PBRU SCIENCE JOURNAL
2022.19(1) : 54-63

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศสีดา (*Lycopersicon esculentum* Mill.) พันธุ์เพชรชมพู

In vitro Callus Induction from Hypocotyl Explants of Sida Tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*) var. Petchchompoo

ทศพร พิพัฒน์ภานุกูล*, ธนารักษ์ แซ่เล้า และโสภิดา มโนมั่น

Tossaporn Pipatpanukul*, Tanarak Saelao and Sophida Manoman

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakorn Pathom Rajabhat University

***Corresponding author; E-mail:** pipatpanukul@hotmail.com

Received: 21 July 2021 /Revised: 04 August 2021 /Accepted: 26 October 2021

บทคัดย่อ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ และมีพื้นที่เพาะปลูกทั่วโลก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเกิดแคลลัสของมะเขือเทศสีดา พันธุ์เพชรชมพู โดยนำชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) ที่เติม BAP และ NAA ในความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาผลกระทบของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีต่อจำนวนวันในการเกิดแคลลัส ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และค่าน้ำหนักสดแคลลัส ผลการศึกษาพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 8.06 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 100% และมีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 2.30 กรัม นอกจากนั้นยังใช้เวลาในการเกิดแคลลัสน้อยที่สุดด้วย การรักษาสภาพแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ NAA พบว่าแคลลัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศสีดาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

คำสำคัญ: ลำต้นใต้ใบเลี้ยง การชักนำให้เกิดแคลลัส การรักษาสภาพแคลลัส มะเขือเทศ

Abstract

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the most important vegetable crops in the world and has been widely grown in almost every country. The effect of plant growth regulators on callus induction in *L. esculentum* Mill. var. Petchchompoo has been developed. Hypocotyl explants were cultured on MS (Murashige & Skoog) medium supplemented with various concentrations of BAP and NAA. Effects of plant growth regulators were studied on days for callus induction, percentage of callus induction and callus fresh weight after 4 weeks. The result showed that MS medium supplemented with 2.22 µM BAP and 8.06 µM NAA was optimum for callus induction, based on the highest percentage of callus induction (100%), highest callus fresh weight (2.30 g) and minimum days for callus induction. Hypocotyl-derived callus was successfully maintained and proliferated when subcultured on MS medium supplemented with BAP and NAA. The results provide a basis for efficient micropropagation and genetic improvement of tomato.

Keywords: Hypocotyl, Callus induction, Callus maintenance, *Lycopersicon esculentum* Mill.

บทนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและมีพื้นที่เพาะปลูกทั่วโลก [1] องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติรายงานสถิติพื้นที่เพาะปลูกมะเขือเทศที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี พ.ศ. 2562 มีพื้นที่เพาะปลูกมะเขือเทศทั่วโลก 5,030,545 เฮกเตอร์ และเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ 180,766,329 ตัน [2] ผลมะเขือเทศใช้รับประทานสดและประกอบอาหาร นอกจากนั้นยังใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ ซอสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศ และมะเขือเทศปอกผิว ผลมะเขือเทศมีคุณค่าทางอาหารสูง โดยประกอบด้วยวิตามินเอ วิตามินบี และไฟเบอร์ในปริมาณสูง นอกจากนั้นมะเขือเทศน้ำหนัก 100 กรัม ยังมีไลโคปีน (Lycopene) เป็นองค์ประกอบประมาณ 20-50 มิลลิกรัม [3] ไลโคปีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ที่มีประสิทธิภาพสูง [4] มีผลการศึกษายืนยันว่าไลโคปีนเป็นสารสำคัญที่ป้องกันโรคมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งโรคหัวใจหลอดเลือดในมนุษย์ [5]

มะเขือเทศสีดามีผลขนาดเล็ก สีชมพู และมีรสเปรี้ยว เป็นพันธุ์รับประทานผลสด นิยมใช้ประกอบอาหารพื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และเป็นมะเขือเทศที่มีการใช้เฉพาะกลุ่ม แต่มีปริมาณการบริโภคสูงและราคาแพง ความต้องการมะเขือเทศพันธุ์รับประทานผลสดของประเทศไทยมีเพิ่มมากขึ้นในทุกปี โดยในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกมะเขือเทศพันธุ์รับประทานผลสด 16,981 ไร่ และมีผลผลิตรวม 45,958 ตัน โดยในจำนวนนี้ร้อยละ 77 เป็นพื้นที่ในเขตภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 6 สำหรับพื้นที่เพาะปลูกมะเขือเทศพันธุ์รับประทานผลสดในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่นิยมปลูก

มะเขือเทศสีดาและพันธุ์พื้นเมือง การปลูกมะเขือเทศสีดาสามารถทำได้ตลอดทั้งปี แต่ในฤดูร้อนและฤดูฝนมักประสบปัญหาการไม่ติดผล และมีการระบาดของโรคและแมลงศัตรูพืชซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการเพาะปลูกมะเขือเทศสีดา ทำให้เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีเพื่อป้องกันและกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชในปริมาณมาก การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศที่มีความต้านทานต่อโรค มีผลผลิตต่อไร่สูง และเก็บเกี่ยวผลผลิตได้นาน สามารถส่งเสริมการเพิ่มผลผลิตมะเขือเทศสีดาในประเทศไทยได้ [7]

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) ถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาวิจัยมะเขือเทศในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากราและแบคทีเรีย [8, 9] การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส [10] การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศทนแล้ง [11] การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชอะทราซีน (atrazine) [12] และการขยายพันธุ์มะเขือเทศจำนวนมากในหลอดทดลอง [13] แคลลัสเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การเจริญเป็นต้นใหม่ทั้งโดยกระบวนการเกิดอวัยวะ (Organogenesis) และกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (Somatic embryogenesis) รวมทั้งการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ (Protoplast) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส (Callus induction medium) ของมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพู เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศสีดาให้มีคุณลักษณะดีด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและพันธุวิศวกรรมพืช

วิธีดำเนินการวิจัย

เพาะเลี้ยงต้นกล้าปลอดเชื้อโดยนำเมล็ดมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาดทีโพล (teepol®) และน้ำประปาจากนั้นนำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% (v/v) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วย้ายเมล็ดไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2% (w/v) เป็นเวลา 25 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำเมล็ดวางบนกระดาษกรองวัตต์แมน (Whatman) ปลอดเชื้อเพื่อซับให้แห้ง

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวแล้ววางเลี้ยงบนอาหารปลอดเชื้อสูตร MS (1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) ร่วมกับผงวุ้น 0.8% (w/v) และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 5.7±0.1 ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ จากนั้นนำขวดอาหารที่บรรจุเมล็ดทั้งหมดวางในสภาพอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อต้นกล้ามะเขือเทศมีอายุ 20 วัน ใช้มีดผ่าตัดปลอดเชื้อตัดส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงให้มีความยาว 1 เซนติเมตร จากนั้นย้ายชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงวางบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) ผงวุ้น 0.8% (w/v) และ BAP (6-benzyl aminopurine) ความเข้มข้น 2.22 4.44 และ 8.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA (Naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 2.69 5.37 และ 8.06 ไมโครโมลาร์ โดยปรับค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.7±0.1 ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อ นำขวดอาหารที่บรรจุชิ้นส่วนพืชทั้งหมดวางในสภาพอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงขาว

จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกค่าจำนวนวันในการเกิดแคลลัส (Days for callus induction) เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (Percentage of callus induction) และค่าน้ำหนักสดแคลลัส (Callus fresh weight) ดำเนินการทดลองกลุ่มทดลองละ 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least significant difference ที่ $p \leq 0.05$

ภายหลังการชักนำลำต้นใต้ใบเลี้ยงให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการรักษาสภาพแคลลัส (Callus maintenance) โดยแยกแคลลัสที่มีลักษณะสีเหลืองออกจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง ตัดแบ่งแคลลัสให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด นำขวดอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสทั้งหมดวางในสภาพอุณหภูมิและความเข้มแสงแบบเดียวกับขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส และย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก ๆ 20 วัน

ผลการศึกษา

ภายหลังการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP (2.22-8.88 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ NAA (2.69-8.06 ไมโครโมลาร์) ในความเข้มข้นต่าง ๆ สังเกตพบแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดและบริเวณรอบ ๆ ชิ้นส่วนพืชในอาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตร โดยจำนวนวันในการเกิดแคลลัสแตกต่างกันในแต่ละสูตรอาหาร สูตรอาหารที่ 4, 7 และ 9 พบการเกิดแคลลัสในระยะเวลา 7 วัน สำหรับสูตรอาหารอื่น ๆ พบการเกิดแคลลัสในระยะเวลา 10-13 วัน ดังแสดงใน (Table 1) แคลลัสมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูมีลักษณะสีเหลือง และเกาะตัวกันแบบหลวม ๆ (Friable callus) (Figure 1)

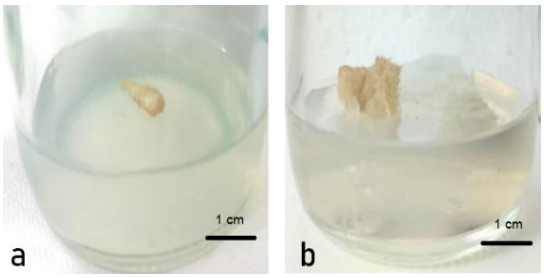

Figure 1. Callus induction of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Petchchopoo (a) callus formation after 1 week of culture (b) callus proliferation after 4 weeks of culture

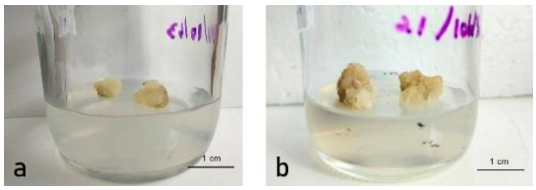

Figure 2. Callus maintenance of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Petchchompoo (a) calli after 1 week of subculture. (b) calli after 3 weeks of subculture

ผลค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและน้ำหนักสดแคลลัสพบว่าลำต้นใต้ใบเลี้ยงมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ 1, 2, 3, 5, 6 และ 7 มีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ 7 มีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.30 กรัม สำหรับชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ 4, 8 และ 9 มีค่า

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 85.71 เปอร์เซ็นต์, 71.43 เปอร์เซ็นต์ และ 80.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การรักษาสภาพแคลลัสมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูอายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ 7 ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุด ผลการสังเกตพบว่าแคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นภายใน 3 สัปดาห์ โดยแคลลัสยังคงมีลักษณะสีเหลืองและเกาะตัวกันแบบหลวม ๆ นอกจากนั้นยังพบมีบราวนิง (browning) เกิดขึ้นในบางบริเวณด้วย (Figure 2)

Table 1. Effects of different combinations of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Petchchompoo

Media	NAA (μM)	BAP (μM)	Days for callus induction	Percentage of callus induction	Callus fresh weight (g)
1	2.69	2.22	9.14^{b}	100%	0.79±0.07^{b}
2	2.69	4.44	12.7^{d}	100%	0.86±0.16^{b}
3	2.69	8.88	9.0^{b}	100%	0.14±0.02^{c}
4	5.37	2.22	7.4^{a}	85.71%	0.74±0.15^{b}
5	5.37	4.44	12.4^{d}	100%	0.71±0.07^{b}
6	5.37	8.88	10.7^{c}	100%	0.46±0.01^{bc}
7	8.06	2.22	7.1^{a}	100%	2.30±0.19^{a}
8	8.06	4.44	10.4^{c}	71.43%	0.21±0.07^{c}
9	8.06	8.88	7.4^{a}	80.56%	0.69±0.18^{b}

Callus fresh weights are expressed as mean±standard errors of 10 replicates. Within a column, values followed by a different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ level according to Least significant difference.

อภิปรายผล

การเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ NAA พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่เหมาะสมที่สุดคือ MS ที่เติม BAP 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 8.06 ไมโครโมลาร์ (สูตรอาหารที่ 7) โดยชิ้นส่วนพืชแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100% และมีน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 2.30 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับสูตรอื่น ๆ นอกจากนั้นยังแสดงจำนวนวันของการเกิดแคลลัสน้อยที่สุดอีกด้วย (7.1 วัน) แต่อย่างไรก็ตามมะเขือเทศแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอย่างแตกต่างกัน [14] นอกจากนั้นชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชยังมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสของมะเขือเทศเป็นอย่างมาก [1] อาหารเพาะเลี้ยงสูตรชักนำการเกิดแคลลัสของมะเขือเทศมีการเติมออกซินหรือไซโทไคนินเพียงชนิดเดียว [15,16] หรือเติมออกซิน ร่วมกับไซโทไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสม [15] NAA เป็นออกซินที่มีผลส่งเสริมการเกิดแคลลัส การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และการเกิดอวัยวะ [17] มีรายงานการเติม NAA ร่วมกับไซโทไคนินหลายชนิดเพื่อชักนำการเกิดแคลลัสของมะเขือเทศ ได้แก่ BAP และ KI (kinetin) [16,18] ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ NAA ต่อ BAP ในอาหารเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสของมะเขือเทศ โดยเมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักสดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และจำนวนวันในการเกิดแคลลัส อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP ความเข้มข้นต่ำ (2.22 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69, 5.37 และ 8.06 ไมโครโมลาร์ (สูตรอาหารที่ 1 4 และ 7 ตามลำดับ) สามารถส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตรอื่น ๆ โดยค่าน้ำหนักสดแคลลัสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ NAA (ตั้งแต่ 0.74-2.3 กรัม) และแสดงจำนวนวันในการเกิดแคลลัสน้อยกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ (7-9 วัน) สำหรับสูตรอาหารที่ 9 (เติม BAP 8.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 8.06 ไมโครโมลาร์) แสดงจำนวนวันในการเกิดแคลลัสในระดับเดียวกับสูตรอาหารที่ 7 ซึ่งเป็นสูตรอาหารชักนำการเกิดแคลลัสที่เหมาะสมที่สุด แต่อย่างไรก็ตามแคลลัสที่ชักนำได้บนอาหารสูตรนี้มีค่าน้ำหนักสดน้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญ (0.69±0.18 กรัม) นอกจากนั้นยังแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ต่ำกว่าด้วย (80.56%) ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kumar et al.[19] ซึ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์ Solan Vajr ให้เกิดแคลลัส และรายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม NAA 13.95 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP 4.44 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการชักนำชิ้นส่วนใบ ระยะระหว่างข้อ และราก ให้เกิดแคลลัส โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 95.2% 100% และ 81.1% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Setiaji et al.[16] ที่รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม NAA 9.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP 0.89 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์ Permata ให้เกิดแคลลัส แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการเพาะเลี้ยงแคลลัสมะเขือเทศสายพันธุ์อื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มีอัตราส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินต่ำส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีเช่นเดียวกัน Harish et al.[18] รายงานการเพาะเลี้ยงใบ ใบเลี้ยง และลำต้นของมะเขือเทศลูกผสมพันธุ์ Sindhu และพันธุ์ Shalimar

ให้เกิดแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP 8.88 ไมโครโมลาร์ ผลการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนพืชมีเปอร์เซ็นต์เกิดแคลลัสมากกว่า 90% นอกจากนั้นยังมีรายงานการชักนำชิ้นส่วนพืชของมะเขือเทศให้เกิดแคลลัสและเจริญเป็นต้นใหม่ได้ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดียวกันอีกด้วย Hanur and Krishnareddy [20] รายงานการชักนำใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยงมะเขือเทศสายพันธุ์ Arka vikas ให้เกิดแคลลัส โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP ร่วมกับ KI ภายหลังมีแคลลัสเกิดขึ้นแล้วได้ย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดิมและพบว่าแคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ในเวลา 10 วัน

นอกจากความเข้มข้นและสัดส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงแล้ว ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมะเขือเทศยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ จีโนไทป์ อายุของชิ้นส่วนพืช และขนาดของชิ้นส่วนพืช [1] แคลลัสมะเขือเทศสามารถชักนำได้จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบ [18,19] ใบเลี้ยง [15] ราก [19] และลำต้นใต้ใบเลี้ยง [15, 16, 18] งานวิจัยนี้เลือกใช้ลำต้นใต้ใบเลี้ยงเป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส และแสดงผลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 71.42%-100% มีรายงานสนับสนุนว่าลำต้นใต้ใบเลี้ยงมะเขือเทศเป็นชิ้นส่วนพืชที่มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส [15,18] นอกจากนั้นแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงมะเขือเทศยังมีประสิทธิภาพในการเกิดต้นใหม่สูงกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนอื่น ๆ ของพืชอีกด้วย [21]

ภายหลังขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส จำเป็นต้องรักษาสภาพแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อรักษาความมีชีวิตของแคลลัสให้ยาวนาน [22] นอกจากนั้นยังเป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนแคลลัสอีกด้วย การรักษาสภาพแคลลัสโดยทั่วไปสามารถทำได้โดยย้ายแคลลัสปฐมภูมิ (Primary callus) ที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีประสิทธิภาพสูงสุด [23] และควรย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารใหม่ในขณะมีอายุและขนาดที่เหมาะสม [24] รวมทั้งควรย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารใหม่ก่อนเกิดบราวนิงด้วย [25] สำหรับงานวิจัยนี้ได้รักษาสภาพแคลลัสมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูด้วยการย้ายลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (MS ที่เติม NAA 8.06 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 2.22 ไมโครโมลาร์) และพบว่าแคลลัสยังคงสภาพความมีชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ โดยแคลลัสบางส่วนเกิดบราวนิง จำเป็นต้องตัดแยกออกก่อนการย้ายลงเลี้ยงในอาหารใหม่ ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Karim and Kayum [26] ซึ่งรายงานว่าภายหลังการชักนำใบและระยะระหว่างข้อของมะเขือเทศพันธุ์ Bina Tomato-3 ให้เกิดแคลลัสด้วยอาหาร เพาะเลี้ยงที่เติม NAA ร่วมกับ BAP แล้ว ได้ทำการเพิ่มจำนวนแคลลัสโดยย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดิมเป็นเวลา 45 วัน ผลการศึกษาพบว่าแคลลัสมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 3.0-4.3 เท่าของน้ำหนักสดที่บันทึกได้ในสัปดาห์แรก แต่อย่างไรก็ตามอาหารเพาะเลี้ยงสูตรรักษาสภาพและเพิ่มจำนวนแคลลัสที่มีประสิทธิภาพของพืชชนิดอื่นมีชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างไปจากอาหารเพาะเลี้ยงสูตรชักนำการเกิดแคลลัส Lin et al. [22] รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตร ½ MS ที่เติม 2,4-D 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไทไดเอซูรอน (Thidiazuron) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำโพรโทคอร์ม

(Protocorm) ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีลูกผสมให้เกิดแคลลัส และพบว่าแคลลัสที่ย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไทไดเอซูรอน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนได้มากกว่าแคลลัสที่ย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม Daffalla et al. [27] รายงานการชักนำระยะระหว่างข้อของ *Grewia tenax* (Forsk.) Flori ให้เกิดแคลลัสด้วยอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม NAA 10.74 ไมโครโมลาร์ และพบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ชักนำได้ย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 10.74 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP 6.66 ไมโครโมลาร์ แคลลัสแสดงค่าน้ำหนักสดสูงมากกว่าแคลลัสที่ย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเมื่อใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากัน

สรุปผลการวิจัย

อาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการชักนำลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศสีดาพันธุ์เพชรชมพูให้เกิดแคลลัสคือ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) ผงวุ้น 0.8% (w/v) ร่วมกับ NAA 8.06 ไมโครโมลาร์ และ BAP 2.22 ไมโครโมลาร์ ปรับค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.7 และสามารถรักษาสภาพและเพิ่มจำนวนแคลลัสด้วยอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดียวกัน ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศสีดาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและพันธุวิศวกรรมพืชต่อไปได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Bhatia P, Ashwath, N, Senaranta, T and Midmore DJ. Tissue Culture Sudies of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2004;78:1-21. Doi:10.1023/b:ticu.0000020430.08558.6e
2. Food and Agriculture Organisation of the United Nation (FAO). Food and Agriculture data, [Internet]. 2021. Available from: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. 2021.
3. Kalloo G. Genetic Improvement of Tomato. In Monographs on Theoretical and Applied Genetics. New York: Springer-Verlag; 1991
4. Butelli E, Titta, L, Gorgio, M, Mock HS and Mantos, A. Enrichment of Tomato Fruit with Health-Promoting Anthocyanins by Expression of Select Transcription Factors. Nature Biotechnology 2008;26:1301-8. Doi:10.1038/nbt.1506
5. Rao AV and Rao LG. Carotenoids and Human Health. Pharmacological Research 2007;55:207-16. Doi:10.1016/j.phrs.2007.01.012
6. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. [อินเทอร์เน็ต]. 2564. เข้าถึงได้จาก:http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/tomato%2063.pdf.

7. ฝากจิต ปาลินทร ลาภจิตร. ปัญหาและความต้องการในการผลิตมะเขือเทศสีดาของเกษตรกรในจังหวัดนครราชสีมา. แก่นเกษตร 2557;42 (ฉบับพิเศษ 3):894-8.
8. Toyoda H, Tanaka N, Hirai T. Effects of The Culture Filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on Tomato Callus Growth and the Selection of Resistant Callus Cells to the Filtrate. Japanese Journal of Phytopathology 1984;50:53–62. Doi:10.3186/jjphytopath.50.53
9. Toyoda H, Shimizu K., Chatani K, Kita N, Matsuda Y, Ouchi S. Selection of Bacterial Wilt-Resistant Tomato Through Tissue Culture. Plant Cell Report 1989;8:317-20. Doi:10.1007/bf00716663
10. Toyoda H, Matsuda Y, Hirai T. Resistance Mechanism of Cultured Plant Cells to Tobacco Mosaic Virus (III) Efficient Microinjection of Tobacco Mosaic Virus into Tomato Callus Cells. Annals of the Phytopathological Society of Japan 1985;51:32-38. Doi:10.3186/jjphytopath.51.32
11. Seo YS, Choi J Y, Kim SJ, Kim EY, Shin JS, Kim WT. Constitutive Expression of *CaRma1H1*, a Hot Pepper ER-Localized RING E3 Ubiquitin Ligase, Increases Tolerance to Drought and Salt Stresses in Transgenic Tomato Plants. Plant Cell Report 2012;31: 1659-65. Doi:10.1007/s00299-012-1278-0
12. Jain SM, Shahin EA, Sun S. Interspecific Protoplast Fusion for the Transfer of Atrazine Resistance from *Solanum nigrum* to Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1988;12:189-92.Doi:10.1007/bf00040084
13. Newman PO, Krishnaraj S, Saxena PK. Regeneration of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Somatic Embryogenesis and Shoot Organogenesis from Hypocotyl Explants Induced With 6-Benzyladenine. International Journal of Plant Science 1996;157:554-560. Doi:10.1086/297375
14. Plastira VA, Perdikaris AK. Effect of Genotype and Explant Type in Regeneration Frequency of Tomato *In Vitro*. Acta Horticulturae 1997;447:231-4. Doi:10.17660/ActaHortic.1997.447.47
15. Khalilueva MR, Bogoutdinovaa LR, Baranovaa GB, Baranovaa EN, Kharchenkoa, PN, Dolgova SV. Influence of Genotype, Explant Type, and Component of Culture Medium on *In Vitro* Callus Induction and Shoot Organogenesis of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Biology Bulletin 2014;6: 512-21. https://doi.org/10.1134/s1062359014060041
16. Setiaji A, Annisa RR., Sismindari E, Rumiyati, R, Semiarti E. Induction and Growth Kinetics Callus of Tomato (*Solanum lycopersicum*). Biosaintifika 2020;12: 35-41. Doi:10.15294/biosaintifika.v12i1.21704

17. Pullaiah T, Subba Rao MV, Sreedevi E Tissue Culture Media. In Plant Tissue Culture: Theory & Practicals 2nd edition. Jodhpur: Scientific Publisher. 2017.
18. Harish MC, Rajeevkumar S, Sathishkumar R. Efficient *In Vitro* Callus Induction and Regeneration of Different Tomato Cultivars of India. Asian Journal of Biotechnology 2010;2:178-84. Doi:10.3923/ajbkr.2010.178.184
19. Kumar A, Shilpa C, Kaur R. Establishment and Regeneration of Callus Cultures in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) from Various Explants. Annual Research & Review in Biology 2017;12:1-6. Doi:10.9734/arrb/2017/32103
20. Hanur VS, Krishnareddy B. *In Vitro* Organogenesis in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Using Kinetin. Advanced in Plants & Agricultural Research 2016;4:397-401. Doi:10.15406/apar.2016.04.00158
21. Chaudhry Z, Habib D, Rashid H, Qurashi, AS. Regeneration from Various Explants of *In Vitro* Seedling of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L., cv. Roma). Pakistan Journal of Biological Sciences 2004;7: 269-72. Doi:10.3923/pjbs.2004.269.272
22. Lin YH, Chang C, Chang WC. Plant Regeneration from Callus Culture of a *Paphiopedilum Hybrid*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2000;62:21-25. Doi:10.1023/A:1006425214471
23. Samantaray S, Rout GR, Das P. An *In Vitro* Study on Organogenesis in *Trema orientalis*. Plant Science 1995;15:87-94. Doi:10.1016/0168-9452(94)04037-h
24. Smith RM. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments 3rd edition, San Diego: Academic Press; 2012.
25. Chan LK, Koay SS, Low PH, Boey PL. Effect of Plant Growth Regulators and Subculture Frequency on Callus Culture and the Establishment of *Melastoma malabathricum* Cell Suspension Cultures for the Production of Pigments. Biotechnology 2008;7:678-85. Doi:10.3923/biotech.2008.678.685
26. Karim M, Kayum MA. *In Vitro* Regeneration of Tomato Plant from Leaf and Internode Segments. Journal of Bangladesh Agricultural University 2007;5:213-6. https://ageconsearch.umn.edu/record/276609/files/bangladesh-ag-uni-0230.pdf
27. Daffalla HM, Elsheikh AM, Ali HA, Khalafalla MM. Callus Maintenance and Cell Line Selection of *Grewia tenax*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 2019;25:218-35. Doi:10.1080/10496475.2019.159525