นิพนธ์ต้นฉบับ

การเกิดแคลลัสจากลำต้นกระเจียว เบอร์ 50 ในสภาพปลอดเชื้อ

สุพัตรา สระธรรม[1] และ กอบเกียรติ แสงนิล[2]

Abstract

Sarathum, S.[1] and Saengnil, K.[2]

In Vitro callus formation from stem explants of _Curcuma_ sp. No. 50

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(3) : 487-498

The effects of some plant growth regulators and age of stem explants on callus induction of *Curcuma* sp. No. 50 *in vitro* were determined. Stem explants 1.0 cm in size measured from the base of *Curcuma* sp. plantlets could be induced to form calli when cultured on MS (Murashige and skoog, 1962) agar medium having 2,4-D. When combinations of 2,4-D (0-0.5 mg/l) and BAP (0-0.25 mg/l) were tested, it showed that 2,4-D singly added was superior to 2,4-D combined with BAP in promoting callus induction. The most effective 2,4-D level was 0.125 mg/l, providing the highest callus formation. The inclusion of 2,4-D and BAP or only BAP in the medium improved growth and development of shoot rather than callus growth. Explants from plantlets cultured for 2 months were more suitable for callus induction than those from 1- and 3- month old plantlets. From histological study, it was found that calli may have originated from parenchyma of initial culture stem explants.

Key words : callus induction, *Curcuma*, 2,4-D, BAP, histological study

[1]Maejo University, Phrae Campus, Rong Kwang, Phrae 54140 Thailand. [2]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand.

[1]วท.ม.(ชีววิทยา), มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ 54140 [2]Ph.D.(Applied Biochemistry), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Corresponding e-mail: ssarathum@yahoo.com

รับต้นฉบับ 21 กรกฎาคม 2547 รับลงพิมพ์ 1 ตุลาคม 2547

บทคัดย่อ

สุพัตรา สระธรรม และ กอบเกียรติ แสงนิล

การเกิดแคลลัสจากลำต้นกระเจียว เบอร์ 50 ในสภาพปลอดเชื้อ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(3) : 487-498

ในการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด และอายุของชิ้นส่วนลำต้นที่นำมาเลี้ยงต่อการเกิดแคลลัสของกระเจียว (*Curcuma* sp.) เบอร์ 50 ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นขนาด 1.0 ซม ของต้นอ่อนกระเจียวถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (Murashige and skoog, 1962) ที่มี 2,4-D ร่วมอยู่ด้วย เมื่อทดลองใช้ 2,4-D (0-0.5 มก/ล) ร่วมกับ BAP (0-0.25 มก/ล) ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า 2,4-D อย่างเดียวมีความเหมาะสมมากกว่า 2,4-D ร่วมกับ BAP โดย 2,4-D 0.125 มก/ล เป็นระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งมีผลทำให้มีการเกิดแคลลัสสูงสุด ส่วนการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่มี 2,4-D ร่วมกับ BAP หรือ BAP เพียงอย่างเดียว มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดมากกว่าการเกิดแคลลัส โดยชิ้นส่วนจากต้นอ่อนที่มีอายุ 2 เดือนมีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสมากกว่าอายุ 1 และ 3 เดือน จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นอาจมีจุดกำเนิดมาจากพาเรงคิมาของชิ้นส่วนลำต้นเริ่มเลี้ยง

กระเจียวเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พืชสกุลนี้มีประมาณ 100 ชนิด พบในประเทศไทยประมาณ 30 ชนิด (เสาวลักษณ์, 2538) พืชสกุลนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น ใช้เป็นอาหาร สมุนไพร และปัจจุบันนำมาใช้ประโยชน์ด้านไม้ดอกไม้ประดับซึ่งนับได้ว่าเป็นสินค้าออกที่สำคัญ เนื่องจากมีลักษณะที่โดดเด่นสีสันสวยงาม และที่สำคัญคือมีอายุการใช้งานนาน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากลักษณะพิเศษของดอกที่มีกลีบดอกค่อนข้างหนาและมีสาร curcumin เป็นองค์ประกอบซึ่งสารนี้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจึงทำให้สามารถยืดอายุการใช้งาน พืชกลุ่มนี้ที่เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญ ได้แก่ ปทุมมา กระเจียว และบัวลาย เป็นต้น การศึกษาในครั้งนี้ใช้กระเจียวเบอร์ 50 (Figure 1) มาเป็นพืชทดลอง ซึ่งเป็นกระเจียวอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเป็นไม้ดอกไม้ประดับเชิงการค้า ทั้งนี้เนื่องจากเป็นกระเจียวที่มีลักษณะช่อดอกและสีสันสวยงามดูแปลกตา โดยช่อดอกส่วนโคนมีสีเขียวอ่อนจางลงจนถึงชมพู และมีสีแดงคล้ำบริเวณปลายช่อดอก แต่มีก้านช่อดอกสั้นทำให้มีข้อจำกัดในการใช้งานซึ่งเป็นลักษณะด้อยอย่างหนึ่งของกระเจียวชนิดนี้ และเป็นพันธุ์ป่าซึ่งไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้

Figure 1. Stem and inflorescence of *Curcuma* sp. No. 50.

ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีขึ้นโดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง ปัจจุบันประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดและนำไปใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส การเจริญเติบโตของแคลลัส และการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดังกล่าว แต่ที่ผ่านมามีการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสในกระเจียวหรือพืชกลุ่มกระเจียวน้อยมาก โดยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเพื่อการขยายพันธุ์ในขิง ขมิ้น ปทุมมา และดาหลา (Arimura *et al*., 2000; Sharma and Singh, 1995; Huang, 1996; Keshavachandran and Khader, 1991; Wanakrairoj, 1992; อภิชาติ, 2539) ส่วนการศึกษาในกระเจียวที่ผ่านมาเป็นเพียงศึกษาชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงและปัจจัยบางประการที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดหรือต้นอ่อนจำนวนมากเพื่อการขยายพันธุ์ (จามจุรี, 2533; ทิพย์สุดา, 2540) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงนับเป็นปัจจัยสำคัญต่อการประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดและอายุของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของกระเจียวเบอร์ 50 รวมทั้งศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาถึงการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงในครั้งนี้ ผลการทดลองที่ได้นี้นับเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแคลลัสที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย โปรโตพลาสต์ หรือการชักนำให้เกิดต้นใหม่เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

วิธีการทดลอง

การเตรียมต้นกล้ากระเจียวเบอร์ 50

ต้นพืชทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นขนาด 0.5 ซม ของต้นอ่อนกระเจียว ที่มีอายุ 1 เดือน มาผ่าแบ่งตามยาวเป็น 2 ส่วนต่อต้น แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก/ล ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 25±2ºC ได้รับแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน ซึ่งมีผลทำให้ชิ้นส่วนนี้มีการเจริญพัฒนาให้ต้นอ่อนจำนวนมาก เมื่อต้นอ่อนเจริญเติบโตมีอายุได้ 1 2 และ 3 เดือน จึงนำมาใช้ในการทดลองโดยการตัดส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของต้นอ่อนกระเจียวที่มีอายุต่างๆ เหล่านี้ขนาดประมาณ 1.0 ซม มาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ในขั้นตอนต่อไป

การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นขนาดประมาณ 1.0 ซม ที่ตัดจากต้นอ่อนกระเจียวที่มีอายุ 1 2 และ 3 เดือน ที่เตรียมไว้ข้างต้นมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มี 2,4-D 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0 0.063 0.125 0.250 และ 0.500 มก/ล และ/หรือ BAP 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0 0.125 และ 0.250 มก/ล รวม 15 กรรมวิธี เลี้ยงไว้ภายใต้สภาพที่มีอุณหภูมิ 25±2ºC ได้รับแสงที่มีความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยบันทึกผลทุกสัปดาห์ เพื่อศึกษาผลของอายุชิ้นส่วนและระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ/หรือ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทำการบันทึกผลการทดลองในเรื่องต่อไปนี้

1) บันทึกข้อมูลและบันทึกภาพการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทั่วไปของชิ้นส่วน ได้แก่ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ การเกิดยอดและราก เป็นต้น

2) บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส วันที่เริ่มเกิดแคลลัสและลักษณะแคลลัส ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเกิดแคลลัส โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีด้วย Least Significant Difference (LSD)

3) บันทึกปริมาณการเกิดแคลลัสโดยให้เป็นระดับคะแนนซึ่งพิจารณาจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส ดัชนีที่ใช้เป็นเกณฑ์แสดงปริมาณแคลลัสโดยการให้ระดับคะแนนที่ประเมินจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส ดังนี้

0 คะแนน หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส
1 คะแนน หมายถึง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-0.5 ซม

2 คะแนน หมายถึง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6-1.0 ซม
3 คะแนน หมายถึง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.1-2.0 ซม
4 คะแนน หมายถึง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $\geq$ 2.1 ซม

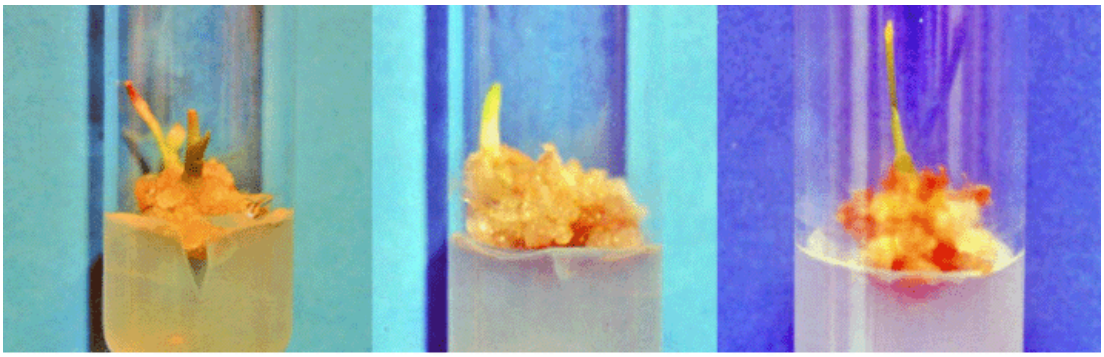
โดยนำข้อมูลปริมาณการเกิดแคลลัสในแต่ละสัปดาห์ของชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของต้นอ่อนกระเจียวทั้ง 3 อายุไปวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีด้วย Kruskal Wallis and Mann Whitney

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดแคลลัส

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของต้นอ่อนกระเจียวอายุ 2 เดือน ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.125 มก/ล เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ มาตัดเนื้อเยื่อทุกๆ สัปดาห์เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาถึงการเกิดแคลลัสและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสตามวิธีการของ Johansen (1940) และ Sass (1966) โดยนำชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาแช่มาในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (FAA) นาน 18-24 ชั่วโมง ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยสารละลายที่ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating reagents) ที่ประกอบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ น้ำกลั่น และ TBA (tertiary butyl alcohol) ที่ความเข้มข้น 50 70 85 95 และ 100 % นานความเข้มข้นละ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ตามด้วยการแช่ใน TBA 100 % นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแช่ใน TBA ร่วมกับพาราฟินเหลว (1:1) นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในพาราฟินเหลวที่มีความบริสุทธิ์สูงโดยเก็บตัวอย่างไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 58-60ºC นาน 7 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนฝังลงในพาราฟิน แล้วนำชิ้นส่วนนี้ไปตัดด้วยเครื่องตัดพาราฟินแบบหมุน (rotary microtome) ความหนา 10 ไมครอน นำชิ้นส่วนที่ตัดได้ (ribbon) ยึดกับแผ่นสไลด์ด้วยน้ำยายึดแผ่นสไลด์ (adhesive) ที่วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ นาน 24 ชั่วโมงเพื่อระเหยน้ำออกและให้แผ่นพาราฟินติดกับสไลด์ได้ดีขึ้น นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสี safranin O และ fast green ทำการปิดกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope) ต่อไป

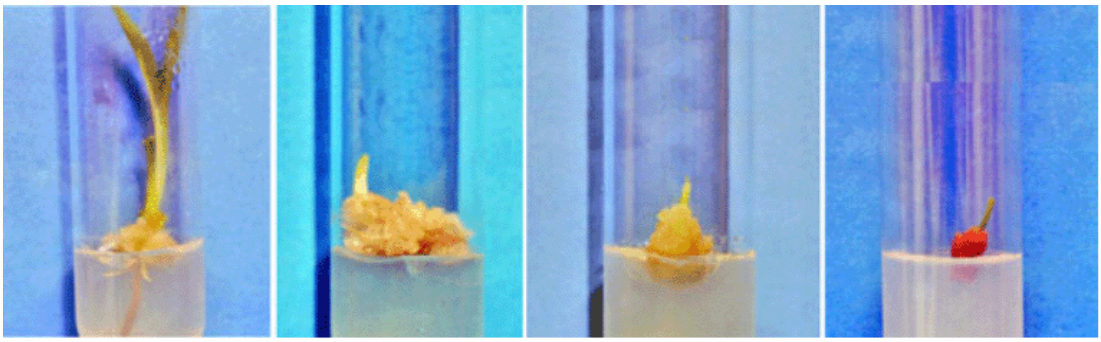
Table 1. Effect of 2,4-D and BAP and explant age on callus induction of stem explants of *Curcuma* sp. No.50 after cultured for 5 weeks.

2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	Callus Induction (%)			Callus Size (score)		
		Explant Age (months)			Explant Age (months)		
		1	2	3	1	2	3
0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
0.063	0.0	60	80	60	1.3	1.6	0.7
0.125	0.0	60	100	90	1.7	3.3	2.8
0.250	0.0	50	100	80	1.4	3.0	2.1
0.500	0.0	40	50	50	0.5	0.6	0.6
0.0	0.125	0	0	0	0.0	0.0	0.0
0.063	0.125	20	40	70	0.2	0.4	0.8
0.125	0.125	20	60	40	0.5	0.6	0.5
0.250	0.125	50	70	50	0.8	1.0	0.9
0.500	0.125	60	60	30	0.7	0.8	0.4
0.0	0.250	0	0	0	0.0	0.0	0.0
0.063	0.250	20	30	10	0.2	0.3	0.2
0.125	0.250	40	50	20	0.6	1.1	0.2
0.250	0.250	50	60	30	0.7	1.4	0.3
0.500	0.250	40	60	30	1.1	1.2	0.3



A B C

Figure 2. Callus formation from different age of stem explants of *Curcuma* sp. No. 50 after cultured on MS medium having 2,4-D 0.125 mg/l for 5 weeks: 1 month old (A) 2 month old (B) and 3 month old (C).



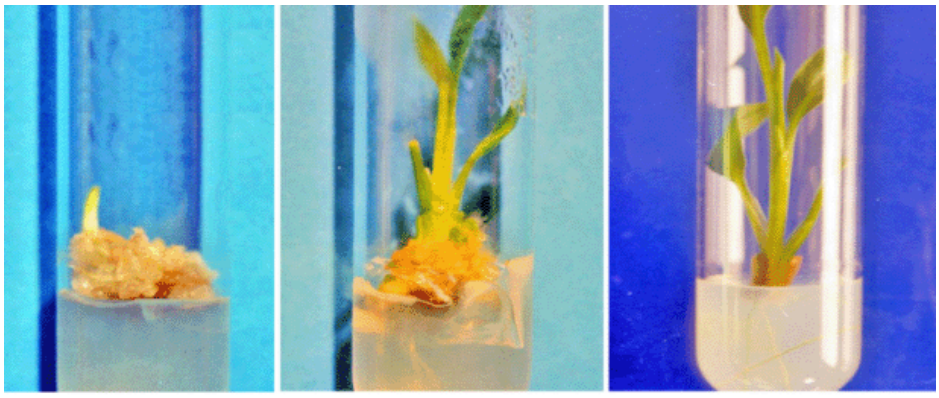
A B C D

Figure 3. Callus formation from 2 month old stem explants of *Curcuma* sp. No. 50 after cultured on MS medium having 2,4-D 0.063 (A) 0.125 (B) 0.250 (C) and 0.50 mg/l (D) for 5 weeks.

ผลการทดลอง

การชักนำให้เกิดแคลลัส

ระดับอายุของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่มี 2,4-D และ/หรือ BAP ทั้ง 15 กรรมวิธีเป็นไปในทำนองเดียวกันในทั้งสามอายุ (Table 1) โดยเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างอายุของชิ้นส่วนทั้งสามอายุที่เลี้ยงบนอาหารรวมทั้งหมด 15 กรรมวิธี พบว่าชิ้นส่วนจากต้นอ่อนที่มีอายุ 2 เดือน มีความเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดคือ 50.67% และมีปริมาณแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.020 คะแนน โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชิ้นส่วนจากต้นอ่อนอายุ 3 และ 1 เดือน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย และมีปริมาณแคลลัสเฉลี่ย 37.33% และ 0.653 คะแนน กับ 34.00% และ 0.647 คะแนน ตามลำดับ (Table 2 และ Figure 2) โดยมีระยะเวลาในการเกิดแคลลัสแตกต่างกันเล็กน้อย คือชิ้นส่วนจากลำต้นอ่อนที่มีอายุ 2 เดือนสามารถสังเกตเห็นแคลลัสได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 เช่นเดียวกับชิ้นส่วนจากลำต้นอ่อนที่มีอายุ 1 เดือน ซึ่งเร็วกว่าชิ้นส่วนที่มีอายุ 3 เดือน 1 สัปดาห์ ส่วนลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนทั้งสามระดับอายุไม่แตกต่าง



A **B** **C**

Figure 4. Callus formation from 2 month old stem explants of *Curcuma* sp. No. 50 after cultured on MS medium having 2,4-D alone (A) 2,4-D plus BAP (B) and BAP alone (C) for 5 weeks.

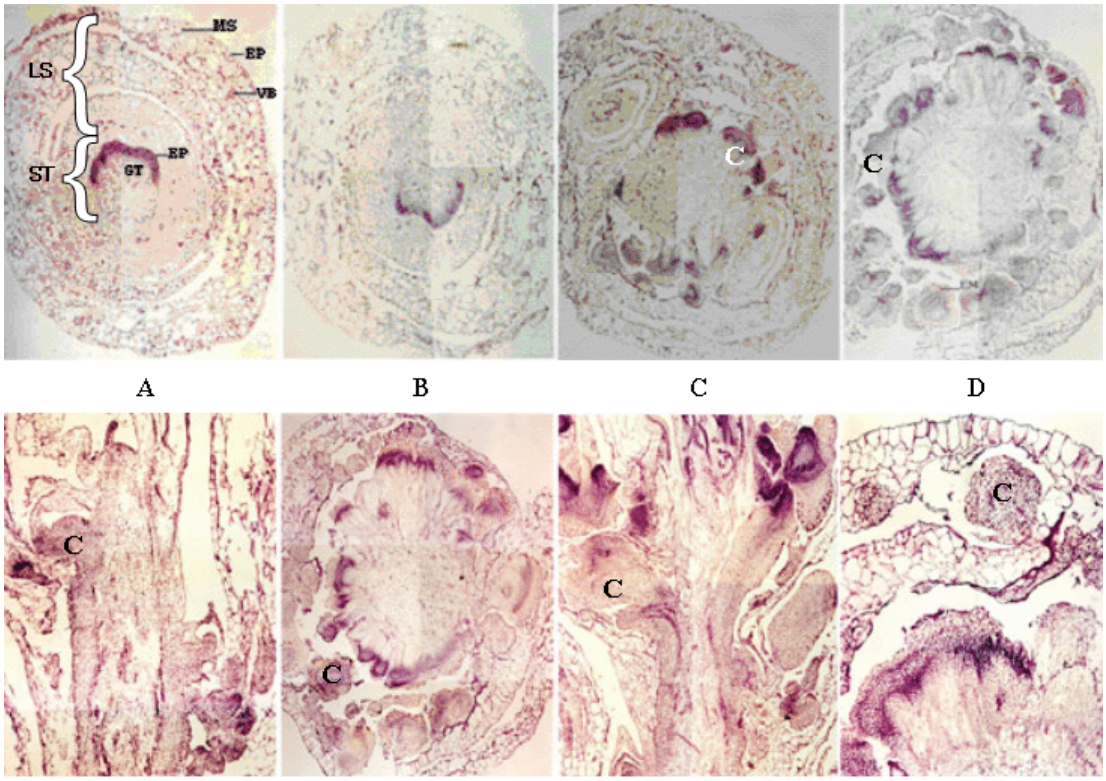


Figure 5. Cross (A-D, F and H) and longitudinal (E and G) sections through stem explants of *Curcuma* sp. No. 50 showing callus formation after cultured on MS medium having 0.125 mg/l 2,4-D for 1 week (A), 2 weeks (B), 3 weeks (C), 4 weeks (D and E) and 5 weeks (F-H): stem (ST), leaf sheath (LS), epidermis (EP), ground tissue (GT), mesophyll (MS), vascular bundle (VB) and callus (C).

Table 2. Effect of different age of stem on callus induction and callus size of stem explants of *Curcuma* sp. No.50 after cultured for 5 weeks.

Explant Age (months)	Callus induction (%)*	Callus Size (score)*
1	34.00 b	0.647 b
2	50.67 a	1.020 a
3	37.33 b	0.653 b

*** Data presents an average of % callus induction and callus size from all culture medium tested. Values in each column followed by different letters are significant differences (P = 0.95).**

Table 3. Effect of 2,4-D and BAP on callus induction of stem explants of *Curcuma* sp. No. 50 after cultured for 5 weeks

BAP (mg/l)	Callus Induction (%)*					Average
	2,4-D (mg/l)					
	0.000	0.063	0.125	0.250	0.500	
0.000	0.00 f	66.67 abc	83.33 a	76.67 ab	46.67 cd	69.00
0.125	0.00 f	43.33 de	40.00 cd	56.67 bcd	50.00 cd	38.00
0.250	0.00 f	20.00 e	36.67 de	46.67 cd	43.33 cd	29.33
	0.00	43.33	53.33	60.00	46.67	

*** Data presents an average of % callus induction from all age of stem explants tested. Different letters denote significant differences (P = 0.95).**

กันมากในแต่ละกรรมวิธี โดยแคลลัสที่เกิดมีสีขาวนวลร่วน (friable callus) เกิดขึ้นบริเวณใบที่เริ่มมีขนาดใหญ่และเพิ่มขนาดใหญ่มากขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 เพียงแต่ชิ้นส่วนจากต้นอ่อนที่มีอายุ 3 เดือนมีการเจริญเติบโตของยอดร่วมกับการเกิดแคลลัส

นอกจากนี้ ยังพบว่าชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและปริมาณแคลลัสได้แตกต่างกัน การเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มี 2,4-D เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ร่วมกับ BAP หรือมีเพียง BAP และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ 2,4-D คือ 0.125 มก/ล ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยทุกระดับอายุของชิ้นส่วน 83.33% (Table 3) โดยชิ้นส่วนในสัปดาห์แรกยังคงมีสีเขียวและมียอดเจริญยืดยาวขึ้นมาเล็กน้อยมีความยาวประมาณ 0.1-0.5 ซม ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 บริเวณโคนของชิ้นส่วนเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยเฉพาะส่วนกาบใบที่สัมผัสกับอาหารวุ้นซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นมีสีจางลงเมื่อเทียบกับบริเวณอื่น และพบว่าขนาดที่ใหญ่ขึ้นของชิ้นส่วนมีความสัมพันธ์ในทางบวกกับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สูงขึ้น แต่มีความสัมพันธ์ในทางลบกับการเจริญเติบโตของยอดและราก ในสัปดาห์ที่ 3 กาบใบแต่ละกาบมีขนาดใหญ่ขึ้นและขยายตัวออก สังเกตพบแคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนเล็กๆ สีขาวนวลร่วน (friable callus) เกิดขึ้นบริเวณส่วนโคนของกาบใบที่มีขนาดใหญ่ซึ่งสัมผัสกับอาหาร จากนั้นแคลลัสมีการเติบโตและเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 (Figure 3 B) อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนมีการเกิดและการเติบโตของแคลลัสลดลงเมื่อใช้ 2,4-D ที่มีความเข้มข้นต่ำและสูงกว่า 0.125 มก/ล โดยพบว่ามีการเจริญเติบโตของยอดและใบร่วมกับการเกิดแคลลัสเมื่อใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ (0.063 มก/

ล) (Figure 3 A) ชิ้นส่วนมีสีเหลืองเข้มเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 0.25 มก/ล (Figure 3 C) และชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลไหม้เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.50 มก/ล (Figure 3 D) อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยทุกอายุของชิ้นส่วนที่ความเข้มข้น 0.125 มก/ล ก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.250 มก/ล (Table 3) แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยพบว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D อย่างเดียวที่ความเข้มข้นสูงมีลักษณะร่วนแห้งและมีสีเหลืองเข้มกว่า แต่มีจำนวนรากน้อยกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ต่ำ

ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่มีทั้ง 2,4-D และ BAP เกิดแคลลัสรองลงมาเมื่อเทียบกับการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว (Figure 4 A) โดยแคลลัสเกิดในลักษณะเดียวกัน แต่เกิดแคลลัสช้ากว่าซึ่งสังเกตพบแคลลัสในสัปดาห์ที่ 4 หรือ 5 โดยชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่ำร่วมกับ BAP ทุกความเข้มข้นมีการเจริญเติบโตของยอด และ/หรือรากไปพร้อมกับการเกิดแคลลัสด้วยและแคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อนๆ (Figure 4 B) ซึ่งตรงข้ามกับชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ที่ความเข้มข้นสูงๆ ร่วมกับ BAP ที่มีการเจริญเติบโตของยอดน้อยกว่า แต่มีการเกิดแคลลัสมากกว่าและแคลลัสที่ได้มีสีเหลืองเข้ม ซึ่งการเกิดแคลลัสนี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D และ/หรือ BAP

ส่วนชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่มี BAP เพียงอย่างเดียวและอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่พบการเกิดแคลลัส มีเพียงการเจริญเติบโตของยอดและรากเท่านั้น โดยรากและยอดมีการเจริญยืดยาวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ BAP ที่สูงขึ้น (Figure 4 C)

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดแคลลัส

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของต้นอ่อนกระเจียวที่ชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.125 มก/ล ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าเนื้อเยื่อส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นในระยะเริ่มการทดลอง (Figure 5 A) ประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรกคือ ส่วนของลำต้น (stem, ST) มีลักษณะเป็นวงรูปไข่ภายในประกอบด้วยชั้นเนื้อเยื่อที่อยู่รอบนอกเรียกเนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis, EP) ถัดเข้ามาเป็นชั้นเนื้อเยื่อพื้น (ground tissue, GT) ที่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยพาเรงคิมา (parenchyma, PR) และมีกลุ่มมัดท่อลำเลียง (vascular bundle, VB) กระจายแทรกอยู่ โดย VB เป็นเนื้อเยื่อลำเลียงประกอบด้วยโพลเอ็ม (phloem) และไซเล็ม (xylem) ที่มีแคมเบียมในมัดท่อลำเลียง (fascicular cambium) กั้นกลาง อีกส่วนหนึ่งคือ ส่วนของกาบใบ (leaf sheath, LS) มีลักษณะเป็นวงรีส่วนกลางหนาและเรียวไปทางด้านปลายและไม่เชื่อมติดกันแต่ห่อหุ้มลำต้นไว้ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายส่วน ได้แก่ ชั้นนอกสุดคือ EP ถัดเข้ามาเป็นชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll, MS) ซึ่งไม่แยกเป็นชั้นแพลิเซด (palisade) และสปองจี (spongy) อย่างชัดเจน และมีกลุ่ม VB กระจายในชั้น MS

เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนนาน 1 สัปดาห์ (Figure 5 A) พบว่าเนื้อเยื่อในส่วนของลำต้นและกาบใบมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยไม่แตกต่างจากเมื่อเริ่มเลี้ยง โดยชิ้นส่วนเริ่มมีขนาดโตขึ้นเล็กน้อยบริเวณโคนกาบใบ แต่เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนนาน 2 สัปดาห์ (Figure 5 B) จะเห็นว่ากาบใบส่วนนอกสุดมีการขยายขนาดใหญ่มากขึ้นแต่ยังไม่พบการเกิดแคลลัส ต่อมาในสัปดาห์ที่ 3 (Figure 5 C) เมื่อสังเกตจากภายนอกพบว่ามีแคลลัส (C) ลักษณะเป็นก้อนเล็กๆ สีเหลืองอ่อนแยกออกมาจากส่วนกาบใบบริเวณที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงแยกออกจากกัน เป็นผลทำให้ก้อนแคลลัสบางส่วนที่อยู่ภายในหลุดออกมา และเมื่อนำชิ้นส่วนดังกล่าวนี้มา section สามารถเห็นการเกิดแคลลัสที่ชัดเจนมากขึ้น โดยพบว่าก้อนแคลลัสที่เกิดมีลักษณะกลมหรือรีขนาดใกล้เคียงกันประกอบด้วยเซลล์พาเรงคิมาเล็กๆ หลายเซลล์ย้อมติดสีเข้มชัดเจน แต่ละกลุ่มก้อนเซลล์มีขอบเขตที่แน่นอน และแต่ละกลุ่มสามารถหลุดแยกออกจากกันโดยอิสระ แคลลัสเกิดขึ้นได้จากทั้งเนื้อเยื่อของลำต้นและกาบใบ โดยสันนิษฐานว่าแคลลัสมีจุดกำเนิดมาจากเซลล์พาเรงคิมาในชั้น GT บริเวณใกล้ๆ ชั้น EP ของลำต้นและเซลล์พาเรงคิมาในชั้น MS ของกาบใบที่มีการเปลี่ยนสภาพกลับ (redifferentiation) ไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ จากนั้นมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มเซลล์พาเรงคิมา แล้วพัฒนาไปเป็นแคลลัส จากภาพจะเห็นได้ว่าก้อนแคลลัสเกิดขึ้นกระจายบางตำแหน่งของเนื้อเยื่อของ

ลำต้นและกาบใบ ปริมาณของแคลลัสเพิ่มมากขึ้นเมื่อเลี้ยงต่อไปในสัปดาห์ที่ 4 (Figure 5 D) โดยแคลลัสบางตำแหน่งแยกตัวหลุดออกมาจากรอยแยกเนื้อเยื่อกาบใบที่ขยายขนาดใหญ่ขึ้น จาก Figure 5 E ซึ่งเป็นภาพตัดตามยาวของชิ้นส่วนเมื่อเลี้ยงบนอาหารนาน 4 สัปดาห์ จะเห็นว่าบริเวณที่เหนือขึ้นมาจากส่วนโคนหรือบริเวณใกล้ยอดก็สามารถเกิดแคลลัสได้เช่นกัน โดยแคลลัสเกิดตรงตำแหน่งตาข้างของลำต้น และในสัปดาห์ที่ 5 (Figure 5 F, G) ก้อนแคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน และเมื่อขยายภาพตัดตามขวางตำแหน่งที่แคลลัสเกิดขึ้นที่กาบใบ (Figure 5 H) พบว่าก้อนแคลลัสที่เกิดขึ้นประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กเท่าๆ กันจำนวนมากที่มีลักษณะผิวมันสีขาว-เหลืองเหมือนกัน แต่ละก้อนแคลลัสมีขอบเขตชัดเจนและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเจริญแต่อย่างใด มีเพียงการขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 5 ซึ่งคาดว่ามีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้นที่สมบูรณ์ได้ถ้าย้ายไปเลี้ยงบนอาหารและสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงต่อไป

วิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำให้เกิดแคลลัส

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนต้นอ่อนที่มีอายุ 2 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและปริมาณแคลลัสสูงกว่าต้นอ่อนที่มีอายุ 1 และ 3 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงบนอาหารมีผลต่อการเจริญพัฒนาและการเกิดแคลลัส สอดคล้องกับการทดลองของ Remotti และ Loffler (1995) ที่พบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนจากหัวแขนง (cormel) ของแกลดิโอลัสที่อายุ 6 และ 9 เดือน บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 9.0 มิลลิโมลาร์ มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนที่มีอายุ 12 เดือน ส่วน Green (1977) ก็พบว่าการเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดที่มีขนาด 0.75-1.50 มม บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าเอ็มบริโอที่มีขนาด 1.60-2.50, 2.60-2.90 และ 3.00 มม ตามลำดับ โดยขนาดของเอ็มบริโอแปรผันโดยตรงกับอายุของเอ็มบริโอในทำนองเดียวกัน Te-chato และ Chartikul (1993) ก็รายงานว่าการเลี้ยงเอ็มบริโอของยางพาราที่มีอายุ 8 สัปดาห์บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มก/ล ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าชิ้นส่วนที่มีอายุ 6 7 9 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ นอกจากปัจจัยเรื่องชนิดพืชและอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงแล้ว ชิ้นส่วนของพืชแต่ละส่วนก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันด้วย โดย Stefaniak (1994) พบว่าชิ้นส่วนจากหัวแขนงของแกลดิโอลัสถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนโคนใบและแผ่นใบทั้งหมด เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มก/ล

การที่ชิ้นส่วนของพืชที่มีอายุแตกต่างกันถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีมากน้อยต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยที่สำคัญคือความเข้มข้นของฮอร์โมนที่มีในชิ้นส่วนพืช ซึ่งความเข้มข้นของฮอร์โมนที่มีในชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของต้นอ่อนกระเจียวที่มีอายุ 2 เดือน อาจอยู่ในระดับที่เมื่อรวมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับจากในอาหารแล้ว มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสดีกว่าชิ้นส่วนที่มีอายุ 1 และ 3 เดือน รวมทั้งชนิดและปริมาณของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อชิ้นส่วนพืชมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะเซลล์พาเรงคิมาและเซลล์เจริญ (meristematic cell) ที่สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาให้แคลลัสได้ (จำนงค์, 2538)

เมื่อพิจารณาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อกระเจียว พบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่มีเพียง 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและได้ปริมาณมากที่สุด ขณะที่ชิ้นส่วนเลี้ยงบนอาหารที่มีทั้ง 2,4-D และ BAP มีการเกิดแคลลัสได้น้อยรองลงมา แต่มีการเจริญเติบโตของยอดและรากเกิดขึ้นดี ส่วนการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่มี BAP เพียงอย่างเดียวหรือไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่มีการเจริญเติบโตของรากและยอดดี เนื่องจากมีจุดเจริญหรือเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดหรือราก แต่อาจมีชนิดและระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ไม่สมดุลสำหรับการแบ่งเซลล์ตลอดเวลา แต่เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมลงไป จึงมีผลส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาการชักนำให้

เกิดแคลลัสในพืชชนิดต่างๆ เช่น ขิง (Babu *et al*., 1993) แกลดิโอลัส (Stefaniak, 1994) และไฮยาซีน (Bae *et al*., 1984) ซึ่งล้วนแต่พบว่า 2,4-D เพียงอย่างเดียวมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เพราะว่า 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (auxin) ตัวหนึ่งที่มีผลดีในการกระตุ้นและส่งเสริมการแบ่งเซลล์ (Leopold and Kriedemann, 1975) การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารที่มีทั้ง 2,4-D และ BAP ทำให้เกิดแคลลัสและมีการเจริญเติบโตของยอดร่วมด้วย โดยขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ 2,4-D และ BAP ทั้งนี้เนื่องจากผลร่วมของ 2,4-D กับ BAP ซึ่ง BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน (cytokinin) ที่มีผลส่งเสริมการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการเจริญเติบโตทางต้น (จำนงค์, 2538) ดังนั้นการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารที่มีเพียง BAP จึงมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดได้ดี จากการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.125 มก/ล เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนกระเจียว แต่การใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้นสูงหรือต่ำกว่านี้มีผลทำให้เกิดแคลลัสน้อยลง โดยเฉพาะอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.50 มก/ล มีผลทำให้ชิ้นส่วนเจริญเติบโตช้าและมีสีเหลืองเข้มถึงน้ำตาล ทั้งนี้อาจเนื่องจากชิ้นส่วนได้รับออกซินในปริมาณมากเกินไปจึงมีผลในการยับยั้งการแบ่งเซลล์หรือมีผลทำลายเนื้อเยื่อได้ (Thimann, 1963) ซึ่งความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันในชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิด เช่น การชักนำให้เกิดแคลลัสของลิลลี่ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 4.0 มก/ล (Stimart *et al*., 1980) ในขณะที่แกลดิโอลัส ใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มก/ล (Stefaniak, 1994) และฟรีเซียใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก/ล (Tamura, 1978) เป็นต้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิดพบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินร่วมกับออกซินมีผลต่อการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าการมีเฉพาะออกซินเพียงอย่างเดียว เช่น การทดลองในแกลดิโอลัสพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนปลายยอดได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 5.0 มก/ล ร่วมกับไคเนติน (kinetin) ความเข้มข้น 0.5 มก/ล (Ziv *et al*., 1970) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาในไอริสพบว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก/ล ร่วมกับไคเนติน ความเข้มข้น 1.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากส่วนใบและดอกอ่อนได้ดีที่สุด (Jehan *et al*., 1994) และ Malamug และคณะ (1991) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปลายยอดของขิงได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มก/ล หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ทั้งนี้เนื่องมาจากสัดส่วนของออกซินและไซโทไคนินมีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส รวมทั้งสารกลุ่มไซโทไคนินมีผลส่งเสริมการแบ่งเซลล์เมื่อใช้ในระดับที่เหมาะสม

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดแคลลัส

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของกระเจียว สันนิษฐานว่าแคลลัสเกิดจากการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างไซเล็มและโฟลเอ็มของลำต้นและกาบใบ และแคลลัสเกิดจากกลุ่มเซลล์พาเรงคิมาในชั้น GT บริเวณใกล้ชั้น EP ของลำต้นและในชั้น MS ของกาบใบที่มีการเปลี่ยนสภาพกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งเมื่อเนื้อเยื่อเจริญเหล่านี้ได้รับอาหารและการกระตุ้นโดยออกซินจากภายนอกในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมมีผลชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว โดยมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเป็นก้อนแคลลัสซึ่งประกอบด้วยเซลล์พาเรงคิมารวมกลุ่มกัน โดยทั่วไป เนื้อเยื่อของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ได้แก่ แคมเบียม คอร์เทกซ์ มัดท่อลำเลียง และพิธ เป็นต้น เนื่องจากประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญที่ยังมีชีวิตและสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ ซึ่งมีการศึกษาในข้าว พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนลำต้นและปลายรากได้ โดยมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อชั้นคอร์เทกซ์ของลำต้นและรากซึ่งประกอบด้วยเซลล์พาเรงคิมาและเซลล์เจริญจนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ประศาสตร์, 2536) นอกจากนี้ ยังให้ผลในทำนองเดียวกับงานทดลองของสุธิดา (2534) และ Dekker และคณะ (1991) ซึ่งพบว่าในการเกิดแคลลัสจากส่วน

ของกาบใบอ่อนของไผ่และขิง แคลลัสเจริญพัฒนามาจากเนื้อเยื่อเจริญและกลุ่มเซลล์พาเรงคิมาที่มีการเปลี่ยนสภาพกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญและมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนพัฒนาไปเป็นแคลลัสเมื่อได้รับออกซินจากภายนอกที่เหมาะสม

สรุปผลการทดลอง

ชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของกระเจียวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D อย่างเดียวหรือ 2,4-D ร่วมกับ BAP โดยอาหารที่มี 2,4-D เพียงอย่างเดียวที่ระดับความเข้ม 0.125 มก/ล มีความเหมาะสมที่สุด และชิ้นส่วนที่มีอายุ 2 เดือนมีความเหมาะสมในการเกิดแคลลัสมากกว่าอายุ 3 และ 1 เดือน โดยสันนิษฐานว่าแคลลัสมีจุดกำเนิดมาจากพาเรงคิมาในชั้นเนื้อเยื่อพื้นของลำต้นและในชั้นมีโซฟิลล์ของกาบใบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ ที่เอื้อเฟื้อพืชทดลอง เครื่องมือ และสถานที่ในการทดลองของหน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปริทรรศน์ ไตรสนธิ ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา รวมทั้งขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จามจุรี โสตถิกุล. 2533. การขยายพันธุ์กระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 192 หน้า.

จำนงค์ อุทัยบุตร. 2538. เอกสารประกอบการสอนสารสังเคราะห์ที่ใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 260 หน้า.

ทิพย์สุดา อนันกุล. 2540. การขยายพันธุ์กระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 182 หน้า.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 158 หน้า.

สุธิดา ฉันทานุรักษ์. 2534. การเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่: ผลของ 2,4-D, NAA และ BAP ต่อการเกิดแคลลัสและยอด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน) คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 125 หน้า.

เสาวลักษณ์ สุขมัย. 2538. ปทุมมาที่ท่าเดื่อ. **ใน** หนังสือรวมไม้ตัดดอกเมืองไทย. หน้า 80-84. สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพฯ.

อภิชาติ ชิดบุรี. 2539. การขยายพันธุ์ดาหลาในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 166 หน้า.

Arimura, C.T., Finger, F.L. and Casali, V.W.D. 2000. Effect of NAA and BAP on ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) spouting in solid and liquid medium. Revista Brasileira de Plants Medicinais 2: 23-26.

Babu, K.N., Samsudeen, K. and Ratnambal, M.J. 1993. Direct regeneration of plant from immature inflorescence of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) by culture. Hort. Abstr. 63: 5386.

Bae, S.K., Lee, B.K. and Eun, J.S. 1984. Clonal propagation of hyacin by *in vitro* culture bulblet culture callus subculture and organ formation from excised tissue. Hort. Abstr. 54: 4.

Dekker, A.J., Rao, A.N. and Gob, C.J. 1991. *In vitro* storage of multiple shoot cultures of ginger at ambient temperature of ginger. Sci. Hort. 47: 157-167.

Green, C.E. 1977. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. HortScience 12: 7-10.

Huang, J.H. 1996. *In vitro* propagation and preservation of ginger germplasm resources. Hort. Abstr. 66: 317.

Jehan, H., Courtois, D., Ehret, C., Lerch, K. and Petiard, V. 1994. Plant regeneration of *Iris pullida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves apices and young flower. Plant Cell Rep. 13: 671-675.

Johansen, D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York. 523 pp.

Keshavachandran, R. and Khader, M.A. 1991. Tissue culture propagation of turmeric. Hort. Abstr. 61: 3060.

Leopold, A.C. and Kriedemann, P.E. 1975. Plant Growth and Development. MC Graw-Hill Book,. New York. 466 p.

Malamug, J.I., Inden, F.H. and Asanira, T. 1991. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. Sci. Hort. 48: 89-97.

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

Remotti, P.C. and Loffler, H.J.M. 1995. Callus induction and plant regeneration from gladiolus. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 42: 171-178.

Sass, J.E. 1966. Botanical Microtechnique. The Iowa State University Press, Iowa. 288 pp.

Sharma, T.R. and Singh, B.M. 1995. *In vitro* micro-rhizome production in *Zingiber officinale* Rosc. Plant Cell Rep. 15: 274-277.

Te-chato, S. and Chartikul, M. 1993. Tissue culture of rubber: Certain factors affecting callus formation from integument of immature seed. Songklanakarin J. Sci. Technol. 15: 227-233.

Stefaniak, B. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of gladiolus. Plant Cell Rep. 13: 386-389.

Stimart, D.P., Ascher, P.D. and Zagorski, J.S. 1980. Plants from of the interspecific hybrid *Lilium* "Black Beauty". HortScience 15: 313-315.

Wanakrairoj, S. 1992. *In vitro* propagation of patumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.). HortScience 27: 97.

Tamura, S. 1978. Adventitious bud formation from excised hyacinth bulb scals *in vitro*. Hort. Abstr. 48: 882.

Thimann, K.V. 1963. Plant growth substances: past, present and future. Ann. Rev. Plant Physiol. 14: 1-8.

Ziv, M., Halevy, A.H. and Shiol, R. 1970. Organs and plantets regeneration of gladious through tissue culture. Ann. Bot. 34: 671-676.