



ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ
จากการเพาะเลี้ยงคัพพะในส้มหอม

Factors influencing callus induction and somatic embryo
in *Citrus japonica* Thunb. from embryo culture

กसानต์ หาดูชนะ¹ และปิยะพร แสนสุข^{1,2*}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

²หน่วยวิจัยอนุกรมวิธานพืชและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและการประยุกต์ใช้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 44150

*Corresponding Author, E-mail: pcornukaempferia@yahoo.com

บทคัดย่อ

ศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหาร ชนิดของอาหาร ฮอร์โมน 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) มอลต์สกัดและขนาดของผลต่อการเพาะเลี้ยงคัพพะของส้มหอม (*Citrus japonica* Thunb.) เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ โดยนำคัพพะจากผลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. และ 1.5-2.5 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) และ Murashige and Tucker (MT) (1969) ที่ไม่เติมและเติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าคัพพะจากผลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MT และเติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1.5 และ 2.0 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 100%

ABSTRACT

Studies were conducted on the effects of media, type of medium, 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), malt extract and size of fruit for callus induction and somatic embryogenesis from embryo culture of *Citrus japonica* Thunb. The embryos were cultured on solid or liquid Murashige and Skoog (MS) (1962) or Murashige and Tucker (MT) (1969) media supplemented with and without 500 mg/l malt extract in combination with 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l 2,4-D for eight weeks. The highest percentages of callus induction and somatic embryogenesis were 100% in embryos from fruits with diameter of 0.4-1.4 cm. that were cultured on solid MT medium with 500 mg/l malt extract added in combination with 1.5 and 2.0 mg/l 2,4-D.

คำสำคัญ: ส้มหอม แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Keywords: *Citrus japonica* Thunb., Callus, Somatic embryo, Tissue culture

บทนำ

ส้มหอม (*Citrus japonica* Thunb.) เป็นพืชชนิดหนึ่งในสกุลส้ม (*Citrus*) วงศ์ส้ม (Rutaceae) เป็นหนึ่งในสกุลที่ได้รับการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลายไปทั่วโลก เนื่องจากได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น อาหาร สมุนไพร เครื่องสำอาง เครื่องเทศ เป็นต้น ตัวอย่างพืชที่อยู่ในสกุลนี้ได้แก่ ส้มโอ ส้มมือ ส้มเกลี้ยง ส้มแก้ว มะนาว มะกรูด เป็นต้น (เต็ม, 2544) ในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาในการที่จะเพิ่มผลผลิตและหาสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพตรงต่อความต้องการของมนุษย์อย่างต่อเนื่อง ส้มหอมเป็นไม้พุ่ม ขนาดกลาง ใบรูปไข่ โดยใบและผลจะมีลักษณะต่างจากหรือคล้ายต่างจากปาล์มเหลือง ผลกลมขนาดเล็ก ในปัจจุบันส้มหอมเป็นพืชที่กำลังมีความนิยมสูง เนื่องจากมีลักษณะที่แปลกและไม่เหมือนส้มชนิดอื่น จึงทำให้นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ แต่ในความเป็นจริงส้มหอมที่มีขายตามท้องตลาดนั้นมีจำนวนจำกัดและมีการเพาะปลูกน้อย จึงได้มีการนำมาปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์เพื่อให้มีจำนวนและลักษณะตามความต้องการของมนุษย์

ในการขยายพันธุ์ส้มหอมโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการเพาะเมล็ด แต่เนื่องจากผลจากการเพาะเมล็ดจะได้ต้นส้มที่มีลักษณะกลายพันธุ์ต่างจากเดิม ในลักษณะที่เป็นข้อเสียมากกว่าข้อดี คือ ได้สภาพต้นที่ช่อดอก ให้อายุสั้น เป็นต้น (เปรมปรี, 2544) ดังนั้นจึงได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการขยายพันธุ์ส้มหอม จากการศึกษาข้อมูลจากแหล่งต่างๆ พบว่ายังไม่มีรายงานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มหอมแต่มีการรายงานการเพาะเลี้ยงพืชในวงศ์ส้มชนิดอื่นได้แก่ ส้มซ่า (*Citrus aurantium* L.) (Carimi et al., 1995) ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco.) (Gill et al., 1995) ส้มเซ่ง (*Citrus sinensis* Osbeck.) (Fazle et al., 2011) และรัฟเลมอน (*Citrus jambhiri* Lush.) (Singh et al., 2012) โดยนำชิ้นส่วนของก้าน เกสรเพศเมีย ใบ ข้อและเมล็ดมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองเพื่อนำชิ้นส่วนของคัพภะ (embryo) ส้มหอมมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหาร ชนิดของอาหาร ความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) มอลต์สกัดและขนาดของผลที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) และโซมาติกเอ็มบริโอ

(somatic embryo) โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขยายพันธุ์ส้มหอมและยังเป็นแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์ส้มหอมต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

นำผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง แล้วฉีกพ่นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นนำไปจุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านเปลวไฟ ส่วนผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5-2.5 ซม.ผ่าและนำเมล็ดออก จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง แล้วฉีกพ่นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่วและนำไปพอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 0.9% หยดน้ำสบู่เหลว (tween 20) จำนวน 1-2 หยด แช่ไว้เป็นเวลา 15 นาที และแช่ต่อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 0.6% แช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกและนำเมล็ดมาทำการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาขนาดของผลส้มหอม สูตรอาหารและความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

นำคัพภะจากผลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. และ 1.5-2.5 ซม. นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และ MT ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก./ล. ทำการทดลอง 15 ซ้ำ โดยได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 ± 2 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของอาหาร มอลต์สกัดและความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

นำคัพภะจากผลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MT ที่เติมและไม่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก./ล. ทำการทดลอง 15 ซ้ำ เพาะเลี้ยงสภาวะเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบเชิงตัวประกอบรูปแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Randomized Complete Block Design) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Two-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (Version 11.5 for Windows)

ผลการวิจัย

การศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหาร ความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และขนาดของผลสัมหต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัพภะสัสมหจากผลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. และ 1.5-2.5 ซม. บนอาหารแข็งสูตร MS และ MT ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน คัพภะที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีขนาดใหญ่มากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน คัพภะจากผลสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยแคลลัสที่พบจะเกิดบริเวณที่คัพภะสัมผัสและไม่สัมผัสกับอาหาร ลักษณะของแคลลัสที่พบในอาหารทุกความเข้มข้นเป็นเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆ (friable callus) สีเหลืองอ่อน สีเขียวและสีขาวคล้ายสาหร่าย เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและคัพภะสามารถชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอได้โดยลักษณะของไซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดในอาหารทุกสูตรมีรูปร่างเป็นทรงกลม (globular shape) สีเหลืองอ่อนหรือขาวใส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าคัพภะจากผลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MT ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 100% (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ในขณะที่คัพภะจากผลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. และ 1.5-2.5 ซม. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และ MT ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ไม่สามารถชักนำให้เกิด

แคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอได้ แต่คัพภะจากผลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2.5 ซม. สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ (รูปที่ 2) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

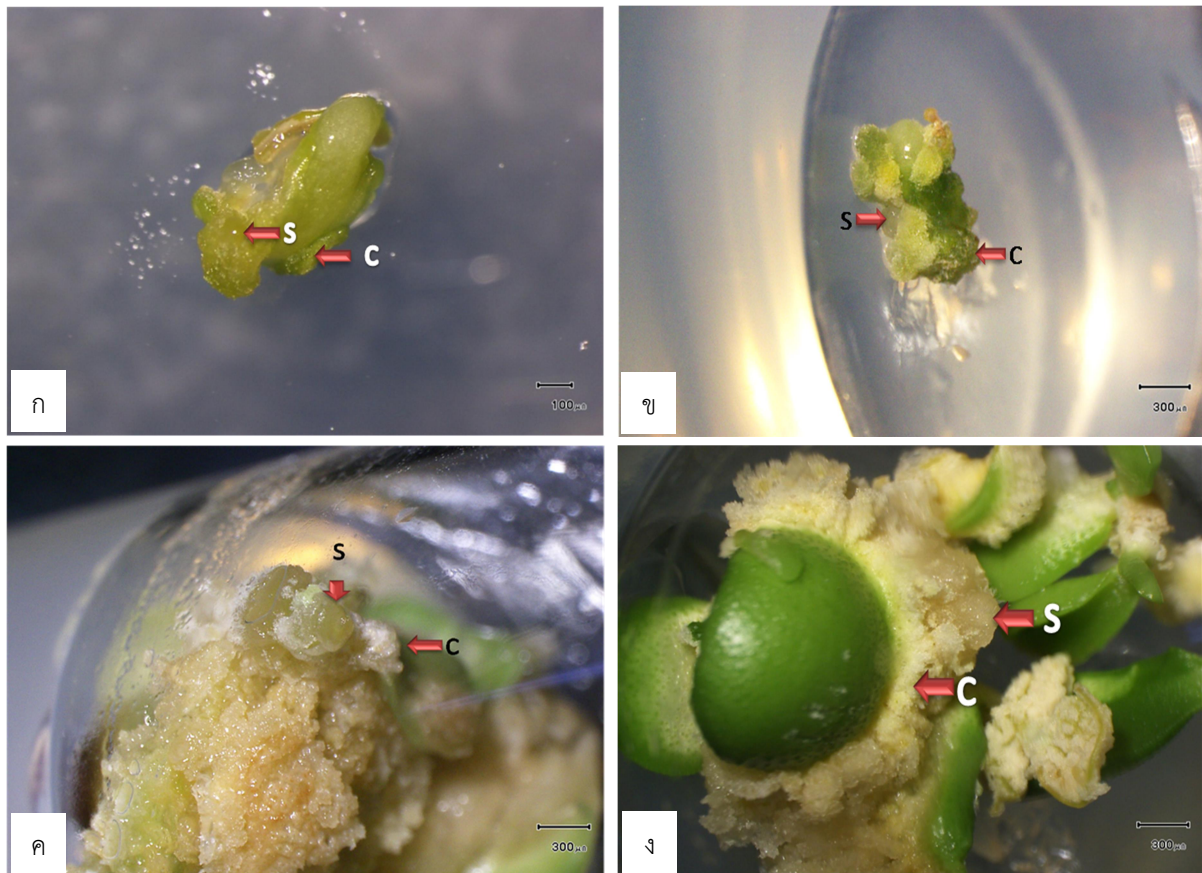
การศึกษาอิทธิพลของชนิดของอาหาร ความเข้มข้นของ 2,4-D และมอลต์สกัดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอ

เมื่อนำชิ้นส่วนของคัพภะสัสมหที่มีขนาดผลเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MT ที่ไม่เติมและเติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน คัพภะที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีขนาดใหญ่มากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน คัพภะเกิดแคลลัสได้โดยมีลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารทุกความเข้มข้นประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆ สีเหลืองอ่อน สีเขียวและสีขาวคล้ายสาหร่าย เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและคัพภะสามารถชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอได้โดยลักษณะของไซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดในอาหารทุกสูตรนั้นมีรูปร่างเป็นทรงกลมสีเหลืองอ่อนหรือขาวใส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MT ที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 100% (ตารางที่ 2, รูปที่ 3) ในขณะเดียวกันคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและเหลวสูตร MT ที่ไม่เติมและเติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสไซมาติกเอ็มบริโอ และยังไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ (รูปที่ 4) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 1 การชักนำคัพภะที่เพาะเลี้ยงจากผลสัสมหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. และ 1.5-2.5 ซม. บนอาหารแข็ง สูตร MS และ MT ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและโชมอดิกเอ็มบริโอเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ขนาดของผล (ซม.)	สูตรอาหาร	2,4-D (มก./ล.)	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดโชมอดิกเอ็มบริโอ (%)
0.4-1.4	MS	0	0 ^o	0 ^q
		0.5	73.33 ^k	73.33 ^k
		1.0	80.00 ^s	80.00 ⁱ
		1.5	79.48 ^h	79.48 ^j
		2.0	86.00 ^f	86.00 ^f
		4.0	86.00 ^f	86.00 ^f
		8.0	76.92 ^j	61.53 ⁿ
	MT	0	0 ^o	0 ^q
		0.5	90.00 ^e	90.00 ^e
		1.0	90.47 ^d	90.47 ^d
		1.5	100.00 ^a	94.73 ^c
		2.0	100.00 ^a	100.00 ^a
		4.0	95.00 ^c	95.00 ^b
		8.0	70.00 ^m	65.00 ^l
1.5-2.5	MS	0	0 ^o	0 ^q
		0.5	63.63 ⁿ	45.45 ^q
		1.0	71.42 ^l	50.00 ^o
		1.5	95.65 ^b	73.91 ^k
		2.0	95.65 ^b	82.60 ^h
		4.0	90.00 ^e	65.00 ^l
		8.0	79.10 ⁱ	62.50 ^m
	MT	0	0 ^o	0 ^q
		0.5	80.00 ^s	85.00 ^s
		1.0	95.00 ^c	85.00 ^s
		1.5	95.00 ^c	90.00 ^e
		2.0	95.00 ^c	90.00 ^e
		4.0	95.00 ^c	90.00 ^e
		8.0	90.00 ^e	85.00 ^s

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 1 คัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (C = แคปซูล, S = โชมaticเอ็มบริโอ)

ก. คัพภะจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

ข. คัพภะจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MT

ค. คัพภะจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5-2.5 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

ง. คัพภะจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5-2.5 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MT



รูปที่ 2 คัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MT ที่ไม่เติมฮอร์โมนเป็นเวลา 8 สัปดาห์

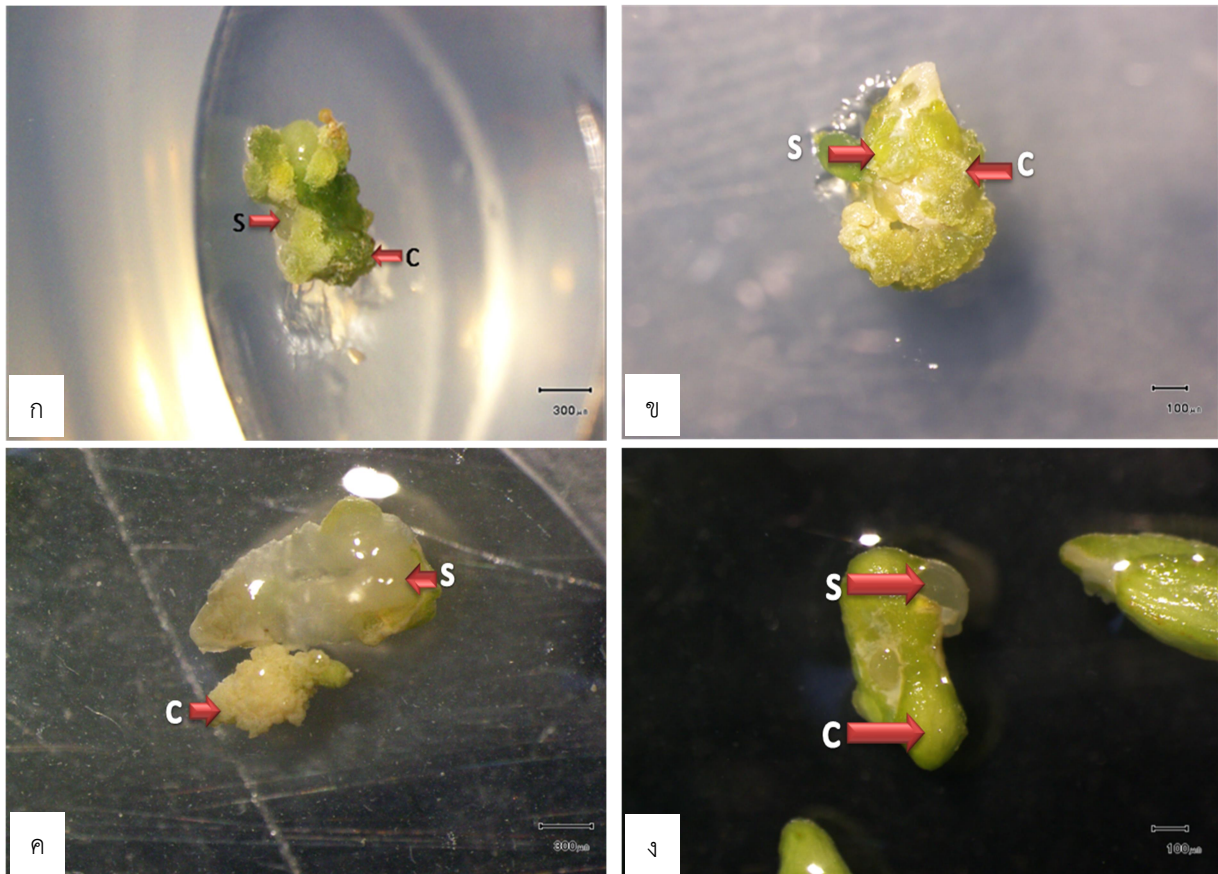
ก. คัพภะจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม.

ข. คัพภะจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5-2.5 ซม.

ตารางที่ 2 การชักนำคัพภะที่เพาะเลี้ยงจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. บนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MT ที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชนิดของอาหาร	มอลต์สกัด (มก./ล.)	2,4-D (มก./ล.)	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (%)
อาหารแข็ง	0	0	0 ^q	0 ^r
		0.5	90.00 ^g	90.00 ^e
		1.0	90.47 ^f	90.47 ^e
		1.5	100.00 ^a	94.73 ^d
		2.0	100.00 ^a	100.00 ^a
		4.0	95.00 ^c	95.00 ^c
		8.0	70.00 ^k	65.00 ^k
	500	0	0 ^q	0 ^r
		0.5	86.11 ^g	86.11 ^f
		1.0	94.44 ^d	94.44 ^d
		1.5	100.00 ^a	100.00 ^a
		2.0	100.00 ^a	100.00 ^a
		4.0	69.23 ^l	69.23 ^j
		8.0	62.97 ^o	62.96 ^l
อาหารเหลว	0	0	0 ^q	0 ^r
		0.5	82.75 ^h	82.75 ^g
		1.0	93.30 ^e	86.66 ^f
		1.5	75.86 ^j	75.86 ^h
		2.0	68.75 ^m	34.37 ^o
		4.0	68.75 ^m	31.25 ^p
		8.0	56.25 ^p	21.87 ^q
	500	0	0 ^q	0 ^r
		0.5	97.05 ^b	97.05 ^b
		1.0	97.05 ^b	97.05 ^b
		1.5	97.05 ^b	97.05 ^b
		2.0	80.00 ⁱ	70.00 ⁱ
		4.0	66.66 ⁿ	60.00 ^m
		8.0	56.66 ^p	56.66 ⁿ

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 3 คัพภะที่เพาะเลี้ยงจากผลส้มหอมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4-1.4 ซม. บนอาหารสูตร MT ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (C = แคลลัส, S = โชมaticเอ็มบริโอ)

- ก. เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ไม่เติมมอลต์สกัด
- ข. เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล.
- ค. เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวที่ไม่เติมมอลต์สกัด
- ง. เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล.



รูปที่ 4 คัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (ก) และอาหารเหลว (ข) สูตร MT ที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์

วิจารณ์ผลการวิจัย

อิทธิพลของสูตรอาหารต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดสอบสูตรอาหารโดยนำคัพพะผสมหอมมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกันคือ อาหารสูตร MS และ MT เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Two-Way ANOVA พบว่าสูตรอาหารมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากการเปรียบเทียบสูตรอาหารด้วยวิธี DMRT พบว่าคัพพะที่เลี้ยงในอาหารสูตร MT สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าคัพพะที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Carimi et al. (1995) เพาะเลี้ยงอวูลของส้มโอที่มีอายุ 8-9 สัปดาห์ พบว่าอวูลที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MT สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าอวูลที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยอาหารสูตร MT เป็นอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารสูตร MS โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของ Nicotinic acid, Pyridoxine HCl, Thiamine HCl และน้ำตาลซูโครส ซึ่ง Nicotinic acid เกี่ยวข้องในการรักษาระดับของ NAD^+ และ $NADP^+$ การเคลื่อนย้ายโปรตอนและอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์และการสังเคราะห์ด้วยแสง Pyridoxine HCl ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการสร้างคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน Thiamine HCl เป็นโคเอนไซม์ใน Pyruvate metabolism (ดวงใจ, 2543) ส่วนน้ำตาลซูโครสมีบทบาทต่อการเกิดสัณฐานวิทยา เมื่อน้ำตาลซูโครสอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทสโดยน้ำตาลกลูโคสมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้าง carbon skeleton ในเซลล์และองค์ประกอบของผนังเซลล์ กระบวนการหายใจระดับเซลล์และน้ำตาลซูโครสยังช่วยปรับแรงดันออสโมซิสของอาหารให้เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส (อัจฉริยาและสุรวิช, 2538)

อิทธิพลของชนิดอาหารต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดสอบประเภทของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยนำคัพพะผสมหอมมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลว และเมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Two-Way ANOVA พบว่าคัพพะที่เพาะเลี้ยงบนประเภทของอาหารที่แตกต่างกัน มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติก

เอ็มบริโออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากการเปรียบเทียบการการเพาะเลี้ยงคัพพะบนอาหารแข็งและอาหารเหลวด้วยวิธี DMRT พบว่าคัพพะผสมหอมที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าคัพพะที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ ดวงใจ (2543) เพาะเลี้ยงมะนาวพันธุ์แป้นห้วย พบว่าอาหารเหลวสูตร MT ที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส 0.1 ไมโครโมล และน้ำตาลซอร์บิทอล 0.1 โมล เป็นเวลา 12 สัปดาห์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีอาจเนื่องมาจากผสมหอมเป็นพืชในวงศ์ส้ม ลักษณะเด่นของพืชวงศ์ส้มคือมีต่อมน้ำมันทุกส่วน น้ำมันที่หลั่งออกมาจากเอ็มบริโอของผสมหอมอาจมีผลไปยับยั้งการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงคัพพะบนอาหารเหลว ทำให้น้ำมันได้สัมผัสกับทุกส่วนของเนื้อเยื่อคัพพะ จึงอาจทำให้การทดลองนี้คัพพะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าคัพพะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว

อิทธิพลของ 2,4-D ต่อการชักนำคัพพะอ่อนผสมหอมให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดสอบความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก./ล. ต่อการชักนำคัพพะผสมหอมให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Two-Way ANOVA พบว่าความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี DMRT พบว่า 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. สามารถชักนำคัพพะให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่า 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นอื่น ในขณะที่คัพพะที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม 2,4-D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในขณะเดียวกันคัพพะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D 8 มก./ล. พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Carimi et al. (1995) โดยสามารถชักนำอวูลของส้มโอให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 87.00% ในอาหารสูตร MT ที่เติม 2,4-D ที่

ระดับความเข้มข้น 0.01 มก./ล. ร่วมกับมอลต์สกัด 500 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 70 ก/ล ในขณะที่ 2,4-D ความเข้มข้น 10 มก./ล. จะมีผลยับยั้งการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ อัจฉริยาและสุรวิช (2538) เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนส้มหอมพันธุ์ทองดีที่ตัดปลายเอาเอ็มบริโอออก จากผลการทดลองพบว่าอาหารสูตร MT ที่เติม BA เข้มข้น 20 มก./ล. หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.01 มก./ล. เพียงอย่างเดียวหนึ่งหรือร่วมกับมอลต์สกัด 500 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด Altaf et al. (2009) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิวเคลียสของส้มซ่า จากผลการทดลองพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 0.1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 2,4-D เป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินซึ่งจะมีผลต่อการสังเคราะห์ DNA โดยมีบทบาทในการกระตุ้นเอนไซม์ DNA polymerase (ลิลลี่, 2546) และการยืดยาวของเซลล์ โดยเซลล์ที่ได้รับออกซินในปริมาณที่เหมาะสมจะปลดปล่อย H^+ เข้าไปในเซลล์ส่งผลให้ค่า pH ลดลง ทำให้ผนังเซลล์คลายตัวและเกิดความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ (นภดล, 2537) เมื่อผนังเซลล์คลายตัวจะไม่สามารถคืนสภาพเดิมได้ จึงทำให้ค่าศักย์ของน้ำ (water potential) ในเซลล์ลดลง ส่งผลให้น้ำเคลื่อนที่เข้าไปในเซลล์จึงทำให้เซลล์ขยายขนาดขึ้น (ลิลลี่และคณะ, 2552) แต่ถ้าได้รับปริมาณของ 2,4-D มากเกินไป 2,4-D ไปยับยั้งกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport system) โดยเอนไซม์ ACC-Synthase (1-amino-cyclo propane-1-carboxylic acid synthase) จะไปเร่งปฏิกิริยา 2,4-D ไดเอทิลีน (ethylene) และไซยาไนด์ (cyanide) เป็นผลิตภัณฑ์โดยไซยาไนด์จะไปยับยั้ง cytochrome oxidase จึงทำให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนถูกรบกวนและเป็นพิษต่อเซลล์ (Fabio et al., 2007)

อิทธิพลของมอลต์สกัดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

จากการทดลองการไม่เติมและเติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. โดยนำคัพเพาะส้มหอมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MT และเมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Two-Way ANOVA พบว่าการเติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากการเปรียบเทียบการไม่เติมและเติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ด้วยวิธี DMRT พบว่าคัพเพาะที่เลี้ยงในอาหารที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล.

สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าคัพเพาะที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมมอลต์สกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Carimi et al. (1999) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านเกสรเพศเมียและยอดเกสรเพศเมียมะนาวเทศ (*Citrus limon* (L.) Osbeck.) บนอาหารสูตร MS จากการศึกษพบว่าก้านเกสรเพศเมียและยอดเกสรเพศเมียสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 5.2% และ 42.4% ตามลำดับ ในอาหารสูตร MS ที่เติมมอลต์สกัด 500 มก./ล. ร่วมกับ BA 13.3 ไมโครโมล/ลิตร นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ ดวงใจ (2543), Altaf et al. (2009) และ Carimi et al. (1999) โดยมีมอลต์สกัดประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนมาก ซึ่งกรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจนและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน คลอโรฟิลล์ พอร์ไฟริน โคเอนไซม์ ฮอร์โมนบางชนิดและสารประกอบอื่น (ดวงใจ, 2543) **อิทธิพลของขนาดผลส้มหอมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ**

จากการนำผลส้มหอมที่มีขนาด 0.4-1.4 ซม. และ 1.5-2.5 ซม. โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และ MT ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก./ล. เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Two-Way ANOVA พบว่าขนาดของผลส้มหอมมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อนำขนาดของผลทั้งสองขนาดมาเปรียบเทียบกับวิธี DMRT พบว่าผลส้มหอมที่มีขนาด 0.4-1.4 ซม. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่าผลที่มีขนาด 1.5-2.5 ซม. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ปริมาณการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอต่อพื้นที่ผิวของคัพเพาะในผลทั้ง 2 ขนาด พบว่าผลที่มีขนาด 1.5-2.5 ซม. แม้จะเกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมาก แต่ปริมาณของแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอต่อพื้นที่ผิวของคัพเพาะมีอัตราส่วนที่น้อยกว่าผลที่มีขนาด 0.4-1.4 ซม. เนื่องจากผลที่ยังอ่อนมีเนื้อเยื่อเจริญในปริมาณที่มาก โดยเนื้อเยื่อเจริญมีความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้ตลอดเวลา เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสม เซลล์จึงมีการแบ่งตัวเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ทันทีโดยไม่เกิดขบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) ของเซลล์ ในขณะที่ผลที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่โดยทั่วไปประกอบด้วยเนื้อเยื่อถาวร

จำนวนมาก โดยเนื้อเยื่อถาวรจะไม่มีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจะต้องเกิดขบวนการเปลี่ยนสภาพเพื่อที่จะสามารถกลับมาเป็นเนื้อเยื่อเจริญแล้วจึงจะแบ่งเซลล์เจริญไปเป็นแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ (คำณูน, 2542)

จากการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัพภะของส้มหอมได้แก่ สูตรอาหาร ชนิดของอาหาร ความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D มอลต์สกัดและขนาดของผลจากการเพาะเลี้ยงคัพภะของส้มหอมวิธี Two-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วยวิธี DMRT พบว่าปัจจัยทุกปัจจัยมีปฏิสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปผลการวิจัย

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สูตรอาหาร ชนิดของอาหาร ความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D มอลต์สกัดและขนาดของผล เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ แต่การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอพบว่าจะสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ในระยะทรงกลมดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเทคนิคและวิธีการเพื่อพัฒนาให้สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยที่ให้ทุนการศึกษา ขอขอบคุณร้านลุงตี๋ ที่ให้ความอนุเคราะห์และจัดส่งผลส้มหอมตลอดจนให้กำลังใจที่ดีเสมอมาและขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นิภาพร ชูดีมนต์ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์สถิติ

เอกสารอ้างอิง

คำณูน กาญจนภูมิ. (2542). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
ดวงใจ ศิลปะระย. (2543). การชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอของมะนาวพันธุ์แป้นทวายโดยการเพาะเลี้ยงอวัยวะสืบพันธุ์อ่อนและเกสรเพศเมีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
เต็ม สมิตินันท์. (2557). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์. กรุงเทพฯ: ประชาชน จำกัด.

นภดล จรัสสัมฤทธิ์. (2537). ฮอริโมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์รั้วเขียว.
เปรมปรีณ สงขลา. (2544). คู่มือการทำสวนส้มอย่างมืออาชีพ. กรุงเทพฯ: ฐานการพิมพ์ จำกัด.
ลิลลี่ กาวีดิ. (2546). การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการพืช. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
ลิลลี่ กาวีดิ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และสุริยา ตันติวิวัฒน์. (2552). สรีรวิทยาพืช. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
อังฉริยา มณีน้อย และ สุวิษ วรรณไกรโรจน์. (2538). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโอ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 28-33.
อรดี สหวัชรินทร์. (2539). เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์.
Altaf, N., Rehman, A., Bhatti, I.A. and Ali, L. (2009). Tissue culture of *Citrus* cultivars. Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry 8(1): 43-51.
Carimi, F., Pasquale, F.D. and Crescimanno, F.G. (1995). Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. Plant Science 105: 81-86.
Carimi, F., Pasquale, F.D. and Crescimanno, F.G. (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell Reports 18: 935-940.
Carimi, F., Tortorici, M.C., Pasquale, F.D. and Crescimanno, F.G. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/styles explants of sweet orange navel group (*Citrus sinensis* (L.) Osb.). Plant Cell Tissus and Organ Culture 54: 183-189.
Fabio, A., Chinalia, M., Helena, R.S. and Elisete M.C. (2007). 2,4-D Toxicity: cause effect and control. Global Science 1(2): 24-33.
Fazle, A., Rahman, M.M., Shamsul, H., Prodhan, S., Sikdar, U., Nayem, Z. and Ashrafuzzaman, M. (2011). Development of efficient callus initiation of malta (*Citrus sinensis* Osbeck.) through tissue culture. International Journal of Agricultural Research 1(1): 64-68.
Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B.S. and Gosal, S.S. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Scientia Horticulturae 63: 167-174.
Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Murashige, T. and Tucker, D.P.H. (1969). Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. In: Chapman HD Proc 1st Int Citrus Symp. University of California. 1151-1161.

Singh, B., Singh, J. and Kaur, A. (2012). Cost effective plant regeneration protocol for rough lemon (*Citrus jambhiri* lush) using gum kondagoguas gelling agent in plant tissue culture media. Journal of Cell and Tissue Research 13(1): 3535-3540.

