

การขยายพันธุ์วานส์ทิศโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Propagation of *Amaryllis* through Tissue Culture

ศัลักษณ์ พรรณศิริ ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา และปรีดี เอกะวิภาต¹

Salux Phunsiri, Paiboolya Gavinlertvatana and Preedee Akavipat

ARSTRACT

Bulb-scale sections of amaryllis (*Hippestrum hybridum*), 8 hybrids and one native variety, were cultured on modified Murashige and Skoog basal medium supplemented with, 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at 0.3 or 3 ppm combined with 6-furfurylamino purine (kinetin) at 0 or 0.3 ppm. Five varieties, Caroussel, Excelsior, Scarlet Leader, Rembrandt and Rilona, were able to regenerate bulblets. Excelsior tissues formed callus 90% and regenerate bulblet 50%. Both Rilona and Caroussel tissues formed callus 70% and bulblet 30%. Regeneration of bulblet in four varieties took 60-70 days but Caroussel variety took 32 days

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อวานส์ทิศพันธุ์ลูกผสม 8 พันธุ์ และพันธุ์พื้นเมือง 1 พันธุ์โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากกลีบหัว (bulb scale) ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงจาก Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารเร่งการเจริญเติบโตคือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0.3 หรือ 3 ppm ร่วมกับ 6-furfurylamino purine (kinetin) ความเข้มข้น 0 หรือ 0.3 ppm พบว่า วานส์ทิศ 5 พันธุ์สามารถเกิดเป็นต้นอ่อนจากเนื้อเยื่อกลีบหัวได้ซึ่งได้แก่พันธุ์ Caroussel, Excelsior Scarlet Leader, Rembrandt และ Rilona โดยที่พันธุ์ Excelsior จะเกิด callus ถึง 90% และเกิดต้นอ่อนถึง 50% รองลงมาคือพันธุ์ Rilona และ Caroussel ซึ่งเกิดเป็น callus ถึง 70% และเกิดต้นอ่อน 30% ส่วนระยะเวลาในการเกิดต้นอ่อนของวานส์ทิศทั้ง 5 พันธุ์นี้ ส่วนใหญ่จะใช้เวลาประมาณ 60-70 วัน จึง

จะเกิดเป็นต้นอ่อนได้ ยกเว้นพันธุ์ Caroussel จะเกิดเป็นต้นอ่อนได้เร็วที่สุดคือใช้เวลาเพียง 32 วัน

คำนำ

วานส์ทิศเป็นไม้ดอกประเภทหัว ซึ่งมีการผสมพันธุ์ทำให้เกิดลูกผสมใหม่ๆและให้ดอกที่มีขนาดใหญ่ มีสีสรรสวยงาม เหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้ประดับ ไม้ตัดดอก และไม้กระถาง วานส์ทิศมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน จึงสามารถปลูกเลี้ยงได้ดีในประเทศไทย (วิลาวัลย์, 2523) และสามารถผลิตหัวพันธุ์เพื่อเป็นการค้าในราคาต้นทุนที่ถูกกว่าประเทศในแถบยุโรป ถึงแม้ว่าวานส์ทิศจะสามารถขยายพันธุ์โดยใช้เพศได้หลายวิธี เช่น scoring, scooping, division หรือ bulblet separation เป็นต้น (วินดา, 2519) แต่ก็ยังไม่สามารถขยายพันธุ์ได้มากพอในระยะเวลาอันสั้นตามความต้องการ ทำให้ต้องสั่งหัวพันธุ์วานส์ทิศลูกผสมมาจากต่างประเทศอยู่เรื่อยๆ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการขยายพันธุ์

¹ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม.

โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้หัวพันธุ์เป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้นโดยใช้หัวพันธุ์เริ่มต้นในจำนวนน้อย ในต่างประเทศก็ได้มีรายงานการขยายพันธุ์ไม้ดอกประเภทหัวโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อนแล้ว เช่น การขยายพันธุ์ Hyacinth (Pierik and Ruibing, 1973) Gladiolus (Simonsen and Hildebrandt, 1971; Ziv *et al.*, 1970) Tulip (Niimi, 1978) Iris (Meyer *et al.*, 1975) Lilium (Simmonds and Cumming, 1976) Haworthia (Kaul and Sabharwal, 1972) หรือ Narcissus (Seabrook *et al.*, 1976) เป็นต้น สำหรับในว่านสัทิส ได้มีการศึกษา การขยายพันธุ์ โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดย Murashige (1974) Mii, Mori and Iwase (1974) และ Hussey (1975) โดยนำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อส่วนหัว (bulb scale) มาเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงของ Murashige and Skoog (1962) ซึ่งเติม α -Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้นตั้งแต่ 2-10 ppm. พบว่า bulb scale สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนใหม่ได้ Bose and Jana (1977) ได้ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนหัวเช่นเดียวกัน บนอาหารสูตรดัดแปลงของ Knudson C (1946) ซึ่งเติมสารเร่งการเจริญเติบโตต่างๆ ได้แก่ NAA, indole-3-acetic acid (IAA,) gibberellic acid (GA_3) และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) พบว่า NAA จะมีผลต่อการเกิดต้นอ่อนใหม่ ในขณะที่ GA_3 ชลอการเกิดหรือยับยั้งการเกิดของต้นอ่อน และ 2,4-D ในความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของว่านสัทิส ซึ่งได้แก่เนื้อเยื่อส่วนใบ (Hussey, 1975; Seabrook and Cumming, 1977) ก้านช่อดอก (Hussey, 1975; Seabrook and Cumming, 1977) ก้านช่อดอกย่อย, กลีบดอก, basal plate (Seabrook and Cumming, 1979), รังไข่ (Hussey, 1975; Seabrook and Cumming,

1977) และเกสรตัวผู้ (Seabrook and Cumming, 1977) บนอาหารสูตรดัดแปลงของ Murashige and Skoog พบว่าส่วนฐานใบ ก้านช่อดอก ก้านช่อดอกย่อยและรังไข่ สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนใหม่ ส่วนปลายใบ กลีบดอก basal plate และเกสรตัวผู้ ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนใหม่ได้ (Hussey, 1975; Seabrook and Cumming, 1977)

อุปกรณ์และวิธีการ

นำส่วนของว่านสัทิสที่ตัดใบและรากออกหมดแล้ว มาลอกกาบบนออก 2 ชั้น แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ลอกกาบบนออกเป็นชั้นๆ ทำความสะอาดด้วย 10% clorox โดยเติมสาร detergent 1-2 หยด แช่เป็นเวลา 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งน้ำแช่แล้ว 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนเหล่านั้นมาตัดให้มีขนาด 0.5×1.5 ซม. แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ Murashige and Skoog (MS) ซึ่งเติมสารเร่งการเจริญเติบโตต่างๆ คือ

สูตร 1 MS + 0.3 ppm 2, 4-D

สูตร 2 MS + 0.3 ppm 2, 4-D + 0.3 ppm kinetin

สูตร 3 MS + 3 ppm 2, 4-D + 0.3 ppm kinetin

สูตร 4 MS + 3 ppm 2, 4-D

นำอาหารไปปรับ pH ให้ได้ 5.8 ± 0.1 ด้วย 1 N KOH หรือ 1 N HCl เติม sucrose 3% และ agar 0.8% บรรจุอาหารลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ 20 ml ปิดปากขวดด้วยกระดาษตะกั่วแล้วนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ $121^\circ C$ (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 20 นาที เลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ $28-29^\circ C$ (ในบางครั้งเกิดการขัดข้องทางไฟฟ้า หรือเครื่องปรับอากาศเสีย ทำให้อุณหภูมิห้องอาจสูงกว่านี้ได้) โดยให้แสงประมาณ 10 ชั่วโมงต่อวัน พันธุ์ที่นำมาเลี้ยงได้แก่พันธุ์ลูกผสม 8 พันธุ์คือ Belinda,

Caroussel, Minerva, Candy Cane, Excelsior, Scarlet Leader, Rembrandt และ Rilona และพันธุ์ พนมเมือง 1 พันธุ์ ศึกษาการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อทุก 1-2 สัปดาห์เป็นเวลา 4 เดือน

ผล

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน bulb scale ของวุ้นสัณฑิพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และในแต่ละสูตรอาหาร แต่ในระยะช่วงแรกของการเลี้ยงคือ เมื่อเลี้ยงไปได้ 2 สัปดาห์แรก เนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงจะเกิด callus ได้ทุกพันธุ์ โดยจะเกิด callus ตรงบริเวณรอยตัดด้านส่วนบนของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหาร และจะเกิด callus ได้ดี ในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.3 ppm และในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm ส่วนในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm และสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 3 ppm จะเกิด callus ได้น้อยกว่า และเมื่อเลี้ยงไปได้ 4 สัปดาห์ พันธุ์ Excelsior, Caroussel, Scarlet Leader, Belinda, Rembrandt และ Rilona เนื้อเยื่อจะสร้าง callus ได้มากขึ้น และชั้นเนื้อเยื่อนั้นจะบวมพองขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีเขียว ส่วนพันธุ์ Minerva, Candy Cane และพันธุ์พนมเมืองอัตราการเกิด callus จะลดลง เนื้อเยื่อไม่แสดงอาการบวมพอง และจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเมื่อเลี้ยงไปได้เป็นเวลา 2 เดือน พันธุ์ Minerva เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด ในทุกสูตรอาหาร ส่วนในพันธุ์อื่น อัตราการตาย จะแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และในแต่ละสูตรอาหาร (ตารางที่ 1)

เมื่อเลี้ยงไปได้เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าพันธุ์ Excelsior จะเกิด callus ได้มากที่สุด โดยในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm จะเกิด callus ได้ถึง 90% และในสูตรอาหารที่

เติม 2,4-D 0.3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm และสูตรที่เติม 2,4-D 3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm จะเกิด callus ได้ 30 และ 36.3% ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ที่เกิด callus รองลงมาคือพันธุ์ Rilona และพันธุ์ Caroussel (ตารางที่ 1) เนื้อเยื่อของวุ้นสัณฑิเกือบทุกพันธุ์ จะเกิด callus ได้ดีในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm ยกเว้นพันธุ์ Belinda ซึ่งจะเกิด callus เฉพาะสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm และสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm และพันธุ์ Minerva ซึ่งตายหมดทุกสูตรอาหารในเดือนที่ 2 ส่วนในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm ร่วมกับ kinetin การเกิด callus ของเนื้อเยื่อจะเกิดได้ดีรองลงมาจากสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm เพียงอย่างเดียว ยกเว้นพันธุ์พนมเมือง ซึ่งจะเกิด callus ได้เฉพาะในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm และพันธุ์ Minerva ในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm นั้น พันธุ์ที่สามารถเกิด callus ได้มีเพียง 3 พันธุ์คือ พันธุ์ Belinda, Excelsior และ Rilona ส่วนในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 3 ppm นั้น เมื่อเลี้ยงไปได้ 4 เดือน ปรากฏว่าเนื้อเยื่อจะตายหมดทุกพันธุ์

การเกิดเป็นต้นอ่อน หรือรากของเนื้อเยื่อวุ้นสัณฑิในแต่ละพันธุ์นั้น จะเกิดโดยผ่าน callus มาก่อน พันธุ์ที่สามารถเกิดเป็นต้นอ่อนได้คือพันธุ์ Caroussel, Excelsior, Scarlet Léader, Rembrandt และ Rilona โดยพันธุ์ที่เกิดเป็นต้นอ่อน ได้ดีที่สุดคือพันธุ์ Excelsior รองลงมาคือพันธุ์ Rilona (ตารางที่ 1) โดยทั้ง 2 พันธุ์ จะเกิดเป็นต้นอ่อนได้ในสูตรอาหารทั้ง 3 คือสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 ppm, 2,4-D 0.3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm และ 2,4-D 3 ppm ร่วมกับ kinetin 0.3 ppm แต่เปอร์เซ็นต์ในการเกิดเป็นต้น

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์ การเกิด callus ต้นอ่อน (shoot) และราก (root) จากเนื้อเยื่อส่วน bulb scale ของว่านสี่ทิศพันธุ์ต่างๆในเวลา 4 เดือน

สูตรอาหาร	การเจริญของเนื้อเยื่อ	เปอร์เซ็นต์การเจริญของเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศพันธุ์ต่างๆ (%)								
		พื้นเมือง	Belinda	Caroussel	Minerva	Candy Cane	Excelsior	Scarlet Leader	Rembrandt	Rilona
MS + 0.3 ppm 2,4-D	callus	20.0	0 ^{a/}	70.0	0 ^{a/}	10.0	90.0	54.3	40.0	70.0
	shoot	0	0	30.0	0	0	50.0	20.0	10.0	20.0
	root	20.0	0	20.0	0	0	0	14.3	0	0
MS + 0.3 ppm 2,4-D + 0.3 ppm kinetin	callus	0 ^{a/}	30.0	50.0	0 ^{a/}	10.0	30.0	33.3	25.0	15.0
	shoot	0	0	0	0	0	10.0	0	5.0	5.0
	root	0	10.0	0	0	0	0	0	0	0
MS + 3 ppm 2,4-D + 0.3 ppm kinetin	callus	0 ^{a/}	30.0	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}	36.3	0 ^{a/}	0 ^{a/}	48.6
	shoot	0	0	0	0	0	27.3	0	0	28.6
	root	0	10.0	0	0	0	0	0	0	0
MS + 3 ppm 2,4-D	callus	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}	0 ^{a/}
	shoot	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	root	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 ^{a/} หมายถึง เนื้อเยื่อตาย

0 หมายถึง เนื้อเยื่อนั้นไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อน หรือราก

ตารางที่ 2 ระยะเวลาในการเกิดเป็นต้นอ่อน หรือรากของเนื้อเยื่อว่านสัทิสพันธุ์ต่างๆ (นับจากวันที่เริ่มเลี้ยง)

สูตรอาหาร	การเกิดเป็นต้น/ราก	ระยะเวลาในการเกิดเป็นต้น/รากของว่านสัทิสพันธุ์ต่างๆ (วัน)								
		พินเมือง	Belinda	Caroussal	Minerva	Candy Cane	Excelsior	Scarlet Leader	Rembrandt	Rilona
MS + 0,3 ppm	ต้น	—	—	32	—	—	60	60	65	65
2,4-D	ราก	47	—	40	—	—	—	51	—	—
MS + 0.3 ppm	ต้น	—	—	—	—	—	60	—	65	70
2,4-D + 0.3 ppm kinetin	ราก	—	110	—	—	—	—	—	—	—
MS + 0.3 ppm	ต้น	—	—	—	—	—	90	—	—	70
2,4-D + 0.3 ppm kinetin	ราก	—	110	—	—	—	—	—	—	—
MS + 3 ppm	ต้น	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,4-D	ราก	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— หมายถึง ไม่เกิด

ซึ่งอาจจะแตกต่างกันในด้านการสะสมอาหาร เพราะชั้นทาบง จะมีอัตราการตายสูงกว่าชั้นทาบง

สรุป

จากการศึกษาการขยายพันธุ์ของว่านสัทิส พันธุ์ลูกผสม 8 พันธุ์ และพันธุ์พื้นเมือง 1 พันธุ์ โดยใช้ส่วน bulb scale นั้น พบว่าเนื้อเยื่อสามารถเกิดเป็น callus และต้นอ่อนได้ โดยจะเกิด callus ได้ดีที่สุดในการอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.3 ppm และอาหารสูตรนี้สามารถพัฒนา callus ให้เป็นต้นอ่อนได้ ว่านสัทิสพันธุ์ที่เกิด callus และต้นอ่อน ได้ดีที่สุดคือพันธุ์ Excelsior รองลงมาคือพันธุ์ Rilona และ Caroussel ตามลำดับ และสำหรับพันธุ์ Caroussel นั้น สามารถเกิดเป็นต้นอ่อนได้ในระยะเวลาสั้นที่สุด

ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่า การขยายพันธุ์ว่านสัทิส โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน bulb scale นั้น ย่อมมีความแตกต่างกันทั้งในเรื่องพันธุ์และสูตรอาหาร

เอกสารอ้างอิง

- วนิดา โสภณเวทยา พ.ศ. 2519 การขยายพันธุ์ว่านสัทิสโดยไม่ใช้เมล็ด. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 35 หน้า
- วิลาวัลย์ มณีรัตน์. พ.ศ. 2523. การบังคับการออกดอกของว่านสัทิส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 40 หน้า
- Bose, T.K. and B.K. Jana. 1977. Regeneration of plantlets in *Hippeastrum in vitro*. Indian J. Hort. 34:446-447.

- Hussey, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae. J. Exp. Bot. 26 : 253-262.
- Kaul, K. and P.S. Sabharwal. 1972. Morphogenetic studies on Haworthia: Establishment of tissue and control of differentiation. Am. J. Bot 59: 377-385.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Am. Orchid Soc. Bull. 55:214-217.
- Meyer, Jr. M.M., L.H. Fuchigami and A.N. Roberts. 1975. Propagation of tall Bearded Irises by tissue culture. Hortscience. 10:479-480.
- Mii, M., T. Mori and N. Iwase. 1974. Organ formation from the excised bulb scale of *Hippeastrum hybridum in vitro*. J.hort.Sci. 49:241-244.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:437-497.
- Niimi, Y. 1987. Influence of low and high temperatures on the initiation and the development of a bulb primordium in isolated tulip embryos. Scientia Hort. 9:61-69.
- Pierik, R.L.M. and M.A. Ruibing. 1973. Regeneration of bulblets on bulb scale segments of hyacinth *in vitro*. Neth, J. agric. Sci. 21:129-138.
- Seabrook, J.E.A. and B.G. Cumming. 1977. The *in vitro*. propagation of amaryllis. In Vitro. 13:831-836.

- Seabrook, J.E.A., B.G. Cumming, and L.A. Dionne. 1976. The *in vitro* induction of adventitious shoot and root apices on *Narcissus* (daffodil and narcissus) cultivar tissue. Can. J. Bot. 54:814-819.
- Simmonds, J.A. and B.G. Cumming. 1976. Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates. Scientia Hort. 5:161-170.
- Simonsen, J. and A.C. Hildebrandt. 1971. *In vitro* growth and differentiation of *Gladiolus* plants from callus cultures. Can. J. Bot. 49:1817-1819.
- Ziv, M., A.H. Halevy and R. Shilo. 1970. Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Ann. Bot. 34: 671-676.