

อิทธิพลของ 6-benzylamino purine และ 6-furfurylamino purine ต่อการเจริญของต้นและการออกรากบนชิ้น

Stem-bud segments ของมันฝรั่งเมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ¹

Growth and root formation of potato stem-bud segments cultured in vitro as influenced by 6-benzylamino purine and 6-furfurylamino purine.

ศาสตราจารย์² พรณศิริ² งามพิศ ธนาภิรมย์³

อุทัย จารณศรี⁴ ไพบุญย์ กวินเลิศวัฒนา⁵

ABSTRACT

Stem-bud segments of potato (*Solanum tuberosum* L.) 'Spunta' were cultured on modified Murashige and Skoog (MS) (7) agar medium. The medium which consisted of MS macro and micro-elements, organic addenda and 0.05 ppm α -naphthaleneacetic acid (NAA) was supplemented with 6-benzylamino purine (BA) at 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 or 0.5 ppm (Experiment 1) or 6-furfurylamino purine (kinetin) 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 or 2.5 ppm (Experiment 2). BA 0.1 ppm (Experiment 1) promoted the longest shoot and root and the highest number of leaves and roots, but tended to reduce number of branch. BA 0.5 ppm caused lesser number of branch and root to form than BA 0.1 ppm, while BA 0.4 ppm caused the least root formation. BA 0.3 ppm however promoted the most number of shoot branching. Kinetin 0.5 ppm (Experiment 2) promoted the longest shoot and the highest number of leaves and survival explants, but caused the least branching. Meanwhile, kinetin 2 ppm promoted the most number of branching.

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) พันธุ์ Spunta ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ส่วนยอด หรือตัดข้อใหม่ตาอย่างน้อย 1 ตา ติดอยู่ (stem-bud) เลี้ยงในอาหารแข็งประกอบด้วย Murashige & Skoog (MS) major, minor elements และ organic addenda ซึ่งมี α -Naphthaleneacetic acid (NAA) 0.05 ppm. และ 6-benzylamino purine (BA) 5 ความเข้มข้นคือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 หรือ 0.5 ppm. (การทดลองที่ 1) พบว่าความยาวเฉลี่ยของต้น จำนวนใบ ความยาวเฉลี่ย

ของราก และจำนวนรากมีความแตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้น โดยที่ BA ความเข้มข้น 0.1 ppm. ทำให้พืชมความยาวเฉลี่ยของต้น จำนวนใบ ความยาวเฉลี่ยของราก และจำนวนรากดีที่สุด ต้นมีการแตกกิ่งข้างน้อยที่สุด ส่วนความเข้มข้น 0.5 ppm. ทำให้พืชมการแตกกิ่งน้อยรองลงมาจาก BA ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm. และมีความยาวเฉลี่ยของต้น จำนวนใบ และจำนวนรากน้อยที่สุด ส่วน BA ความเข้มข้น 0.4 ppm. ทำให้ความยาวรากเฉลี่ยน้อยที่สุด

¹ ได้รับการเห็นชอบจากภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร. มก. ให้ลงตีพิมพ์เลขที่ พส. 23-0005

^{2, 3} นิสิตปริญญาตรี และ ^{4, 5} อาจารย์ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตามลำดับ

และ BA ความเข้มข้น 0.3 ppm. ทำให้เปอร์เซ็นต์การแตกกิ่งข้างมากที่สุด ส่วนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน แต่ใช้ kinetin 5 ความเข้มข้นแทน (การทดลองที่ 2) โดยใช้ kinetin เข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 หรือ 2.5 ppm. นั้นพบว่า kinetin เข้มข้น 0.5 ppm. จะทำให้มันฝรั่งมีความยาวเฉลี่ยของต้น จำนวนใบ และเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดตายมากที่สุด และต้นมีการแตกกิ่งข้างน้อยที่สุด ส่วน kinetin เข้มข้น 2 ppm. ทำให้ต้นมันฝรั่งมีเปอร์เซ็นต์การแตกกิ่งข้างมากที่สุด

มันฝรั่งเป็นพืชที่มีปัญหาเรื่องโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส (virus) มาก ทำให้ผลผลิตลดลง จึงได้มีการทดลองเลี้ยงมันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางผลิตมันฝรั่งที่ปราศจากเชื้อไวรัสต่อไป Kassanis, 1957, & Verma, 1971 ได้ทดลองเพาะเชื้อไวรัสลงบนต้นมันฝรั่งและตัดส่วน apical meristem มาเลี้ยง ปรากฏว่าต้นที่ได้จะปราศจากโรคไวรัส ส่วน Stace-smith และ Mellor (1970) ทดลองใช้ความร้อน treat ต้นมันฝรั่งก่อนที่จะตัด axillary bud มาเลี้ยงในอาหารในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าจะได้ต้นที่ปราศจากเชื้อไวรัสเช่นเดียวกัน นอกจากการเลี้ยงตาขอดและตาข้างได้สำรวจแล้ว ยังมีการศึกษาการเจริญของแคลลัส (callus) บนสูตรอาหารต่างๆ โดยเติมน้ำมันมะพร้าว และ 2,4-D ลงไปในสูตรอาหาร (Chapman, 1955; Zingappa, 1957; Steward and Caplin, 1951) ซึ่งพบว่า 2,4-D จำเป็นในการเจริญเติบโต ทำให้เกิด แคลลัส และแคลลัสสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นได้โดยการใช้สารพวก cytokinin การที่จะให้มันฝรั่งมีการเจริญเติบโตได้นั้น ต้องใช้ธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต (สุรนันทน์, 2521; Quak, 1976) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้คือสารในกลุ่ม auxin และ cytokinin โดยที่ auxin ส่งเสริมการยืดตัวของ เซลล์ กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ และกระตุ้นให้เกิด root initiation แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการออกราก และกระตุ้นให้

เกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียว (Quak, 1976; Weaver, 1972) ส่วน cytokinin นั้นทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว และกระตุ้นให้เกิด cell differentiation (Weaver, 1972) Okaza Katsura and Tagawa (Okazawa, et al., 1967) ศึกษาอัตราส่วน cytokinin ต่อ auxin โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อพาเรโนไคมา ของหัวมันฝรั่งพบว่า แคลลัสจะเจริญเติบโตเป็นต้นได้จะต้องมี auxin ร่วมกับ cytokinin ในปริมาณที่พอดี โดยที่ auxin มีผลทำให้เกิดแคลลัส บนเนื้อเยื่อ และ cytokinin ช่วยให้ แคลลัส นั้นพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน อัญชลี (อัญชลี, 2521) ทดลองขยายพันธุ์มันฝรั่งโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ปลายยอดอ่อน และตาข้างของ sprout มันฝรั่งเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ปรากฏว่าตาขอดและตาข้างของ sprout จะเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ และหลังจากตัดต้นอ่อนมันฝรั่งที่ได้ออกเป็นท่อนๆ ละ 1 ตา แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมใหม่ (sub-culture) ปรากฏว่าต้นอ่อนมันฝรั่งมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จำนวนราก และความยาวในอาหารสูตร MS+0.1 ppm NAA+0.1 ppm kinetin แต่ไม่ได้รายงานไว้ ถ้าใช้ NAA ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า หรือใช้ BA หรือ kinetin ความเข้มข้นสูงกว่า จะมีการเจริญเติบโตและออกรากได้หรือไม่ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาการใช้ NAA ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1 ppm เพื่อหาความสมดุลของ NAA และ BA หรือ NAA และ kinetin ที่จะกระตุ้นให้พืชมีการออกราก และมีการเจริญเติบโตได้ดี

อุปกรณ์และวิธีการ

นำต้นอ่อนมันฝรั่งพันธุ์ Spunta ที่ได้จากการเลี้ยงตาขอดและตาข้างของ sprout มันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดเป็นท่อนๆ ให้มีขนาดติดอยู่อย่างน้อย 1 ตา (stem-bud segment) หรือใช้ส่วนยอด ความยาวประมาณ 10 มม. ย้ายลงอาหารในขวดขนาด 100 ml. ซึ่งบรรจุอาหาร 20 ml. อาหารประกอบด้วย MS major และ

minor elements และ organic addenda (Murashige and Skoog, 1962) โดยมี NAA 0.05 ppm และ BA 5 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 หรือ 0.5 ppm (การทดลองที่ 1) หรือ kinetin 5 ความเข้มข้น คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 หรือ 2.5 ppm (การทดลองที่ 2) ผสมอยู่ pH ของอาหารมีค่า 5.5 ซึ่งปรับโดยใช้ 1N NaOH หรือ 1N HCl ก่อนเติมวัน 10 กรัม/ลิตร และนำไปลงในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (หรืออุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที) แล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนถ่ายเนื้อเยื่อลงเลี้ยง เนื้อเยื่อเหล่านี้เลี้ยงในห้องปรับอากาศ ซึ่งได้แสดงตอนกลางวันประมาณ 10 ชั่วโมง อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 27-30°C โดยเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

ผลการทดลอง

การตรวจผลครั้งสุดท้าย หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ 8 สัปดาห์ สังเกตพบว่า มันฝรั่งในขวดอาหารซึ่งใช้ BA ได้ดีกว่าในขวดที่ใช้ kinetin โดยที่ต้นจะสูงกว่า และมีรากเกิดขึ้นดีกว่า ส่วนจำนวนใบไม่แตกต่างกันมาก (ตารางที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบกับตารางที่ 3)

การทดลองที่ 1 ซึ่งใช้ BA นั้นพบว่า ความเข้มข้นต่ำของ BA คือ 0.1 ppm ทำให้พืชมีความยาวเฉลี่ยของต้น จำนวนใบ ความยาวเฉลี่ยของราก และจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นสูง คือยาว 4 ซม., 15 ใบ, 3.86 ซม. และ 7 รากตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2) และ

มีเปอร์เซ็นต์การแตกกิ่งข้างน้อยที่สุด คือ 31.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ต้นมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง ใบใหญ่ มีการยึดของข้อดี มีจำนวนรากมาก รากยาวและสมบูรณ์ ส่วน BA ความเข้มข้นสูง คือ 0.5 ppm ทำให้พืชมีความยาวเฉลี่ยของต้น จำนวนใบ และจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นน้อยที่สุด คือ 1.46 ซม., 9 ใบ และ 1 รากตามลำดับ (ดังตารางที่ 1 และ 2) ต้นเตี้ยผอม ใบเล็กและมีการยึดของข้อเพียงเล็กน้อย และ BA 0.4 ppm ทำให้พืชมีความยาวรากเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 1.1 ซม. (ตารางที่ 2) และ BA ความเข้มข้น 0.3 ppm ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การแตกกิ่งมากที่สุด คือ 63.6% (ตารางที่ 1) และมีเปอร์เซ็นต์ของต้นที่รอดตายทั้งหมดเฉลี่ยประมาณ 78 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 2 พบว่าความเข้มข้น 0.5 ppm ช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ต้นอวบ มีเปอร์เซ็นต์การแตกกิ่งข้างน้อยที่สุด คือ 20.83 เปอร์เซ็นต์ ความยาวของต้นเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.75 ซม. และ 15.7 ใบ (ตารางที่ 3) ส่วน kinetin ความเข้มข้น 2.0 ppm มีความยาวเฉลี่ยของต้น และจำนวนใบเฉลี่ย รองลงมาจาก 1.48 ใบ (ตารางที่ 3) และมีเปอร์เซ็นต์การแตกกิ่งข้างมากที่สุด คือ 47.8 เปอร์เซ็นต์ จำนวนใบแต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน และเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารที่มี kinetin ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 ppm มีรากเพียงเล็กน้อย คือประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ไม่มีรากเกิดขึ้น ส่วน

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลของ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อความยาวของต้น จำนวนใบ และการแตกกิ่งข้าง หลังจากเลี้ยงบนอาหารของ MS major และ minor elements นาน 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (ppm)	ความยาวเฉลี่ยของต้น (ซม.)	จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น	% การแตกกิ่งข้าง	% ต้นที่รอดตาย
0.1	4	15	31.6	76
0.2	3.85	14	44.4	78.3
0.3	2.6	11	63.6	100
0.4	2.93	13	32.1	82.6
0.5	1.46	9	36.4	52.4

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความยาวราก และจำนวนรากของม้วนฝรั่ง ซึ่งเลี้ยงบนสูตรอาหารของ MS major และ minor elements นาน 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (ppm)	จำนวนรากทั้งหมด	จำนวนรากต่อต้น (คิดเฉพาะต้นที่ออกราก)	ความยาวเฉลี่ยของราก (ซ.ม.)	% ต้นที่ออกราก
0.1	93	7	3.86	68.4
0.2	72	5	3.6	77.8
0.3	20	2	2.73	45.5
0.4	4	1.3	2.73	15.8
0.5	3	1	1.76	27.3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลของ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ stem-bud segment ของม้วนฝรั่ง หลังจากเลี้ยงบนอาหารของ MS major และ minor elements 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ kinetin (ppm)	ความยาวเฉลี่ยของต้น (ซ.ม.)	จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น	% การแตกกิ่งข้าง	% ต้นที่รอดตาย
0.5	2.74	15.74	20.83	87.50
1.0	1.61	12.50	31.82	72.73
1.5	2.22	11.11	33.33	85.71
2.0	2.46	14.80	47.83	86.96
2.5	1.76	12.89	33.33	75

โคนต้นด้านที่สัมผัสกับอาหารเกิดเป็น callus ส่วนเนื้อเยื่อที่เหลือในอาหาร มี kinetin ความเข้มข้น 2.0 และ 2.5 ppm จะไม่มีรากเกิดขึ้นเลย เปอร์เซนต์ต้นที่รอดตายทั้งหมดประมาณ 72-88 เปอร์เซนต์

วิจารณ์

Cytokinin ความเข้มข้นตามแนวโน้มที่จะช่วยให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตที่สุด และมีรากเกิดขึ้นด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ cytokinin ความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 0.5-2.5 ppm. แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งความยาวต้นและจำนวนใบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน auxin ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งต้องสมดุลกับ cytokinin ความเข้มข้นต่ำด้วยถ้า auxin ความเข้มข้นต่ำ แต่ cytokinin ความเข้มข้นสูง พืชแนวโน้มที่จะเจริญแต่ทางยอด

มากกว่าทางราก ต้นที่ได้จึงอวบใบหนาและมีการแตกกิ่งข้างมาก ส่วนโคนต้นเกิดเป็น callus ไม่มีการพัฒนาไปเป็นราก (Okazawa, et al., 1967; Quak, 1976) ฉะนั้นจากการทดลอง cytokinin (BA หรือ kinetin) ความเข้มข้น 0.1 ppm. จึงมีความสมดุลกับ auxin (NAA) ที่ 0.05 ppm. ทำให้เปอร์เซนต์การออกรากมาก ความยาวและจำนวนรากมากที่สุด นอกจากนั้น การเจริญทางยอดก็ดีขึ้น ซึ่งพืชพร้อมที่จะนำออกไปปลูกเลี้ยงในสภาพภายนอกได้ หลังจากเลี้ยงไปได้ 8 สัปดาห์แล้ว cytokinin ในแต่ละความเข้มข้นไม่ทำให้พืชมีจำนวนใบแตกต่างกันมากนัก แต่ cytokinin ความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มจะทำให้พืชมีเปอร์เซนต์การแตกกิ่งข้างมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ cytokinin ความเข้มข้นสูงช่วยให้พืชมีการเจริญทางยอดได้ดี และช่วยให้ apical dominance ถูก

ทำลายได้ (สรนันท, 2521) ส่วน cytokinin ความเข้มข้นตามการแตกกิ่งน้อย จึงทำให้ต้นสูง แข็งแรง สมบูรณ์ และมีรากเป็นจำนวนมาก

จากการทดลองในกรณีนี้พบว่า NAA ความเข้มข้น 0.05 ppm. ก็เพียงพอต่อการออกรากแล้ว ไม่จำเป็นต้องใช้ NAA ในความเข้มข้นที่สูงกว่า และ NAA ความเข้มข้นต่ำก็สมดุลกับ cytokinin ความเข้มข้นต่ำด้วย ในการทดลองนี้ เมื่อใช้ cytokinin ที่ความเข้มข้นสูง คือ ความเข้มข้น 1.5-2.5 ppm. เนื้อเยื่อเกือบไม่มีการเกิดขน แต่พบ callus ที่ปลายกิ่งงอกแทน แสดงให้เห็นชัดว่า เมื่อใช้ cytokinin สูงเกินไปทำให้อัตราส่วนของ auxin: cytokinin ขาดความสมดุล และทำให้เกิดการเกิดรากได้ (สรนันท, 2521; อัญชลี, 2521) และนอกจากนี้ยังทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากเกินไปจนเกิดความจำเป็นด้วย

สรุปผลการทดลอง

BA ความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 ppm. ผสมลงในอาหารเลี้ยง stem-bud segments ของมันฝรั่ง สามารถทำให้ตาข้างเจริญ และออกรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เมื่อแยกออกจากหลอดแก้วลงดิน มีเปอร์เซ็นต์รอดตายสูง จึงเป็นแนวทางที่จะขยายมันฝรั่งในปริมาณมาก ๆ โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อมันฝรั่งบนอาหารไดออกซินหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

สรนันท สุกัทรพันธุ์. พ.ศ. 2521. ไซโตไคนิน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสวน. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 53-65.
อัญชลี เต็มวิชกร. พ.ศ. 2521. การขยายพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์เพื่อประกอบการทำปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 68 หน้า.

Chapman, H.W. 1955. Potato tissue cultures. *Am. Potato Jour.* 32 : 207-210.
Kassanis, B. 1957. The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* 45(3) : 422-427.
Kassanis, B. and A. Varma. 1971. The production of virus-free clones of some British potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* 59 : 447-450.
Lingappa, Y. 1957. Tissue cultures of *Solanum tuberosum* and *Ipomoea pandurata*. *Amer. Jour. Bot.* 44 : 419-423.
Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
Okazawa, Y., N. Katsura and T. Tagawa. 1967. Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue culture in vitro. *Physiol. Plant.* 20(4) : 862-869.
Quak, F. 1976. Meristem culture and virus free plant. Springer-Verlag, Berlin.
Stace-Smith, R. and F.C. Mellor. 1970. Eradication of potato spindle tuber virus by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopathology* 60 : 1857-1858.
Steward, F.C. and S.M. Caplin. 1951. A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2, 4-D and coconut milk. *Science* 113 : 518-520.
Weaver, R.J. 1972. *Plant growth substances in agriculture*. University of California, Davis copyright. 594 p.