

การเพิ่มปริมาณหน่อแขนงของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสลูกผสม ในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Multiplication of Adventitious Shoots of Hybrid *Phalaenopsis*

คำพะไพวัลย์ วงไชย และ วิลัยลักษณ์ ชินะจิตร์

Khamphaphayvan Vongxay and Wilailak Chinachit

Abstract

Phalaenopsis sp. is a kind of economic important orchid pot plant. The multiplication of adventitious shoots from prolong tissue cultured stock plants was very difficult. Therefore, effect of culture media, concentration of TDZ and activated charcoal on proliferation and multiplication of adventitious shoot was investigated. The axillary buds of hybrid *Phalaenopsis* Brother purple X Phal. Delicata (PP-S-638/7109) from prolong cultured plants were cultured on VS or hyponex media containing 0 and 0.5 mg/l TDZ for 3 months. The highest number of adventitious shoot was achieved from explants cultured on hyponex media supplemented with 0.5 mg/l TDZ (15 shoots/ explants). The media containing activated charcoal and TDZ in VS media induced lowest number of adventitious shoot but highest in root number.

Key words: *Phalaenopsis* multiplication tissue culture

บทคัดย่อ

ฟาแลนนอปซิสเป็นกล้วยไม้กระถางที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ต้นพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน มักนำมาขยายเพิ่มปริมาณต้นใหม่ได้ยาก และมีจำนวนหน่อแขนงน้อย การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์คือศึกษาการเพิ่มปริมาณหน่อแขนงของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสลูกผสม (*Phalaenopsis* Brother purple X Phal. Delicata (PP-S-638/7109) จากต้นที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลานาน โดยนำส่วนของตาข้างมาเพาะเลี้ยง มาเลี้ยงบนอาหารสูตร VS และ สูตร Hyponex ที่ไม่เติมและเติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอาหารสูตร hyponex ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อมีการสร้างหน่อแขนงได้สูงสุด 15 หน่อต่อชิ้นส่วน ส่วนอาหารสูตร VS ที่เติมผงถ่านร่วมกับ TDZ ทุกระดับความเข้มข้นพบว่า เนื้อเยื่อมีการสร้างหน่อแขนงต่ำที่สุด แต่มีการเจริญสร้างรากจำนวนมากที่สุด

คำสำคัญ: กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส เพิ่มปริมาณหน่อแขนง เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทนำ

เนื่องจากกล้วยไม้ฟาแลนออปซิส (*Phalaenopsis* sp.) เป็นกล้วยไม้ที่มีแหล่งกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pridgeon, 1995; Bilton, 1998) ดังนั้นจึงมีการเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย อีกทั้งประเทศไทยยังเป็นแหล่งสำคัญในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตไม่ต่ำกว่าปีละ 100 ล้านต้น และจำนวนต้นพันธุ์กล้วยไม้ฟาแลนออปซิส (*Phalaenopsis* sp.) ลูกผสมยังเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศอยู่เสมอ (Arditti and Ernst, 1993) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อเข้ามาช่วยเพิ่มปริมาณหน่อแขนงกล้วยไม้ฟาแลนออปซิสลูกผสมให้มีการเพิ่มจำนวนมากโดยอาศัยต้นพันธุ์เริ่มต้นจำนวนน้อยและใช้เวลาอันรวดเร็ว (Morel, 1960; 1972) และต้นที่ได้ยังปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตามต้นพันธุ์กล้วยไม้ฟาแลนออปซิส ที่เก็บไว้ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานานๆ เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณต้นใหม่ มักพบว่ามีปัญหาที่ต้นพันธุ์นั้นมีการเจริญเติบโตไม่ดี มีการสร้างหน่อแขนงใหม่จำนวนน้อย ทำให้ได้ต้นใหม่จำนวนน้อยไปด้วย ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงควรมีการศึกษาถึงปัจจัยที่จะมีผลส่งเสริมให้มีการสร้างหน่อแขนงจำนวนมากจากต้นพันธุ์ที่เก็บไว้ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานานๆ อีกทั้งยังพบว่ามีการควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดที่มีผลส่งเสริมให้เนื้อเยื่อมีการสร้างหน่อแขนงในสภาพปลอดเชื้อจำนวนมาก (สมุนทิพย์, 2541) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทดสอบสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดตลอดจนผงถ่านที่มีการชักนำให้กล้วยไม้ฟาแลนออปซิสลูกผสมมีการสร้างหน่อแขนงจำนวนมาก

วิธีการทดลอง

ชนิดอาหารเพาะเลี้ยง ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดแขนง

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงทดสอบ 4 ชนิด คือ สูตร VS สูตร Hyponex ที่เป็นอาหารปกติ และที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 5.7

นำต้นอ่อนกล้วยไม้ฟาแลนออปซิสลูกผสม Brother purple X Phal. Delicata (PP-S-638/7109) ที่เจริญอยู่ในสภาพปลอดเชื้อโดยมีขนาดต้น 2 - 3 เซนติเมตร มาตัดใบ ยอด และราก ออกแล้วตัดเอาเฉพาะส่วนต้นที่มีตาข้างขนาด 1 เซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารทดสอบที่เตรียมไว้ นำไปเก็บบ่มเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียสในสภาพที่มีแสง 2,300 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือน วางแผนการทดลองแบบ 2x2 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) 4 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น บันทึกผลการทดลองคือ น้ำหนักสด จำนวนยอดแขนงต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ความสูงของยอดแขนง จำนวนรากและจำนวนใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม MSTAT

ผลกระทบของผงถ่านกับ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณยอดแขนง

เตรียมอาหารแข็งสูตร VS ที่เติมและไม่เติมผงถ่าน (activated charcoal) อัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 , 0.25 , 0.5 , 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับความเป็นกรด - ด่าง 5.7 แล้วเติมวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มให้วุ้นละลายแล้วกรอกใส่ขวดขนาด 8 ออนซ์ ปริมาตร 40 มิลลิกรัมต่อขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

นำต้นกล้วยไม้ฟาแลนออปซิสลูกผสมที่มีความสูงเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตร มาตัดใบ ยอด และรากออก เอาเฉพาะส่วนลำต้นที่มีขนาดสูง 1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปเก็บบ่มเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียสในสภาพที่มีแสง 2,300 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 3 เดือนโดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ เดือน วางแผนการทดลองแบบ 2x5 Factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A เป็นสูตรอาหารพื้นฐาน ปัจจัย B ร่วมกับ TDZ ที่ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญพัฒนา

เกิดเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ฟาแลนออปซิสทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้น บันทึกผลการทดลองคือ จำนวนยอดแขนง จำนวนราก และจำนวนใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม MSTAT

ผลการทดลองและวิจารณ์

ชนิดอาหารเพาะเลี้ยง ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดแขนง

ชิ้นส่วนลำต้นของต้นกล้วยไม้ฟาแลนออปซิส ลูกผสมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VS และ hyponex ที่ไม่เติมและเติม TDZ 0 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนลำต้นมีการเจริญพัฒนาไปเป็นยอดแขนงในจำนวนที่แตกต่างกันทางสถิติ และ สูตรอาหาร มีปฏิสัมพันธ์กับชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เติมลงไปซึ่งมีผลต่อจำนวนยอด ราก และใบ ที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งโดยชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร hyponex ที่เติม 0.5 กรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้ชิ้นส่วนมีการเจริญสร้างยอดแขนงในจำนวนเฉลี่ยมากที่สุดคือ 15 ยอดต่อชิ้นส่วนและสูตรอาหาร VS ที่เติม TDZ 0.5 กรัมต่อลิตร มีผลให้ชิ้นส่วนมีการเจริญสร้างยอดในจำนวนเฉลี่ยรองลงมาคือ 9 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VS และ hyponex ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการเกิด

ยอดได้น้อยที่สุดคือ 1 ยอดต่อชิ้นส่วน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากว่า TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน ซึ่งมีผลต่อการสร้างอวัยวะของเนื้อเยื่อพืชพัฒนาไปเป็นยอดแขนงได้ดี (Nayak.et.al.,1997) การเจริญพัฒนาการสร้างรากของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ มีการสร้างรากสูงสุดคือ 4.25 รากต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน hyponex มี 3 รากต่อชิ้นส่วน ส่วนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VS และ hyponex ที่เติม TDZ ไม่มีการสร้างรากเกิดขึ้น (Table 1 และ Fig 1) แต่สูตรอาหาร และ TDZ ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อน้ำหนักสด และความสูงยอด

ผลกระทบของผงถ่านกับ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณยอดแขนง

เมื่อนำชิ้นส่วนกล้วยไม้ฟาแลนออปซิสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VS ซึ่งเติมและไม่เติมผงถ่าน ร่วมกับการเติม TDZ ระดับต่างๆ พบว่า การไม่เติมและเติมผงถ่านมีปฏิสัมพันธ์กับการไม่เติมและเติม TDZ ในอาหารสังเคราะห์สูตร VS ต่อน้ำหนักสด จำนวนยอด ความสูงยอด จำนวนใบ และจำนวนรากของยอดแขนง และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ โดยอาหารที่เติม TDZ ทุกระดับความเข้มข้นแต่ไม่เติมผงถ่าน มีการสร้างยอดแขนงสูงสุดไม่แตกต่างกันทางสถิติมีจำนวน

Table 1 Shoot and root development of *Phalaenopsis* sp. after cultured on VS and hyponex media containing 0 and 0.5 mg/l TDZ

Treatment	Fresh weight (g)	Shoot number (shoot/explant)	High shoot (cm)	Root number (root/explant)	Leaf number (leaf/explant)
VS	3.127	1.000c	1.250	4.250a	1.750b
VS+0.5 mg/l TDZ	4.250	9.000b	1.110	0c	1.180b
Hyponex	3.047	1.000c	1.250	3.000b	2.750a
Hyponex+0.5 mg/l TDZ	3.687	15.00a	0.8375	0c	1.550b
F-Test	ns	**	ns	*	*
C.V.(%)	24.61	8.88	24.43	34.71	21.48

ns, *,** = not significant, significant at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively

ns = not significantly different *significantly different ($P < 0.05$), **significantly different ($P < 0.01$)

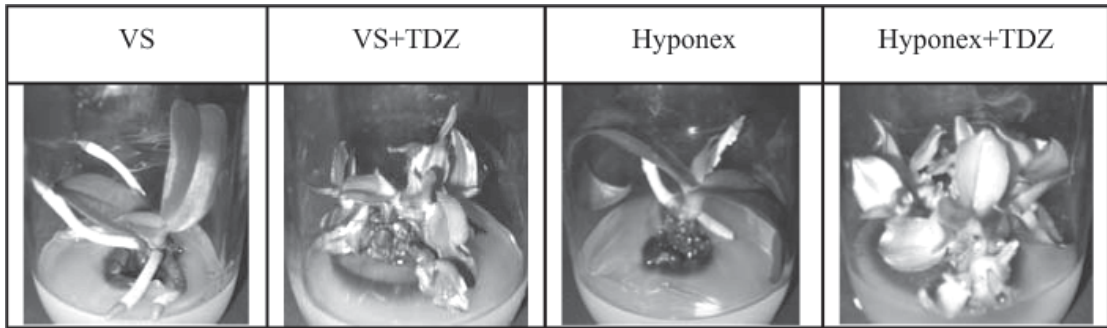


Fig. 1 Shoot and root development of hybrid *Phalaenopsis* Brother purple X Phal. Delicata (PP-S638/7109). after culture on VS and hyponex media containing 0 and 0.5 mg/l TDZ

ยอดแขนงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 9.2 ถึง 10.2 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่เมื่อเติมผงถ่านร่วมกับ TDZ ทุกระดับความเข้มข้น เนื้อเยื่อกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสลูกผสมมีการสร้างยอดแขนงได้ต่ำที่สุดเพียง 1 ยอดต่อชิ้นส่วน ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากว่า ผงถ่านมีคุณสมบัติในการดูดซับสารต่างๆ เมื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากผงถ่าน จะดูดซับสารพวก phenolic แล้วยังอาจดูดซับสารควบคุม การเจริญเติบโต TDZ ไปด้วย จึงทำให้ TDZ ที่เติมลงไป

ในอาหารเลี้ยงเคราะห์ไม่มีผลชักนำให้เกิดรากสร้างยอดแขนง ได้ (Pan and Staden, 1998) การเจริญของเนื้อเยื่อ กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสลูกผสมบนอาหารที่เติมเฉพาะ ผงถ่านเพียงอย่างเดียว หรือมีผงถ่านร่วมกับสาร TDZ ทุกระดับความเข้มข้นมีการพัฒนาทางใบ และรากมากกว่า ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเคราะห์ที่เติม TDZ ทุกระดับโดยไม่มีการเติมผงถ่านที่ พบว่า ไม่มีการชักนำ ให้สร้างราก (Table 2 และ Fig. 2) ที่เป็นเช่นนี้อาจ

Table 2 Development of shoot and root from hybrid *Phalaenopsis*. Brother purple X Phal. Delicata (PP-S-638/7109 stem tissue after being culture on VS media containing 0 and 0.5g/l VS+ Activated charcoal 0, 0.5 g 0 และ 0.25 0.5 0.75 และ 1 mg/l TDZ.

Treatment	Shoot no./explant	Root no./explant	Leaf no.
VS	1.000b	3.600c	2.400a
VS+0.25 mg/l TDZ	10.20a	0d	0.9620b
VS+0.5 mg/l TDZ	10.00a	0d	1.494b
VS+0.75 mg/l TDZ	10.20a	0d	1.1000b
VS+1 mg/l TDZ	9.200a	0d	1.130b
VS+0.5 g/l Activated charcoal	1.000b	5.400a	2.600a
VS+0.25 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	1.000b	4.200bc	2.600a
VS+0.5 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	1.000b	6.000a	2.400a
VS+0.75 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	1.000b	4.200bc	2.400a
VS+1 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	1.000b	4.600b	2.600a
F-Test	**	*	*
C.V(%)	12.21	18.90	23.99

*,** = significant at p<0.05 and p<0.01 respectively

เนื่องจากผงถ่านที่เดิมอยู่ในอาหารมีส่วนทำให้อาหาร มีสีดำมืด ส่งผลให้มีการเคลื่อนย้ายของ endogenous auxin ในต้นฟาแลนออปซิสลูกผสมมายังส่วนโคนต้น

ทำให้เกิดการชักนำให้มีการพัฒนารากจำนวนมาก (Leopold, 1964)

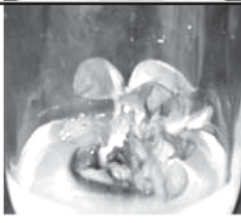
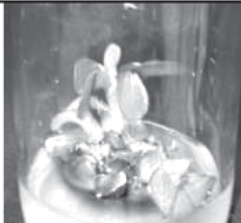
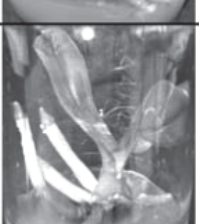
Treatment		Treatment	
VS		VS+0.5 g/l Activated charcoal	
VS+0.25 mg/l TDZ		VS+0.25 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	
VS+0.5 mg/l TDZ		VS+0.5 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	
VS+0.75 mg/l TDZ		VS+0.75 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	
VS+1 mg/l TDZ		VS+1 mg/l TDZ+0.5 g/l Activated charcoal	

Fig. 2 Shoot and root development of hybrid *Phalaenopsis* Phal. Brother purple X Phal. Delicata (PP-S-638/7109) stem tissue after being cultured on various culture media.

สรุปผลการทดลอง

การเจริญพัฒนาและการเพิ่มปริมาณของยอดแขนงจากเนื้อเยื่อส่วนลำต้นของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส ลูกผสม Phal. Brother purple X Phal. Delicata (PP-S-638/7109) พบว่าเกี่ยวข้องกับสูตรอาหารพื้นฐาน การเติมผงถ่านและสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ โดยอาหารพื้นฐาน Hyponex ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดแขนงต่อชิ้นเนื้อเยื่อได้มากกว่าอาหารพื้นฐาน VS ในอาหารพื้นฐานที่ไม่เติมสาร TDZ พบว่ามีรากเกิดขึ้นแต่ไม่มีการแตกของยอดแขนง การเติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ลดบทบาทของสาร TDZ ในอาหารเพาะเลี้ยงในการชักนำให้เกิดการแตกของยอดแขนง และส่งเสริมการเกิดรากมากกว่า

เอกสารอ้างอิง

- สุนันทิพย์ นูนนาค. 2541. การเจริญเติบโตและฮอร์โมนพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Arditti, J. and R. Ernst, 1993. Micropropagation of orchid. Wiley, New York, USA. 467 - 520.
- Bilton, R. 1998. Truly tropical but easy to grow. Orchid Rev. 106: 303-309.
- Leopold, A.C. 1964. Auxins and plant growth. Berkeley: University of California (USA).
- Morel, G.M., 1960. Producing virus-free cymbium. Amer. Orchid Soc. Bull. 29:495-497.
- Nayak, N.R., S.P. Rat, and S. Patnaik. 1997. In vitro propagation of three epiphytic orchid, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. And *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. Scientia Horticulture 71: 243 - 250.
- Pan, M.J. and J. van Staden (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture A review. Plant Growth Reg. 26: 155-163.
- Prigeon, A. 1995. The illustrated encyclopedia of orchid. Timber press, Portland, Oregon.