ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 27:463-468 (2536)

การชักนำให้เกิดแคลลัสและเอมบริออยด์ของเนื้อเยื่อหอมหัวใหญ่พันธุ์ Granex 33 (*Allium cepa* L. cv. Granex 33)

Induction of Onion (*Allium cepa* L. cv. Granex 33) Callus Formation and Embryogenesis

นิรันดร์ จันทวงศ์ ประศาสตร์ เกื้อมณี มาลี ณ นคร และ สุรีย์รัตน์ คิ้วฮก[1]

Niran Juntawong, Prasart Kaumanee, Malee Nanankorn and Surirat Khewhok

ABSTRACT

The comparative study on growth and differentiation between basal portion and bulb scale of onion (*Allium cepa* L. cv. Granex 33) grown on different culture media were carried out. The results showed that the basal plate tissue cultured on Murashige and Skoog medium (MS) containing 1.0-1.5 mg/l 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and on modified MS medium containing 3.3 mg/l 3,6-dichloro-o-anisic acid (Dicamba) was remarkedly induced to form a compact callus within 6 weeks after culture initiation. However, embryogenesis has been generated only from the callus mediated directly on MS medium containing 1.0 mg/l 2,4-D and subsequently cultured on MS medium comprising 0.1 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) and 1.0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) within 15 weeks. After transferring onto MS medium containing no growth regulators the embryoid developed into complete plantlets within 8 weeks. In contrast to the basal portion tissue, the bulb scale tissue cultured on these media produced afriable callus which could not regenerate into complete plantlets.

Key words : onion, *Allium cepa*, embryogenesis, 2,4-D, Dicamba

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อส่วนฐานต้นและกลีบหัวของหอมหัวใหญ่พันธุ์ Granex 33 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าอาหารสูตร Murashigeและ Skoog (MS) ที่เติม 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้นระหว่าง 1.0-1.5 มก./ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงโดยเติม 3,6-dichloro-o-anisic acid (Dicamba) ความเข้มข้น 3.3 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนฐานต้นเกิด compact callus ได้ในเวลา 6 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง และแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงส่วนฐานต้นในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร เมื่อย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่มี indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ 6-benzylamino purine (BAP) ความเข้มข้น 1.0 มก./

1 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

ลิตร เป็นเวลานาน 15 สัปดาห์สามารถพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ได้ และเจริญเติบโตเป็นต้นหลังจากย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MSที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชใน 8 สัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อกลีบหัวนั้นสามารถชักนำให้เกิดเพียง friable callus และไม่สามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ด้วยสูตรอาหารดังกล่าว

คำนำ

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ประยุกต์ใช้เพื่อขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากและปลอดจากเชื้อโรค การศึกษาโดยใช้เทคนิคดังกล่าวประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามงานศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอมหัวใหญ่กลับมีน้อยมาก Fridborg (1971) รายงานว่า 2,4-D และ napthalene acetic acid (NAA) สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อหอมหัวใหญ่ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเกิดแคลลัสได้ ส่วน 6-(3-methyl-2-butenylamino) purine (2iP) ไม่มีบทบาทในการควบคุมการเจริญและพัฒนาของแคลลัสหอม ในขณะที่ Shahin และKaneko (1986) รายงานว่าในหอมต้น (non-bulbing onion) นั้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร และ 6-(furfuryl-amino)purine (kinetin) ความเข้มข้น 1 มก./ลิตร และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้เมื่อย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1.5 มก./ลิตรPhillips and Hubstenberger (1987) รายงานว่าอาหารสูตร BDS ที่เติม 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridine-carboxylic acid(Picloram) ความเข้มข้น 0.75 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.0 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เนื้อปลายยอดหอมเจริญและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ และเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมแต่เติม Picloram ความเข้มข้น 0.03 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร แคลลัสก็สามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Duncan *et al.* (1985) รายงานว่าการใช้ Dicamba สามารถชักนำการสร้างแคลลัสในข้าวโพด

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้เพื่อต้องการศึกษาสูตรอาหารที่จะชักนำให้เนื้อเยื่อหอมหัวใหญ่พันธุ์Granex 33 เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาต้นที่สมบูรณ์

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำหอมหัวใหญ่พันธุ์ Granex 33 เก็บจากแปลงปลูกในตำบลบ้านกาด อำเภอสันป่าตองจังหวัดเชียงใหม่ มาฟอกฆ่าเชื้อโดยการแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20% ซึ่งเติมสารจับใบ Tween 20 ลงไปประมาณ 2-3 หยดแช่ไว้นานประมาณ 30 นาทีจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วจึงตัดตัวอย่างหัวหอมโดยนำส่วนฐานต้น (basal plate) และ กลีบหัว (scale) มาเลี้ยงบนอาหารสูตร 1) Murashige and Skoog, 1962 (MS) ซึ่งเติม2,4-D ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 และ 1.5 มก./ลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และวุ้น 6.5 กรัม/ลิตร 2) MS ซึ่งเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และ วุ้น 6.5 กรัม/ลิตร 3) MS ซึ่งเติมNAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 1 มก./ลิตร น้ำตาลซูโครส30 กรัม/ลิตร และ วุ้น 6.5 กรัม/ลิตร และ 4) Modified MS (Duncan *et al.*, 1985) ซึ่งเติม Dicamba ความเข้มข้น 3.3 มก./ลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และ วุ้น 6.5 กรัม/ลิตร จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในห้องมืดที่มีอุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส แต่ละสูตรอาหารทำการทดลอง 4 ซ้ำ

การกระตุ้นให้เกิดยอดและพัฒนาไปเป็นต้น

นำแคลลัสที่ได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร นาน 15 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายลงบนอาหารสูตรMS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบ

โต เลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากหลอดโกรลักซ์ซึ่งมีความเข้มแสงประมาณ 1000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ผลและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดแคลลัส

เนื้อเยื่อส่วนฐานต้น

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนฐานต้นของหอมหัวใหญ่เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0-1.5 มก./ลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น1.0 มก./ลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร และสูตร Modified MS ซึ่งเติม Dicamba ความเข้มข้น 3.3 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อฐานต้นได้ภายในเวลา 6 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) และมีสีเหลือง แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงส่วนฐานต้นบนอาหารสูตร Modified MS ซึ่งเติม Dicamba ความเข้มข้น 3.3 มก./ลิตร มีปริมาณมากที่สุด (Table 1 และ Figure 1A) ส่วนฐานต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตรได้แคลลัสในปริมาณรองลงมา สำหรับส่วนฐานต้นซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 1.0มก./ลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร เกิดแคลลัสในปริมาณน้อยมาก ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-Dความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0-0.5 มก./ลิตร เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Table 1)

เนื้อเยื่อส่วนกลีบหัว

กลีบหัวซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตรสร้างแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ (friable callus) ปริมาณเล็กน้อยและมีสีเหลือง ส่วนกลีบหัวซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร Modified MS ซึ่งเติม Dicamba ความเข้มข้น 3.3 มก./ลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ สร้างแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเหลืองเช่นเดียวกัน แต่มีปริมาณแคลลัสมากกว่า (Table 1)

Table 1 Amount of callus and callus type from basal plate and scaleleaf of onion (*Allium cepa* L. cv. Granex 33) cultured on differentmedia within 6 weeks.

Culture media	Callus Type		Amount of Callus	
	Basal Plate	Scale Leaf	Basal Plate	Scale Leaf
MS+0.0 mg/l 2,4-D	-	-	-	-
MS+0.5 mg/l 2,4-D	-	-	-	-
MS+1.0 mg/l 2,4-D	c	f	++	+
MS+1.5 mg/l 2,4-D	c	-	+	-
MS+0.1 mg/l 2,4-D +1.0 mg/l 2iP	c	-	+	-
MS+0.1 mg/l NAA +1.0 mg/l 2iP	c	-	+	-
Modified MS +3.3 mg/l Dicamba	c	f	+++	++

-=no callus, +=low, ++=medium, +++=high, c=compact callus, f=friable callus

การกระตุ้นให้เกิดยอดและพัฒนาไปเป็นต้น

แคลลัสที่เกิดจากส่วนฐานต้นซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ได้เมื่อย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.0มก./ลิตร เลี้ยงนาน 15 สัปดาห์ (Figure 1B) โดยในระยะแรก embry-

Table 2 Number of plantlets of onion (*A. cepa* L. cv. Granex 33) after transferring callus onto MS medium +0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/lBAP for 15 weeks and then onto MS medium containing no growthregulators for 8 weeks.

Callus derived from	Number of Plantlets	
	Basal Plate	Scale Leaf
MS+1.0 mg/l 2,4-D	7	-
MS+1.5 mg/l 2,4-D	-	-
MS+0.1 mg/l 2,4-D +1.0 mg/l 2iP	-	-
MS+0.1 mg/l NAA +1.0 mg/l 2iP	-	-
Modified MS +3.3 mg/l Dicamba	-	-

ogenic callus ที่ได้เจริญและพัฒนาลักษณะรูปร่างเป็นแบบ globular shape (Figure 1C) และแบบ heart-shape (Figure 1D) และสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นได้เมื่อย้ายลงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตและมีจำนวนถึง 7 ต้นต่อชิ้นแคลลัส (Table 2 และ Figure 1E) ภายใน 8 สัปดาห์

2,4-D สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่มีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ พืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น ข้าว (Yamada *et al.*, 1967) ข้าวโอ๊ต (Carter *et al.*, 1967) และ ข้าวฟ่าง (Masteller and Holden, 1970) ต้องการ 2,4-D NAA และ IAA ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งผลจากการทดลองนี้แสดงว่า 2,4-D มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสเช่นกัน อย่างไรก็ตามเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มี 2,4-D พบว่ากลุ่มแคลลัสดังกล่าวก็จะเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เช่นเดียวกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่นๆ เช่นข้าว (Nishi *et al.*, 1968) และข้าวโอ๊ต (Carter *et al.*, 1967) ซึ่งมีรายงานว่าในสภาพที่ไม่มี 2,4-D พบว่าแคลลัสจะมีการพัฒนาไปเป็นต้นและรากการลดระดับความเข้มข้นของ 2,4-D หรือ NAA มีผลชักนำให้แคลลัสอ้อยมีการเจริญเติบโตเป็นต้นได้ดี Dicamba ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรด benzoic เช่นเดียวกับออกซินก็มีคุณสมบัติในการชักนำการเกิดแคลลัสเช่นกัน Dicamba ความเข้มข้น 3.3 มก./ลิตร ที่เติมลงในอาหารสูตร Modified MS สามารถชักนำให้กลุ่มเซลฐานต้นเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

สำหรับ BAP แม้จะมีรายงานว่าสามารถชักนำให้แคลลัสหอมหัวใหญ่พัฒนาไปเป็นต้นได้นั้นแต่จากการทดลองว่าแม้ว่าจะย้ายแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่มี BAP พบว่าการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นไม่ได้เกิดในอาหารทุกสูตรที่มี BAP (Table 2)

สรุป

ผลจากการทดลองสรุปได้ว่า ในหอมหัวใหญ่พันธุ์ Granex 33 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จากเนื้อเยื่อส่วนฐานต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นระหว่าง1.0-1.5 มก./ลิตร และอาหารสูตร Modified MS ที่เติม Dicamba ความเข้มข้น 3.3 มก./ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และสามารถชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ได้จากแคลลัสซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตรเมื่อย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่เติมIAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร เป็นเวลา 15สัปดาห์ และสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตใน 8 สัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อกลีบหัวนั้นไม่สามารถชักนำให้เกิด compactcallus และต้นได้ด้วยอาหารสูตรต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

Carter, O., Y. Yamada and E. Takahashi. 1967. Tissue culture of oats. Planta 89 : 299-302.

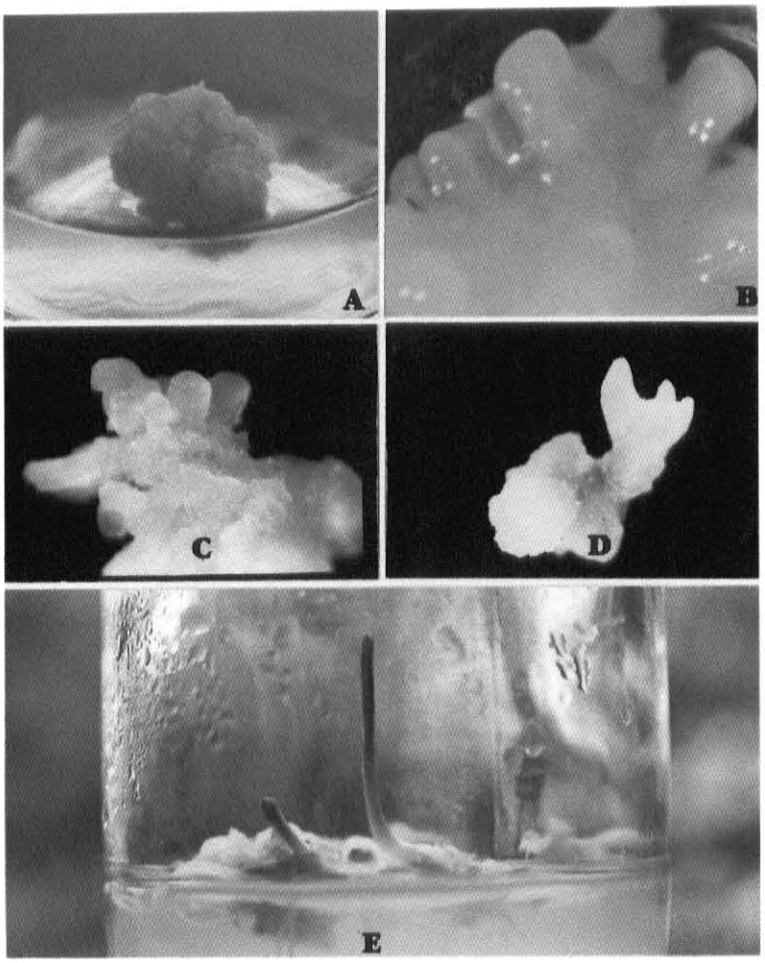

Figure 1 Growth of callus from basal plate tissue of onion (*A . cepa* L. cv. Granex 33) cultured on Modified MS medium containing 3.3 mg/lDicamba within 6 weeks (A). Within 15 weeks after transferring onto MS medium comprising 0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/l BAP these embryogenic calli developed into the stage of globular (B and C) and heart shape (D) andthen developed into complete plantlets after transferred onto MS medium containing no growth regulators (E) within 8 weeks.

Duncan, D.R., M.E. Williams, B.E. Zehr and J.M. Widholm. 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. Planta 165 : 322-332.

Dustin, D.J. and K.C. Short. 1977. *In vitro* studies on organogenesis and growth in *Allium cepa* tissue cultures. Acta Hortic. 139-145.

Dustin, D.J. and K.C. Short. 1978. Shoot production from onion callus tissue culture. Scientia Horticulture 9 : 99-110.

Fridborg, G. 1971. Growth and organogenesis in tissue culture of *Allium cepa* var. Proliferum. Physiol. Plant. 25 : 436-440.

Masteller, J. and D. Holden. 1970. The growth and organ formation from callus tissue of Sorghum. Plant Physiol. 45 : 362-364.

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

Nishi, T., Y. Yamada and E. Takahashi. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature 219 : 508-509.

Phillips, G. and J. Hubstenberger. 1987. Plant regeneration *in vitro* of selected *Allium* species and interspecific hybrids. Hort. Science 22 : 124-125.

Shahin, E. and K. Kaneko. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of nonbulbing onions. Hort. Science 21 : 294-295.

Yamada, Y., K.Tanaka and E. Takahashi. 1967. Callus induction in rice, *Oryza sativa* L., Proc. Japan. Acad. 43 : 156-159.