

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยงคัพภะในงา

ประสิทธิ์ ใจศิล และ สุกลักษณ์ นพคุณางกุล

ภาควิชาพืชไร่ และศูนย์ศึกษาค้นคว้าและพัฒนาเกษตรกรรมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

บทคัดย่อ

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของงาที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์งาต่อไป ชิ้นส่วนจากลำต้น hypocotyl และใบงาที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ คือ BA, IAA, NAA และ 2, 4-D ส่วนการเพาะเลี้ยงคัพภะนั้นได้ทดลองนำไขอ่อนของงาลูกผสมระหว่างพันธุ์ KKU 1 X KKU 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA และ Kinetin ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ บันทึกความยาวรากและลำต้นของต้นอ่อนที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงไขอ่อนในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่างๆ กัน

ผลการทดลองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่องา พบว่าชิ้นส่วนจาก hypocotyl และลำต้นจะให้ขนาดของแคลลัสใหญ่กว่าชิ้นส่วนจากใบและสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 2 มก/ลิตร จะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยงาพันธุ์ MK 60 จะตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดีที่สุด ตามด้วยงาพันธุ์ Roi Et 1, Pb. Till และ KKU 1 ตามลำดับ

สำหรับการเพาะเลี้ยงไขอ่อนนั้น พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA 20 μ M เป็นสูตรที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดโดยอาศัยความยาวรากเป็นเกณฑ์ อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สูตรอาหาร MS ธรรมดาก็สามารถชักนำให้ไขอ่อนของงาพัฒนาเป็นต้นกล้าได้โดยจะเติมหรือไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตก็ได้ผลเช่นเดียวกัน จะให้ผลต่างกันเฉพาะความยาวของรากเท่านั้น การเพาะเลี้ยงไขอ่อนหรือการเพาะเลี้ยงคัพภะนี้จะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถสร้างลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) และเพาะเลี้ยงลูกผสมให้พัฒนาเป็นต้นพืชปกติได้โดยสมบูรณ์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชได้

Keywords : Sesame, tissue culture, embryo culture

Tissue Culture and Embryo Culture Techniques in Sesame

Prasit Jaisil and Supalak Nopkunangkul

Department of Agronomy and Agricultural Development Research Center
in Northeast Thailand , Faculty of Agriculture, Khon Kaen University
Khon Kaen 40002, Thailand

ABSTRACT

Tissue culture and ovule culture of sesame were conducted at Khon Kaen University. Hypocotyl, stem and leaf explants excised from *in vitro* grown sesame were inoculated for callus induction on MS media supplemented with different concentrations and combinations of BA, IAA, NAA, and 2, 4-D. Young ovule of hybrid sesame (KKU 1 X KKU 2) was used for ovule culture. MS media supplemented with different concentrations and combinations of IAA and kinetin were used for ovule culture. After 5 weeks of culture, data were recorded on root length and plant height of sesame seedlings.

The results from tissue culture revealed that hypocotyl and stem explants can be used for tissue culture better than leaf explant in all combination of culture media. A combination of BA 2 mg/l was the most efficient for the formation of calli from all kind of explants. The sesame variety that gave the best response to culture medium was MK 60 followed by Roi Et 1, Pb. Till and KKU 1, respectively.

The results from ovule culture indicated the MS supplemented with IAA 20 μ M was efficient for ovule culture based on root length of the seedlings excised from ovule culture. However, MS medium supplemented with or without plant growth regulators can be used for sesame ovule culture in this study. Ovule or embryo culture is a valuable tool for plant breeders to obtain hybrids from wild crosses that would otherwise abort on the plant.

Keywords : Sesame, tissue culture, embryo culture

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยงคัพภะในงา

Tissue Culture and Embryo Techniques in Sesame

บทนำ

ในสภาพของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ อ้วนน้ำไม่ดี และการกระจายของฝนไม่สม่ำเสมอ ก่อให้เกิดสภาวะแห้งแล้งอยู่เป็นประจำ มีพืชไร่เพียงไม่กี่ชนิดที่ปลูกได้ผลดีในภูมิภาคนี้ พืชไร่ที่เป็นพืชหลักของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ มันสำปะหลัง ปอแก้วและอ้อย ซึ่งต่างก็ต้องพึ่งตลาดต่างประเทศที่ไม่แน่นอน เกษตรกรประสบปัญหาราคาพืชผลตกต่ำอยู่เป็นประจำ จึงจำเป็นต้องแสวงหาพืชไร่ชนิดอื่นที่ปลูกได้ผลดีมาให้เกษตรกรเลือกใช้เพิ่มขึ้น

งาเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่ปลูกกันอยู่มากพอสมควรในภูมิภาคนี้และเป็นพืชที่มีศักยภาพในการผลิตและการตลาดสูงมากพืชหนึ่ง แต่พันธุ์งาที่เกษตรกรใช้ปลูกส่วนใหญ่ยังคงเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่ให้ผลผลิตต่ำ และคุณภาพของเมล็ดไม่ตรงตามความต้องการของตลาด หากทำการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นก็เชื่อว่าจะสามารถขยายการผลิตงาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้อีกมาก และจะเป็นอีกพืชหนึ่งที่เกษตรกรสามารถเลือกปลูกได้เมื่อราคาพืชอื่นตกต่ำ นอกจากนี้ยังช่วยให้การใช้ที่ดินเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย เพราะสามารถใช้เป็นพืชร่วมระบบในระบบการปลูกพืชของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้อย่างเหมาะสม

โครงการปรับปรุงพันธุ์งาของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้เริ่มทำการวิจัยอย่างจริงจังมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525 โดยได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2526 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และระหว่างปี พ.ศ. 2526 - 2532 ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากรัฐบาลออสเตรเลียผ่านทางโครงการวิจัยเกษตรแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ นอกจากนี้ประชาคมยุโรป (European Community) ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์งาโดยเฉพาะอีกระหว่างปี พ.ศ. 2528-2534 หลังจากนั้นได้ดำเนินงานอย่างต่อเนื่อง โดยใช้งบประมาณจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไปของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งทางโครงการได้คัดเลือกพันธุ์งาที่ให้ผลผลิตสูงได้ 3 พันธุ์ คือ งาขาว มข. 1 งาดำ มข. 2 และ งาแดง มข.3 และได้เผยแพร่ให้กับเกษตรกรในแหล่งปลูกงาที่สำคัญๆ ของประเทศไปบ้างแล้ว เช่น พืชญโลก เพชรบูรณ์ เลย บุรีรัมย์ มหาสารคามหนองคาย ขอนแก่น และกาญจนบุรี เป็นต้น

งาพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 พันธุ์ดังกล่าวนี้ เป็นพันธุ์ที่โครงการแนะนำให้เกษตรกรใช้ในระยะสั้นไปพลางๆ ก่อน เนื่องจากยังมีบางลักษณะที่ควรปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้น เช่น ขนาดเมล็ดและโดยเฉพาะความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของงา ในการนี้ทางโครงการได้รวบรวมพันธุ์งาไว้ประมาณ 300 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีฐานทางพันธุกรรมกว้าง (broad genetic base) เพราะประกอบไปด้วย พันธุ์ป่า (wild species) และพันธุ์เพาะปลูก

(cultivated species) การผสมพันธุ์ (hybridization) จึงอาจจะทำได้ทั้งการผสมพันธุ์ภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific hybridization) หรือการผสมพันธุ์ข้ามชนิด (interspecific hybridization) ซึ่งในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์เหล่านี้ การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมนับว่าเป็นสิ่งจำเป็นขั้นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์พืชทุกชนิด

การทดลองในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยงคัพภะในางเพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การตรวจเอกสาร

งา (*Sesamum indicum* L.) เป็นพืชน้ำมันเก่าแก่ที่สุดพืชหนึ่งที่มนุษย์ปลูก สันนิษฐานว่าอาจจะมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเอธิโอเปีย (Yermanos, 1980) หลังจากนั้นก็แพร่เข้าไปปลูกในประเทศต่างๆ ทั้งในทวีปแอฟริกา ยุโรป อเมริกา เอเชีย และออสเตรเลีย สำหรับประเทศไทยนั้นสันนิษฐานว่าถูกนำเข้ามาปลูกครั้งแรกในภาคเหนือก่อนโดยผ่านเข้ามาทางประเทศพม่า

จากข้อมูลของศูนย์สถิติการเกษตร (2537) พบว่าระหว่างปี 2527-2537 มีการขยายพื้นที่ปลูกจากปีละ 230,000 ไร่ เป็น 377,000 ไร่ ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากปีละ 22,100 ตัน เป็น 32,800 ตัน โดยผลผลิตที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการขยายพื้นที่ปลูก เพราะผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของงาไม่ได้เพิ่มขึ้นเลย กลับมีแนวโน้มลดต่ำลงด้วยซ้ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะดินที่ใช้ปลูกขาดการอนุรักษ์ทำให้เสื่อมโทรมลงมาก และงาพันธุ์ที่หน่วยงานราชการต่างๆ ปรับปรุงขึ้นมาไม่ได้รับการส่งเสริมเผยแพร่อย่างทั่วถึง นอกจากนี้แล้วเกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกงาเป็นพืชเสริมรายได้และผลผลิตอยู่ในเขตเกษตรล้าหลังที่อาศัยน้ำฝนแต่เพียงอย่างเดียว แนวทางในการเพิ่มผลผลิตจึงต้องปรับปรุงทั้งด้านการเกษตรกรรมและพันธุกรรมของงาโดยเฉพาะการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีฐานทางพันธุกรรมกว้างและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทั่ว ๆ ไปได้ดี

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ขั้นตอนที่สำคัญประการหนึ่งคือ การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้เกิดขึ้นในประชากรก่อน หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป ซึ่งในการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมนี้ ในอดีตจะใช้วิธีผสมพันธุ์ระหว่างพืชที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่ปฏิบัติกันมาตั้งแต่อดีต (conventional plant breeding) แต่ในปัจจุบันวิทยาการด้านต่างๆ มีความเจริญก้าวหน้าอย่างมาก ทำให้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งนับว่าเป็นวิธีการสมัยใหม่ (non-conventional plant breeding) และช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์พืชประสบผลสำเร็จได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่อาจจะนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นมีมากมาย เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) การเพาะเลี้ยงไข่อ่อน (ovule culture) การเพาะเลี้ยงเรณูหรืออับเรณู (pollen or anther culture) การหลอมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) และพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นการนำชิ้นส่วนของพืช เช่น ชิ้นส่วนจากใบ ลำต้น ราก เป็นต้น มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีการควบคุมแสง อุณหภูมิและความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ต่อไป ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้จะมีพันธุกรรมเหมือนกับต้นเดิมทุกประการ ยกเว้นในกรณีที่จะเกิดความแปรปรวนของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) ซึ่งจะช่วยให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ได้ โดยลักษณะใหม่ๆ ที่เกิดขึ้นนี้สามารถดำรงพันธุ์และขยายพันธุ์เพิ่มเติมต่อไปได้

นั่นคือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากจะช่วยขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากๆ ในเวลาอันจำกัดแล้ว ยังอาจจะสร้างพืชพันธุ์ใหม่ได้โดยตรงหรือใช้ช่วยในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับเรณู การเพาะเลี้ยงคัพภะ การหลอมเซลล์หรือการทำพันธุ์วิศวกรรมได้อีกด้วย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จในพืชทั่วๆ ไปอย่างมากมาย สำหรับในงานนั้น Lee et. al. (1986 a) พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้ยอดอ่อนของงากลายเป็นต้นอ่อนได้มากที่สุด คือ สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม NAA 0.1 มก./ลิตร, IAA 0.5 มก./ลิตร และ Kinetin 2 มก./ลิตร และ BA 1 มก./ลิตร ซึ่งช่วยชักนำให้เป็นต้นงาที่สมบูรณ์ได้ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Lee et. al. (1986 b) ยังได้ทดลองเพาะเลี้ยงอับเรณูของงาในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 25 มก./ลิตร และ BA 1 มก./ลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 55 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังไม่สามารถกระตุ้นให้พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้

อุปสรรคประการหนึ่งในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิด (interspecific hybridization) คือความอ่อนแอของลูกผสม ซึ่งอาจจะเป็นผลอันเนื่องมาจากการเข้ากันไม่ได้ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของไซโกต (zygote) และลักษณะทางพันธุกรรมของการสะสมอาหาร ทำให้คัพภะแห้งหรือตาย (Halward and Stalker, 1987) ดังเช่นปรากฏการณ์ในการผสมข้ามชนิดของถั่วลิสง (Nalini and Sastri, 1985) ซึ่งพบว่าการเจริญเติบโตของคัพภะลูกผสมและอาหารสะสมถูกทำให้ช้าลงและหยุดการเจริญเติบโต โดย hypertrophy ของเยื่อหุ้มเมล็ดและในที่สุดคัพภะก็จะตายโดยไม่มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนต่อไป

จากปัญหาและอุปสรรคในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดดังกล่าว เทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) จึงถูกนำมาใช้เพื่อช่วยแก้ไขอุปสรรคเหล่านี้ การเพาะเลี้ยงคัพภะเป็นเทคนิคในการนำเอาคัพภะอ่อน (immature embryo) หรืออาจจะนำเอาคัพภะที่เจริญเต็มที่แล้วมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (in vitro culture) เพื่อช่วยให้คัพภะลูกผสมสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้

สำหรับการเพาะเลี้ยงคัพภะในงานนั้นยังไม่มีใครรายงานไว้ ทั้งนี้เนื่องจากงาเป็นพืชที่มีขนาดเมล็ดเล็กมาก การนำเอาคัพภะมาเพาะเลี้ยงทำได้ยากเช่นเดียวกับพืชที่มีเมล็ดขนาดเล็กชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงต้องดัดแปลงนำเอาไข่อ่อน (ovule) มาเพาะเลี้ยงแทนที่จะเอาคัพภะคัพภะอย่างเดียว การเพาะเลี้ยงคัพภะของลูกผสมข้ามชนิดได้มีผู้พยายามศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง (Nalini and Sastri, 1985) white clover (Yamada and Fukuoaka, 1986) red clover (Phillips et. al., 1992) และยาสูบ (Chung et. al., 1988) เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของงา

1.1 การเตรียมต้นกล้าปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำเมล็ดงาพันธุ์ KKU1 KKU2 KKU3 Loei UCRXZhutt Pb.Till MK 60 และ Roi ET 1 มาฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ดโดยแช่ใน 70% ethyl alcohol นาน 30 วินาที แล้วนำไปแช่ใน 1% sodium hypochlorite นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยการแช่เมล็ดในน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงนำเมล็ดงาไปวางบนอาหารสูตร MS ที่เตรียมไว้ในขวดเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อและเก็บที่อุณหภูมิ 25°C โดยวางบนชั้นที่มีแสงสว่างประมาณ 3,000 lux 14 ชม./วัน เมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ก็สามารถตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากใบ ลำต้น หรือ hypocotyl ไปทดลองเพาะเลี้ยงต่อไปได้

1.2 การกระตุ้นการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ

ชิ้นส่วนของงาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาจากส่วนต่างๆ คือ ใบ ลำต้น และ hypocotyl โดยตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 5-10 มม. แล้วย้ายลงในอาหารสูตรต่างๆ ที่เตรียมไว้ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยไม่ต้องฆ่าเชื้อบริเวณผิวเนื้อเยื่อซ้ำอีก นำไปเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25°C และให้แสงสว่างประมาณ 3,000 lux 14 ชม./วัน สังเกตและบันทึกลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนต่างๆ ของงาทั้ง 8 สายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงส่วนประกอบเสริมโดยใช้ฮอร์โมนพืชในกลุ่ม auxins และ cytokinins หรือ gibberellins ในส่วนผสมและระดับต่างๆ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Plant growth regulators combination in MS medium for tissue culture of sesame.

Treatment	Plant growth regulator (mg/l)		
	BA	IAA	NAA
1	0.1	0.1	-
2	0.5	1.0	-
3	1.0	2.0	-
4	0.1	-	0.1
5	0.5	-	1.0
6	1.0	-	2.0

หมายเหตุ

- BA = 6-benzyl-aminopurine
 IAA = indole-3-acetic acid
 NAA = naphthaleneacetic acid

2. การศึกษาการเพาะเลี้ยงคัพภะของงา

การทดลองเพาะเลี้ยงคัพภะของงา (embryo culture) นั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาข้อมูลขั้นพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงคัพภะของงาลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) ในขั้นต่อไป แต่เนื่องจากเมล็ดงามีขนาดเล็กมากทำให้ยากต่อการแกะเอาคัพภะมาเพาะเลี้ยง จึงได้ปรับวิธีการใหม่เป็นการเพาะเลี้ยงไข่อ่อน (ovule culture) แทน

การทดลองเริ่มต้นโดยใช้งาขาวพันธุ์ KKU1 ผสมกับงาดำพันธุ์ KKU2 เมื่อฝักงามีอายุ 20 วัน ทำการตัดฝักงามาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ใน ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วย้ายไปแช่ในคลอโรกซ์ ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วย้ายไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าวจะทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

หลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ฝักฝักงาตามความยาว แล้วแกะเอาเมล็ดอ่อนที่อยู่ภายในฝักงามาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA (indole-3-acetic acid) และ kinetin (6-furfurylaminopurine) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน 6 ระดับ (Table 2) ใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design ทำ 10 ซ้ำ และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ ทำการบันทึกความยาวรากและความสูงของลำต้น

Table 2 Plant growth regulators combination in MS medium for embryo culture of sesame

Treatment	Plant growth regulator (μM)	
	IAA	kinetin
1 (control)	-	-
2	10	-
3	10	2.3
4	20	-
5	20	2.3
6	30	-
7	30	2.3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของงา

จากผลการทดลองที่แสดงไว้ใน Table 3 พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มก./ลิตร - NAA 2.0 มก./ลิตร จะทำให้แคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 2.94 มม. รองลงมาคือ MS-BA 1.0 มก./ลิตร + IAA 2.0 มก./ลิตร ซึ่งเพิ่มขนาดของแคลลัสได้ 2.11 มม. และ สูตร MS+BA 0.5 มก./ลิตร + NAA 1.0 มก./ลิตร จะเพิ่มขนาดแคลลัสได้ 2.09 มม. เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

Table 3 Effect of concentration and plant growth regulators on callus formation.

Treatment	Mean of the increase in diameter of callus (mm)
0.1 BA + 0.1 IAA	0.72
0.5 BA - 1.0 IAA	1.96
1.0 BA + 2.0 IAA	2.11
0.1 BA - 0.1 NAA	1.18
0.5 BA - 1.0 NAA	2.09
1.0 BA + 2.0 NAA	2.94

สำหรับชิ้นส่วนต่างๆ จากต้นกล้าของงาที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้น พบว่าชิ้นส่วนจาก hypocotyl สามารถทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เฉลี่ยการเพิ่มขนาดของแคลลัสจากชิ้นส่วนเดิมคือ 2.19 มม. ในขณะที่ชิ้นส่วนจากลำต้น เพิ่มขนาดได้รองลงมาคือ 2.08 มม. และชิ้นส่วนจากใบจะเพิ่มขนาดได้ต่ำที่สุด คือ 1.23 มม.

พันธุ์กรรมของงาก็มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเช่นกันโดยพิจารณาจากการเพิ่มขนาดของแคลลัสพบว่า งาพันธุ์ KKC 2 ตอบสนองต่อสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงดีที่สุดโดยเพิ่มขนาดแคลลัสได้ 2.17 มม. (Table 4) รองลงมาคือพันธุ์ UCRXZhutt (2.07 มม.) และพันธุ์ Locic (2.03 มม.) ตามลำดับ ชิ้นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงจะเริ่มสังเกตเห็นการเกิดแคลลัสเมื่อสัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป

Table 4 Effect of sesame genotypes on callus formation.

Genotype	Mean of the increase in diameter of callus (mm)
KKU 1	1.22
KKU 2	2.17
KKU 3	1.77
Pb.Till	1.89
Loei	2.03
UCRXZhutt	2.07
MK 60	1.53

เมื่อทดลองนำชิ้นส่วนของงาไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 2 มก./ลิตร และ ABA (abscisic acid) อัตราต่างๆ 4 ระดับ คือ 0.1 1.0 5.0 และ 10.0 มก./ลิตร โดยนำไปเพาะเลี้ยงในห้องมืดพบว่าอาหารสูตร MS+2,4-D 2 มก./ลิตร + ABA 10 มก./ลิตร จะเพิ่มขนาดของแคลลัสได้มากที่สุดเฉลี่ย 1.40 มม. รองลงมาคือสูตรที่เติม ABA 5 มก./ลิตร (Table 5) และพันธุ์ที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดีที่สุดคือ พันธุ์ KKU 1 รองลงมาคือ พันธุ์ Pb.Till MK 60 และ Roi Et 1 (RE1) ตามลำดับ

Table 5 Effect of concentrations and plant growth regulators on callus formation culture under dark condition.

Treatment	Increase in diameter of callus (mm)				Average
	KKU 1	Pb.Till	MK 60	RE 1	
MS+2,4-D 2 mg/l+ABA 0.1 mg/l	0.67	1.57	1.05	0.67	0.99
MS+2,4-D 2 mg/l+ABA 1.0 mg/l	1.00	1.14	0.90	0.38	0.86
MS+2,4-D 2 mg/l+ABA 5.0 mg/l	2.05	1.10	0.86	0.90	1.23
MS+2,4-D 2 mg/l+ABA 10.0 mg/l	1.95	1.52	1.19	0.95	1.40
Average	1.42	1.33	1.00	0.73	1.12

อัตราการเพิ่มขนาดของแคลลัสในสภาพมืดนี้ค่อนข้างต่ำมาก เฉลี่ย 0.99-1.40 มม. แคลลัสจะมีลักษณะสีขาวซีด โดยชิ้นส่วนที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงและตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดีที่สุดคือชิ้นส่วนจากลำต้น (1.58 มม.) รองลงมาคือ hypocotyl (1.29 มม.) และใบ (0.49 มม.) ตามลำดับ

และเมื่อนำชิ้นส่วนของงาไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงในอาหารสูตร MS+BA 2 ระดับคือ 2 มก./ลิตร และ 5 มก./ลิตร พบว่าชิ้นส่วนจากลำต้นจะใช้เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุดโดย

ขนาดของแคลลัสเพิ่มขึ้น 4.57 มม. รองลงมาคือชิ้นส่วนจาก hypocotyl (2.97 มม.) และชิ้นส่วนจากใบ (2.52 มม.) และพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ลิตร จะเพิ่มขนาดแคลลัสได้มากที่สุด เฉลี่ย 5.29 มม. โดยที่งาพันธุ์ MK 60 จะตอบสนองต่อการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด เฉลี่ย 4.65 มม. รองลงมาคือ RE 1 Pb.Till และ KKU 1 ตามลำดับ (Table 6)

Table 6 Effect of concentrations and plant growth regulators on callus formation culture under light condition.

Treatment	Increase in diameter of callus (mm)				Average
	KKU 1	Pb.Till	MK 60	RE 1	
MS+BA 2 mg/1	3.44	5.17	7.00	5.53	5.29
MS+BA 5 mg/1	1.08	0.47	2.30	1.86	1.43
Average	2.26	2.82	4.65	3.70	3.36

2. การศึกษาการเพาะเลี้ยงคัพภะของงา

ตามที่กล่าวไว้แล้วว่าได้มีการปรับเปลี่ยนวิธีการเพาะเลี้ยงคัพภะมาเป็นการเพาะเลี้ยงไข่อ่อนของงาแทนเนื่องจากเมล็ดงามีขนาดเล็กมาก ไม่เหมาะที่จะใช้วิธีการเพาะเลี้ยงคัพภะ

จากผลการทดลองที่แสดงไว้ใน Table 7 พบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอัตราความเข้มข้น 10 μM ลงในอาหารสูตร MS จะไม่ช่วยให้ความยาวของรากแตกต่างจากการใช้ MS เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อเพิ่ม IAA เป็น 20 μM หรือ 30 μM ไม่ว่าจะใส่ kinetin ในระดับ 2.3 μM หรือไม่ก็ตาม จะช่วยให้รากยาวขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามไข่อ่อนของงาที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรจะให้ความสูงของลำต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความยาวของรากจะพบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ในระดับความเข้มข้น 20 μM โดยไม่ต้องใส่ kinetin จะช่วยให้รากยาวขึ้นได้

Table 7 Effect of plant growth regulators on root length and plant height of sesame hybrid (KKU1 x KKU2)

Treatment	Root length ^{1/} (cm)	Plant height (cm)
MS (control)	4.25 ^c	4.71
MS + IAA 10 μ M	4.54 ^{bc}	4.66
MS + IAA 10 μ M + kinetin 2.3 μ M	4.52 ^{bc}	4.52
MS + IAA 20 μ M	5.69 ^a	5.54
MS + IAA 20 μ M + kinetin 2.3 μ M	5.39 ^a	5.00
MS + IAA 30 μ M	5.13 ^{ab}	4.86
MS - IAA 30 μ M + kinetin 2.3 μ M	5.00 ^{abc}	5.12
F-test	*	ns
C.V. (%)	17.9	21.1

1/ Means followed by the same letter are not significantly different (DMRT P=0.05)

ns = not significant and

* = significance at the 0.05 level of probability.

สรุปและวิจารณ์

วิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่นำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ครั้งนี้พบว่ามีความสำคัญภาพสูงพอสมควร การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของงานนั้น เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้เทคนิคขั้นสูงต่อไป เช่น การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดย somaclonal variation การเพาะเลี้ยงอับเรณูหรือละอองเรณูเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์แท้ในเวลาอันรวดเร็ว หรือการเพาะเลี้ยงคัพภะหรือไซ่อ่อนเพื่อช่วยให้ลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) มีชีวิตรอดและขยายพันธุ์ต่อไปได้ตามปกติ เป็นต้น

สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปกติได้ดีที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มก./ลิตร + NAA 2.0 มก./ลิตร ในขณะที่พันธุ์ที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงสูง คือ งามดำพันธุ์ KKU2 งามขาว Loei และงามลูกผสมระหว่าง UCR x Zhuit สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของงามภายใต้สภาพมิดนั้น สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 2 มก./ลิตร - ABA 10 มก./ลิตร จะให้แคลลัสขนาดใหญ่ที่สุดโดยมีงามขาวพันธุ์ KKU1 ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธีนี้สูงที่สุด และชิ้นส่วนจากลำต้นจะใช้เพาะเลี้ยงได้ดีกว่าชิ้นส่วนจาก hypocotyl หรือใบ

เมื่อทดลองนำเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพที่มีแสงสว่าง พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ลิตร จะให้แคลลัสขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีงามขาวพันธุ์ MK 60 ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธีนี้สูงที่สุด และชิ้นส่วนจากลำต้นจะใช้เพาะเลี้ยงได้ดีกว่าชิ้นส่วนจาก hypocotyl และใบ

สำหรับการเพาะเลี้ยงไซ่อ่อนของงานนั้น พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA 20 μM จะใช้เพาะเลี้ยงไซ่อ่อนได้ดีเพราะมีลำต้นและรากยาวกว่าสูตรอาหารอื่นๆ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้จะใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงไซ่อ่อนของงามลูกผสมข้ามชนิดต่อไปโดยงานที่จะทำในขั้นต่อไป คือ การศึกษาจำนวนโครโมโซม และลักษณะประจำพันธุ์ของงามพันธุ์ป่า (wild species) เพื่อหาวิธีถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นของงามพันธุ์ป่า เช่น ลักษณะทนแล้ง หรือลักษณะต้านทานโรคและแมลงศัตรูงาที่สำคัญมาไว้ในงามพันธุ์เพาะปลูกต่อไป โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงไซ่อ่อน (ovule culture) ในการสร้างลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) เพื่อพัฒนาเป็นงามสายพันธุ์ใหม่ต่อไป