อิทธิพลของสูตรอาหารสังเคราะห์ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายจากชิ้นส่วนใบอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

Influence of culture media on Multiplication of *Platycerium hillii* from leaf cultured *in vitro*

ขวัญชีวา บุญสูง[1] และ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร[1*]

Khuancheewa Boonsung[1] and Wilailak Chinachit[1*]

บทคัดย่อ: เฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายเป็นเฟินต่างประเทศที่มีราคาค่อนข้างสูงและได้รับความนิยมมากที่สุดชนิดหนึ่ง แต่มีปัญหาในการเพาะสปอร์ที่สามารถเกิดความแปรปรวนของพันธุ์ เกิดเชื้อราและตะไคร่น้ำ รวมทั้งแมลงเข้าทำลายเป็นเหตุให้ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นตาย จึงได้มีการศึกษาวิธีเพิ่มปริมาณเพื่อลดปัญหาดังกล่าวด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนในอาหารสังเคราะห์ 5 สูตร ได้แก่ สูตร ½ MS, MS, 2MS, MM และ VW เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสูตร MM และ ½ MS มีผลให้ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อชิ้นส่วน จำนวนใบ ความยาวใบ และความกว้างใบสูงที่สุด ($P<0.01$) นอกจากนั้นอาหารแข็งสูตร MM ยังมีเปอร์เซ็นต์การเจริญของชิ้นส่วนมากที่สุดคือ 80% และมีการเกิดต้นสปอร์โรไฟต์เร็วที่สุด (45 วัน) ทำให้อาหารแข็งสูตร MM เป็นสูตรที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณต้นสปอร์โรไฟต์จากชิ้นส่วนใบอ่อนของเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: เฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอาย, สูตรอาหารสังเคราะห์

ABSTRACT: *Platycerium hillii* is a popular and valuable foreign fern. The problems of its propagation through spore germination were contamination of fungi and algae, low sporophyte regeneration rate and hight genetic variation of sporophytes. *In vitro* culture of young leaf was the method which overcomed these problems. In this study, various culture medium (½ MS, MS, 2MS, MM and VW) were tested for multiplication from leaf culture of *P. hillii*. MM and ½ MS media induced the highest sporophytes per explants, leaf number, leaf length and leaf width ($p< 0.01$), but the highest percentage of regenerated explants was found on MM media. Because of these effect, MM was the optimal culture media for the multiplication of sporophyte of *P. hillii* from leaf culture.
Keywords: *Platycerium hillii*, culture media

[1] สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Horticulture Section, Department of Plant Science and Agricultural Resource, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: wilailak@kku.ac.th

บทนำ

เฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอาย (*Platycerium hillii*) มีถิ่นกำเนิดที่ออสเตรเลีย บริเวณภาคตะวันออกของรัฐควีนส์แลนด์และปาปัวนิวกินีด้านตะวันออก (จารุพันธ์และปิยเกษตร, 2550) เป็นเฟินที่มีความสวยงาม นิยมนำมาปลูกประดับภายในสวน และเป็นเฟินชายผ้าสีดาจากต่างประเทศที่มีการนำเข้ามาจำหน่ายเป็นการค้าที่ได้รับความนิยมมากที่สุดชนิดหนึ่งและมีราคาค่อนข้างสูง (ภัทราและวีระ, 2549) แต่เกิดความแปรปรวนจากการเพาะสปอร์ได้และมีปัญหาการเกิดเชื้อราและตะไคร่น้ำ รวมทั้งแมลงเข้าทำลายเป็นเหตุให้ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นตายได้ (ภัทรา, 2554) ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการขยายพันธุ์ในสภาพปกติ (Deberg, 1994, cited after Fernandez and Revilla, 2003) แนวทางหนึ่งที่จะลดความเสียหายจากปัญหาดังกล่าวและได้ต้นที่ตรงตามสายพันธุ์เดิม คือ การขยายพันธุ์จากเนื้อเยื่อเซลล์ร่างกาย (somatic cell) เช่น การแบ่งกอในเฟินบางชนิดที่มีการแตกกอ แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วและไม่ปลอดโรค ดังนั้นเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นเทคนิคที่ควรนำมาใช้ในการขยายพันธุ์เฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอาย โดยใช้ชิ้นส่วนที่เป็นเซลล์ร่างกาย เช่น ใบอ่อน เพื่อให้ได้ต้นปริมาณมาก เพียงพอกับความต้องการของตลาด และเป็นการทดแทนการนำเข้า ได้พบว่ามีการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนของเฟินชายผ้าสีดาสายพันธุ์อื่น คือ เฟินชายผ้าสีดาออสเตรเลีย (Platycerium bifurcatum) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ และสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้ภายใน 2-3 สัปดาห์ (Camloha et al., 1994 ; Yue Ken et al., 2011) ส่วนเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายนั้นยังไม่พบว่ามีงานการทดลองขยายพันธุ์โดยใช้ชิ้นส่วนของใบมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนจะประสบผลสำเร็จได้ดีขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่ต้องจัดให้เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาปัจจัยสูตรอาหาร เพื่อจะได้ข้อมูลที่จะนำไปเพิ่มปริมาณต้นสปอร์โรไฟต์ของเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายให้ได้จำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการศึกษา

เตรียมอาหารสังเคราะห์ 5 สูตร คือ สูตร Murashige and Skoog, 1962 (MS) สูตร MS ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของสูตรปกติ (2MS) สูตร MS ที่มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) สูตร Miller and Miller, 1961 (MM) และสูตร Vacin and Went, 1949 (VW) เติมน้ำตาลซูโครส 3% นำไปปรับ pH ของอาหารให้ได้ 5.7 ทำให้อาหารแข็งด้วยการเติมวุ้นความเข้มข้น 0.7% จากนั้นบรรจุลงในขวดแก้วขนาด 2 ออนซ์ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

นำชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์อายุ 90 วัน ตัดให้มีขนาด 1x1 ซม. ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ ตามการทดลอง แล้วนำไปเก็บบ่มในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 5 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ขวด มีทั้งหมด 50 หน่วยทดลอง ทำการบันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบอ่อนของเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายหลังเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ได้แก่ น้ำหนักสดของเนื้อเยื่อ (กรัม) เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนที่มีการเจริญเติบโต จำนวนต้นต่อชิ้นส่วน จำนวนใบต่อต้น ความยาวใบ ความกว้างใบ และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม MSTAT

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ชิ้นส่วนใบอ่อนเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งทั้ง 5 สูตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (**Figure 1**) พบว่า มีน้ำหนักสดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (**Table 1**)โดยมีน้ำหนักสดอยู่ในช่วง 0.12-0.42 กรัม แต่พบว่าจำนวนต้นต่อชิ้นส่วนในอาหารแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยอาหารสูตร MM มีจำนวนต้นอ่อนสูงสุด 69.2 ต้น และไม่ต่างจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS (40 ต้น), MS (37 ต้น), VW (36 ต้น) แต่แตกต่างจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 2 MS ซึ่งไม่พัฒนาเป็นต้นอ่อนเลย (**Table 1**) ส่วนการเจริญและพัฒนาด้านอื่นๆ ของเฟินชายผ้าสีดา พบว่า ชิ้นส่วนใบมีการเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีจำนวนใบต่อต้น ความยาวและความกว้างใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$) โดยที่อาหารสูตร MM และ ½ MS มีผลชักนำให้มีจำนวนใบต่อต้น ความยาวและความกว้างใบสูงสุดไม่ต่างกันทางสถิติ (**Table 1**) คือ จำนวนใบ 2 และ 1.8 ใบ ตามลำดับ ความยาวใบ 0.36 และ 0.26 ซม. ตามลำดับ ความกว้างใบอยู่ที่ 0.28 และ 0.21 ซม. ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร 2MS ไม่มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนเลย เปอร์เซ็นต์การเจริญของชิ้นส่วนใบอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ 5 สูตร พบว่าสูตร MM มีเปอร์เซ็นต์การเจริญสูงสุด คือ 80% รองลงมาคือ ½ MS ส่วนอาหารสูตร 2MS เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญเติบโต จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบในอาหารสูตรต่างๆ ครั้งนี้ ชิ้นส่วนใบมีการเจริญที่ดีที่สุดในอาหารสูตรที่มีความเข้มข้นและมีปริมาณธาตุอาหารต่ำ อย่างเช่น MM และ ½ MS ส่วนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุอาหารสูงๆ เช่น สูตร 2MS มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต่ำมากๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ สมพร (2539) และ Wu et al. (2010) ที่ได้รายงานว่าอาหารสูตร MM, ¼ MS และ ½ MS ส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตของเฟินชายผ้าสีดา เฟินข้าหลวงหลังลาย และเฟินก้านดำ สูงกว่าอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารเต็มสูตร

Table 1 Effect of media on growth and development of young leaf of *Platycerium hillii* cultured *in vitro* for 12 weeks.

Media	Fresh weight (g)	No. of plants/explant	No. of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Multiplication of explant (%)
½ MS	0.32	40.00a	1.80ab	0.26a	0.21a	70.00
MS	0.27	37.00ab	1.00bc	0.12b	0.12b	60.00
2MS	0.12	0.00b	0.00d	0.00c	0.00c	0.00
MM	0.42	69.20a	2.00a	0.36a	0.28a	80.00
VW	0.22	36.00ab	0.80c	0.10bc	0.06bc	20.00
F-Test	ns	**	**	**	**	-
C.V. (%)	12.57	69.60	20.35	6.40	4.55	-

The data used in the analysis of the real data conversion method by $\sqrt{x+0.5}$

Means in the column followed with the same letter are not significant at $P < 0.05$

** significantly different ($P < 0.01$), ns nonsignificant

สรุป

อาหารแข็งสูตร MM และ ½ MS ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอาย เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีผลให้ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อชิ้นส่วน จำนวนใบ ความยาวใบ และความกว้างใบ สูงที่สุด แต่ในอาหารแข็งสูตร MM มีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนที่มีการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนมากที่สุดคือ 80% และมีการเจริญเป็นต้นสปอร์โรไฟต์เร็วที่สุด (45 วัน) ดังนั้นอาหารแข็งสูตร MM จึงเป็นสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณต้นสปอร์โรไฟต์จากชิ้นส่วนใบอ่อนของเฟินชายผ้าสีดาฮิลลิอายต่อไปได้

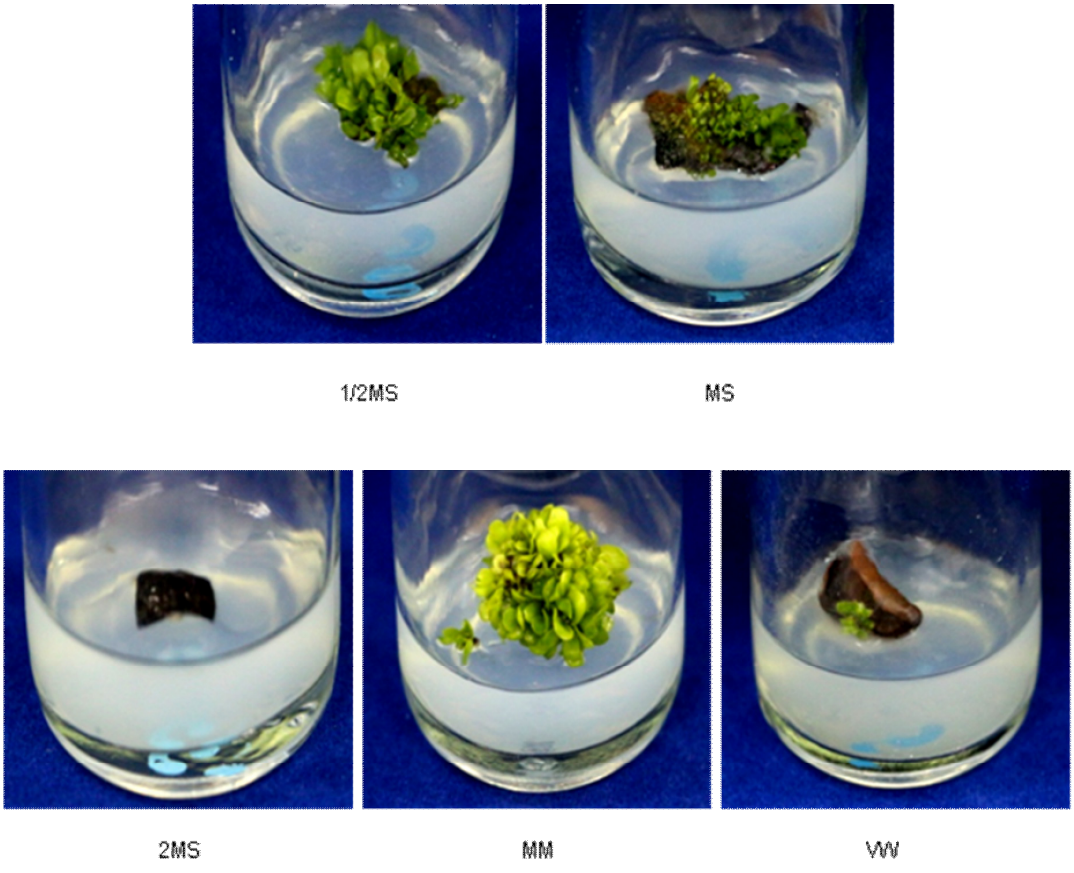

Figure 1 Growth of young leaf of *Platycerium hillii* cultured on 5 media for 12 weeks. (MS = Murashige and Skoog, 1962, ½ MS = half strength of MS media, 2MS = double strength of MS media, MM = Miller & Miller, 1961 and VW = Vacin and Went, 1949).

เอกสารอ้างอิง

จารุพันธ์ ทองแถม และ ปิยเกษตร สุขสถาน. 2550. FERNS. สำนักพิมพ์สารคดี: กรุงเทพฯ.

ภัทรา แสงดานุช. 2554. เฟินชายผ้าสีดา. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน): กรุงเทพฯ.

ภัทรา แสงดานุช และ วีระ โดแวนเว. 2549. ปลูกเฟินอย่างมืออาชีพ. สายธุรกิจโรงพิมพ์: กรุงเทพฯ.

สมพร จันทเดช. 2539. การศึกษาการเพาะเลี้ยงสปอร์เฟิร์นชายผ้าสีดาและเฟิร์นข้าหลวงหลังลายในอาหารวุ้น. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 18(3): 275-286.

อรดี สหวัชรินทร์. 2542. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. อักษรสยามการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

Camloha, M., N. Gogola and R. Janko. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platycerium bifurcatum* in vitro. Scientia Horticulturae 56: 257–266.

Deberg, P. 1994. *In vitro* culture of ornamentals. In: Vasil IK and Tthrope TA (Eds). Plant Cell and Tissue Culture: 561-573

Fernandez, H. and M.A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tissue and Organ Culture 73: 1-13.

Ken, L.Y. and W. Yi Hui. 2011. *In vitro* propagation of *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C.Chr. *via* green globular body initiation. Botanical Studies. 52: 455-463.

Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.

Wu H., L. Xiu-Qun, J. Hua, and C. Long-Qing. 2010. Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantumreniforme* var. sinense (Adiantaceae). Scientia Horticulturae 125: 417–421.