นิพนธ์ต้นฉบับ

การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ราตรี นิตยเดชพัฒน์ [1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Nitayadatpat, R.[1] and Te-chato, S.[2]

Enhanced efficiency for propagation of anthurium by tissue culture technique

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(5) : 1003-1008

Enhanced efficiency for clonal propagation of anthurium could be carried out by increasing the concentration of adenine sulfate and overlaying liquid medium on solid medium. The results revealed that increasing concentration of adenine sulfate form 0.1 to 1 mg/l yielded an average number of shoot of 21 per explant. Addition of half strength liquid MS medium without phytohormone to the old cultures (agar solidified medium) gave optimum results in growth, healthy stem and leaves. In case of gelling agent, gelrite yielded a high number of shoots without callus formation. Proliferation rate of the shoots in gelrite solidified medium in the following subculture was not found. Thus, agar-agar was suitable for propagation in terms of low cost production and proliferation rate.

Key words : anthurium, adenine sulfate, callus, gelrite

[1]Center for Scientific and Technological Equipments, Walailak University, Tha Sala, Nakhon Si Thammarat, 80160 Thailand. [2]Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

[1]วท.ม.(พืชศาสตร์), นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160 [2]Ph.D.(Plant cell Technology), รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: sratree@wu.ac.th

รับต้นฉบับ 27 พฤศจิกายน 2547 รับลงพิมพ์ 25 เมษายน 2548

บทคัดย่อ

ราตรี นิตยเดชพัฒน์ และ สมปอง เตชะโต

การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(5) : 1003-1008

การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์หน้าวัวกระถางดอกสีแดงสามารถทำได้โดยใช้วิธีการเพิ่มความเข้มข้นของ Adenine sulphate และการใช้เทคนิคการเติมอาหารเหลวบนอาหารแข็ง (Overlay) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Adenine sulphate จาก 0.1 มก./ลิตร เป็น 1 มก./ลิตร มีผลให้ยอดรวมของหน้าวัวเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 21 ยอด/ชิ้นส่วน การเติมอาหารเหลวสูตร ½ MS (Half Strength Murashige and Skoog) ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงบนอาหารแข็ง มีผลให้ยอดเจริญเติบโตได้ดีทั้งในด้านความสูง ความสมบูรณ์ของลำต้นและแผ่นใบ ส่วนชนิดของผงวุ้น พบว่า เจลไรท์มีผลให้ยอดรวมเจริญเติบโตดี แต่ไม่มีเนื้อเยื่อแคลลัสที่ฐานทำให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดรวมในการย้ายเลี้ยงครั้งต่อไปลดลงหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณตายอดได้อีก ดังนั้นการใช้ผงวุ้นธรรมดา จึงมีความเหมาะสมกว่า ทั้งในเรื่องต้นทุนและอัตราการขยายพันธุ์เมื่อต้องการย้ายเลี้ยงเป็นเวลานาน

หน้าวัว (*Anthurium* sp.) เป็นไม้ดอกที่ได้รับความสนใจมากชนิดหนึ่งในวงการไม้ดอกในประเทศไทยและในตลาดโลก เมื่อมองถึงศักยภาพในการผลิตหน้าวัวตัดดอกในเชิงการค้าแล้ว ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีสภาพภูมิอากาศเหมาะสม โดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศ และสามารถพัฒนาศักยภาพในการผลิตเพื่อป้อนตลาดโลกได้ในอนาคต ถึงแม้ว่าปัจจุบัน การผลิตยังไม่เพียงพอสำหรับการใช้งานภายในประเทศก็ตาม ประเทศผู้บุกเบิกตลาดหน้าวัวคือสหรัฐอเมริกา โดยมีแหล่งผลิตใหญ่อยู่ที่หมู่เกาะฮาวาย แต่ในปัจจุบัน หน้าวัวในหมู่เกาะฮาวายกำลังประสบปัญหาเรื่องโรคระบาด ทำให้ศักยภาพในการผลิตมีน้อยลง นอกจากนี้ยังมีประเทศผู้ผลิตอื่นๆ เช่น เนเธอร์แลนด์ ไต้หวัน และฟิลิปปินส์ เป็นต้น แต่ผลผลิตที่ได้ก็ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดโลก สำหรับพื้นที่ปลูกในประเทศไทยปัจจุบันมีเพียง 60-70 ไร่ ในขณะที่ตลาดภายในประเทศสามารถรองรับผลผลิตได้ถึง 100 ไร่ (เคหเกษตร, 2543) สายพันธุ์หน้าวัวที่มีวางขายในท้องตลาดส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่สั่งซื้อจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ต้นพันธุ์ขนาดประมาณ 1-2 นิ้ว ราคาประมาณ 50-80 บาท ซึ่งเป็นต้นทุนที่สูงสำหรับการลงทุนของเกษตรกร

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ขยายพันธุ์พืชได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่น้อยกว่า 20 แห่ง ทั้งของราชการและเอกชน กระจายอยู่ในพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์หน้าวัวและลดการนำเข้าพันธุ์หน้าวัวจากต่างประเทศ

ในการศึกษานี้เป็นการรายงานการเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์หน้าวัวโดยการดัดแปลงสูตรอาหารด้วยการเติม Adenine sulfate ความเข้มข้นที่เหมาะสม การดัดแปลงอาหารที่ใช้เลี้ยงตลอดจนชนิดของวุ้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การทดลองนี้ใช้หน้าวัวสายพันธุ์กระถาง ดอกสีแดง เริ่มต้นเตรียมชิ้นส่วนโดยตัดใบอ่อนของหน้าวัวที่เริ่มคลี่หรืออายุประมาณ 1 สัปดาห์ นำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด หลังจากนั้นจึงจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 15% เขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 25 นาที ล้างชิ้นส่วนที่ฟอกเรียบร้อยแล้วด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อในตู้ย้ายเลี้ยง หลังจากนั้นตัดชิ้นส่วนใบเป็นชิ้นขนาด 1 x 1 ซม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำการสร้างแคลลัส (อาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS) (Murashige and

Skoog, 1962) เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 0.1 มก./ลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัม/ลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 45 วัน หลังจากนั้นจึงย้ายเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำยอด (อาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ลิตร และ adenine sulphate ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร น้ำตาล 30 กรัม/ลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัม/ลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เวลาให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27ºC (ดัดแปลงจาก สมัชชา, 2544)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาความเข้มข้นของ Adenine sulphate ต่อการพัฒนาของยอดรวม

เพาะเลี้ยงกลุ่มตายอดของหน้าวัวขนาดประมาณ 1 มม. ในอาหารแข็งสูตรชักนำยอด โดยใช้ความเข้มข้นของ adenine sulphate 3 ระดับ คือ 0.1, 0.5 และ 1 มก./ลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ตรวจผลการสร้างแคลลัส และยอดรวม ในแต่ละความเข้มข้นของ adenine sulphate เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละความเข้มข้นของ adenine sulphate ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยให้ 1 ขวดที่เพาะเลี้ยง จำนวน 4 กลุ่มตายอดต่อขวด คิดเป็น 1 ซ้ำ

2. การศึกษาผลจากชนิดของผงวุ้นต่อการเจริญเติบโตของยอดรวม

เพาะเลี้ยงกลุ่มยอดรวมของหน้าวัวที่มีความสูงประมาณ 1 ซม. ในอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ลิตร adenine sulphate ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ทดสอบผงวุ้น 2 ชนิด คือ agar-agar ความเข้มข้น 7 กรัม/ลิตร และเจลไรท์ ความเข้มข้น 1.8 กรัม/ลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของยอดใหม่และการสร้างแคลลัส เปรียบเทียบกันระหว่างชนิดของผงวุ้นโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละความเข้มข้นของผงวุ้นทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยให้ 1 ขวดที่เพาะเลี้ยง จำนวน 4 กลุ่มยอดรวมต่อขวด คิดเป็น 1 ซ้ำ

3. การศึกษาผลของการเติมอาหารเหลวลงบนอาหารแข็ง

หลังจากวางเลี้ยงกลุ่มตายอดของหน้าวัวในอาหารสูตรชักนำยอดเป็นเวลา 2 เดือน ทดลองเติมอาหารเหลวลงบนอาหารแข็ง (overlay) อาหารเหลวที่ใช้เติมเป็นสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลง $\frac{1}{2}$ และ $\frac{1}{4}$ เท่า ไม่เติมและเติม BA ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร รายละเอียดของสิ่งทดลองมีดังต่อไปนี้คือ

$\frac{1}{2}$ MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
$\frac{1}{2}$ MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
$\frac{1}{4}$ MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มก./ลิตร
$\frac{1}{4}$ MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มก./ลิตร

อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล ซูโครส ความเข้มข้น 30 มก./ลิตร เติมอาหารเหลวลงบนอาหารแข็งขวดละ 15 มล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลการสร้างยอดใหม่ ความสมบูรณ์ของต้น ความสูงของต้นและความสมบูรณ์ของใบเปรียบเทียบกันระหว่างสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรที่ใช้เติมลงบนอาหารแข็ง

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความเข้มข้นของ adenine sulphate ต่อการพัฒนาของยอดรวม

หลังจากเพาะเลี้ยงกลุ่มตายอดขนาดประมาณ 1 มม. ในอาหารเติม adenine sulphate ความเข้มข้น 3 ระดับ พบว่ากลุ่มตายอดที่วางเลี้ยงในอาหารเติม adenine sulphate เข้มข้น 1 มก./ลิตร มีการพัฒนาของยอดรวมมากที่สุด เพิ่มขึ้น 26 ยอด/ชิ้นส่วน เฉลี่ย 21 ยอด/ชิ้นส่วนภายใน 2 เดือน ในขณะที่อาหารเติม adenine sulphate ความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 มก./ลิตร มีการพัฒนาของยอดรวมเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5 และ 3 ยอด/ชิ้นส่วนตามลำดับ (Table 1) ลักษณะของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม adenine sulphate ทั้ง 3 ระดับ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในอาหารที่เติม adenine sulphate ความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 มก./ลิตร บริเวณฐานของกลุ่มยอดรวมมีเนื้อเยื่อแคลลัสพัฒนาขึ้นในขณะที่ adenine sulphate ความเข้มข้น 1 มก./ลิตร ไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสบริเวณฐาน

Table 1. Effect of adenine sulphate at various concentrations on multiple shoot formation of anthurium.

Conc. (mg/l) of adenine sulphate	Increasing no. of shoots(avg)		Remarks
	1 month	2 month	
0.1	3	3b	Callus occur at stem base
0.5	3	5b	Callus occur at stem base
1.0	5	21a	Greenish stem base without callus
F-test	ns	**	
C.V. (%)	8.35..	10.13..	

ns = not significant difference
**** Significant difference at p<0.01**
Mean having the same letter within column showed no significant difference by DMRT

Table 2. Effect of gelling agent on growth of multiple shoot of anthurium.

Time of culture (month)	Agar - Agar		Gelrite	
	Avg. no. of shoot (shoot)	Appearance of shoot	Avg. no. of shoot (shoot)	Appearance of shoot
1	3	Green color with callus	3b	Green color without callus
2	7	Green color with callus	20a	Green color without callus
F-test	ns		**	
C.V.(%)	6.52		3.76	

ns = not significant difference
**** Significant difference at p<0.01**
Mean having the same letter within column showed no significant difference by T-test

2. การศึกษาผลจากชนิดผงวุ้นต่อการเจริญเติบโตของยอดรวม

หลังจากเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดหน้าวัวเป็นเวลา 2 เดือน ในอาหารสูตรชักนำยอด ที่เติมผงวุ้น 2 ชนิด พบว่าหน้าวัวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอดเติมผงวุ้นเจลไรท์ มีการแตกยอดใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 20 ยอด/ชิ้นส่วน ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอดเติมผงวุ้นชนิด agar-agar มีการแตกยอดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 7 ยอด/ชิ้นส่วน (Table 2)

3. การศึกษาผลของการเติมอาหารเหลวบนอาหารแข็ง

การเติมอาหารเหลวลงบนอาหารแข็งหลังจากเพาะเลี้ยงหน้าวัวเป็นเวลา 2 เดือน โดยใช้อาหาร 4 สูตร พบว่าหน้าวัวที่เติมอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยเฉพาะในเรื่องความสมบูรณ์ของต้น ความสูงและความสมบูรณ์ของใบ (Table 3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัว สามารถเติมอาหารเหลวได้ รายละเอียดขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวเพื่อการค้าแสดงใน Figure 1

วิจารณ์

ต้นทุนที่สูงที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ ค่าแรงงานในการย้ายเลี้ยง การทดลองครั้งนี้เป็นข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น สำหรับการพัฒนางานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวในเชิงการค้า การใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของ adenine sulphate และการเติมอาหารเหลวลงบนอาหารแข็ง ทำให้อัตราการขยายพันธุ์

Table 3. Effect of concentration of liquid medium overlay onto solid medium after culture for 2 months on multiplication of the shoot of anthurium.

Development	Conc. of liquid medium			
	½ MS +1BA	¼ MS +1BA	½ MS Free	¼ MS Free
New shoot formation	+++	++	+	+
Healthy shoot	+	+	+++	+
Stem height	++	++	++++	++
Healthy leaf	++	+	+++	+

+, ++, +++ and ++++ : are poor, moderate, good and excellent response, respectively.

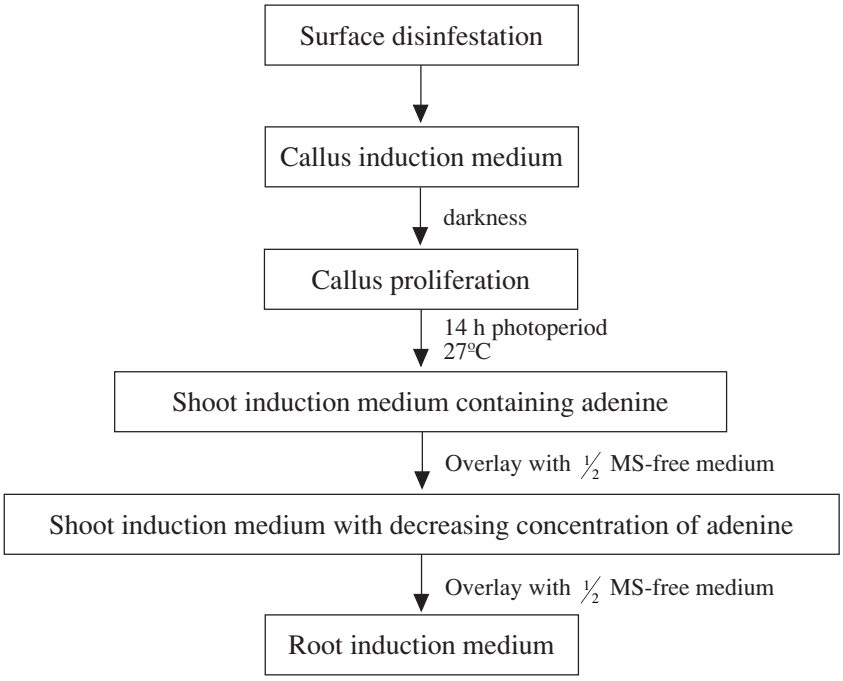

Figure 1. Protocol for commercial propagation of anthurium through tissue culture technique.

และการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากเป็นการเพิ่มอาหารและอากาศให้ต้นไม้ในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับการเติมอาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด (Te-chato, 1998) การเติมอาหารเหลวลงบนอาหารแข็งทำให้การใช้แรงงานเพื่อการย้ายเลี้ยงน้อยลง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงโดยปกติจะต้องย้ายเลี้ยงหรือเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1-2 เดือน การเติมอาหารเหลวลงบนอาหารแข็งจะช่วยลดค่าแรงในการย้ายเลี้ยงประมาณ 50% นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณ adenine sulphate ลงในอาหารทำให้อัตราการพัฒนาของยอดรวมเพิ่มขึ้น ในการเพาะเลี้ยงแต่ละครั้งจึงได้จำนวนต้นเพิ่มขึ้น ช่วยลดระยะเวลาในการทำงาน อย่างไรก็ตาม เมื่อได้จำนวนต้นที่ต้องการแล้ว ต้องลดความเข้มข้นของ adenine sulphate ลง เพื่อลดอัตราการขยายของยอดรวมและสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของลำต้นทั้งในด้านขนาดและความสมบูรณ์ได้ เพื่อให้เหมาะสมกับการออกปลูก ในการเพาะเลี้ยงระยะนี้อาจจะใช้วิธีการเติมอาหารเหลวเพื่อลดต้นทุนด้านแรงงาน เมื่อเปรียบเทียบการใช้ผงวุ้นชนิด agar-agar กับเจลไรท์ พบ

ว่าไม่มีความแตกต่างกันมากนักเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน ในทางการค้าจึงควรใช้ผงวุ้นชนิด agar-agar เนื่องจากต้นทุนถูกและหาซื้อได้ง่าย

จากข้อมูลการทดลองครั้งนี้ ทำการทดลองกับหน้าวัวเพียงสายพันธุ์เดียว ซึ่งในทางปฏิบัติแล้วหน้าวัวที่มีสายพันธุ์หรือพันธุกรรมต่างกันจะมีการตอบสนองกับชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน (Pierik *et al*., 1974; สมปอง และคณะ, 2545) เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นๆ ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสายพันธุ์ต่างประเทศบางสายพันธุ์นิยมการเพาะเลี้ยงตาข้าง (Kunisaki, 1980) แต่มีข้อจำกัดคือ หน้าวัวบางสายพันธุ์ไม่แตกตาข้าง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจึงเป็นวิธีการที่ค่อนข้างเหมาะสม (Mutsumoto and Kuehnle, 1997) อย่างไรก็ตาม หน้าวัวแต่ละสายพันธุ์จะตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน การนำไปใช้ประโยชน์จึงควรทดลองกับหน้าวัวแต่ละสายพันธุ์ด้วย

เอกสารอ้างอิง

สมปอง เตชะโต สมัชชา นาคสมบัติ และจารุวรรณ บุญศิริ. 2545. ผลของพันธุ์และชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัสและการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีไมโครพรอพาเกชัน. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 24: 569-578.

สมัชชา นาคสมบัติ. 2544. การถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพขยายพันธุ์ไม้ดอกการค้าของภาคใต้ โดยการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ ครั้งที่ 1 ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 34 หน้า

โอฬาร พิทักษ์. 2543. หน้าวัว ไม้ดอกอนาคตไกลที่ไทยน่าจะพัฒนาสู่ตลาดโลก. ว. เคหการเกษตร 24: 57-76.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Kunisaki, J.T. 1980. *In vitro* propagation of *Anthurium andraenum* Linn. HortScience. 15: 508-509.

Mutsumoto, T.K. and Kuehnle, A.R. 1997. Micropropagation of anthurium. **In** Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 40, pp 14-28 Heidelberg: Springer Verlag.

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

Te-chato, S. 1998. Recent potential in the biotechnology of mangosteen I: Micropropagation. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20: 275-284.