นิพนธ์ต้นฉบับ

การขยายพันธุ์ผักเหลียงโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สมปอง เตชะโต[1] และ ภาณุพงศ์ หนูชุม[2]

Abstract

Te-chato, S. and Nuchum, P.

Propagation of gnetum by tissue culture technique

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(3) : 365-369

Plantlet regeneration from tissue culture of gnetum could be induced using two pathways depending upon explant types. Leaf lamina yielded somatic embryos through somatic embryogenesis in basal MS supplemented with the same concentration of BA and TDZ at 0.5 mg/l. Using cluster of flowers or ovules in the same medium formula, however, callus formation took place and developed into meristemoid structures. These calli are called meristematic nodular calli and the pathway was organogenesis. Both pathways of plantlet regeneration could be applied for mass propagation of gnetum on a commercial scale in the future.

Key words : propagation of gnetum, tissue culture technique, gnetum

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] M.S. นักศึกษาปริญญาโท สาขาพืชศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

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

รับต้นฉบับ 3 มกราคม 2545 รับลงพิมพ์ 22 มีนาคม 2545

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต และ ภาณุพงศ์ หนูชุม

การขยายพันธุ์ผักเหลียงโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(3) : 365-369

การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของผักเหลียงสามารถเกิดได้2ทางขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนแผ่นใบให้พัฒนาการของต้นอ่อน (somatic embryogenesis) ในอาหารสูตรพื้นฐาน MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ในขณะกลุ่มของดอกและไข่อ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันให้พัฒนาการแคลลัสที่มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (meristematic nodular callus) หรือ organogenesis ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการใดสามารถนำมาประยุกต์ใช้ขยายพันธุ์ผักเหลียงจำนวนมากเชิงการค้าต่อไปได้

ผักเหลียง ผักเมี่ยง หรือ ผักเขรียง *(Gnetum gnemon* var. *tenerum*, Gnetaceae) เป็นพืชที่มีกำเนิดในคาบสมุทรมาลายู พบในประเทศไทย มาเลเซีย และเกาะบอร์เนียว สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ ป่าร้อนชื้น พื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 50-200 เมตร สำหรับในประเทศไทยมีผักเหลียงกระจายอยู่มากในแถบจังหวัดระนอง พังงา ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ชื่อเรียกในแต่ละท้องที่แตกต่างกันออกไป (สุธาชีพ, 2527) โดยทั่วไปผักเหลียงเป็นไม้พุ่ม มีนิสัยการเจริญเติบโตในที่ร่มเงาโดยเฉพาะร่มเงาพืชเศรษฐกิจหลักของภาคใต้ เช่น สวนยางพาราหรือสวนมะพร้าว เป็นต้น ความสูงอาจถึง 3 เมตร มีการแตกไหลออกไปทางด้านข้างจึงทำให้มองดูแล้วมีลักษณะเป็นพุ่ม ปัจจุบันนิยมใช้ใบอ่อนมาประกอบเป็นอาหารหลายชนิด เช่น ต้มกะทิ แกงเลียง ผัดไข่ ห่อหมก ลวกจิ้มน้ำพริก เป็นต้น มีราคาขายปลีกกิโลกรัมละ 80-90 บาท ทำรายได้ไม่น้อยกว่า 20,000 บาท/ไร่/ปี (คำนวณ, 2543) นอกจากนี้คุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าผักทั่วไปในท้องตลาด (กูล, 2539) เมื่อต้นโตประมาณ 1 เมตร (หลังจากปลูกเป็นเวลา 1 ปี) มีการสร้างดอกประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม ช่อดอกที่สร้างเป็นแบบช่อเชิงลด (spike) ความยาว 2-5 ซม เมล็ดมีลักษณะเปลือยไม่มีผลห่อหุ้ม รูปไข่ ความยาว 1-1.5 ซม หลังจากร่วงลงดินมีการพักตัว งอกได้ยากและช้า ดังนั้นการขยายพันธุ์ผักเหลียงจึงนิยมวิธีการไม่อาศัยเพศโดยการใช้ไหลราก การตอนกิ่ง และการปักชำ ซึ่งวิธีการไม่อาศัยเพศที่กล่าวมาทั้งหมดยังคงประสบปัญหาที่สำคัญคือระยะเวลาที่ใช้ค่อนข้างนาน 2 เดือนขึ้นไป อัตราความสำเร็จต่ำ มีเปอร์เซ็นต์ต้นตายสูง ดังนั้นการกระจายหรือแพร่พันธุ์ผักเหลียงจึงค่อนข้างจำกัด (สุทธาชีพ, 2527)

จากเหตุผลดังกล่าว การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อน ช่อดอกอ่อน ปลายยอด แล้วชักนำการสร้างยอดแขนงจำนวนมาก หรือชักนำแคลลัสที่มีโครงสร้างต้นอ่อนภายใน (embryogenic callus) จากนั้นใช้แคลลัสดังกล่าวเป็นเครื่องมือในการขยายพันธุ์ผักเหลียง ก็นับเป็นการช่วยขยายพันธุ์พืชดังกล่าวได้อีกทางหนึ่ง จนถึงปัจจุบันคงมีเพียงรายงานเพียงฉบับเดียวที่ชักนำ embryogenic callus ของ Gnetumula (*Gnetum edule*) จากการเพาะเลี้ยง megagametophyte ที่มีคัพภะที่แก่รวมอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามไม่สามารถส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ (Augustine and D'Souza, 1997) บทความนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์ผักเหลียงโดยการเพาะเลี้ยงใบอ่อน และช่อดอกในสภาพปลอดเชื้อ และช่องทางการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่แตกต่างกันทั้ง 2 ชนิด

วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการ

ต้นผักเหลียง

ในการศึกษานี้ใช้ต้นผักเหลียงอายุ 1 ปี ที่ปลูกดูแลในสภาพสวนครัวหลังบ้าน มีการให้น้ำวันละครั้ง และให้ปุ๋ยคอกเดือนละครั้ง และแสงตามธรรมชาติ นอกจากนี้มี

การตัดแต่งใบอ่อนมาใช้ประกอบอาหารตามปกติ เก็บรวบรวมใบอ่อนในระยะที่เรียกว่าเพสลาด (อายุ 5-7 วันหลังจากแตกยอดใหม่) และช่อดอกอ่อนอายุ 7 วันหลังจากแทงช่อดอกให้เห็น มายังห้องปฏิบัติการเพื่อฟอกฆ่าเชื้อเตรียมเพาะเลี้ยงต่อไป

การฟอกฆ่าเชื้อ

นำใบและช่อดอกอ่อนที่เก็บรวบรวมมาล้างสิ่งสกปรกที่ติดมาที่ผิวด้านนอกด้วยน้ำยาล้างจานที่มีฤทธิ์เป็นกลาง (ซันไลท์) จากนั้นล้างด้วยน้ำไหล 10 นาที จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอร๊อกซ์เข้มข้น 20% เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำไปวางในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ในตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมตัดแยกเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงต่อไป

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงและวิธีการเตรียม

เนื่องจากผักเหลียงเป็นไม้ยืนต้นเนื้อแข็ง เมื่อเพาะเลี้ยงอาจมีการสร้างยาง หรือสารที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลได้ ดังนั้นในการศึกษาขั้นต้นจึงเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ช่วยชะลอการสร้างสารดังกล่าว ดังเช่นที่ประสบความสำเร็จในมังคุด (Te-chato *et al*., 1995) สูตรอาหารที่ใช้คือสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) เติมน้ำตาลซูโครส 3% benzyladenine (BA) เข้มข้น 0.5 มก/ล ร่วมกับ thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0.5 มก/ล หลังจากเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองแล้วปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 เติมวุ้น 0.6% หลอมวุ้นให้เข้ากันดีด้วยไมโครเวฟ แบ่งถ่ายใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 50 × 80 มม ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กก/ตร.ซม อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งจึงนำไปใช้เลี้ยงต่อไป

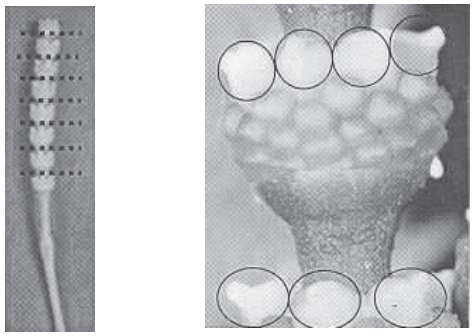
การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน

ใบอ่อน

หลังจากฆ่าเชื้อที่ผิวและล้างน้ำกลั่นแล้ว ตัดแต่งส่วนที่เสียหายซึ่งมีสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากสารฟอกฆ่าเชื้อทำลายออก ตัดแผ่นใบให้มีเส้นกลางใบติดมาด้วยขนาดกว้าง × ยาว 5 × 5 มม เพาะเลี้ยงบนอาหารโดยให้ทางด้านท้องใบสัมผัสผิวอาหาร ในขวดซึ่งบรรจุอาหาร 10 มล ขวดละ 5 ชิ้น

ช่อดอกอ่อน

เก็บช่อดอกอ่อนตัวเมียมาทำการเพาะเลี้ยงใน 2 วิธี คือ 1) ตัดแยกกลุ่มของดอกในแต่ละชั้นออกมาเพาะเลี้ยงในแต่ละชั้นประกอบไปด้วยกลุ่มของดอกย่อยประมาณ 8-10 ดอกย่อย หรือไข่อ่อนในแต่ละชั้น รวม 4 ชั้น (Figure 1A) 2) ตัดแยกดอกย่อยแต่ละดอกออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรข้างต้น (Figure 2B)



A B

Figure 1. Floral explant used as plant material for aseptic culture.
A: Culture as cluster of ovules
B: Culture as individual ovule (circle, 16X)

สภาพการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนทั้งสองในสภาพการให้แสง ความเข้ม 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ที่อุณภูมิ 26-28 °C ตลอดการศึกษา ในกรณีที่มีการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่แล้วก็ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพเดิมจนกว่าจะมีการสร้างแคลลัส

ผลและวิจารณ์

เมื่อเพาะเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 1 เดือนไม่พบการสร้างแคลลัสจากใบอ่อน คงมีเพียงการบวมพองของชิ้นส่วนใบและมีการบิดเบี้ยว เนื่องจากอัตราการดูดน้ำและธาตุอาหารของเซลล์บริเวณท้องใบและหลังใบมีไม่เท่ากัน

ในเดือนที่ 2 (ย้ายเลี้ยงครั้งแรก) ใบอ่อนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และเหลืองน้ำตาลในเวลาต่อมา และพบการสร้างต้นอ่อน (somatic embryo) บริเวณขอบรอยตัดของแผ่นใบ สีเหลืองใสในการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 (สิ้นเดือนที่ 3 ของการเลี้ยง) อัตราการสร้างอวัยวะจากชิ้นส่วน 20% จำนวนต้นอ่อนโดยเฉลี่ย 5 ต้นต่อชิ้นส่วนที่สร้าง ต้นอ่อนที่ได้ มีลักษณะปลายด้านหนึ่งเป็นปลายยอด ส่วนอีกด้านเป็นปลายราก (Figure 2A) เมื่อย้ายต้นอ่อนแต่ละต้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า มีการสร้างปลายยอดสีเขียวเข้ม (Figure 2B) ภายใน 6 สัปดาห์หลังการย้ายเลี้ยง ต้นอ่อนดังกล่าวมีการพัฒนาไปเป็นปลายยอด มองเห็นแกนต้นอ่อนได้

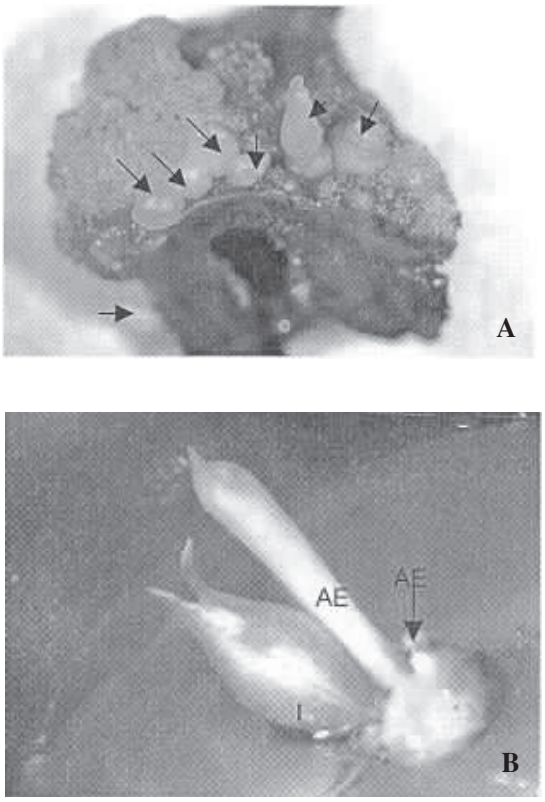


Figure 2. Direct somatic embryos (arrows) developed from cut surface of leaf fragment (A) on MS medium with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ and germination of individual (I) and adventive embryos (AE) in hormone-free MS medium (B)

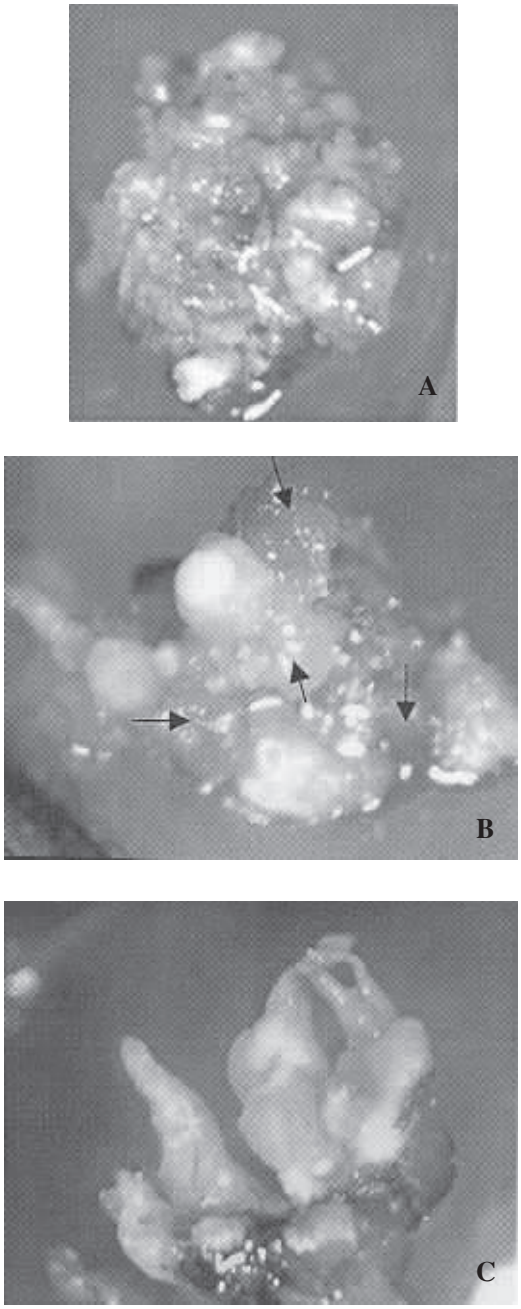


Figure 3. Development of floral segment in culture medium.

A: Nodular callus obtained after 3 weeks of culture

B: Green nodule (arrows) obtained after twice subculturing (at 3-4 week intervals)

C: Multiple shoot formation from green nodule

อย่างชัดเจน แต่ไม่ปรากฏพัฒนาการของรากทั้งนี้เพราะอาจขาดออกซินที่จำเป็นต่อการสร้างรากซึ่งไม่ได้เติมลงไป นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ฐานของต้นอ่อนแต่ละต้นที่ตัดแยกไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการพัฒนาต้นอ่อนใหม่ขึ้นมาที่เรียกว่า adventive embryos จำนวน 3-5 ต้น ต้นใดที่พัฒนาก่อนมีการเจริญเติบโตเร็วมากจนอาจสูงกว่าต้นอ่อนเดิม ส่วนต้นอ่อนที่ยังไม่พัฒนาคงพักตัวเล็กอยู่เช่นเดิมในกรณีเช่นนี้อาจทำการขยายพันธุ์โดยการย้ายเลี้ยงต้นอ่อนเดี่ยวๆ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะ 6-8 สัปดาห์ก็ได้ จากผลการศึกษาดังกล่าวคล้ายกับการเพาะเลี้ยงมังคุด (Te-chato *et al*., 1995) ในขณะที่ส้มแขก (ราตรี และ สมปอง, 2539) *Pelargonium peltatum* (Robichon *et al*., 1997) และ *Pyrus pyrifolia* (Lane *et al*., 1998) ไม่สามารถชักนำได้

เมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของดอกอ่อน พบว่า ทั้งการเลี้ยงในลักษณะกลุ่มของชั้นดอก และดอกเดี่ยวให้พัฒนาการที่เหมือนกันคือส่งเสริมการสร้างแคลลัสที่มีลักษณะเป็นปม (meristematic nodular callus) (Figure 3A) แต่ละปมเป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดพัฒนาเป็นปมสีเขียวให้เห็นในระยะเวลาต่อมา (Figure 3B) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงกลุ่มชั้นดอกส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเลี้ยงดอกเดี่ยว อาจเนื่องมาจากการดูดซึมธาตุอาหารของกลุ่มดอกมีพื้นที่มากกว่า และในแต่ละดอกส่งเสริมการเกิดแคลลัสร่วมกัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์หรือ 1 เดือนก็เห็นแคลลัสที่มีลักษณะดังกล่าว ดังนั้น ระยะเวลาการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนดอกสั้นกว่าใบ เมื่อย้ายเลี้ยงต่อมาอีก 2 ครั้ง (เดือนละครั้ง) พบว่า มีการสร้างปมสีเขียว หรือ เหลืองเข้ม และงอกเป็นยอดรวม (Figure 3C) ในเวลา 1 เดือนต่อมาคล้ายกับการเพาะเลี้ยงดอก *Gnetum edule* (Augustine and D'Souza, 1997)

เมื่อพิจารณาพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่แตกต่างกันของผักเหลียงในการศึกษาขั้นต้นพบว่า มีความแตกต่างกันในชิ้นส่วนที่เลี้ยง ชิ้นส่วนใบอ่อนให้พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการโซมาติคเอ็มบริโอเจนีซีสโดยตรง และสามารถที่จะใช้ต้นอ่อนที่พัฒนาขึ้นมาเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นเพิ่มปริมาณต้นอ่อนใหม่ต่อไปได้ ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในขณะที่ชิ้นส่วนดอกให้พัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่โดยผ่านการสร้างแคลลัสที่เรียกว่า meristematic nodular callus จากนั้นเป็นการสร้างยอดรวมให้เห็น ในกรณีนี้สามารถที่จะเพิ่มปริมาณแคลลัสจำนวนมาก แล้วชักนำการสร้างยอดรากเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวนำเสนอรายงานการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

บทความนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการทำวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

เอกสารอ้างอิง

กูล จุลแก้ว. 2539. ผักเหมียงราชินีแห่งผักพื้นบ้านภาคใต้. กรุงเทพฯ: พิมพ์ดี 81 หน้า.

คำนวณ แก้วช่วง. 2543. พรรณไม้พื้นเมืองปักษ์ใต้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน. หน้า 62-77.

ราตรี สุจารีย์ และ สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มแขก. แก่นเกษตร 24:14-22.

สุธาชีพ ศุภเกษร. 2527. ต้นผักเหลียงผักพื้นเมืองที่น่าสนใจ. กสิกร 57:5-11.

Augustine, A.C. and D'Souza, L. 1997. Somatic embryogenesis in *Genetum ula* Brongn. (*Gnetum edule*)(wild) Blume. Plant Cell Reports 16: 354-257.

Lane, W.D., Iketani, H. and Hayashi, T. 1998. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54:9-14.

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

Robichon, M.P., Renou, J.P. and Jalouzot, R. 1997. Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49:209-212.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 17: 115-120.