมีจุดสีเขียวซึ่งคาดว่าเป็นโครงสร้างของยอด อย่างไรก็ตามพบการเกิดสีน้ำตาลค่อนข้างสูง และไม่มีการพัฒนาเป็นต้น ทำนองเดียวกันอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ ให้แคลลัสที่มีโครงสร้างแข็งและมีจุดสีเขียว มากกว่าอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA และเมื่อทำการปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยลดความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับการเติม TDZ พบว่า การพัฒนาของ embryogenic callus ลดลงโดยมีการสร้างปมต่ำกว่าสูตรปกติและเกิดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นและตายลงเมื่อย้ายเลี้ยงต่อไป

จากการทดลองนี้แม้ว่าโซมาติคเอมบริโอของหญ้าแฝกไม่สามารถชักนำให้มีการงอกเป็นต้นได้ การย้ายเลี้ยงอย่างสม่ำเสมอในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. ร่วมกับ CH 1,000 มก./ล. นี้ส่งเสริมพัฒนาการของเอมบริโอเข้าสู่ระยะรูปหัวใจ-ทอริปโดได้ในการศึกษาต่อไปเพื่อส่งเสริมการงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ควรปรับความเข้มข้นของ CH ร่วมกับการเติม 2,4-D แล้วย้ายไปชักนำการงอกในอาหารแข็งที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงเป็น 1/4 เติม CH ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ BA ร่วมกับ GA_3 ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่ต่อไป

สรุป

การเพาะเลี้ยง embryogenic callus หญ้าแฝกในอาหารเลี้ยงสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มก./ล. ชักนำไซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปกลมสูงสุด 90.91% จำนวนปมเฉลี่ยสูงสุด 2.71 ปม/ชิ้นส่วน ระยะรูปหัวใจสูงสุด 2.56% ส่วนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิค แคลลัสในอาหารเลี้ยงสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มก./ล. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ CH เข้มข้น 1,000 มก./ล. ให้เซลล์เดี่ยวๆ และส่งเสริมพัฒนาการของไซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปหัวใจ-ทอริปโดสูงสุด 26.79% อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถชักนำให้มีการออกเป็นต้นได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมให้ไซมาติคเอ็มบริโอออกเป็นต้น โดยอาจจะเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงเป็น 1/4 ร่วมกับการเติม CH และสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด และความเข้มข้นต่างๆ เช่น BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ BA ร่วมกับ GA₃

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2541. ความรู้เรื่องหญ้าแฝก. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 115 หน้า.

Ipekci, Z. and N. Gozukirmizi. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. Plant Cell Reports 22: 16-24.

Leupin, R.E., M. Leupin, C. Ehret, K.H. Erismann and B. Witholt. 2000. Compact callus induction and plant regeneration of a non-flowering vetiver from Java. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62: 115-123.

Mucciarelli, M., M. Gallino, S. Scannerini and M. Maffei. 1993. Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 267-271.

Nanakorn, M., S. Surawattananon, C. Wongwattana, K. Namwongprom and S. Suwannachitr. 1998. *In vitro* induction of salt tolerance in grass (*Vetiveria zizanioides* Nash). J. Weed Sci. Tech. 43: 134-137.

Pareek, A. and S.L. Kothari. 2003. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. Scientia Horticulturae 98: 449-459.

Sahrawat, A. K. and S. Chand. 2004. High frequency plant regeneration from coleoptile tissue of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science 167: 27-34.

Suzuki, S., M. Oota, and M. Nakano. 2002. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton: Histological study and response to selective agents. Scientia Horticulturae 95: 123-132.

Te-chato, S., H. Aslan and Y. Ibrohem. 2003. Improve callus induction and embryogenic callus formation from culture young leaves of oil palm seedling. Thai J. Agric. Sci. 35: 407-143.

Vietmeyer, N. D. 1996. Organizing vetiver's next steps to global acceptance. pp. 18-26. In: N. Chomchalow and H.V. Henle (eds.). Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass. The Chaipattana Foundation, Bangkok.

Vietmeyer, N. D. and F. R. Ruskin. 1993. Vetiver Grass: A Thin Green Line Against Erosion. National Academy Press, Washington, D. C.

Wang, Z. Y., J. Bell and A. Hopkins. 2003. Establishment of a plant regeneration system for wheatgrasses (*Thinopyrum*, *Agropyron*

and *Pascopyrum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 265-273.

Yantcheva, A. A., M. Vlahova and A. Antanassov.
1998. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Cell Reports 18: 148-153.
