The Journal of Applied Science **Vol. 14 No. 2: 123-133 [2015]**
วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์
ISSN 1513-7805 Printed in Thailand

Review Article

การฟื้นฟูป่าสักเมืองไทยด้วยเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย

Restoration of Thai teak forest through somatic embryo

กรวิชช์ ณ ฉลาง[1]* และกิตติ โพธิปัทมะ[2]

Karavich Nathalang[1]* and Kitti Bodhipadma[2]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Ratchathewi District, Bangkok 10400

[2]สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ บางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

[2]Division of Agro-Industrial Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangsue, Bangkok 10800

***E-mail**: karavich.nat@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายเป็นหนึ่งในจุดเปลี่ยนที่สำคัญในเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพราะปรากฏการณ์นี้จะให้เอ็มบริโอแบบไม่อาศัยเพศซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่าง ๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาป่าไม้ ไม้ต้นหลายชนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นโดยผ่านวิถีการเกิดอวัยวะ อย่างไรก็ตามไม้ป่าที่ได้จากการเกิดอวัยวะหลังจากการย้ายออกปลูกแล้วจะมีความอ่อนแอต่อภัยธรรมชาติเนื่องจากไม่มีรากแก้ว ในแง่นี้เอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายจึงเป็นทางเลือกหนึ่งซึ่งให้โอกาสที่ดีกว่าสำหรับการฟื้นฟูป่า ปัจจุบันไม้สักเป็นไม้ที่มีราคาสูงมากในประเทศไทย และที่ผ่านมาการผลิตกล้าไม้ของพืชชนิดนี้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักอาศัยการเกิดอวัยวะ บทความปริทัศน์นี้ได้สรุปเนื้อหางานวิจัยเกี่ยวกับการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของสักและอภิปรายถึงประโยชน์ของการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายที่เหนือกว่าการเกิดอวัยวะในการปลูกป่าสักทดแทน

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สัก การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย

Abstract

Somatic embryogenesis is one of the great turning points in plant tissue culture technology because this phenomenon provides an asexual embryo that could be applied in various ways especially for forest improvement. Many tissue cultured trees were produced via organogenic pathway. However, those organogenic forest plants, after deflasking, were vulnerable for natural disaster due to them lacking of tap roots. In this way, somatic embryo would be an alternative method offering the better chance for forest restoration. Currently, teak timber is very expensive in Thailand and, so far, the seedling production of this plant species through tissue culture mostly was organogenesis. The present review article summaries teak somatic embryogenesis research and discusses the advantage of somatic embryogenesis over organogenesis on teak reforestation.

Keywords: plant tissue culture, teak, somatic embryogenesis

บทนำ

นอกจากอาหารและน้ำแล้ว มนุษย์จะดำรงชีวิตอยู่รอดได้ก็ต้องอาศัยออกซิเจนซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดจากบรรยากาศรอบๆ ตัวเรา ป่าไม้นอกจากเป็นแหล่งสำคัญบนพื้นดินที่ให้ออกซิเจนแก่สิ่งมีชีวิตบนโลกของเราได้มากที่สุดแล้ว ยังเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าเชิงเศรษฐกิจต่อมนุษยชาติอีกด้วย ป่าไม้ให้ทั้งเนื้อไม้ เส้นใย น้ำยาง และน้ำมันหอมระเหย แล้วยังช่วยฟื้นฟูสภาพแวดล้อมอีกด้วย ในรอบทศวรรษที่ผ่านมา ปัญหาการลักลอบตัดไม้ทำลายป่าของประเทศไทยไม่ได้ลดน้อยถอยลงแต่ประการใด แม้ว่ารัฐจะมีกฎหมายและมาตรการหลายๆ วิธีในการป้องกันอยู่แล้วก็ตาม พบว่าระหว่างปี ค.ศ. 1990 ถึง 2000 มีการสูญเสียเนื้อที่ป่าไม้เมืองไทยถึง 1,120 ตารางกิโลเมตรต่อปี ซึ่งเทียบเท่ากับการทำลายป่า (deforestation) ในอัตราร้อยละ 0.7 ต่อปี โดยผู้เชี่ยวชาญด้านป่าไม้ได้ให้ความคิดเห็นต่อสถานการณ์ในปัจจุบันว่าประเทศไทยมีพื้นที่ป่าไม้เหลือเพียงประมาณร้อยละ 15 ถึง 21 เท่านั้น (Höffken, 2010; Leicachและคณะ, 2012)

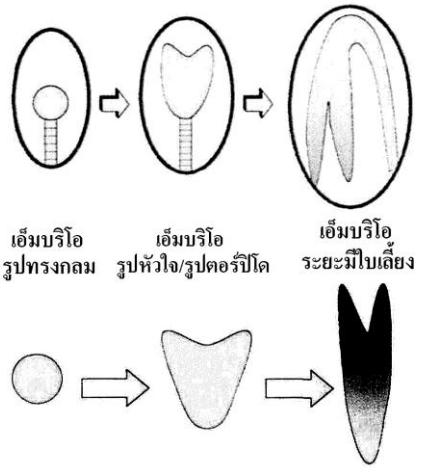
สัก (*Tectona grandis* Linn. f.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae เป็นไม้ผลัดใบซึ่งมีถิ่นกำเนิดและการกระจายตัวตามธรรมชาติอยู่ในประเทศไทย ลาว เมียนมาร์ อินเดีย และหมู่เกาะชวา ไม้สักเป็นไม้เนื้ออ่อนที่เป็นองค์ประกอบหลักของป่าเศรษฐกิจของหลายๆ ประเทศในแถบเขตร้อน พื้นที่ทั่วโลกมีป่าสักตามธรรมชาติ 29,035 ล้านเฮกเตอร์ (ให้เนื้อไม้ 2 ล้านตารางเมตร) และป่าสักปลูก 4,346 ล้านเฮกเตอร์ (ให้เนื้อไม้ 0.5 ล้านตารางเมตร) เนื่องจากไม้สักเป็นไม้ที่มีคุณภาพดีมาก มีความแข็งแรง เนื้อไม้มีลวดลายสวยงาม มีความทนทานตามธรรมชาติโดยเฉพาะความทนทานต่อปลวก เชื้อรา และเห็ดต่าง ๆ เป็นอย่างดี จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างมากมาย ได้แก่ ใช้ในการสร้างบ้าน ต่อเรือ ทำเครื่องเรือน เฟอร์นิเจอร์ แกะสลัก และวนเกษตร (agroforestry) เป็นต้น ด้วยเหตุที่ไม้สักมีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักกันแพร่หลายกันทั่วโลกและมีมูลค่าและความต้องการในตลาดสูงมาก

จึงพบการลักลอบตัดไม้สักตามป่าธรรมชาติซึ่งส่งผลให้จำนวนป่าสักลดลงไปเป็นอย่างมาก (อรพรรณและสันติ, 2557; Galeanoและคณะ, 2015; Sadonoและคณะ, 2015) ดังนั้นการหาวิธีที่จะช่วยเพิ่มปริมาณต้นสักให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็วจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเครื่องมือที่สำคัญส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีชีวภาพพืชซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในหลาย ๆ ด้านได้ โดยเฉพาะการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) ได้ให้โอกาสในการอนุรักษ์และฟื้นฟูสภาพป่าอย่างรวดเร็ว (Grossnickleและ Sutton, 1999; Bodhipadmaและคณะ, 2006; Nathalang, 2012) จึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะนำวิทยาการนี้มาช่วยฟื้นฟูป่าไม้สักเมืองไทย ดังนั้นบทความนี้จะได้นำเสนอถึงเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryo) ว่ามีประโยชน์และสามารถนำมาใช้ในการฟื้นฟูป่าไม้สักของประเทศไทยได้อย่างไร

เอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายและรูปแบบการเกิด

โดยทั่วไปเอ็มบริโอ (embryo) หมายถึงโครงสร้างที่เจริญมาจากไซโกต (zygote) ซึ่งเกิดจากการปฏิสนธิ (fertilization) ของสเปิร์ม (sperm) กับไข่ (egg) แต่เอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายมีความแตกต่างจากเอ็มบริโอจากธรรมชาติเนื่องจากเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายเกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปฏิสนธิ อีกทั้งยังไม่ต้องอาศัยเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) มาเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตาม สิ่งที่น่าสนใจคือแม้ว่าเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายจะมีกำเนิดจากเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ก็จริงแต่กระบวนการเจริญกลับพบว่าไม่แตกต่างจากเอ็มบริโอที่พบในธรรมชาติ กล่าวคือ มีการเจริญจากเอ็มบริโอรูปทรงกลม (globular embryo) เอ็มบริโอรูปหัวใจ (heart-shaped embryo) เอ็มบริโอรูปตอร์ปิโด (torpedo-shaped embryo) และเอ็มบริโอระยะมีใบเลี้ยง (cotyledon-stage embryo) (Santosและคณะ, 2006; Ohnishiและคณะ, 2014) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ระยะของเอ็มบริโอ (บน) และเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (ล่าง) ที่คล้ายคลึงกัน
(ดัดแปลงจาก Zimmerman, 1993)

การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) มีอยู่ 2 รูปแบบ คือ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยตรง (direct somatic embryogenesis) และการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยอ้อม (indirect somatic embryogenesis) การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยตรงจะเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช (explant) ที่นำมาเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยอ้อมจะมีขั้นตอนเพิ่มขึ้นมาคือ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชแล้ว พบว่ากลุ่มของเซลล์ที่เรียกว่าแคลลัส (callus) จะพัฒนาจากชิ้นส่วนพืชขึ้นมาก่อน ต่อมาเซลล์แคลลัสจึงมีการเจริญไปเป็นเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (von Arnold, 2008; Deo และคณะ, 2010) ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากมีการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย วิธีการนี้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้านหลายแง่มุม และหนึ่งในคุณประโยชน์นั้นก็คือการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านป่าไม้

เอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายกับไม้ต้น

ปัญหาหลักที่เป็นข้อจำกัดเมื่อมีการขยายพันธุ์ไม้ต้น (tree) หรือไม้เนื้อแข็ง (woody plant) แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการตัดชำกิ่งก็คือการที่ไม่สามารถทำให้เกิดรากได้ในพืชทุกชนิดหรือทุกกิ่งที่ถูกตัดชำ และหากไม่มีเทคนิคในการทำให้กิ่งหรือต้นที่ถูกตัดชำเกิดรากได้ รวมถึงส่วนของพืชที่นำมาขยายพันธุ์อาจมีข้อจำกัดอีกด้วย การเพิ่มปริมาณของไม้ต้นดังกล่าวจึงเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้ถ้าเลือกใช้วิธีการขยายพันธุ์ไม้ต้นด้วยการเกิดยอด (shoot organogenesis) จากชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ยังต้องมีขั้นตอนของการเกิดราก (root organogenesis) เพิ่มขึ้นมาอีก ซึ่งขั้นตอนนี้อาจทำได้โดยง่ายหรือยากก็ได้ ดังนั้นทางเลือกที่ดีที่สุดของระบบการขยายพันธุ์ไม้ต้นซึ่งจะมาช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ก็คือวิธีการผลิตเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (Lane, 2004; Nawrot-Chorabik, 2012)

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1958 ซึ่ง Reinert กับ Steward และคณะ (Bajaj, 1995) ค้นพบการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย ได้มีการขยายพันธุ์พืชหลากหลายชนิดรวมถึงไม้ป่าด้วยวิธีการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย จากข้อมูลของงานวิจัยทางด้านไม้ต้นหรือไม้เนื้อแข็งที่ผ่านมา (MinochaและMinocha, 1995; da SilvaและMalabadi, 2012; Srichuayและคณะ, 2014) แสดงให้เห็นว่า

(1) มีการผลิตเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของไม้เนื้อแข็งบางชนิดโดยเฉพาะพืชพวกสน (conifer) ได้อย่างเป็นการค้าแล้ว

(2) โดยทั่วไปเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายสามารถเติบโตไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ซึ่งสามารถทดสอบและประเมินลักษณะในแปลงปลูกได้

(3) รูปแบบการเจริญของเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายเทียบได้คล้ายกับการเจริญของเอ็มบริโอจากไซโกต (zygotic embryo) เพียงแต่ไม่มีส่วนของเนื้อเยื่อแกมีโทไฟต์ (gametophytic tissue) มาห่อหุ้ม

(4) แหล่งของชิ้นส่วนพืช (source of the explant) ภาวะของการเพาะเลี้ยง และจีโนไทป์ (genotype) ของพืช มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเนื้อเยื่อกำเนิดเอ็มบริโอ (embryogenic tissue) และการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย

(5) ในการผลิตเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย แม้ว่าจะมีกระบวนการเจริญที่คล้ายคลึงกันก็ตาม แต่ความต้องการที่จำเพาะของเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายในช่วงการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) และการเจริญเต็มวัย (maturation) เช่น โมเลกุลสัญญาณ (signal molecule) อาจมีความแตกต่างกันตามชนิดพืช

ป่าไม้สักเมืองไทยกับเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย

ถึงแม้จะมีรายงานว่าประเทศไทยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการขยายพันธุ์ไม้เนื้อแข็งหลายชนิด ได้แก่ ยางพารา ปาล์มน้ำมัน กาแฟ มะม่วง ลิ้นจี่ (Jain, 1999; SirisomและTe-chato, 2012) รวมถึง มังคุด (Te-chatoและLim, 1999) ชิงชัน (ปัญจรัตน์และคณะ, 2544) ยูคาลิปตัส (รุ่งอรุณและคณะ, 2553) พะยูง (จำนรรจ์และคณะ, 2558) และสัก (จำนรรจ์, 2544) แต่งานวิจัยดังกล่าวก็ไม่ได้ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย โดยเฉพาะในแง่ของสักนั้นแม้ว่าประเทศไทยจะประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์สักเชิงการค้าได้ (Yasodhaและคณะ, 2004) แต่การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของสักในประเทศไทยยังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับไม้เนื้อแข็งชนิดอื่นๆ

เป็นที่ทราบกันว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีวิถีกำเนิดสัณฐาน (morphogenic pathway) อยู่ 2 แบบหลักที่จะนำไปสู่การเกิดต้นพืชใหม่ทั้งต้น คือ (1) การเกิดยอดแล้วตามด้วยการเกิดราก ซึ่งเป็นรูปแบบของการเกิดอวัยวะ (organogenesis) ที่ต้องการสัญญาณชักนำให้เกิดอวัยวะ (organogenic induction) ที่แตกต่างกันสองสัญญาณเพื่อให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ เนื่องจากอวัยวะที่เกิดขึ้นมานั้นมีสภาพเป็นขั้วเดียว (unipolar) คือเป็นยอดหรือเป็นราก โดยสัญญาณแรกใช้เพื่อชักนำยอดกับสัญญาณที่สองใช้เพื่อชักนำราก และ (2) การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) ซึ่งมีสภาพเป็นสองขั้ว (bipolar) คือเป็นยอดและรากพร้อมกัน จึงต้องการสัญญาณชักนำเพียงสัญญาณเดียว ที่ผ่านมามีพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่มีวิถีการเกิดสัณฐานทั้ง 2 แบบ (Phillips, 2004) ซึ่งในแง่ของการปลูกป่าทดแทน (reforestation) หรือการขยายพันธุ์ของไม้ต้นนั้น พบว่าการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายช่วยให้มีการเพิ่มปริมาณของไม้ป่าได้จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว ให้คุณภาพไม้ดีและมีความทนทานต่อโรคและแมลง และเป็นหนทางหนึ่งที่มาช่วยในกรณีซึ่งไม้ต้นชนิดนั้นให้เมล็ดน้อยหรือมีอัตราการงอกที่ต่ำมาก (Grossnickleและ Sutton, 1999; MerkleและDean, (2000)

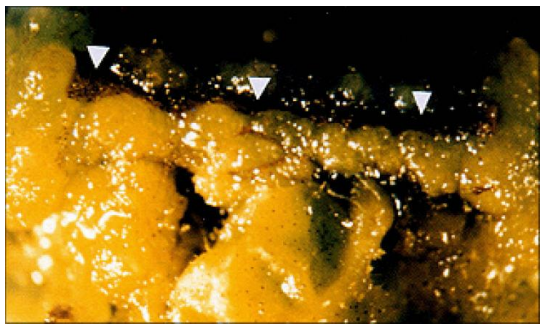
Yasodhaและคณะ (2004) รายงานถึงสักในประเทศไทยว่าจากการแช่เมล็ดสัก 100 เมล็ด จะได้ต้นกล้าที่สามารถนำไปปลูกได้เพียง 5 ต้น เท่านั้น ดังนั้นการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของสักจึงเป็นทางเลือกหรือโอกาสที่น่าสนใจยิ่ง เพราะนอกจากจะเป็นวิธีที่มีข้อดีดังกล่าวมาข้างต้นแล้ว วิธีนี้ยังให้ต้นสักที่มีรากซึ่งเสมือนเป็นรากแก้วที่จะช่วยให้พืชมีความทนทานต่อภัยธรรมชาติโดยเฉพาะวาตภัย เช่น พายุหรือมรสุม หรืออุทกภัย ได้ดีกว่าพืชที่มีแต่รากพิเศษ (adventitious root) เนื่องจากรากดังกล่าวมีความแข็งแรงและช่วยยึดพยุงพืชได้เป็นอย่างดี

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่างานวิจัยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักจะประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีโดยผ่านรูปแบบของการเกิดอวัยวะ แต่ผลงานวิจัยเกี่ยวกับเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของสักทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทยกลับพบว่ายังไม่ก้าวหน้าเท่าที่ควร

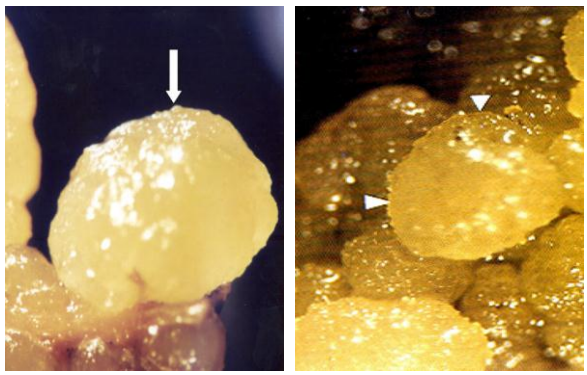
ในปี ค.ศ. 1996 Kushalkar และ Sharon เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่รายงานการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของสัก โดยมีการชักนำทั้ง 2 รูปแบบ คือ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยตรงและโดยอ้อม ด้วยการใช้ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของสักที่มีอายุ 3 ปี มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ในที่มืด 72 ชั่วโมงแล้วย้ายไปให้ได้รับแสง 1,200 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าหลังจาก 1 สัปดาห์ จะเกิดแคลลัสบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ซึ่งเติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแคลลัสมีลักษณะแข็ง แน่น และมีสีขาวในตอนแรก แล้วจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียว ต่อมาเมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโตของพืชหลายชนิดหลายความเข้มข้น แคลลัสจากชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของสักมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน กล่าวคือแคลลัสที่เกิดจากตายอดจะมีเอ็มบริโอรูปทรงกลมเกิดขึ้นบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ซึ่งเติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเอ็มบริโอรูปทรงกลมจะมีการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเอ็มบริโอรูปหัวใจบนอาหารสูตรเดียวกัน ในกรณีของชิ้นส่วนตาข้างของสักจะพบการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายทั้งโดยตรงและโดยอ้อม แต่เนื่องจากไม่พบว่ามีเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายเกิดขึ้นบนอาหารกึ่งแข็งเต็มสูตร MS ดังเช่นแคลลัสจากชิ้นส่วนตายอด แคลลัสที่เกิดจากตาข้างจึงถูกย้ายลงไปในอาหารเหลวครึ่งสูตร MS แทน และหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวครึ่งสูตร MS ซึ่งเติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 ถึง 6 สัปดาห์ จะพบเอ็มบริโอรูปทรงกลมและรูปหัวใจเกิดขึ้นรอบนอกของแคลลัส นอกจากนี้หากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของสักบนสะพานกระดาษกรอง (filter paper bridge) ที่จุ่มลงในอาหารเหลวครึ่งสูตร MS ซึ่งเติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2iP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในหลอดทดสอบ จะพบเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายเกิดขึ้นโดยตรงบนชิ้นส่วนตาข้าง แต่เกิดขึ้นเพียงร้อยละ 2 ของชิ้นส่วนตาข้างทั้งหมดเท่านั้น (KushalkarและSharon, 1996)

แปดปีต่อมา มีงานวิจัยที่ใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงและแกนเอ็มบริโอ (embryonic axis) ของสัก มาชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแคลลัสกำเนิดเอ็มบริโอ (embryogenic callus) ซึ่งมีเนื้อละเอียด มีความเปราะและสีเหลืองพัฒนาจากชิ้นส่วนแกนเอ็มบริโอของสักเท่านั้น โดยเกิดจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวในที่มืดบนอาหารครึ่งสูตร MS ซึ่งเติม 2,4-D 1.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือบนอาหารเต็มสูตร MS ซึ่งเติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากย้ายแคลลัสที่เกิดเอ็มบริโอนี้ลงบนอาหารกึ่งแข็ง ไม่พบว่ามีการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย แต่ถ้าย้ายลงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน MS กลุ่มของเซลล์แขวนลอยที่อยู่ในอาหารเหลวจะพัฒนาไปเป็นโครงสร้างเอ็มบริโอ (embryonal structure) และเมื่อมีการเพาะเลี้ยงต่อช่วง (subculture) 6-7 ครั้ง จะพบเอ็มบริโอรูปทรงกลมและเอ็มบริโอรูปหัวใจระยะต้น (early heart-stage embryo) เกิดขึ้น (Pingและคณะ, 2004)

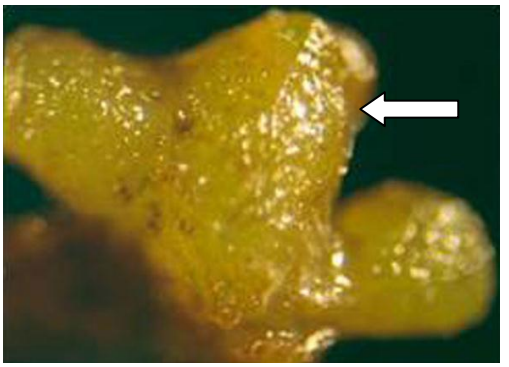
ในประเทศไทย มีการนำใบอ่อนของต้นสักใหญ่พันธุ์สักทองที่มีอายุขัยยืนยาวมากกว่า 1,500 ปี และเป็นต้นสักซึ่งใหญ่ที่สุดในโลก มาชักนำแคลลัสกำเนิดเอ็มบริโอ (รูปที่ 2) บนอาหารครึ่งสูตรพื้นฐาน MS ซึ่งเติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การให้แสง 1,500 ลักซ์ จากหลอดไฟ Gro-lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และช่วงมืด 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ภาวะดังกล่าวมีค่าดัชนีการเติบโต (growth index) ของแคลลัสกำเนิดเอ็มบริโอสูงสุด ภายหลังจากย้ายแคลลัสกำเนิดเอ็มบริโอลงในอาหารเหลวภายใต้ภาวะเหมาะที่สุด พบเอ็มบริโอรูปทรงกลม (รูปที่ 3 ซ้ายมือ) เอ็มบริโอรูปหัวใจระยะต้น (รูปที่ 3 ขวามือ) และเอ็มบริโอรูปหัวใจ (รูปที่ 4) เพิ่มจำนวนอย่างเห็นได้ชัดเจนที่ผิวของกลุ่มเอ็มบริโอ (embryogenic clump) นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างดังกล่าวแขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวอีกด้วย (Nathalang, 2012)



รูปที่ 2 แคลลัสกำเนิดเอ็มบริโอของต้นสักใหญ่พันธุ์สักทองซึ่งมีสีเขียวปนเหลืองครีม ถูกชักนำจากบริเวณเส้นกลางใบ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 3 เอ็มบริโอรูปทรงกลม (ลูกศรชี้รูปซ้ายมือ) และเอ็มบริโอรูปหัวใจระยะต้น (ลูกศรชี้รูปขวามือ) ของต้นสักใหญ่พันธุ์สักทอง



รูปที่ 4 เอ็มบริโอรูปหัวใจ (ลูกศรชี้) ของต้นสักใหญ่พันธุ์สักทอง

(Nathalang, 2012)

สรุป

จากข้อมูลการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของสักดังกล่าวทำให้ทราบได้ว่า ชิ้นส่วนสักที่แตกต่างกัน ได้แก่ ชิ้นส่วนตายอด ตาข้าง ใบเลี้ยง แกนเอ็มบริโอ และใบอ่อน มีความต้องการภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายไม่เหมือนกัน และทุกการทดลองจะเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายรูปหัวใจได้เท่านั้น ยังไม่พบงานวิจัยใดที่ได้ระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายเกินไปกว่านี้ ดังนั้นเพื่อช่วยให้เอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายมีการเจริญต่อไปเป็นเอ็มบริโอรูปตอร์ปีโดและระยะมีใบเลี้ยงจึงควรใช้วิธีดังต่อไปนี้

(1) เลือกใช้ชิ้นส่วนพืชแบบอื่นๆ ซึ่งอาจทำให้มีประสิทธิภาพในการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายของสักได้ดีกว่านี้

(2) ปรับปรุงภาวะของการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกว่าเดิม ไม่ว่าจะเป็นสูตรอาหารสำหรับการเจริญเต็มวัย (maturation medium) หรือภาวะทางกายภาพที่ช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย

(3) คัดเลือกจีโนไทป์เด่นมาศึกษาซึ่งเป็นการคัดเลือกแม่ไม้สัก (teak plus tree selection) เพื่อไว้ใช้ในการขยายพันธุ์ที่ดีต่อไป

การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายนอกจากจะช่วยให้การขยายพันธุ์สักเกิดขึ้นอย่างยั่งยืนแล้วยังเป็นการอนุรักษ์และฟื้นฟูสภาพป่าสักซึ่งมีคุณค่ายิ่งได้อีกด้วย แต่เนื่องจากงานวิจัยทางด้านนี้ยังมีอีกหลายบริบทที่ต้องคำนึงถึงเพื่อให้เกิดความสำเร็จในอนาคต จึงนับว่าเป็นเรื่องท้าทายที่นักวิจัยทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควรจะต้องหาคำตอบให้ได้โดยเร็ว

เอกสารอ้างอิง

จำนรรจ์ เพียรอนุรักษ์, (2544) “เทคนิคการลดอายุกิ่งแก่ของไม้สักเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ”, หน้า 332-345, ใน: รายงานการสัมมนาทางวนวัฒนวิทยา ครั้งที่ 7: วนวัฒนวิทยาเพื่อพัฒนาสวนป่าเศรษฐกิจ, 12-14 ธันวาคม 2544, คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จำนรรจ์ เพียรอนุรักษ์, ประสิทธิ์ เพียรอนุรักษ์ และสาโรจน์ วัฒนสุขสกุล (2558) “ผลของอัตราส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินและอ็อกซินในอาหารต่อการพัฒนาชิ้นพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพะยูง”, ใน: การประชุมวิชาการป่าไม้ 2558, 22-26 เม.ย. 2558, คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปัญจรัตน์ จินตนา, ไพโรจน์ ชัยเลิศพงษา และประสิทธิ์ เพียรอนุรักษ์, (2544) “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ชิงชัน”, หน้า 300-306, ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม, 5-7 กุมภาพันธ์ 2544, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รุ่งอรุณ สุ่มแก้ว, ยุพา ปานแก้ว, ลดาวัลย์ พวงจิต, สมคิด สิริพัฒนดิลก และสมบัตร โคกกระเทียม (2553) “การผลิตกล้ายูคาลิปตัส คามาลดูเลนซีสด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยระบบ temporary immersion แบบขวดคู่”, หน้า 514-522, ใน: เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาพืช, 3-5 ก.พ. 2553, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรพรรณ ปานขาว และสันติ สุขสอาด (2557) การผลิตและการตลาดของผลิตภัณฑ์ไม้สักในตำบลน้ำชำ อำเภอสูงเม่น จังหวัดแพร่. ว. วนศาสตร์, 33(1): 28-35.

Bajaj Y.P.S., (1995) “Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement”, pp. 105-125, In: Bajaj Y.P.S. (Ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry Volume 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, Springer-Verlag, Berlin.

Bodhipadma K., Noichinda S., Udomrati S., Nathalang G., Kijwijan B. and Leung D.W.M., (2006) Anthocyanin accumulation in the hypocotyl and petal of red agati (*Sesbania grandiflora*), an ornamental legume. J. App. Hort., 8(2): 143–146.

da Silva J.A.T. and Malabadi R.B., (2012) Factors affecting somatic embryogenesis in conifers. J. Forest. Res., 23(4): 503-515.

Deo P.C., Tyagi A.P., Taylor M., Harding R. and Becker D., (2010) Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. South Pac. J. Nat. App. Sci., 28(1): 27-40.

Galeano E., Vasconcelos T.S., Vidal M., Mejia-Guerra M.K. and Carrer H., (2015) Large-scale transcriptional profiling of lignified tissues in Tectona grandis. BMC Plant Biol., 15: 221.

Grossnickle S.C. and Sutton B.C.S., (1999) Applications of biotechnology for forest regeneration. New Forests, 17(1): 213-226.

Höffken P., (2010) New issues in old forests: recent approaches to conserve Thailand's major protected areas. Pacific News, Issues 33, pp. 20–23.

Jain S.M., (1999) "An overview of progress on somatic embryogenesis in forest trees", pp. 57-63, In: Altman A., Ziv M. and Izhar S. (Eds), Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century, Springer, Netherlands.

Kushalkar R. and Sharon M., (1996) Direct and indirect somatic embryogenesis in teak (*Tectona grandis* L.). Curr. Sci., 71(9): 712-715.

Lane A., (2004) Attack of the clones: somatic embryogenesis in forestry. BioTeach J., 2: 13-17.

Leicach S.R., Yaber Grass M.A., Chludil H.D., Garau A.M, Guarnaschelli A.B. and Fernandez P.C., (2012) "Chemical defenses in *Eucalyptu*s species: a sustainable strategy based on antique knowledge to diminish agrochemical dependency", pp. 225-256, In: New Advances and Contributions to Forestry Research, Oteng-Amoako A.A. (Ed), New Advances and Contributions to Forestry Research, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/newadvances-and-contributions-to-forestry-research/chemical-defenses-in-eucalyptus-species-a-sustainablestrategy-based-on-antique-knowledge-to-diminis.

Merkle S.A. and Dean J.F.D., (2000) Forest Biotechnology. Curr. Opin. Biotech., 11: 298-302.

Minocha S.C. and Minocha R., (1995) "Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants", pp. 9-22, In: Jain S.M., Gupta P. and Newton R. (Eds). Somatic Embryogenesis in Woody Plants Vol.1, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands.

Nathalang K., (2012) Factors important for somatic embryo induction and proliferation from young leaf explant of the most gigantic teak. J. of KMUTNB, 22(1): 24-30.

Nawrot-Chorabik K., (2012). "Somatic embryogenesis in forest plants", pp. 423-446, In: Sato K.-I. (Ed), Embryogenesis, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-woody-plants.

Ohnishi Y., Hoshino R. and Okamoto T., (2014) Dynamics of male and female chromatin during karyogamy in rice zygotes. Plant Physiol. 165(4):1533-1543.

Phillips G.C., (2004) In vitro morphogenesis in plants-recent advances. In Vitro Cell. Dev.–Pl., 40(4): 342-345.

Ping L.S., Aziz, M.A. Sinniah U.R. and Zainudin F., (2004) In vitro regeneration system of teak (*Tectona grandis* L.) In: The 4th Annual Seminar for National Science Fellowship 2004, 20-21 December 2004, Pulau Pinang, Malaysia.

Sadono R., Rachmadwiati R. and Supriyatno N., (2015) Preliminary dominant height growth model and site quality class of Perhutani's teak plus from clonal seed orchards in Madiun, Saradan, and Ngawi forest district, East Java, Indonesia. Aust. J. Basic & Appl. Sci., 9(11): 559-566.

Santos K.G.B.d., Mariath J.E.d.A., Moço M.C.C. and Bodanese-Zanettini M.H., (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): ontogeny of somatic embryos. Braz. Arch. Biol. Technol., 49(1): 49-55.

Sirisom Y. and Te-chato S., (2012) The effect of peptone and silver nitrate on In vitro shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. J. Agric. Tech., 8(4): 1509-1516.

Srichuay W., Kalawong S., Sirisom Y. and Te-chato S., (2014) Callus induction and somatic embryogenesis from anther cultures of *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Kasetsart J. (Nat. Sci.), 48: 364-375.

Te-chato S. and Lim M., (1999) Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. Plant Cell Tiss. Org., 59(2): 89-93.

von Arnold S., (2008) "Somatic Embryogenesis", pp. 335-354, In: George E.F. , Hall M.A. and De Klerk G.-J. (Eds), Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background, Springer, Netherlands.

Yasodha R., Sumathi R. and Gurumurthi K., (2004) Micropropagation for quality propagule production in plantation forestry. Indian J. Biotech., 3: 159-170.

Zimmerman J.L., (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell, 5(10): 1411–1423.