ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ

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

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี[1*]

Sumet Treesaksri[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ ทำการทดลองโดยนำชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วจากสภาพปลอดเชื้อ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0,1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0,3,5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรมีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุด 1.34 คะแนน ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 22.22 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, กล้วยไม้เอื้องจิ๋ว

ABSTRACT: The effect of MS medium supplement with NAA and BA on callus induction from leaf 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 0,1 and 5 mg/l NAA combined with 0,3,5 and 10 mg/l BA for 16 week. It was found that the highest score of callus growth of leaf segment were achieved from MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 3 mg/l BA. The highest percentage of explants formed callus were achieved from MS medium supplemented with 5 mg/l BA

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

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน ที่มีพันธุ์กล้วยไม้ป่านานาชนิดอยู่ตามธรรมชาติ จำนวนมากเท่าที่พบแล้วมีจำนวนทั้งหมด 796 สกุล ประมาณ 17,500ชนิด(สลิล,2549) สามารถจะนำมาศึกษาเพาะเลี้ยง เพื่อการอนุรักษ์ ขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ให้เกิดประโยชน์ในด้านสังคม เศรษฐกิจและอนุรักษ์ธรรมชาติ ได้เป็นอย่างดีกล้วยไม้ป่า มีความสวยงาม ทั้งลำต้นและดอกโดยเฉพาะดอกมีความสวยงามสะดุดตา ปลูกเลี้ยงง่ายได้ดอกไว้เชยชม สามารถปลูกเป็นการค้าขายต้นและดอก ลักษณะนี้ทำให้กล้วยไม้ป่าเป็นพืชที่ผู้คน

[1] สาขาวิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Department of Agricultural Education, Faculty of Industrial Education, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

* Corresponding author: ktsumet@kmitl.ac.th

ต้องการมาก ทำให้กล้วยไม้ป่าจำนวนมากมายหลายชนิดถูกลักลอบนำออกจากป่าเพื่อปลูกไว้ดูเล่น เพื่อการวิจัย และเพื่อการค้าจึงทำให้กล้วยไม้ในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะกล้วยไม้ป่าที่ตลาดมีความต้องการสูง กล้วยไม้หลายชนิดเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (ครรชิต,2547)

กล้วยไม้เอื้องจิ๋ว *Schoenorchis Reinw*. ex Blume อยู่ในสกุลซีนออร์คิส หรือ เซินออร์คิส มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ทวีปออสเตรเลีย และหมู่เกาะในทะเลแปซิฟิก พบประมาณ 20 ชนิด ประเทศไทยพบ 8 ชนิด ตามป่าผลัดใบทุกภูมิภาค ยกเว้นภาคกลาง ปัจจุบันในธรรมชาติมีจำนวนน้อย พบบางพื้นที่ และมีจำนวนลดลง (สลิล,2549) เป็นที่ต้องการของตลาดและนักสะสมกล้วยไม้ป่า จึงมีโอกาสที่จะลดจำนวนลงและใกล้จะสูญพันธุ์ได้ (ครรชิต, 2547) จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นจึงเป็นสาเหตุให้เกิดการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องจิ๋วที่ทำให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดและนักสะสมกล้วยไม้ป่า นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์จากการกลายพันธุ์เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อสร้างสายพันธุ์ใหม่ และ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เอื้องจิ๋วต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษาผลของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog,1962) ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้เกิด แคลลัสจากใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ ทำการทดลองโดย เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องจิ๋วบนอาหารสูตร VW เป็นเวลาประมาณ1 ปี จากนั้นนำต้นกล้วยไม้เอื้องจิ๋วมาทำการตัดใบ โดยตัดส่วนปลายและโคนใบออก แล้วนำเฉพาะส่วนกลางใบขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตรมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0,1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0,3,5 และ 10มิลลิกรัมต่อลิตร นำชิ้นส่วนไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสทุกสัปดาห์ (**Figure 1**) โดยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสมีมาตรวัด คือแคลลัสสีดำและตายให้ 0 คะแนน แคลลัสที่มีสีขาวและสีเหลืองเกิดบนชิ้นส่วนที่มีสีดำให้ 1 คะแนน แคลลัสแคลลัสที่มีสีเขียวเกิดบนชิ้นส่วนสีดำให้ 2 คะแนนแคลลัสที่มีสีขาวเกิดบนชิ้นส่วนที่มีสีเขียวให้ 3คะแนน และ แคลลัสที่มีสีเขียวเกิดบนชิ้นส่วนที่มีสีเขียวให้ 4 คะแนน โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 12 treatment มี 3 ซ้ำๆละ 6ชิ้นส่วน วิเคราะห์ความแปรปรวน ด้วย ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test

ผลการศึกษา

การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 7 ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการเจริญเติบโต โดยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (**Figure 2A**) ในสัปดาห์ที่ 11 ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีการเจริญเติบโต โดยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด(**Figure 2A**) ยกเว้นชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ

อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังคงมีการเจริญเติบโตของแคลลัสต่อไป โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 22.22 16.66 และ 5.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยชิ้นส่วนใบที่มีสีน้ำตาลจะมีแคลลัสสีขาว (**Figure 2B**) ในสัปดาห์ที่ 16 ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 22.22 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 16.66 และ 5.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (**Table 1**) ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (**Figure 2C**) มีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุด 1.34 คะแนนรองลงมาคือ ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (**Figure 2D**) มีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัส 1.23 คะแนน

Table 1 Effect of NAA and BA on the leaf explants of *Schoenorchis fragrans*(Parish&Rchb.f.) Seidenf.&Smitinand for 16 weeks .

Treatment (mg/l)	Percentage offormed callus (%)	scores of callus growth
MS	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ BA 3	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ BA 5	22.22 [a]	1.23 [a]
MS+ BA10	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ NAA 1	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ NAA 1+BA 3	16.66 [a]	1.34 [a]
MS+ NAA 1+BA 5	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ NAA 1+BA 10	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ NAA 5	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ NAA 5+BA 3	0.00 [b]	0.00 [b]
MS+ NAA5+BA 5	5.55 [b]	1.23 [a]
MS+ NAA 5+BA 10	0.00 [b]	0.00 [b]
F-test	**	*
CV.	106.09	205.45

Data represent mean of 18 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) * = Significant difference at $P \leq 0.05$ ** = Significant difference at $P \leq 0.01$

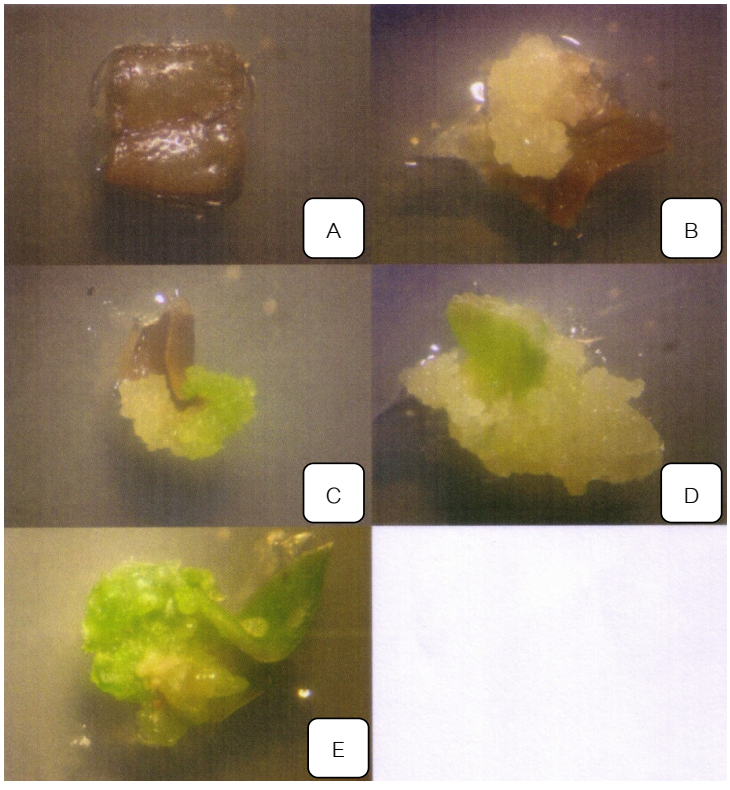

Figure 1 Scores of callus growth of leaf culture of *Schoenorchis fragrans*(Parish & Rchb.f.)Seidenf.&Smitinand on MS medium supplemented with NAA and BA for 16 week was 0 score for browned dead leaf (A) 1 score for brown leaf with white callus (B) 2 score for browned leaf with light yellow callus (C) 3 score for faded green leaf with light yellow callus(D) 4 score for green leaf with green callus (E).

วิจารณ์

การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำให้ใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 22.22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ค่อนข้างต่ำซึ่งสอดคล้องกับ Tanaka and Sakanishi (1985) ได้ทำการเพาะเลี้ยงส่วนของใบอ่อนกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสโดยตัดเป็น 3 ส่วน แล้ววางบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร adenine 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 10 วัน ส่วนปลายใบ (distal) จำนวนหนึ่งตาย หลังจากนั้น 3 เดือน ส่วนปลายใบตาย 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลางใบ (middle) ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ และส่วนโคนใบ (basal) ตาย 26 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนใบทั้ง 3 ส่วน หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 7 เดือน พบว่าตายทั้งหมด เหลือเพียงชิ้นส่วนโคนใบซึ่งเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสงน้อย (basal etiolated part) เกิดปุ่มที่แผ่นใบด้านบน (adaxial) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารนาน 135 วัน และแปรสภาพเป็น PLBs ภายใน 8 เดือน ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำให้ใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วมีคะแนนการเจริญเติบโต

ของแคลลัสดีที่สุด 1.34 คะแนน ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่ำๆ และ อาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋ว ตายในที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสัดส่วนของฮอร์โมนที่ไม่สมดุลโดย ประศาสตร์ (2538) กล่าวว่า ฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งการพัฒนาของพืชจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของฮอร์โมนสองกลุ่มนี้ คือ ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง พืชจะพัฒนาไปเป็นราก สัดส่วนออกซินต่อ ไซโตไคนินต่ำจะพัฒนาเป็นต้น และหากอยู่ในสัดส่วนปานกลางหรือสมดุล ก็จะพัฒนาไปเป็นแคลลัส จากการศึกษาในหลายๆ พืช พบว่าออกซินที่ใช้อยู่ในช่วง ความเข้มข้น 0.01– 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไซโตไคนิน อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1–10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ George et al. (2008) ยังกล่าวว่าในการชักนำให้เนื้อเยื่อจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเกิดเป็นแคลลัส อาจใช้ออกซินความเข้มข้นสูงเพียงอย่างเดียว โดยที่อาจจะไม่จำเป็นต้องใช้ร่วมกับไซโตไคนินก็ได้ นอกจากนี้ยังกล่าวว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบต้นท้อ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารที่มี 2,4-D เพียงอย่างเดียว และสอดคล้องกับ Ishii et al.(1998)ได้ทำการชักนำแคลลัสจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ฟาแลนอปซีส พบว่า อาหารสูตรที่เติม 2.4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ฟาแลนอปซีสเกิดเป็นแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ จากที่กล่าวมาข้างต้นในการชักนำแคลลัสจากใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋ว อาจไม่จำเป็นต้องใช้ไซโตไคนินในสูตรอาหารเลยก็ได้

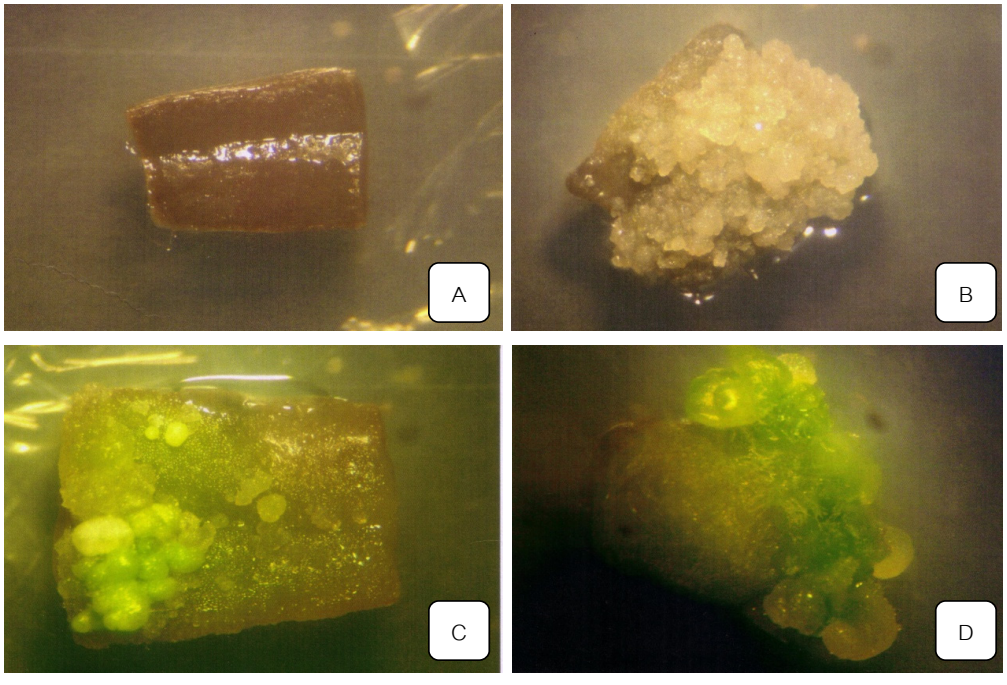

Figure 2 Leaf culture of *Schoenorchis fragrans*(Parish&Rchb.f.)Seidenf.&Smitinand on MS medium supplemented with NAA and BA for 16 week (A) browned dead leaf (B) brown leaf with white callus (C) faded green leaf with light yellow callus (D) green leaf with green callus.

สรุป

การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 22.22 เปอร์เซ็นต์และ มีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัส1.23 คะแนน ในขณะที่ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เอื้องจิ๋วที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 16.66 เปอร์เซ็นต์ และมีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุด 1.34 คะแนน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ โดยสนับสนุนการวิจัยจากแหล่งทุนเงินรายได้คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังประจำปีงบประมาณ 2557

เอกสารอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

สลิล สิทธสิจจธรรม. 2549. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิง.

George E.M. *et al.* 2008 .Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Springer

Ishii,Y. , Takamura,T. ,Goi,M . And Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis . Plant Cell Reports 17: 446–450

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues. Physiologia Plantarum, 15: 473-479.

Tanaka, M. and Sakanishi, Y. 1985. Regenerative capacity of in vitro cultured leaf segments excised from mature Phalaenopsis plants. Bull. Univ. Osaka Prefect Ser. B. 37:1–4