

ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ต่อการเพาะเลี้ยง แคลลัสกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิว

Effect of MS medium supplemented with NAA and BA on callus culture of *Schoenorchis fragrans* (Parish & Rchb.f.) Seidenf. & Smitinand

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี^{1*}

Sumet Treesaksri^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้เอื้องจิวในสภาพปลอดเชื้อโดยนำชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิวจากสภาพปลอดเชื้อ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 16 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้มาทำการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0,1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0,1,3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้ชิ้นส่วนแคลลัสมีคะแนนขนาดของแคลลัสดีที่สุด

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, กล้วยไม้เอื้องจิว

ABSTRACT: The effect of MS medium supplement with NAA and BA on callus culture of *Schoenorchis fragrans* (Parish & Rchb.f.) Seidenf. & Smitinand were studied. Leaf segment of *Schoenorchis fragrans* (Parish & Rchb.f.) Seidenf. & Smitinand were *in vitro* cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA combined with 3 mg/l BA for 16 week. After the callus appeared, explants were transferred to MS medium supplement with 0, 1 and 3 mg/l NAA combined with 0, 1, 3 and 5 mg/l BA for 8 week. It was found that the highest score of callus size were achieved from MS medium supplemented with 3 mg/l NAA and MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 5 mg/l BA

Keywords: plant tissue culture, *Schoenorchis fragrans* (Parish & Rchb.f.) Seidenf. & Smitinand

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน ที่มีพันธุ์กล้วยไม้ป่านานาชนิดอยู่ตามธรรมชาติ จำนวนมากเท่าที่พบแล้วมีจำนวนทั้งหมด 796 สกุล ประมาณ 17,500 ชนิด(สลิล,2549) สามารถจะนำมาศึกษาเพาะเลี้ยงเพื่อการอนุรักษ์ ขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ให้เกิด

ประโยชน์ในด้านสังคม เศรษฐกิจและอนุรักษ์ธรรมชาติได้เป็นอย่างดีกล้วยไม้ป่า มีความสวยงาม ทั้งลำต้นและดอกโดยเฉพาะดอกไม้มีความสวยงามสะดุดตา ปลูกเลี้ยงง่ายได้ดอกไว้สวยงาม สามารถปลูกเป็นการค้าขายต้นและดอก ลักษณะนี้ทำให้กล้วยไม้ป่าเป็นพืชที่ผู้คนต้องการมาก ทำให้กล้วยไม้ป่าจำนวนมากมายนหายชนิดถูกลักลอบนำออกจากป่าเพื่อปลูกไว้ดูเล่น เพื่อ

¹ สาขาวิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Department of Agricultural Education, Faculty of Industrial Education, KingMongkut's Institute of Technology
Ladkrabang

* Corresponding author: ktsumet@kmitl.ac.th

การวิจัย และเพื่อการค้าจึงทำให้กล้วยไม้ในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะกล้วยไม้ป่าที่ตลาดมีความต้องการสูง กล้วยไม้หลายชนิดเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (ครรรชิต, 2547)

กล้วยไม้เอื้องจ้าว *Schoenorchis Reinw. ex Blume* อยู่ในสกุลขึ้นออร์คิส หรือ เซินออร์คิส มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ทวีปออสเตรเลีย และหมู่เกาะในทะเลแปซิฟิก พบประมาณ 20 ชนิด ประเทศไทยพบ 8 ชนิด ตามป่าผลัดใบทุกภูมิภาค ยกเว้นภาคกลาง ปัจจุบันในธรรมชาติมีจำนวนน้อย พบบางพื้นที่ และมีจำนวนลดลง (สลิท, 2549) เป็นที่ต้องการของตลาดและนักสะสมกล้วยไม้ป่า จึงมีโอกาที่จะลดจำนวนลงและใกล้จะสูญพันธุ์ได้ (ครรรชิต, 2547) จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นจึงเป็นสาเหตุให้เกิดการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจ้าวในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องจ้าวที่ทำให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดและนักสะสมกล้วยไม้ป่า นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์จากการกลายพันธุ์เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อสร้างสายพันธุ์ใหม่ และ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เอื้องจ้าวต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษามูลของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากกล้วยไม้เอื้องจ้าวในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการเพาะเมล็ดกล้วยเอื้องจ้าวบนอาหารสูตร VW เป็นเวลาประมาณ 1 ปี จากนั้นนำต้นกล้วยไม้เอื้องจ้าวมาทำการตัดใบเฉพาะส่วนโคนใบขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสกล้วยไม้เอื้องจ้าว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่

ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำชิ้นส่วนไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการบันทึกข้อมูลการทดลองทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยบันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส และคะแนนขนาดของแคลลัสมีมาตรฐานคือ เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 เซนติเมตรให้ 1 คะแนน เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1-1.5 เซนติเมตรให้ 2 คะแนน เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.6-2.0 เซนติเมตรให้ 3 คะแนน เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.1-2.5 เซนติเมตรให้ 4 คะแนน เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.6-3.0 เซนติเมตรให้ 5 คะแนน เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.1-3.5 เซนติเมตรให้ 6 คะแนน และเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.6-4.0 เซนติเมตรให้ 7 คะแนนวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 12 treatments มี 3 ซ้ำๆ ละ 4 ชิ้นส่วนวิเคราะห์ความแปรปรวน ด้วย ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test

ผลการศึกษา

การศึกษามูลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจ้าวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจ้าวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีคะแนนขนาดของแคลลัส 1.7 คะแนน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 เซนติเมตร ลักษณะแคลลัสเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลและค่าขนาดของแคลลัส ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และตายในที่สุด (Figure 1A) แคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจ้าวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA

ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีคะแนนขนาดของแคลลัส 2.0 คะแนนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.1-1.5 เซนติเมตรลักษณะแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ขนาดของแคลลัสมีการเพิ่มขึ้นและเริ่มที่เจริญเติบโตขยายออกมาทางด้านข้าง แคลลัสมีขนาดค่อนข้างเล็กแคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีคะแนนขนาดของแคลลัส 2.3 คะแนนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.1-2.0 เซนติเมตรลักษณะแคลลัสเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (Figure 1B) ขนาดของแคลลัสมีการเพิ่มขึ้นและเริ่มที่เจริญเติบโตขยายออกมาทางด้านข้าง แคลลัสมีขนาดปานกลาง แคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA

ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรมีคะแนนขนาดของแคลลัส 2.7 คะแนน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.1-2.0 เซนติเมตรลักษณะแคลลัสมีสีเขียว (Figure 1C) ขนาดของแคลลัสมีการเพิ่มขึ้นและเริ่มที่เจริญเติบโตขยายออกมาทางด้านข้าง แคลลัสมีขนาดใหญ่ มีการเจริญเติบโตออกทางด้านข้างและด้านบนของแคลลัส และมีการเจริญเติบโตต่อไปแคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิวที่เลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิวที่เลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคะแนนขนาดของแคลลัสสูงสุด 3.0 คะแนน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6-2.0 เซนติเมตร ลักษณะแคลลัสมีสีเขียว (Figure 1C) ขนาดของแคลลัสมีการเพิ่มขึ้นและเริ่มที่เจริญเติบโตขยายออกมาทางด้านข้าง แคลลัสมีขนาดใหญ่ มีการเจริญเติบโตออกทางด้านข้างและด้านบนของแคลลัสและมีการเจริญเติบโตต่อไป

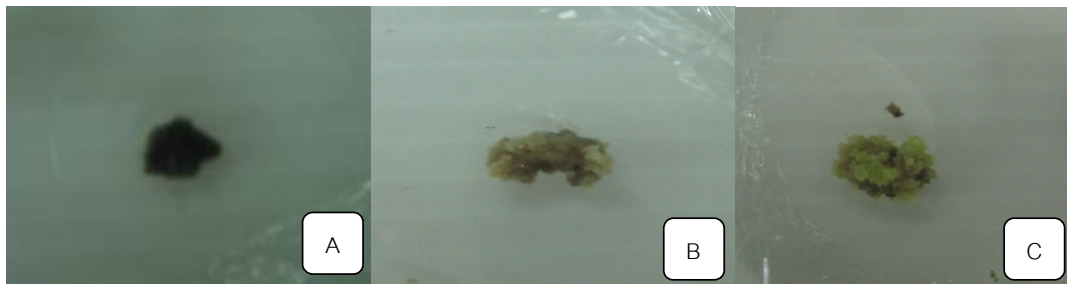


Figure 1 Callus growth of *Schoenorchis fragrans* (Parish & Rchb.f.) Seidenf. & Smitinandon MS medium supplemented with NAA and BA for 8 week: browned dead callus (A), light yellow callus (B), green callus (C)

Table 1 Effect of NAA and BA on callus culture of *Schoenorchis fragrans* (Parish & Rchb.f.) Seidenf.&Smitinand for 8 weeks.

Treatment (mg/l)	Average scores of callus size	Callus growth
MS	2.3	green callus
MS+ BA 1	1.7	browned dead callus
MS+ BA 3	1.7	browned dead callus
MS+ BA 5	1.7	browned dead callus
MS+ NAA 1	2.0	light yellow callus
MS+ NAA 1+BA 1	2.0	light yellow callus
MS+ NAA 1+BA 3	2.7	green callus
MS+ NAA 1+BA 5	3.0	green callus
MS+ NAA 3	3.0	green callus
MS+ NAA 3+BA 1	2.0	light yellow callus
MS+ NAA 3+BA 3	2.0	light yellow callus
MS+ NAA 3+BA 5	2.0	light yellow callus
F-test	NS	
CV.	38.80	

Data represent mean of 12 explants per treatment in three replicated experiments.

Means within a column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's

Multiple Range Test (DMRT) NS= No Significant difference at $P \leq 0.05$

วิจารณ์

การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิว พบว่าแคลลัสของกล้วยไม้เอื้องจิวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคะแนนขนาดของแคลลัสสูงสุด 3.0 คะแนน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6-2.0 เซนติเมตร ลักษณะแคลลัสมีสีเขียว ขนาดของแคลลัสมีการเพิ่มขึ้นและเริ่มที่เจริญเติบโตขยายออกมาทางด้านข้าง แคลลัสมีขนาดใหญ่ มีการเจริญเติบโตออกทางด้านข้างและด้านบนของแคลลัส และมีการเจริญเติบโตต่อไปตามที่ George et al. (2008) กล่าวว่าในการชักนำให้เนื้อเยื่อจากพืชใบเลี้ยง

เดี่ยวให้เกิดเป็นแคลลัสอาจใช้ออกซินความเข้มข้นสูงเพียงอย่างเดียว โดยที่อาจจะไม่จำเป็นต้องใช้ร่วมกับไซโตไคนินก็ได้ นอกจากนี้ยังกล่าวว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นท้อ บนอาหารที่มี 2,4-D เพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับ Ishii et al. (1998) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส โดยใช้อาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 36 เปอร์เซ็นต์ และตามที่ Le Van Tuong Huan et al. (2004) สามารถเพาะเลี้ยงแคลลัสของกล้วยไม้ชนิดนี้โดยใช้อาหารสูตร VW ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น อาจใช้ออกซินเพียงอย่างเดียวหรืออาจ

ใช้ออกซินปริมาณมากกว่าร่วมกับไซโตไคนินปริมาณเพียงเล็กน้อย ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของกล้วยไม้เอื้องจิว เพื่อเพิ่มปริมาณของแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้นต่อไป

สรุป

การศึกษาค้นคว้าของ NAA และ BA ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของกล้วยไม้เอื้องจิว ทำการทดลองได้นำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและแคลลัสของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องจิวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคะแนนขนาดของแคลลัสสูงสุด 3.0 คะแนน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6-2.0 เซนติเมตร ลักษณะแคลลัสมีสีเขียว

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ โดยสนับสนุนการวิจัยจากแหล่งทุนเงินรายได้ คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2557

เอกสารอ้างอิง

- ครุฑธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.
- สถิตสิทธสิจธรรม. 2549. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. อมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.
- George E.M. *et al.* 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Springer
- Ishii, Y., T. Takamura, M. Goi and M. Tanaka. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis. Plant Cell Reports 17: 446-450
- Le Van Tuong Huan, T. Takamura and M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. Plant Science 166 : 1443-1449
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues. Physiologia Plantarum 15: 473-479.