การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอและยอด จากการเพาะเลี้ยงใบโตเต็มที่ของแววมยุรา

Somatic Embryo and Shoot Formation *via* Mature Leaf Culture in *Torenia fournieri* Lind.

กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล*

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

Korn Koarapatchaikol*

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University,

Khuntalea, Muang, Suratthani 84100

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงใบที่โตเต็มที่แล้วของแววมยุรา (*Torenia fournieri* Lindl.) บนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม NAA และ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลปรากฏว่าเกิดแคลลัส ยอด ราก และโซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ ภายใต้อิทธิพลความเข้มข้นและอัตราส่วนของ NAA และ BAP อาหารที่เติม BAP อย่างเดียว (1.0, 3.0, 5.0 มก/ล) จะชักนำให้ใบที่เพาะเลี้ยงเกิดยอด 100 % โดยมีปริมาณยอดรวมเกิดขึ้นสูงสุดบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP 5.0 มก/ล (55.5±1.2) ส่วนอาหารที่เติม BAP 1.0, 3.0 และ 5.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 หรือ 0.5 มก/ล จะชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยมีปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอเกิดขึ้นสูงสุดจากใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP 5.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 มก/ล (59.2±3.7) ส่วนในอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว (0.1, 1.5, 3.0 มก/ล) จะเกิดรากและแคลลัส เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ายอดที่เกิดขึ้นบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP อย่างเดียวจะไม่มีราก ถ้าเติม BAP ความเข้มข้น 3.0 หรือ 5.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 หรือ 0.5 มก/ล ลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะชักนำให้ใบที่เพาะเลี้ยงเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ทั้งยอดและโซมาติกเอ็มบริโอมีจุดกำเนิดมาจากด้านบนของใบโดยไม่ผ่านระยะแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง ยอดเกิดรากเมื่อตัดย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่าน 200 มก/ล ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสามารถอนุบาลได้สำเร็จและเจริญเติบโตมีลักษณะปกติเหมือนต้นแม่ทุกประการ

คำสำคัญ : แววมยุรา; โซมาติกเอ็มบริโอ; ยอด; การเพาะเลี้ยงใบ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** kkoarapatchaikol@gmail.com

Abstract

Mature leaves of Torenia (*Torenia fournieri* Lind.) were cultured on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with various concentrations of NAA (α-naphthalene acetic acid) and BAP (N6-benzylaminopurine). Calluses, shoots, roots and somatic embryos occurred in different media, depending upon the ratios and concentrations of NAA and BAP. In the medium containing BAP alone (1.0, 3.0, 5.0 mg/l), explants were proliferated shoots reach to 100 %. The maximum shoots formation was obtained in the medium containing 5.0 mg/l BAP (55.5±1.2). Whereas somatic embryos were formed on the media containing 1.0, 3.0 and 5.0 mg/l BAP plus 0.1 or 0.5 mg/l NAA. The highest somatic embryos production was occurred on the medium containing both 5.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA (59.2±3.7). The media containing NAA singly (0.1, 1.5, 3.0 mg/l) resulted in explants rich in roots and calluses. Morphogenesis monitoring under the microscopes displayed that somatic embryos were formed in the media containing 0.1 or 0.5 mg/l NAA plus 3.0 or 5.0 mg/l BAP and significantly confirmed that the upper leaf side was the origin of the shoots. The somatic embryos occurred without intervening callus phase. Somatic embryos automatically developed to seedlings without changing the medium. Shoots were rooted in the MS medium containing 200 mg/l activated charcoal. *In vitro* derived plants were acclimatized successfully and grew with uniformity as mother plant.

Keywords: Torenia; somatic embryo; shoot; leaf culture

1. บทนำ

แววมยุรา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Torenia fournieri* Lindl. เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Scrophulariaceae เป็นพืชล้มลุกมีความสูงประมาณ 25-30 เซนติเมตร ใบรูปไข่ (ovate) เรียงแบบตรงกันข้าม (opposite) ขอบใบแบบฟันเลื่อย (serrate) โดยปกติดอกมีสีเหลืองและมีแถบสีม่วงบนกลีบดอก [1] แต่มีการปรับปรุงพันธุ์ทำให้มีความหลากหลายในลักษณะของสีดอกและลักษณะอื่น ๆ ที่แตกต่างกัน [2-4] พืชชนิดนี้นิยมปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับแบบไม้กระถางหรือกระเช้าแขวนตามบ้านเรือนและสำนักงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่มีสภาพอากาศหนาว เช่น ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และประเทศต่าง ๆ ในทวีปยุโรป เนื่องจากเป็นพืชที่ออกดอกหนาแน่นทำให้ดูโดดเด่นสะดุดตา ประวัติของแววมยุราพบว่ามีต้นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ เวียดนาม ไทย ลาว มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ดังนั้นแววมยุราจึงเป็นพืชประจำถิ่นดั้งเดิมของไทยชนิดหนึ่ง

แววมยุราเจริญเติบโตได้ดีในดินเกือบทุกชนิดที่อุดมสมบูรณ์ด้วยสารอินทรีย์ แต่ชอบขึ้นในที่มีร่มเงา (shading) หรือความเข้มแสงต่ำ ๆ จึงสามารถนำมาปลูกในกระถางและปลูกเลี้ยงในเรือนอนุบาลได้ แต่เป็นพืชที่เหี่ยวเฉาง่ายถ้าหากขาดน้ำและโดนแสงแดดจัดเกินไป ปกติแววมยุราขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด โดยเริ่มจากทำการเพาะเมล็ดในกระถางหรือกระบะดินในที่ร่มแล้วค่อย ๆ ย้ายไปเลี้ยงในที่มีความเข้มแสงเพิ่มขึ้นจนปลูกกลางโล่งแจ้งได้ นอกจากนี้ แววมยุรายังสามารถ

ขยายพันธุ์ได้ด้วยวิธีการปักชำ โดยการตัดกิ่งแล้วจุ่มแช่ด้านรอยตัดด้วยสารละลาย NAA (α-naphthalene acetic acid) หรือ IBA (indole butyric acid) ที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ [5] แล้วนำไปปักชำในวัสดุที่มีความชุ่มชื้นสูง เช่น ขุยมะพร้าว หรือพีทมอส (peat moss) หรือขุยมะพร้าวผสมพีทมอสในอัตราส่วน 1:1 นำไปวางเลี้ยงในเรือนอนุบาลหรือที่มีร่มเงาและแสงแดดอ่อน ๆ รดน้ำทุกวัน วันละครั้ง ประมาณ 15-30 วันจะเกิดรากสามารถย้ายปลูกในแปลงหรือภาชนะที่ต้องการได้ แต่วิธีการขยายพันธุ์แบบนี้มีข้อจำกัดเรื่องปริมาณกิ่งที่นำมาทำกิ่งพันธุ์ในกรณีจำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก รวมทั้งยังมีโอกาสแพร่กระจายโรคบางชนิดที่เกิดขึ้นในแววมยุราให้กว้างขวางขึ้น [6] จึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาขยายพันธุ์แวมยุรา โดยทดลองขยายพันธุ์จากลำต้นหรือกิ่ง [7,8] เพาะเลี้ยงใบอ่อน [9] รวมทั้งการศึกษาทางเซลล์วิทยาเกี่ยวกับการแบ่งเซลล์ ทำให้ทราบว่าการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการเพาะเลี้ยงกิ่งหรือลำต้นเกิดจากการแบ่งเซลล์ของเซลล์ผิวชั้นนอกของลำต้น [10, 11] ต่อมาศึกษาการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีเพื่อสร้างพันธุ์ใหม่ [2] การชักนำให้เกิดต้นเตตระพอลิพลอยด์ด้วยสารโคลชิซิน พบว่ามีภาวะเป็นหมัน (sterility) สูงกว่าต้นดิพลอยด์ [12] สิ่งที่น่าสนใจในการขยายพันธุ์แวมยุราโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การเพาะเลี้ยงใบ เพราะทราบกันดีว่าใบเป็นส่วนของพืชที่สามารถนำมาขยายพันธุ์ได้อย่างไร้ขีดจำกัดและไม่ทำลายต้นพืชเดิม อีกทั้งยังรักษาลักษณะเดิมไว้ได้ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงใบที่โตเต็มที่ (mature leaf) ให้เกิดต้นจำนวนมาก และอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด ศึกษาจุดกำเนิดและลักษณะการเกิดต้นจากใบในแววมยุรา

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อาหารเพาะเลี้ยงและสภาพการเพาะเลี้ยง

ต้นพืชทดลอง คือ แววมยุรา ได้มาจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อที่มีอายุ 3 เดือน เก็บใบที่โตเต็มที่แล้วที่มีขนาดใกล้เคียงกันใช้เป็นชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง (explant) โดยทดลองในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาคารศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อาหารเพาะเลี้ยงใช้สูตร MS [13] ปรับค่ากรด-ด่างเป็น 5.7 เติมวุ้น 8,000 มก/ล (มิลลิกรัม/ลิตร) บรรจุในขวด 4 ออนซ์ ขวดละ 20 มล (มิลลิลิตร) ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว สภาพห้องเพาะเลี้ยงปรับอุณหภูมิไว้ที่ 25$\pm$1 องศาเซลเซียส และให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence lamp) ด้วยเครื่องตั้งเวลาอัตโนมัติ (timer) 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์

2.2 การเพาะเลี้ยงใบ

นำต้นแววมยุราออกจากขวดในตู้ปลอดเชื้อแล้วใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดใบที่โตเต็มที่จากต้นแววมยุรานำลงเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม NAA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 มก/ล) ร่วมกับ BAP (0, 1.0, 3.0, 5.0 มก/ล) โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) รวม 20 สูตร สูตรละ 10 ซ้ำ ทำซ้ำ 1 ครั้ง ปิดฝาขวดให้แน่นก่อนนำไปวางเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เมื่อครบกำหนดจึงบันทึกผลการทดลอง

2.3 การชักนำให้เกิดราก การอนุบาล และย้ายปลูก

ตัดแยกยอดที่มีความยาว 3-10 ซม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น นำลงเพาะเลี้ยงโดยปักด้านรอยตัดให้จมลงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมผงถ่าน 200 มก/ล นำไปวางเลี้ยงให้เกิดรากในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน จะมีรากเกิดขึ้น เมื่อ

รากยาวและแข็งแรงแล้วจึงย้ายไปอนุบาลและปลูกลงกระถาง ส่วนโซมาติกเอ็มบริโอจะเกิดรากและต้นที่สมบูรณ์โดยไม่ต้องย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ เมื่อต้นกล้ามีความยาว 2-10 ซม สามารถย้ายไปอนุบาลได้

2.4 การตรวจลักษณะการเกิดต้นและโซมาติกเอ็มบริโอ

ในเบื้องต้น สุ่มเก็บตัวอย่างใบที่เพาะเลี้ยงทุกสัปดาห์ นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น SZH10 หลังจากนั้นเลือกชิ้นส่วนใบที่พบว่าเกิดต้นไปตรวจดูรายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ยี่ห้อ JEOL 5800LV โดยตรวจดูทั้งผิวใบด้านบนและผิวใบด้านล่างเพื่อหาจุดเริ่มต้นพัฒนาของต้นจากใบบนอาหารสูตรต่าง ๆ

2.5 การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

นับจำนวนใบที่เกิดต้น แคลลัส ราก และโซมาติกเอ็มบริโอ นำมาหาค่าร้อยละ และนับจำนวนยอดและโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้น นำมาหาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี LSD (least significance difference) ส่วนข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น ลักษณะการตอบสนองแบบต่าง ๆ ใช้วิธีสังเกตด้วยตาเปล่าและตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งแบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยวิธีการพรรณนาใช้ภาพถ่ายประกอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพาะเลี้ยงใบในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ

การตัดใบที่โตเต็มที่ (รูปที่ 1A) นำลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 60 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงโดยรวม 4 ลักษณะ กล่าวคือ เกิดยอด (shoot) โซมาติกเอ็มบริโอ แคลลัส (callus) และราก (root) การเกิดยอดจะเกิดขึ้นกับใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BAP อย่างเดียวหรือ BAP ร่วมกับ NAA 0.1 มก/ล โดยมีเปอร์เซ็นต์ใบที่เพาะเลี้ยงเกิดยอดสูงสุด 100 % ปริมาณการเกิดยอดรวมสูงสุดบนอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 5.0 มก/ล (55.5±1.2) ส่วนบนอาหารที่เติม BAP 3.0 และ 5.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 หรือ 0.5 มก/ล จะเกิดต้นเกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่นจำนวนมาก (รูปที่ 1F) และมีจำนวนต้นรวมสูงสุดบนอาหารที่เติม BAP 5.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 มก/ล (59.2±3.7) ส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมทั้ง NAA และ BAP หรือเติมเฉพาะ NAA เพียงอย่างเดียวจะไม่เกิดต้นเลย (0 %) ปริมาณการเกิดต้นจะลดลงถ้าเติม NAA ความเข้มข้น 1.0 หรือ 2.0 มก/ล ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่วนการเกิดแคลลัสของใบที่เพาะเลี้ยง พบว่าส่วนใหญ่เกิดขึ้นในอาหารที่เติม NAA อย่างเดียว หรือเติม NAA ความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 มก/ล ร่วมกับ BAP แคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้นสูงมีสีขาวและลักษณะฟู อาจพบแคลลัสสีน้ำตาลหรือเขียวเหลืองที่มีลักษณะฉ่ำน้ำ (watery callus) หรือเนื้อแน่น (compact callus) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม NAA เพียงอย่างเดียวหรือ NAA ต่ำ ๆ (0.1 หรือ 0.5 มก/ล) ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นสูง (3.0 หรือ 5.0 มก/ล) สำหรับการเกิดรากพบมากในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.5 มก/ล ถ้าความเข้มข้น 3.0 มก/ล จะเกิดรากสั้น จำนวนน้อย และส่งเสริมให้เกิดแคลลัสสีขาวฟูขนาดใหญ่ (ตารางที่ 1)

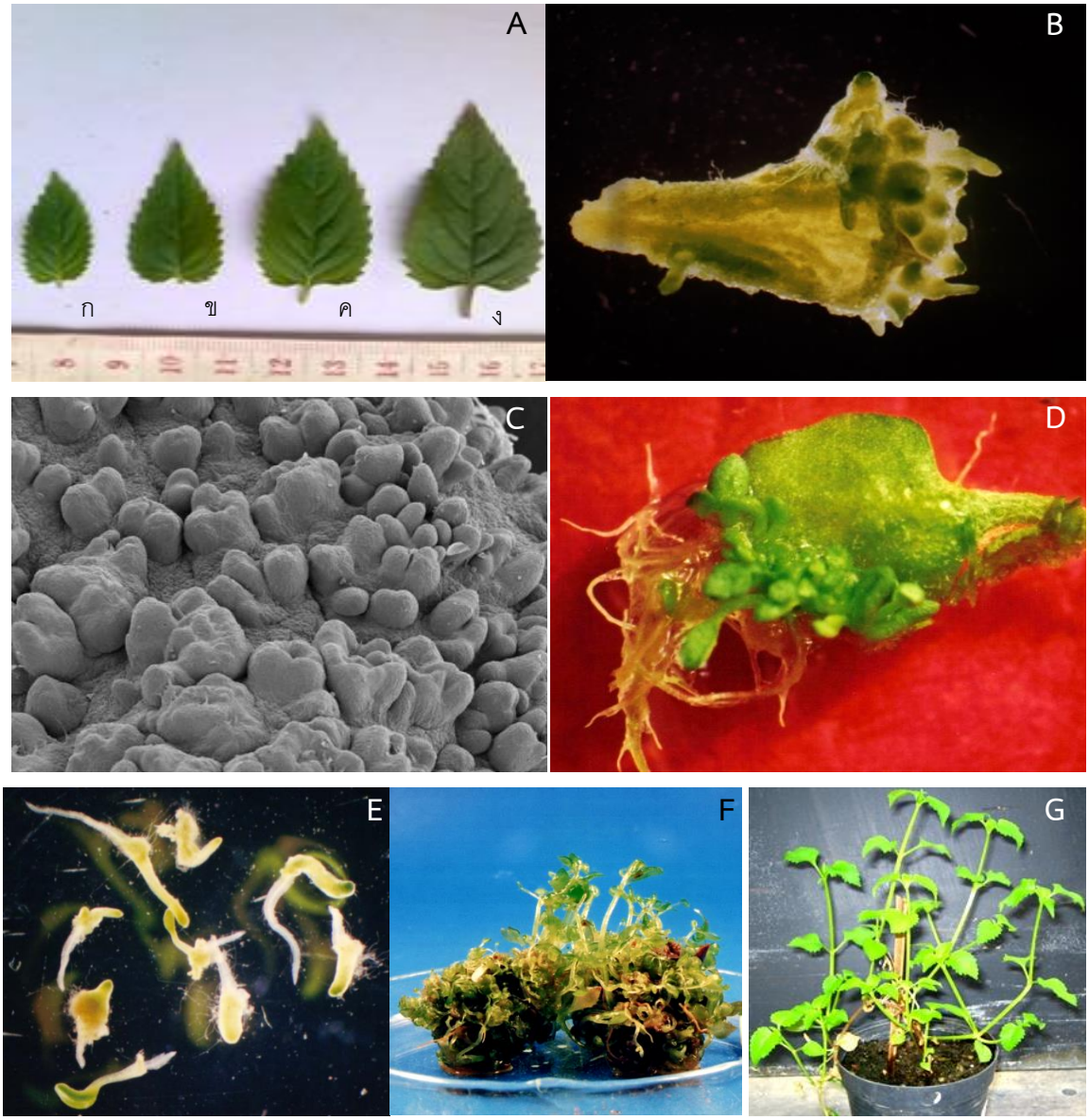
ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าใบที่โตเต็มที่แล้วของแววมยุราสามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นต้น ราก และแคลลัสได้เช่นเดียวกับใบอ่อน [9] ซึ่งน่าจะเกิดจากเซลล์ใบยังคงมีศักยภาพ (totipotentcy)

ตารางที่ 1 ผลของ NAA และ BAP ต่อการเพาะเลี้ยงใบที่โตเต็มที่ของแววมยุรา หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน

ความเข้มข้น (มก/ล)		แคลลัส (%)	เกิดยอด		เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ		เกิดราก (%)
NAA	BAP		ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	
0	0	0	0	0^{e}	0	0^{e}	0
	1.0	0	100	25.4 ± 3.9^{c}	0	0^{e}	0
	3.0	30	100	45.8 ± 2.5^{b}	0	0^{e}	0
	5.0	75	100	55.5 ± 1.2^{a}	0	0^{e}	0
0.1	0	0	0	0^{e}	0	0^{e}	20
	1.0	0	60	28.6 ± 2.6^{c}	40	14.3 ± 2.5^{d}	0
	3.0	0	0	0^{e}	100	44.7 ± 4.1^{b}	0
	5.0	0	0	0^{e}	100	59.2 ± 3.7^{a}	0
0.50	0	100	0	0^{e}	0	0^{e}	50
	1.0	100	0	0^{e}	100	30.7 ± 0.8^{c}	0
	3.0	15	0	0^{e}	100	35.4 ± 1.7^{c}	0
	5.0	0	0	0^{e}	100	37.5 ± 1.5^{c}	0
1.00	0	100	0	0^{e}	0	0^{e}	15
	1.0	50	0	0^{e}	0	0^{e}	0
	3.0	100	0	0^{e}	0	0^{e}	0
	5.0	100	0	0^{e}	10	10.2 ± 4.5^{d}	0
3.00	0	100	0	0^{e}	0	0^{e}	0
	1.0	20	0	0^{e}	0	0^{e}	80
	3.0	100	0	0^{e}	0	0^{e}	0
	5.0	100	0	0^{e}	0	0^{e}	0

LSD05 ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เช่นเดียวกับที่พบว่าเซลล์ผิวใบ (epidermis) ของ *Gaillardia picta* [14] และเซลล์คุมของ sugar beet [15] สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นต้นหรือโซมาติกเอ็มบริโอได้ จะแตกต่างกันบ้างที่แววมยุราสามารถเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยไม่ต้องผ่านระยะแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงลำต้น [8, 11] และเพาะเลี้ยงต้นกล้าของแววมยุรา [10] ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจาก BAP เป็นไซโทไคนิน (cytokinin) ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการทำให้เกิดยอดหรือหน่อจำนวนมาก จึงมีรายงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์พืชหลายชนิดทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว [16-19] และพืชใบเลี้ยงคู่ [20,21] เพราะสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนินมีบทบาทในการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของใบและลำต้น



รูปที่ 1 การเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงใบที่โตเต็มที่แล้วของแววมยุรา : (A) ใบขนาดต่าง ๆ (ก, ข, ค = ใบอ่อน และ ง = ใบที่โตโตเต็มที่), (B) เกิดตุ่มสีเขียวจำนวนมากบนหลังใบ, (C) รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมาก, (D) ต้นกล้าที่เกิดจากหลังใบโดยไม่ผ่านระยะแคลลัส, (E) โซมาติกเอ็มบริโอที่กำลังพัฒนาเป็นต้นกล้ามีรากแก้วเชื่อมต่อกับต้น, (F) ลุ่มต้นกล้าจำนวนมากที่พัฒนามาจากแคลลัส และ (G) ต้นกล้าที่ผ่านการอนุบาลและปลูกในกระถางเจริญเติบโตสมบูรณ์ปกติ

ซึ่งโดยปกติพืชสามารถสังเคราะห์ได้ทั้งออกซินและไซโทไคนิน เพื่อใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยพืชมีการควบคุมอัตราส่วนของสารดังกล่าวให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ [22] การเติม BAP ลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้มีปริมาณไซโทไคนินใน

เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงสูงมากกว่าออกซิน พืชจึงมีการแสดงออกโดยการเกิดใบและยอด และถ้าปริมาณ NAA ที่เติมในอาหารมากขึ้นจะทำให้อิทธิพลของออกซินเพิ่มมากขึ้นด้วย จะส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัสและรากและยับยั้งการเกิดยอด การเติมออกซินหรือไซโทไคนินลงในอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาณต่างกัน ทำให้มีอิทธิพลอย่างสำคัญในการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินในใบที่เพาะเลี้ยงของแววมยุรา [7,8,23] จะส่งผลให้เกิดต้น ราก หรือโซมาติกเอ็มบริโอ ปรากฏการณ์นี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยในพืชชนิดอื่น ๆ หลายชนิด [18,24,25]

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานการเกิดต้นแววมยุราจากใบ

การสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของใบแววมยุราที่เพาะเลี้ยงทุกสัปดาห์ด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าในสัปดาห์แรกใบจะเริ่มบวมพองและผิวด้านหลังใบมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ ทำให้รูปร่างใบเปลี่ยนไปในลักษณะต่าง ๆ โดยใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้นสูงร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่ำจะไม่มีการบิดเบี้ยวเปลี่ยนรูปทรงมากเหมือนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP หรือ NAA ความเข้มข้นสูง (3.0 และ 5.0 มก/ล) เพียงอย่างเดียว ในสัปดาห์ที่ 2-3-4 จะสังเกตเห็นผิวใบมีลักษณะขรุขระ เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สะเตอริโอจะเห็นตุ่มสีเขียวจำนวนมากบริเวณด้านหลังใบ (รูปที่ 1B) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีกำลังขยายสูง พบว่ามีตุ่มเกิดขึ้นจำนวนมาก และส่วนบนของตุ่มมีลักษณะกลมหรือตรงกลางบุ๋มมีขอบ 2-3 แฉก (รูปที่ 1C) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 5-6-7 จะพบว่าตุ่มเหล่านี้มีรูปร่างยืดยาวขึ้นและมีใบอ่อนเล็ก ๆ ปรากฏให้เห็นด้วยตาเปล่า ระยะนี้พบว่าใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP 3.0 หรือ 5.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 หรือ 0.5 มก/ล มีทั้งรากและใบปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน (รูปที่ 1D) เมื่อทำการแยกต้นกล้าที่เกิดขึ้นเป็นต้นเดี่ยว ๆ พบว่ามีส่วนของรากแก้วติดยึดกับลำต้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 1E) แสดงให้เห็นว่าต้นที่เกิดขึ้นในสูตรดังกล่าวพัฒนาด้วยกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซิสแบบไม่ผ่านระยะแคลลัส (direct somatic embryogenesis) ซึ่งพบในอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้นต่ำ ๆ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นสูง ส่วนการเกิดต้นจากใบของแววมยุราในอาหารที่เติม BAP เพียงอย่างเดียวไม่มีรากเกิดขึ้นมีเฉพาะยอดเท่านั้น ปรากฏการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงต้นกล้า [11] และชิ้นส่วนลำต้น [8] ของแววมยุรา ดังนั้นอาหารที่เติม BAP อย่างเดียวจึงชักนำให้เกิดยอดด้วยวิธีออแกนโนจินีซิสแบบไม่ผ่านระยะแคลลัส (direct organogenesis) สำหรับอาหารที่เติมเฉพาะ NAA เพียงอย่างเดียวโดยไม่เติม BAP จะชักนำให้ใบเกิดแคลลัสสีขาวหรือสีเขียวอ่อน โดยลักษณะของแคลลัสอยู่ภายใต้อิทธิพลของความเข้มข้นของ NAA ถ้าความเข้มข้นสูงแคลลัสมีสีขาวและฟู แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำแคลลัสจะฉ่ำน้ำหรือเนื้ออัดแน่น โดยที่ขนาดของแคลลัสเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของ NAA และไม่พบการเกิดต้นจากแคลลัสเหล่านี้ ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของแววมยุรา [9] ที่พบว่าแคลลัสจากใบอ่อนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ซึ่งน่าจะเกิดจากปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง เช่น ปริมาณความเข้มข้นของ NAA และ BAP แตกต่างกัน อายุใบที่ใช้เพาะเลี้ยง และส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้น [15] นอกจากนี้แคลลัสอาจต้องการอาหารใหม่ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันจึงจะพัฒนาเป็นต้นต่อไปได้ ดังเช่นที่พบในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ [26] กล้วยไม้ฟาแลนนอบซิส [27]

3.3 การชักนำราก การอนุบาล และย้ายปลูก

ต้นกล้าแววมยุราที่พัฒนามาจากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซิสมีรากที่สมบูรณ์ดี เมื่อต้น

กล้ามีความสูงประมาณ 2-5 ซม สามารถย้ายไปปลูกอนุบาลในกระถางที่บรรจุส่วนผสมของขุยมะพร้าวกับพีทมอสในอัตราส่วน 1:1 ได้ ส่วนต้นที่เกิดขึ้นบนอาหารที่เติม BAP อย่างเดียวจะไม่มีราก ต้องตัดแยกต้นที่มีความยาว 2-5 ซม ไปชักนำให้เกิดรากในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช แต่เติมผงถ่าน 200 มก/ล หลังจากนั้นประมาณ 30 วัน จะเกิดรากและต้นเจริญเติบโตแข็งแรงมากพอที่จะย้ายไปอนุบาลได้ ให้นำมาล้างวุ้นออกจากรากให้หมดแล้วนำลงปลูกในกระถางที่มีพีทมอสผสมขุยมะพร้าวเช่นกัน ต้นที่ปลูกลงกระถางอนุบาลทั้งหมดนำไปวางอนุบาลในที่มีแสงประมาณ 50 % ให้น้ำวันละครั้งด้วยระบบสเปรย์เพื่อรักษาความชื้น ข้อควรระวังอย่าให้ความชื้นต่ำเพราะแวววมยุราจะเหี่ยวและมีอัตราการตายสูง หลังจากอนุบาลประมาณ 1 เดือน สามารถย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติ จากการสังเกตพบว่าต้นแวววมยุราที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงใบมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการโดยไม่พบลักษณะผิดปกติ (รูปที่ 1G)

4. สรุป

การทดลองเพาะเลี้ยงใบที่โตเต็มที่แล้วของแวววมยุราบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม NAA และ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถสรุปได้ว่า

4.1 ใบแวววมยุราที่โตเต็มที่ตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม NAA และ BAP แตกต่างกันโดยมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นและปริมาณความเข้มข้นของอัตราส่วนระหว่าง NAA และ BAP

4.2 อาหารสูตร MS ที่เติม BAP เพียงอย่างเดียวชักนำให้เซลล์ด้านหลังใบเกิดออแกโนจินีซิส และอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้นต่ำร่วมกับ BAP ความเข้มข้นสูง จะชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซิส ส่วนอาหารที่เติมเฉพาะ NAA เพียงอย่างเดียวจะชักนำให้เกิดแคลลัสและราก

4.3 โซมาติกเอ็มบริโอและยอดมีจุดกำเนิดมาจากเซลล์บริเวณหลังใบของแวววมยุราเหมือนกันแต่เกิดบนสูตรอาหารแตกต่างกัน ต้นที่พัฒนาผ่านโซมาติกเอ็มบริโอจะมีทั้งรากแก้วและต้น

4.4 การเพาะเลี้ยงใบที่โตเต็มที่แล้วของแวววมยุราสามารถนำมาขยายพันธุ์แวววมยุราได้ต้นลูกจำนวนมากและคงลักษณะเดิมไว้ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกและอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ทำการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

6. รายการอ้างอิง

[1] Fischer, E., 2004, The Families and Genera of Vascular Plants, Volume VII, Kadereit, J.W. (Ed.), Springer-Verlag, New York.

[2] Miyazaki, K., Suzuki, K., Iwaki, K., Kusumi, T., Abe, T., Yoshida, S.H. and Fukui, H., 2006, Flower pigment mutation induced by heavy ion beam irradiation in an interspecific hybrid of *Torenia*, Plant Biotechnol. 23: 163-167.

[3] Aida, R., Kishimoto, S., Tanaka, Y. and Shibata, M., 2000, Modification of flower color in Torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation, Plant Sci. 153: 33-42.

[4] Aida, R., Yosida, S.H., Ichimura, K., Goto, R. and Shibata, M., 1998, Extension of flower longevity torenia plants incorporating ACC oxidase transgene, Plant Sci. 138: 91-101.

[5] Starman, T.W., 2005, Focus on vegetative annuals: *Torenia*, Greenhouse Grower: 92-94.

[6] Holocomb, G.E., 1999, First report of powdery mildew caused by an *Oidium* sp. on *Torenia fournieri*, Plant Disease 83: 878.

[7] Takeuchi, N., Tanimoto, S. and Harada, H., 1984, Effects of wounding on adventtious bud formation in *Torenia* stem segments cultured *in vitro*, J. Exp. Bot. 36: 841-847.

[8] Tanimoto, S., 1994, Localization of intracellular free calcium ions during adventitious bud initiation in *Torenia* stem segments, Plant Tiss. Cult. Lett. 11: 55-60.

[9] Kanchanapoom, K., Buntin, N. and Kanchanapoom, K., 2009, Micropropagation through adventitious shoot regeneration from leaf culture of *Torenia fournieri* Lind. Songklanakarin J. Sci. Technol. 31: 587-590.

[10] Chlyah, H. and Van, M.T.T., 1975, Distribution pattern of cell division centers on the epidermis of stem segments of *Torenia fournieri* during *de novo* bud formation, Plant Physiol. 56: 28-33.

[11] Tanimoto, S. and Sueishi, M., 1995, Direct induction of adventitious buds in *Torenia* seedlings, Plant Tiss. Cult. Lett. 12: 83-86.

[12] Tandon, S.L. and Bhutani, K., 1965, Morphological and cytological studies of colchicines-induced tetraploids in *Torenia fournieri* Lind., Genetica 36: 439-445.

[13] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol. Plant. 15: 473-497.

[14] Pillai, K.G., Rao, I.U., Rao, I.V. and Ram, H.Y., 1992, Induction of division and differentiation of somatic embryos in the leaf epidermis of *Gaillardia picta*, Plant Cell Rep. 10: 599-603.

[15] Hall, R.D., Riksen-Bruinsma, T., Weyens, C., Lefèbvre, M., Dunwel, J.M. and Krens, F.A., 1996, Stomatal guard cells are totipotent, Plant Physiol. 11: 889-892.

[16] Chang, C., Chen, C., Tsai, Y. and Chang, W., 2000, A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. gloriosoides Baker, Bot. Boll. Acad. Sin. 41: 139-142.

[17] Srangsam, A. and Kanchanapoom, K., 2007, Establishment of *in vitro* culture of *Musa* AA Group 'Kluai Sa' and *Musa* AA group 'Kluai Leb Mue Nang' and the analysis of ploidy stability, ScienceAsia 33: 437-442.

[18] Moran, G.P., Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. and Codina, C., 2003, Mass

propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture, Sci. Hort. 98: 49-60.

[19] Hou, Q., Carman, J.G. and. Varga, W.A., 1997, Micropropagation of Sego Lily, Plant Cell Tiss. Org. 49: 149-151.

[20] Chaturvedi, R. and Bhatnagarhigh, S.P., 2001, Frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar baby, *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 37: 255-258.

[21] จำเนียร สร้างสาม, 2533, การเกิดต้นและเอ็มบริออยด์จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะละกอ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 175 น.

[22] Moore, T.C., 1979, Biochemistry and Physiology of Plant Hormones, Springer-Verlag, New York, 274 p.

[23] Trewavas, A.J. and Cleland, R.E., 1983, Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances ?, Trends Biochem. Sci. 8: 354-37.

[24] Takayama, S. and Misawa, M., 1983, The mass propagation of *Lilium in vitro* by stimulation of multiple adventitious bulb-scale formation and by shake culture, Can. J. Bot. 61: 224-228.

[25] Kongbangkerd, A., Kopf, A., Allacher, P., Wawroch, C. and Kopp, B., 2005, Micropropagation of squill (*Charybdis numidica*) through nodal culture, Plant Cell Rep. 23: 673-677.

[26] Bregitzer, P., 1992, Plant regeneration and callus type in barley: effects of genotype and culture medium, Crop Sci. 32: 1108-1112.

[27] Chen, Y., Chang, C. and Chang, W., 2000, A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 36: 420-423.