นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของพันธุ์และชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัส และการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีการไมโครพรอพาเกชัน

สมปอง เตชะโต[1] สมัชชา นาคสมบัติ[2] และ จารุวรรณ บุญศิริ[3]

Abstract

Te-chato, S., Naksombut, S. and Boonsiri, J.

Effect of variety and explant on callus formation and micropropagation of anthurium

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 569-578

Various explant types-petiole, leaf lamina, spathe and spadix-of three varieties of anthurium were cultured on modified Murashige and Skoog (MS) supplemented with 0.5 mg/l benzyladenine (BA) and 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ). The results revealed that Tropicana variety gave the best average callus formation from all explant types at 82%, followed by Champaign and Duang-sa-morn variety, respectively. Among the explants, petiole resulted in the best callus formation at 82%, followed by leaf lamina (57%), spadix (55%) and spathe (18%), respectively. Callus from leaf lamina gave the best shoot bud development

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

[1] Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ [2] วท.ม. (พืชศาสตร์) [3] วท.บ. (เกษตรศาสตร์) ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : tesompon@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 29 มีนาคม 2545 รับลงพิมพ์ 28 พฤษภาคม 2545

in the presence of 0.25-0.5 mg/l BA. Petiole-derived callus gave response to BA at concentration of 0.5-0.75 mg/l whereas spathe- and spadix-derived callus could not develop into shoot. Mass propagation of cultivated variety of anthurium was routinely carried out as follows: leaf-derived callus was transferred to shoot induction medium; promotion of healthy and elongation of the shoots was carried out in basal MS-free medium; the shoots were then rooted in ½ MS hormone-free as root induction medium; acclimatization of plantlets was performed in coconut fiber as supporting planting material placed in 25-36-hole plastic trays before transferring to growing pots.

Key words : callus formation, anthurium, micropropagation of anthurium

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต สมัชชา นาคสมบัติ และ จารุวรรณ บุญศิริ

ผลของพันธุ์และชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัส และการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีการไมโครพรอพาเกชัน

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 569-578

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ก้านใบ ใบ จานรองดอก ปลีดอก ของหน้าวัว 3 พันธุ์ ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม BA ร่วมด้วย TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. พบว่า พันธุ์ ทรอปพิกานาให้การสร้างแคลลัสโดยเฉลี่ยในทุกชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด 82% รองลงมาเป็นพันธุ์แชมเปญ และพันธุ์ดวงสมรตามลำดับ ชิ้นส่วนก้านใบให้การสร้างแคลลัสสูงที่สุด (82%) รองลงมาเป็นแผ่นใบ (57%) ปลีดอก (55%) และจานรองดอก (18%) แคลลัสจากชิ้นส่วนแผ่นใบให้การสร้างยอดได้ดีเมื่อใช้ BA เข้มข้น 0.25 - 0.5 มก./ล. สำหรับชิ้นส่วนก้านใบตอบสนองต่อ BA ความเข้มข้น 0.50 - 0.75 มก./ล. ในขณะที่ชิ้นส่วนจานรองดอกและปลีดอกไม่สามารถชักนำยอดได้ สำหรับการขยายพันธุ์หน้าวัวโดยใช้แคลลัสนั้น ใช้แคลลัสจากใบ ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำยอด ส่งเสริมการยืดยาวและความแข็งแรงยอดในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ตัดแยกยอดไปชักนำรากในอาหารสูตร ½ MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากล้างรากห่อด้วยเปลือกมะพร้าวนำไปอนุบาลในถาดหลุม 25-36 ช่อง เมื่อตั้งตัวได้แล้วจึงย้ายลงกระถางปลูกต่อไป

หน้าวัว (anthurium, *Anthurium andraeanum* L.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศโคลัมเบีย (อดิศร, 2539) ได้มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2440 แต่ใครเป็นผู้นำเข้ามาปลูกนั้นไม่ปรากฏหลักฐานแน่ชัด (สมเพียร, 2525) ในระยะแรกนั้นหน้าวัวถูกนำมาปลูกเป็นไม้ประดับในบ้านเรือนเพื่อความสวยงาม แต่เนื่องจากหน้าวัวมีจานรองดอก (spathe) เด่น สีสวยสะดุดตา เช่น สีขาว แดง ชมพู ส้ม ก้านดอกยาวและเป็นดอกไม้ที่บานทนมีอายุการใช้งานได้นานวัน สามารถปลูกเลี้ยงได้ง่ายจึงนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ ต่อมาได้มีการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีขึ้น เช่น จานรองดอกใหญ่ รูปทรงสีสวย และได้มีการพัฒนาการปลูกเลี้ยงมาโดยลำดับ (สรรลาภ, 2520 อ้างโดย ชะอ้อน, 2531) ปัญหาการปลูกหน้าวัวในปัจจุบันคือ ไม่มีต้นพันธุ์เพียงพอในการส่งเสริมให้ปลูกเป็นสวนขนาดใหญ่ การขยายพันธุ์หน้าวัวโดยทั่วไปนิยมปฏิบัติกัน 2 วิธี คือ การเพาะเมล็ด และการตัดส่วนต่างๆ ของลำต้นไปปลูก เช่น การแยกหน่อ การตัดชำยอด และการตัดชำต้น แต่ยังคงทำได้ช้า ทำให้ต้นพันธุ์ที่ใช้ปลูกมีน้อยและราคาแพง วิธีที่ดีที่สุดคือการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีบทบาทสำคัญในการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น สตรอเบอรี่ กล้วย ส้ม สับปะรด มันฝรั่ง ปาล์มน้ำมัน กล้วยไม้ และพืชอื่นอีกหลายชนิด ซึ่งการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นี้สามารถขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว โดยใช้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเพียงจำนวนน้อยต้นพืชที่ได้จะเหมือนต้นเดิมและปลอดโรค นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมปริมาณการผลิตต้นพันธุ์พืชได้ตลอดปีตามความต้องการของผู้ปลูกหน้าวัว

การศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวเริ่มโดย Pierik และคณะ (1974) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวโดยใช้คัพภะและชิ้นส่วนใบอ่อนมาเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง Murashige และ Skoog (1962) โดยใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักเพียงครึ่งเดียว ธาตุอาหารรอง ธาตุเหล็กและสารอินทรีย์เท่าเดิม พบว่า การเจริญเติบโตของแคลลัสและการสร้างยอดและรากขึ้นอยู่กับพันธุกรรมชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงข้างต้นเติม BAP (Benzylaminopurine) 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียวส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดี แม้ว่าในระยะแรกการเจริญเติบโตช้ามาก การชักนำรากและการเพิ่มความแข็งแรงให้รากเป็นไปได้ดีในอาหารเติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) นอกจากนี้ Pierik (1976) ยังรายงานว่า ระยะเวลาในการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับพันธุกรรม ส่วนปัจจัยสำคัญในการชักนำยอดจากแคลลัส คือ แอมโมเนียมไนเตรท โดยที่ความเข้มข้นต่ำๆ ร่วมกับ BAP 1 มก./ล. ส่งเสริมการสร้างยอดได้ดี BAP ความเข้มข้นสูงกว่านี้มีผลต่อการยับยั้งการสร้างยอด และการชักนำแคลลัสทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง ระยะเวลาทั้งหมดในการเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวจนได้ต้นที่สมบูรณ์ 12 เดือน คือ ชักนำแคลลัส 3 เดือน เพิ่มปริมาณแคลลัส 2 เดือน ชักนำยอด 4 เดือน สร้างคลอโรฟิลล์และใบ 1 เดือน สร้างราก 2 เดือน (Pierik,1976) ชะอ้อน (2531) รายงานการเพาะเลี้ยงใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของหน้าวัวพันธุ์ double spathe ในอาหารสูตร MS เติม NAA หรือ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า แคลลัสพัฒนาได้ในทุกระดับความเข้มข้นของ NAA หรือ BA แต่ลักษณะของแคลลัสไม่เหมือนกัน กล่าวคือแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเติม NAA มีลักษณะการจับตัวอย่างหลวม สำหรับแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเติม BA มีลักษณะแข็งและมีแนวโน้มที่จะเจริญไปเป็นยอดต่อไป Kuehnle และ Sugii (1991) รายงานการนำชิ้นส่วนใบและก้านใบของหน้าวัวพันธุ์ฮาวายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ในที่มืดเป็นเวลา 2-3 เดือน พบว่า อาหารสูตรดัดแปลง MS โดยการลดความเข้มข้นองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร (3%) เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.36 μM และ BA ความเข้มข้น 4.4 μM สามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด

ในบทความนี้ได้อธิบายผลของพันธุ์ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และการตอบสนองต่อความเข้มข้นของ BA ในการสร้างแคลลัสเริ่มต้น การสร้างยอด และขั้นตอนที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวเพื่อการขยายพันธุ์เป็นการค้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้หน้าวัวพันธุ์ดวงสมร พันธุ์แชมเปญ พันธุ์ทรอปิกาน่า นำต้นพันธุ์ที่จะใช้ในการทดลองซึ่งเลี้ยงในกระถางมาวางไว้ในกระบะพลาสติก ให้น้ำเช้าเย็นและฉีดไทโอยูเรีย ความเข้มข้น 250 มก./ล. อาทิตย์ละครั้ง เพื่อเร่งการแตกใบอ่อนและดอกอ่อน สำหรับแสงนั้นให้ความเข้มในช่วง 1000-3000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงในหนึ่งวัน อุณหภูมิที่ได้รับตอนกลางวัน 30 °C ส่วนกลางคืน 22 °C เมื่อใบอ่อนเริ่มปรากฏให้เห็นจึงทำการบันทึกระยะเวลาเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป

การฟอกฆ่าเชื้อ

ตัดใบอ่อนอายุ 3 วันหลังคลี่ และดอกอ่อนอายุ 3-5 วัน หลังจากสร้างตาดอก ให้ติดก้านโดยตัดให้ชิดโคนต้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยล้างด้วยซันไลต์บริเวณผิวภายนอกให้สะอาด แล้วจุ่มแช่ชิ้นส่วนทั้งสองในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% เป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 20% ที่มี Tween 20 1-2 หยด ต่อสารละลายคลอร็อกซ์ 100 มล. ผสมอยู่ด้วย นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง ขั้นตอนนี้ทำในตู้ย้ายเลี้ยง นำชิ้นส่วนใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อตามขั้นตอนข้างต้นไปวางในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ทำการตัดชิ้นต่างๆ ไปเลี้ยงในอาหารต่อไป

สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

สูตรอาหารที่ใช้เป็นสูตร MS ดัดแปลงองค์ประกอบและปริมาณมีหน่วยเป็น มก./ล.ดังนี้คือ NH_4NO_3 825, KNO_3 950, KH_2PO_4 85, H_3BO_3 6.2, KI 0.83, $MnSO_4 1H_2O$ 22.3, $ZnSO_4 7H_2O$ 8.6, $CuSO_4 5H_2O$ 0.25, $Na_2MoO_4 2H_2O$ 0.25, $CoCl_2 6H_2O$ 0.25, $CaCl_2 2H_2O$ 440, $MgSO_4 7H_2O$ 370, $FeSO_4 7H_2O$ 13.9, Na_2EDTA 18.65, myo-innositol 100, nicotinic acid 0.5, pyridoxine-HCl 0.5, thiamine-HCl 0.1, glycine 2, adenine sulfate 0.1 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามวัตถุประสงค์และการเลี้ยง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.8 เติมน้ำตาล 3% เติมวุ้นตรานางเงือก 0.75% หลอมวุ้นให้เข้ากันดีแล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. สูง 15 ซม. ปิดปากหลอดด้วยอะลูมินัมฟอยล์ให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กก./ตร.ซม. อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีการศึกษา

1. ผลของพันธุ์และแหล่งของชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัส

ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัย คือพันธุ์และชิ้นส่วน พันธุ์หน้าวัวที่ใช้มี 3 พันธุ์ คือ พันธุ์แชมเปญ พันธุ์ทรอปิกาน่า พันธุ์ดวงสมร ชิ้นส่วนที่ใช้มี 4 ประเภทคือ ใบอ่อน (อายุ 3 วัน หลังคลี่) ก้านใบ ปลีดอก และจานรองดอก แต่ละชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงตัดให้มีขนาด 0.5×0.5 ซม. นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่มีองค์ประกอบข้างต้นเติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ TDZ เข้มข้น 0.5 มก./ล. ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาดกลางจำนวน 1 ชิ้น/หลอด แต่ละชิ้นส่วนของแต่ละพันธุ์ทำ 3 ซ้ำๆ ละ 20 หลอด ในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 26±2 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเกิดแคลลัสเปรียบเทียบกันระหว่างปัจจัยทั้งสองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) ในแฟกทอเรียล วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย DMRT (Duncan's multiple range test)

2. ผลของความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างยอดจากแคลลัสหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบผลของระดับความเข้มข้นของ BA ที่มีต่อการชักนำยอดจากแคลลัสจากพันธุ์และชิ้นส่วนต่างๆ จากการศึกษาที่ 1 ตัดแยกแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ข้างต้นเติม BA เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 มก./ล. การเพาะเลี้ยงทำในหลอดทดลองโดยเพาะเลี้ยงหลอดละ 1 ชิ้น ในแต่ละความเข้มข้นของ BA ที่ทดสอบทำ 3 ซ้ำๆ ละ 20 หลอด ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26±2 °C บันทึกจำนวนยอดที่สร้างเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA ที่ทดสอบ

3. การขยายพันธุ์โดยใช้ meristematic nodular - callus

ในการศึกษานี้ ใช้แคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนแผ่นใบในการศึกษาที่ 2 ที่มีการสร้างตายอดแล้วซึ่งแคลลัสดังกล่าวเรียกชื่อว่า meristematic nodular ย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเพาะลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ หรือไม่เติมเพื่อความเหมาะสมในแต่ละพันธุ์ และศึกษาขั้นตอนที่แน่นอนคือการชักนำยอดที่สมบูรณ์ การชักนำรากการอนุบาลต้นกล้า และระยะเวลาในแต่ละขั้นตอนในอันที่จะขยายพันธุ์หน้าวัวเชิงการค้าต่อไป

ผลการทดลอง

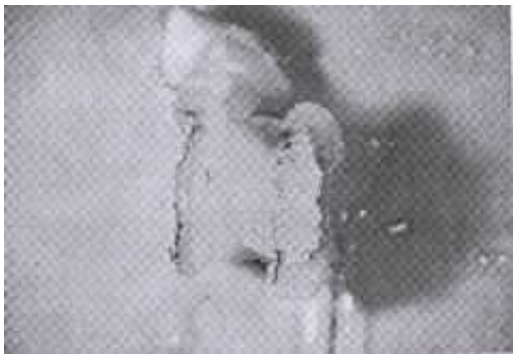
1. ผลของพันธุ์และแหล่งของชิ้นส่วนหน้าวัวที่มีผลต่อการสร้างแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ก้านใบ ใบ จานรองดอก ปลีดอก ของหน้าวัว 3 พันธุ์ ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม BA ร่วมด้วย TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. พบว่า พันธุ์และชิ้นส่วนที่แตกต่างกันมีผลต่อการสร้างแคลลัสเริ่มต้นในสภาพที่มืดที่แตกต่างกัน พันธุ์ทรอปิกา-นาสร้างแคลลัสโดยเฉลี่ยในทุกชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด 82% รองลงมาเป็นพันธุ์แชมเปญ และพันธุ์ดวงสมรตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง พบว่า ชิ้นส่วน

Table 1. Callus formation from various sources of explants of the three varieties of anthurium on modified MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ.

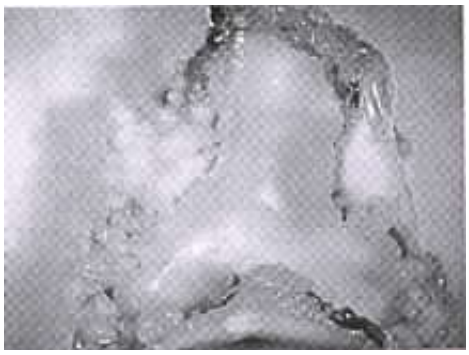
Variety	Percentage explant forming callus				Average (variety)
	Petiole	Leaf lamina	Spathe	Spadix	
Champaign	91.66[a]	17.33[d]	16.33[d]	66.67[b]	48.00B
Tropicana	100.00[a]	91.67[a]	39.00[c]	100.00[a]	82.66A
Duang-sa-morn	56.33[b]	64.67[b]	0[e]	0[e]	30.25B
Average (explant)	82.66A	57.88B	18.44C	55.55B	

C.V.(%) variety = 10.92
C.V. (%) explant = 24.47
Means having the same small letters within treatment combination showed no significant different by DMRT.
Means having the same capital letters within factor showed no significant different by DMRT.



(A) Compact yellow callus from petiole of Champaign variety

(B) Compact yellowish-green and friable white callus from petiole of Duang-sa-morn variety



(C) Meristematic nodular callus from leaf lamina of Duang-sa-morn variety

Figure 1. Callus development from the two different explants of the two varieties of anthurium.

ก้านใบให้การสร้างแคลลัสสูงที่สุด (82%) รองลงมาเป็นแผ่นใบ (57%) ปลีดอก (55%) และจานรองดอก (18%) ตามลำดับ (Table 1) อย่างไรก็ตามการสร้างแคลลัสของแต่ละชิ้นส่วนในแต่ละพันธุ์แตกต่างกันทางสถิติ ($P = 0.05$) ในกรณีของชิ้นส่วนจานรองดอก และปลีดอกพันธุ์ดวงสมรไม่ตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสเลย (การสร้างแคลลัส 0%) ในขณะที่ชิ้นส่วนแผ่นใบให้การสร้างแคลลัสสูงที่สุด แคลลัสสีมีสีเหลือง เกิดบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (Figure 1) ลักษณะของแคลลัสที่สร้างจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกัน แคลลัสจากก้านใบ และแผ่นใบมีสีเหลือง โดยส่วนใหญ่แคลลัส มีลักษณะเกาะกันแน่น และแข็ง (compact) และมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดส่วน แคลลัสที่ชักนำจากก้านใบพันธุ์ดวงสมรมีสีขาวถึงเขียวเหลือง และมีแคลลัสที่ร่วนเปราะ (friable callus) ปนอยู่ด้วย (Figure 1)

2. ผลของความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างยอดจาก - แคลลัสหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 จากชิ้นส่วนใบ ก้าน ฐานรองดอก ปลีดอก ของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA ความเข้มข้น 0.00, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มก./ล. พบว่าส่วนของจานรองดอก ปลีดอกของทุกพันธุ์ และ ชิ้นส่วนก้านใบของพันธุ์ทรอปิกาน่า ไม่มีการสร้างยอด แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีดำ และมีการเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ในเดือนแรกแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนก้านใบและใบของหน้าวัวทุกพันธุ์เมื่อนำไปวางเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรจะขยายตัวเพียงเล็กน้อย ในเดือนที่ 2 แคลลัสจะค่อนข้างแน่น มีการเพิ่มปริมาณใหญ่ขึ้นและมีตายอดเกิดขึ้น แคลลัสจากชิ้นส่วนใบจะตอบสนองต่อ BA ความเข้มข้น 0.25-0.5 มก./ล. ดีที่สุด โดยที่พันธุ์แชมเปญให้การสร้างยอดสูงสุด 7.5 ยอด/ชิ้นส่วน รองลงมาคือ พันธุ์ดวงสมรให้การสร้างยอด 3 ยอด/ชิ้นส่วน และพันธุ์ทรอปิกาน่าให้การสร้างยอดต่ำที่สุด 2 ยอด/ชิ้นส่วน ชิ้นส่วนก้านใบตอบสนองต่อ BA ความเข้มข้น 0.50-0.75 มก./ล. โดยที่พันธุ์แชมเปญให้การสร้างยอดประมาณ 3 ยอด/ชิ้นส่วน สูงกว่าพันธุ์ดวงสมรเล็กน้อย (Table 2)

3. การขยายพันธุ์โดยใช้ meristematic nodular callus

การชักนำให้เกิดยอดนั้น พบว่า ความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกัน เช่น การชักนำยอดจากแคลลัสที่สร้างจากใบหน้าวัวพันธุ์ดวงสมร ต้องการอาหารเติม BA 0.25-0.75 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.5 มก./ล. นอกจากนี้พบว่า สภาพที่มีแสงส่งเสริมให้มีการสร้างยอดได้ สังเกตการสร้างยอดและย้ายเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดทุก 45 วัน สำหรับขั้นตอนการขยายพันธุ์ แสดงใน Figure 2

3.1 การแยกยอดไปเลี้ยงให้มีขนาดใหญ่แข็งแรง

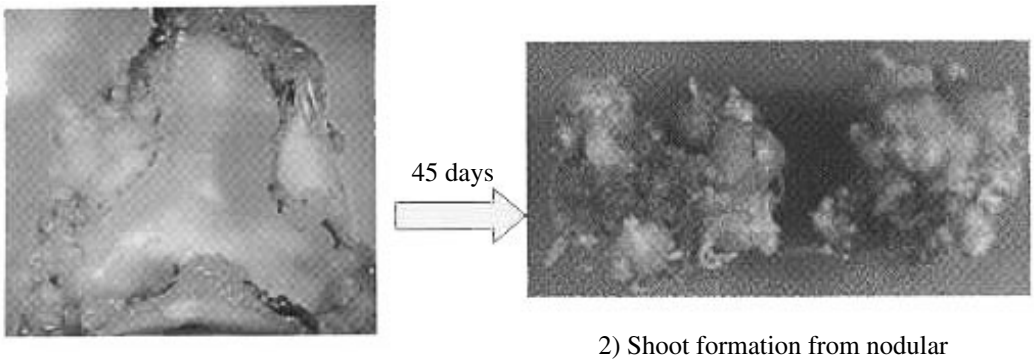
เมื่อพบว่าแคลลัสของหน้าวัวสร้างยอดใหม่ และยอดมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยใบอย่างน้อย 2 ใบ หรือสูงประมาณ 1 - 2 ซม. ให้ตัดแยกยอดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในกรณีที่ยอดยังมีขนาดเล็กและมีจำนวนมาก โดยขึ้นเป็นกระจุกบนก้อนแคลลัส ให้ย้ายก้อนแคลลัสดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1-2 เดือน ในช่วงนี้ต้นหน้าวัวจะยืดยาวและมีความสมบูรณ์มากขึ้นและอาจพบว่ามีการสร้างรากเกิดขึ้น

3.2 การชักนำราก

ย้ายต้นหน้าวัวที่สมบูรณ์และมีขนาดใหญ่ไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ ($^1/_2$MS) ยกเว้นน้ำตาลซูโครส (ใช้ความเข้มข้น 3%) และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่วนต้นที่มีขนาดเล็กให้ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกครั้งหนึ่ง เพื่อให้ยอดใหญ่ขึ้นจึงค่อยนำมาชักนำรากต่อไป ซึ่งจะพบว่า ภายหลังเลี้ยงนาน 1-2 เดือน หน้าวัวสร้างรากและได้หน้าวัวที่พร้อมนำออกปลูกอนุบาลต่อไป

3.3 การอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก

วัสดุปลูกที่เหมาะสมสำหรับอนุบาลต้นกล้าหน้าวัวควรเป็นวัสดุที่อ่อนนุ่ม โปร่ง อุ้มน้ำสูง เช่น ขุยมะพร้าว กาบมะพร้าว เวอมิคูไรท์ พีทมอส เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่าวัสดุที่หาง่ายและมีราคาถูกก็คือ กาบมะพร้าว การนำกาบมะพร้าวมาใช้ควรตัดเป็นท่อนเล็กๆ ยาวประมาณ 4-5 ซม. นำไปแช่น้ำให้ชุ่มอย่างน้อย 1 คืน จากนั้นย้ายหน้าวัวที่สร้างรากสมบูรณ์ออกจากขวดเพาะเลี้ยง ล้างวุ้นที่ติดกับรากออกด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันราก



1) Callus induction in the dark
(modified MS+0.5mg/l BA+0.5mg/l TDZ)

2) Shoot formation from nodular
(modified MS+0.25-1.0 mg/l BA)

30-60 days

3) Promotion of healthy shoots
(Hormone-free MS medium)

30-60 days

4) Root induction from excised
single shoot (1/2 hormone free)

14 days

5) Plantlets at 2 months after transfer to soil

Figure 2. Steps in clonal propagation of anthurium through meristematic nodular callus.

Table 2. Shoot development from callus induced from various explants of the three varieties of anthurium on MS medium supplemented with various concentrations of BA.

Explant	Concentration BA (mg/l)	% Explant forming shoot	Avg. number of shoots (±SE)
Duang-sa-morn			
Leaf lamina	0.00	28.5	1.50±0.50
	0.25	50.0	3.60±1.62
	0.50	55.5	3.00±1.41
	0.75	60.0	2.11±0.99
	1.00	45.4	2.60±1.20
Petiole	0.00	50.0	2.00±0.00
	0.25	50.0	2.00±0.00
	0.50	100.0	2.50±0.50
	0.75	50.0	2.00±0.00
	1.00	100.0	2.00±0.00
Champaign			
Leaf lamina	0.00	25.0	1.00±0.00
	0.25	50.0	1.50±0.50
	0.50	66.6	7.50±0.50
	0.75	75.0	1.60±0.47
	1.00	25.0	1.00±0.00
Petiole	0.00	50.0	1.00±0.00
	0.25	40.0	2.00±1.00
	0.50	71.4	2.20±0.74
	0.75	66.6	2.91±2.13
	1.00	70.0	1.87±1.05
Tropicana			
Leaf lamina	0.00	0.0	0.0±0.0
	0.25	50.0	2.0±0.0
	0.50	25.0	2.0±0.0
	0.75	50.0	1.5±0.5
	1.00	0.0	0.0±0.0

กระทบกระเทือนหรือฉีกขาด นำไปปลูกด้วยกาบมะพร้าวโดยฉีกให้เป็นชิ้นเล็กๆ หรือบีบให้อ่อนนุ่ม ห่อรากของต้นกล้าหน้าวัวให้แน่น มัดด้วยหนังยางหรืออาจนำใส่ถาดหลุมสำหรับอนุบาลต้นกล้า คลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นเจาะถุงพลาสติกเป็นรูขนาดเล็ก 2-3 รู เพื่อให้ต้นกล้าปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ และขยายขนาดรูให้ใหญ่ขึ้นและเอาถุงพลาสติกออกภายใน 2 สัปดาห์

วิจารณ์

ความสามารถในการสร้างแคลลัส และการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนของหน้าวัว แต่ละพันธุ์ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับสภาพทางพันธุกรรม สอดคล้องกับการรายงานของ Pierik และคณะ (1974) ว่าความเร็วในการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วน ใบ ก้านใบ จานรองดอก ก้านช่อดอกไม่เท่ากัน จากการทดลองวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบ ใบ จานรองดอก และ ปลีดอกของหน้าวัว 3 พันธุ์ ในการศึกษานี้บนอาหารสูตรดัดแปลง MS ร่วมด้วย BA 0.5

มก./ล. และ TDZ 0.5 มก./ล. พบว่า ความสามารถในการสร้างแคลลัสของชิ้นส่วนทั้งหมดในพันธุ์ทรอปพิกาน่าให้การสร้างแคลลัสเร็วที่สุด และสูงสุด 82.66% เมื่อเทียบกับพันธุ์แชมเปญและพันธุ์ดวงสมร (Table 1) อย่างไรก็ตามความสามารถในการสร้างแคลลัสนั้นยังขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตด้วย ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินต้องมีความเหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส ชนิดของออกซินและไซโตไคนินก็มีผลทั้งนี้ขึ้นกับชนิดพืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง จากการศึกษาของ Kuehnle และ Sugii (1991) พบว่า การใช้ 2,4-D เข้มข้น 0.36 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ เติมลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบหน้าวัวสามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด ในทำนองเดียวกันนี้ จารุวรรณ (2523) อ้างโดย ชะอ้อน (2531) รายงานว่า 2,4-D และ BA ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัส อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกัน ผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างจากการศึกษานี้ กล่าวคือในการศึกษานี้ไม่ประสบผลสำเร็จจากการชักนำแคลลัสโดยใช้ออกซิน (ไม่แสดงข้อมูล) การใช้ไซโตไคนิน 2 ชนิดร่วมกันคือ BA และ TDZ ในอัตราความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดทั้ง 3 พันธุ์ที่ทดสอบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของพันธุ์ที่ศึกษา การดูแลต้นพันธุ์ก่อนนำมาใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตาม สันนิษฐานว่า ใบอ่อนของหน้าวัวที่นำมาเพาะเลี้ยงในการศึกษานี้อาจมีการสร้างและสะสมออกซิน ดังนั้นเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงจึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้ออกซินจากภายนอก (ที่เติมลงในอาหาร) ใบที่นำมาเพาะเลี้ยงมีสีรงควัตถุแอนโธไซยานินสีแดง ซึ่งรงควัตถุดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์ และการสร้างและสะสมออกซิน ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของมังคุด (Te-chato and Lim, 2000) แม้ว่าทุกชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงให้การสร้างแคลลัสได้ก็ตาม แต่แคลลัสที่มีลักษณะเป็นปมและมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดที่เรียกว่า meristematic nodule นั้น ได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้จำนวนยอดที่พัฒนาจากแคลลัสมากกว่าด้วย (Table 2) ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงเลือกใช้แคลลัสที่พัฒนาจากแผ่นใบเพื่อขยายพันธุ์จำนวนมากเชิงการค้าต่อไป ในกรณีของปลีดอกและจานรองดอกนั้นให้การพัฒนาของยอดต่ำ และแม้ว่าสามารถขยายได้จำนวนมากแต่โอกาสที่จะมีการกลายพันธุ์สูงมาก เพราะเป็นชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศจึงไม่นิยมนำมาใช้ในการขยายพันธุ์

ชิ้นส่วนแผ่นใบของทุกพันธุ์ที่ทดสอบ พบว่า BA ความเข้มข้น 0.75 มก./ล. ให้การสร้างยอดดีที่สุด ส่วนในชิ้นส่วนก้านใบของทุกพันธุ์นั้น BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล. ดีที่สุด สำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มี BA เป็นส่วนประกอบนั้นแคลลัสมีลักษณะค่อนข้างแน่นและมีตุ่มสีเขียว ซึ่งตุ่มนี้สามารถพัฒนาไปเป็นยอดต่อไป จรูญ (2526) อ้างโดย ชะอ้อน (2531) และ Pierik และคณะ (1974) พบว่า ไซโตไคนินมีผลต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส ตลอดจนการเกิดต้นของชิ้นส่วนหน้าวัวโดยเฉพาะ อย่างไรก็ตาม สรรลาภ (2526) รายงานว่า การชักนำยอดจากแคลลัสหน้าวัวต้องการออกซินในอัตราความเข้มข้นต่ำ ในการศึกษานี้ไม่ได้ทดลองออกซินในขั้นตอนของการชักนำยอด แต่จากการสังเกตการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA และ TDZ พบว่าไม่มีการสร้างยอดให้เห็นคงมีเพียงการเพิ่มปริมาณ meristematic nodular callus เท่านั้น เมื่อย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารที่เติม BA เพียงอย่างเดียวส่งเสริมการสร้างยอดและการยืดยาวของยอดได้ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงของมังคุด (Te-chato and Lim, 2000)

ในการขยายพันธุ์พืชจำนวนมากเป็นการค้าหรือเชิงพาณิชย์นั้นจำเป็นต้องทราบขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำพืชต้นใหม่ที่แน่นอน โดยทั่วไปแล้วในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ดอกไม้ประดับเชิงการค้าประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 4 ขั้นตอนหลักคือ การชักนำแคลลัสหรือเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง การชักนำยอดและการเพิ่มปริมาณ การชักนำรากจากยอด และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการอนุบาลต้นพืชที่ได้ลงดินปลูกต่อไป ขั้นตอนดังกล่าวอาจมากกว่านี้แตกต่างกันออกไปทั้งนี้ขึ้นกับพืชเช่นเดียวกับการขยายพันธุ์หน้าวัวในการศึกษานี้ซึ่งพบว่าประกอบไปด้วยขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่เนื่องจากเมื่อชักนำยอดได้ในขั้นตอนที่ 3 แล้วยอดที่ได้มีความแข็งแรงต่ำ (ไม่ยืดยาวและสมบูรณ์) มักเกิดเป็นกระจุกในอาหารชักนำและเพิ่มปริมาณยอด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องส่งเสริมการเจริญและยืดยาวของยอดโดยการย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้ขั้นตอนการ

ขยายพันธุ์ประกอบด้วยขั้นตอน 5 ขั้นตอน Te-chato และ Lim (2000) รายงานการขยายพันธุ์มังคุดโดยใช้แคลลัส 4 ขั้นตอน ซึ่งในขั้นตอนดังกล่าวมีการส่งเสริมการยืดยาวของยอดด้วย แต่ในรายละเอียดการส่งเสริมการยืดยาวของยอดแตกต่างกัน ในกรณีของมังคุดใช้อาหารเหลวสูตรพื้นฐานที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ ยกเว้นน้ำตาลซูโครส และเติม NAA 0.06 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.03 มก./ล.

เอกสารอ้างอิง

ชะอ้อน หิรัญรัตน์. 2531. การขยายพันธุ์หน้าวัวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปาริชาติ นุกูลการ. 2535. การขยายพันธุ์หน้าวัวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ชัยพฤกษ์วิทยาศาสตร์. 39:18-19.

สรรลาภ สงวนภักดี. 2526. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมเพียร เกษมทรัพย์. 2525. การปลูกไม้ดอก. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 460 หน้า.

อดิศร กระแสชัย. 2539. แอสเตอร์ หน้าวัว ลิลลี่ จิบซอฟฟิล่า. เชียงใหม่ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 85 หน้า.

Kuehnle, A.R. and Sugii, N. 1991. Callus induction and plantlet regeneration in tissue culture of Hawaiian Anthurium. HortScience 26:919-921.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plantalum 15:473-497.

Pierik, R.L.M. 1976. Anthurium andraeanum plantlet produced from callus tissue cultivated *in vitro*. Physiol. Plant 37:80-82.

Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. and van Dermeys, J.A.J. 1974. Plantlet formation in callus tissue of *Anthurium andraeanum* Linn. Scientia Hort. 2:193-198.

Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. Scientia Hort. 86:291-298.