วารสารเกษตร 14(1) : 87 - 98 (2541)
Journal of Agriculture 14(1) : 87 - 98 (1998)

# การขยายพันธุ์ผีเสื้อราตรีในหลอดทดลอง

# *In Vitro* Propagation of *Oxalis corymbosa* D.C.

*พจมาลย์ สุรนิลพงศ์* [1/] *และสมปอง เตชะโต* [2/]
***Potjamarn Suraninpong*** [1/] ***and Sompong Te-Chato*** [2/]

**Abstract** : *In vitro* propagation of *Oxalis corymbosa* D.C. could be carried out via direct and indirect organogenesis. Direct organogenesis was induced by culturing 0.5 cm petiole on basal Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) and 0.1 mg/l N-phenyl-N-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea (thidiazuron or TDZ) for 4 weeks. At the end of culture, a number of shoot of 3.30 shoots/explant was obtained. Indirect organogenesis could be induced on MS supplemented with 1.0 mg/l IAA and 5.0 mg/l 6-furfurylaminopurine (KN) after culture for 4 weeks. On that culture, 100% of the callus was obtained. For induction of shoots, the callus must be transfered to MS medium supplement with 1.0 mg/l IAA and 0.1 mg/l TDZ and culture for 4 weeks. By this method, 6.20 shoots/callus were obtained. Shoot proliferation was carried out by excision single shoot and transfered to culture on MS supplement with 0.1 mg/l TDZ for 4 weeks. An average of 4.27 shoots was induced from one shoot. Root induction could be done by excision single shoot and cultured onto MS supplemented with 0.5 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) and 0.5 mg/l naphthalene-1-acetic acid (NAA) for 3 weeks. Rooted shoots were successfully trasferred to soil under both cover and non-cover plastic cup.

**บทคัดย่อ** : การขยายพันธุ์ผีเสื้อราตรีจำนวนมากในหลอดทดลองสามารถทำได้โดยผ่านกระบวนการชักนำยอดโดยทางตรงหรือโดยทางอ้อม การชักนำยอดโดยทางตรงทำโดยการวางเลี้ยงก้านใบความยาว 0.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติมกรดอินโดลอะซีติค (IAA) เข้มข้น 1.0 มก/ล ร่วมด้วยไธไดอะซูรอน (TDZ) เข้มข้น 1.0 มก/ล ร่วมด้วยไคเนติน (KN) เข้มข้น 5.0 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์

[1/]โครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี, สุราษฎร์ธานี 84000
[1/]Faculty of Bioindustry, Prince of Songkla University, Surathani Campus, Suratthani 84000, Thailand.
[2/]ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, สงขลา 90112
[2/]Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat-Yai Campus, Songkhla 90112, Thailand.

การเพิ่มปริมาณยอดทำโดยตัดแยกยอดเดี่ยวๆ ย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามาถชักนำยอดรวมได้ 4.27 ยอด การชักนำรากทำโดยนำยอดเดี่ยวๆ ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 0.5 มก/ล ร่วมด้วยกรดแนปธาลีนอะซิติค (NAA) เข้มข้น 0.5 มก/ล เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พืชต้นใหม่ที่ชักนำได้เมื่อนำไป อนุบาลต้นกล้าโดยการครอบด้วยแก้วพลาสติกและไม่ครอบเป็นเวลา 3 วัน พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดไม่แตกต่างกัน

**Index words** : ผีเสื้อราตรี, ปักผีเสื้อ, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ,

*Oxalis corymbosa*, propagation, *in vitro*, organogenesis, thidiazuron

## บทนำ

ผีเสื้อราตรีหรือปักผีเสื้อเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล *Oxalis* spp. มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oxalis corymbosa* D.C. เป็นพืชที่ปลูกและดูแลรักษาง่าย ลักษณะและสีของใบ ก้านใบ และดอกสวยงาม จึงนิยมนำมาปลูกเป็นไม้กระถาง ต้นผีเสื้อราตรีมีความสูงประมาณ 4-6 นิ้ว ใบมีขนาด 2-4 นิ้ว มีลักษณะคล้ายใบถั่วโคลเวอร์ ดอกออกเป็นช่อมีขนาดเล็กสีม่วงอ่อน มีจำนวนมาก ดอกจะบานเมื่อได้รับแสง และหุบในเวลากลางคืน หรือเมื่อท้องฟ้ามีเมฆมาก ขยายพันธุ์โดยใช้หัว ซึ่งสร้างหัวหลังจากออกดอก สามารถนำหัวไปปลูกเพื่อขยายพันธุ์ในฤดูกาลต่อไป เนื่องจากหัวที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงที่วางเลี้ยงมีจำนวนไม่เพียงพอต่อการผลิตเพื่อจำหน่าย จึงนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อมาใช้เพื่อขยายพันธุ์ในเชิงการค้า ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวไม่ต้องใช้ชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศในการเพิ่มปริมาณ และสามารถทวีจำนวนพืชต้นใหม่ที่มีความสม่ำเสมอและตรงตามพันธุ์ได้มากในระยะเวลาสั้น และในไม้ดอกโดยทั่วไป สามารถนำชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ก้านใบ ใบ ช่อดอก ก้านดอก ลำต้น และราก มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อได้ เนื่องจากชิ้นส่วนดังกล่าวประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต และมีความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ (สมปอง, 2540) ไม้ดอกไม้ประดับที่ประสบผลสำเร็จในการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองในปัจจุบันได้แก่ อัฟริกันไวโอเล็ต (Cooke, 1977) บิโกเนีย (Takayama and Missawa, 1982) ทานตะวัน (Greco *et al.*, 1984) แกลดิโอลัส (Danta and Bhojwani, 1987) คาร์เนชั่น (Nugent *et al.*, 1991) ลิลลี่ (Custer and Bergervoet, 1994) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการพัฒนาของชิ้นส่วนให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ พบว่าขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ทั้งปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรมของพืช ชิ้นส่วนพืช และปัจจัยภายนอก เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโต ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร และสภาพแวดล้อมของการเลี้ยง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของชิ้นส่วนผีเสื้อราตรีเพื่อให้ได้พืชต้นใหม่จำนวนมากที่ตรงตามพันธุ์และใช้ระยะเวลาอันสั้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### วัสดุพืช

ตัดก้านใบของต้นผีเสื้อราตรีจากต้นที่ชักนำได้โดยการวางเลี้ยงก้านช่อดอกในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

เติมไคเนติน (KN) เข้มข้น 1 มก/ล และกรดอินโดลอะซิติค (IAA) เข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ดูแลรักษาโดยการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 3 สัปดาห์

**อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม**

1. สูตรอาหารชักนำการพัฒนาของชิ้นส่วน คืออาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปของออกซินคือ IAA เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมด้วยไซโตไคนิน คือ KN หรือ 6-เบนซิลอะดินิน (BA) 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 3 และ 5 มก/ล หรือไธไดอะซูรอน (TDZ) เข้มข้น 0.1 มก/ล หรือเติมเฉพาะไซโตไคนินในรูปของ TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล

2. สูตรอาหารชักนำการสร้างยอด คืออาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในรูปของออกซินคือ IAA หรือ NAA เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับไซโตไคนินคือ TDZ หรือ BA หรือ KN หรือ 2-ไอโซเพนทีนิลอะดินิน (2i-P) เข้มข้น 0.1 มก/ล

3. สูตรอาหารชักนำยอดรวม คือ อาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปของไซโตไคนิน คือ TDZ จำนวน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 0.1 และ 0.2 มก/ล หรือ KN หรือ BA หรือ 2i-P 3 ระดับความเข้มข้นคือ 1, 3 และ 5 มก/ล

4. สูตรอาหารชักนำการสร้างแอนโธไซยานิน คืออาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปของไซโตไคนินคือ TDZ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01 , 0.1 และ 0.5 มก/ล

5. สูตรอาหารชักนำการสร้างราก คืออาหารสูตร MS หรือ สูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2MS) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมและไม่เติมผงถ่าน หรือสูตร 1/2MS ไม่เติมผงถ่าน เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปของออกซินคือ NAA ร่วมกับ Phloroglucinol (PG) หรือ NAA ร่วมกับ IBA หรือ PG ร่วมกับ IBA ในระดับความเข้มข้นที่เท่ากันคือ 0.5 มก/ล

อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เติมผงวุ้น (Agar-Agar) ในกรณีที่เติมผงถ่าน ใช้ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในขวดๆ ละ 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## วิธีการศึกษา

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการพัฒนาของชิ้นส่วนก้าน**

วางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบความยาว 0.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตรชักนำการพัฒนาของชิ้นส่วน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส การชักนำยอด และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลอง

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำยอด**

ตัดแยกแคลลัสที่ชักนำได้ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างยอด วางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การชักนำยอด จำนวนยอดต่อแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลอง

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการเพิ่มปริมาณยอด**

ตัดแยกยอดผีเสื้อราตรีอายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 1 ยอด มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวมวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนยอดต่อต้นเปรียบเทียบกัน ในแต่ละหน่วยทดลอง

**ผลของ TDZ ต่อความสามารถในการสร้างแอนโธไซยานินที่ก้านใบและใบ**

ตัดแยกยอดผีเสื้อราตรีอายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 1 ต้นมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างแอนโธไซยานิน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนยอดต่อต้นเปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลอง

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำราก**

ตัดแยกยอดผีเสื้อราตรีแต่ละยอดจากกลุ่มยอดรวมอายุ 6 สัปดาห์ หลังจากชักนำได้ มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำราก วางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การชักนำรากเปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลอง

**การอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก**

ย้ายต้นผีเสื้อราตรีที่สมบูรณ์มีทั้งยอดและรากอายุ 4 สัปดาห์ หลังชักนำรากมาปลูกในดินผสมที่ประกอบด้วย ทราย:แกลบ:ดิน ในอัตราส่วน 1:1:1 บรรจุในกระถางขนาดเล็ก ทำการอนุบาลต้นกล้าโดยวิธีปกติไม่มีการคลุมด้วยแก้วพลาสติก ให้น้ำวันละ 2 ครั้งเช้าและเย็น หรือครอบด้วยแก้วพลาสติกเป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงเปิดแก้วออก ทำการดูแลรักษาต้นกล้าในเรือนเพาะชำในที่ร่มเป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงเปิดแก้วออก ทำการดูแลรักษาต้นกล้าในเรือนเพาะชำในที่ร่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นับต้นกล้าที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลอง

**การวางแผนการทดลอง**

ทุกการทดลองในการศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ขวด (กระถางในกรณีการศึกษาการอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก) และทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,600 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน

## ผลการทดลอง

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการพัฒนาของชิ้นส่วนก้านใบ**

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบต้นผีเสื้อราตรีบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารเติม IAA เข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ KN หรือ BA ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้สูงกว่าอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล เพียงลำพัง หรือร่วมกับ IAA เข้มข้น 1 มก/ล การเพิ่มความเข้มข้นของ KN และ BA ให้สูงขึ้น พบว่าสามารถส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้มากขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมลดลง ในขณะที่ TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล ร่วมด้วย IAA เข้มข้น 1.0 มก/ล สามารถชักนำการสร้างยอดรวมได้สูงที่สุด 70% และให้จำนวนยอดรวมต่อชิ้นส่วนสูงที่สุดคือ 3.30 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 1)

**Table 1 Effect of plant growth regulators on development of petiole.**

| Plant growth regulators (mg/l) | | % Callus inducing | %Shoot formation | No.of shoot/explant |
|---|---|---|---|---|
| IAA | KN | | | |
| 1 | 1 | 84.50 d | 12.50 d | 0.25 c |
| 1 | 3 | 65.00 e | 0 f | 0 c |
| 1 | 5 | 100.00 a | 0 f | 0 c |
| IAA | BA | | | |
| 1 | 1 | 62.50 f | 37.50 b | 1.40 b |
| 1 | 3 | 95.00 b | 5.00 e | 0.25 c |
| 1 | 5 | 90.00 c | 0 f | 0 c |
| IAA | TDZ | | | |
| 0 | 0.1 | 62.50 f | 17.50 c | 1.31 b |
| 1 | 0.1 | 30.00 g | 70.00 a | 3.30 a |
| C.V.(%) | | 0.63 | 2.22 | 16.21 |

Mean within column with different superscript differ significantly at P≤0.05

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำยอด**

จากการวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารเติม IAA หรือ NAA เข้มข้น 1.0 มก/ล ร่วมด้วย TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล สามารถชักนำการสร้างยอดรวมได้สูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้อาหารเติม IAA เข้มข้น 1.0 มก/ล ร่วมด้วย TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล ให้จำนวนยอดต่อแคลลัสได้สูงที่สุด คือ 6.20 ยอดต่อแคลลัส ยอดใหม่ที่ชักนำได้เป็นยอดที่สมบูรณ์ประกอบด้วยก้านใบที่อ้วนและยาว ก้านใบและใบมีสีม่วง ใบแผ่บานเต็มที่ ในขณะที่อาหารเติม IAA เข้มข้น 1.0 มก/ล ร่วมด้วย 2i-P เข้มข้น 0.1 มก/ล สามารถชักนำการสร้างดอกต่อแคลลัสได้สูงที่สุดคือ 75 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเติม IAA ร่วมด้วย BA สามารถชักนำการสร้างดอกต่อแคลลัสได้สูงที่สุด คือ 7.0 ดอกต่อต้น (ตารางที่ 2)

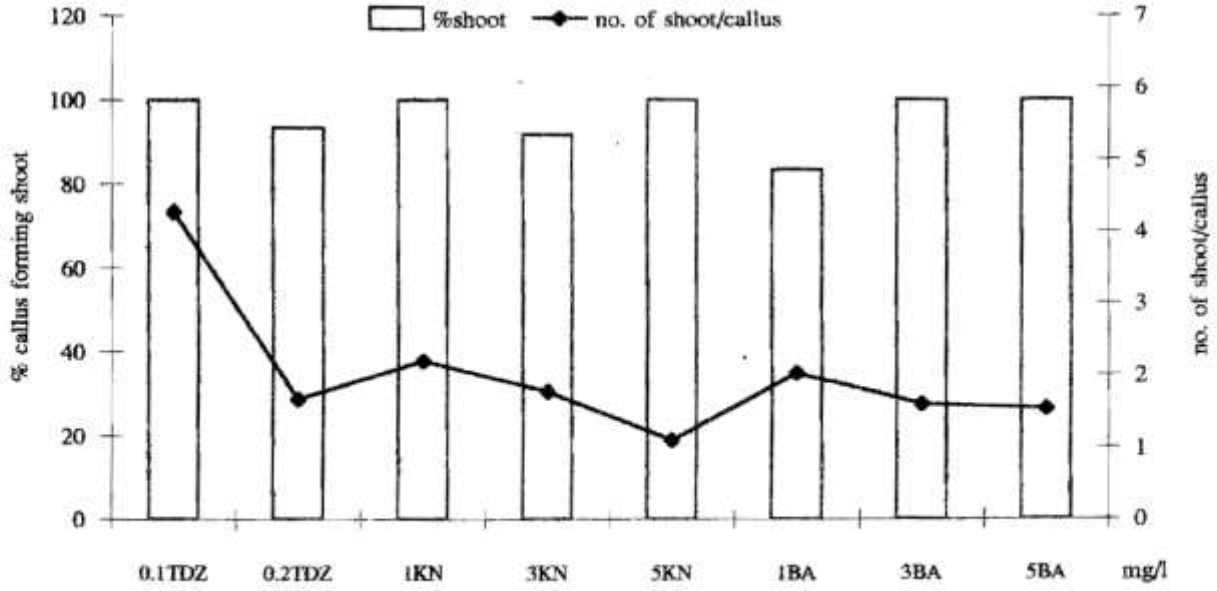
**Table 2 Effect of plant growth regulators on differentiation of the callus.**

| Plant growth regulator (mg/g) | % Shoot induction | Number of shoot/callus | % Flower induction | Number of flower/callus |
|---|---|---|---|---|
| NAA(1)TDZ(0.1) | 100.00 a | 3.13 b | 6.67 b | 2.60 b |
| IAA(1)TDZ(0.1) | 100.00 a | 6.20 a | 66.67 a | 3.60 b |
| IAA(1)BA(0.1) | 50.07 b | 2.50 b | 67.67 a | 7.00 a |
| IAA(1)KN(0.1) | 44.43 b | 3.06 b | 65.67 a | 3.70 b |
| IAA(1)2i-P(0.1) | 24.40 b | 3.40 b | 75.00 a | 5.80 a |
| C.V.(%) | 18.54 | 18.91 | 15.32 | 17.12 |

Mean within column with different superscript differ significantly at P<0.05

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำยอดรวม**

หลังจากตัดแยกยอดใหม่จำนวน 1 ยอด มาวางเลี้ยงบนอาหารเติมไซโตไคนินในรูปของ TDZ หรือ KN หรือ BA ความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารเติมไซโตไคนินทั้ง 3 รูป ที่ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำยอดใหม่ได้ไม่แตกต่างกัน อาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล สามารถชักนำการสร้างยอดต่อต้นได้สูงที่สุด คือ 4.27 ยอดต่อต้น การเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ, KN หรือ BA ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมลดลง ยอดที่ชักนำได้บนอาหารเติม TDZ เป็นต้นที่สมบูรณ์ มีก้านใบยาว และขนาดใหญ่ ก้านใบและใบมีสีม่วง ในขณะที่ต้นที่ชักนำได้บนอาหารเติม BA และ KN เป็นต้นที่มีก้านใบสั้น ก้านใบมีขนาดเล็ก ใบมีสีเขียว และมีจำนวนน้อย การเพิ่มความเข้มข้นของ BA และ KN ให้สูงขึ้นพบว่าส่งผลให้ก้านใบมีความยาวและขนาดเล็กลง และมีใบที่ม้วนงอ (ภาพที่ 1)




**TDZ:thidiazuron, KN:kinetin, BA:benzyladenine**

**Figure 1 Effect of various kinds and concentrations of cytokinins on shoot proliferation.**

**ผลของ TDZ ต่อความสามารถในการชักนำการสร้างแอนโธไซยานินที่ก้านใบและใบ**

จากการเลี้ยงยอดผีเสื้อราตรีอายุ 3 สัปดาห์ บนอาหารเติม TDZ ความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล สามารถชักนำการสร้างแอนโธไซยานินที่ก้านใบและใบได้สูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของ TDZ ลดลง พบว่าเปอร์เซ็นต์การสร้างแอนโธไซยานินที่ก้านใบและใบลดลง ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ สูงขึ้น ไม่สามารถชักนำการสร้างแอนโธไซยานินที่ก้านใบและใบได้ อย่างไรก็ตามก้านใบและใบที่ชักนำได้บนอาหารเติม TDZ ทุกระดับความเข้มข้นมีขนาดใหญ่และยาว (ภาพที่ 2)

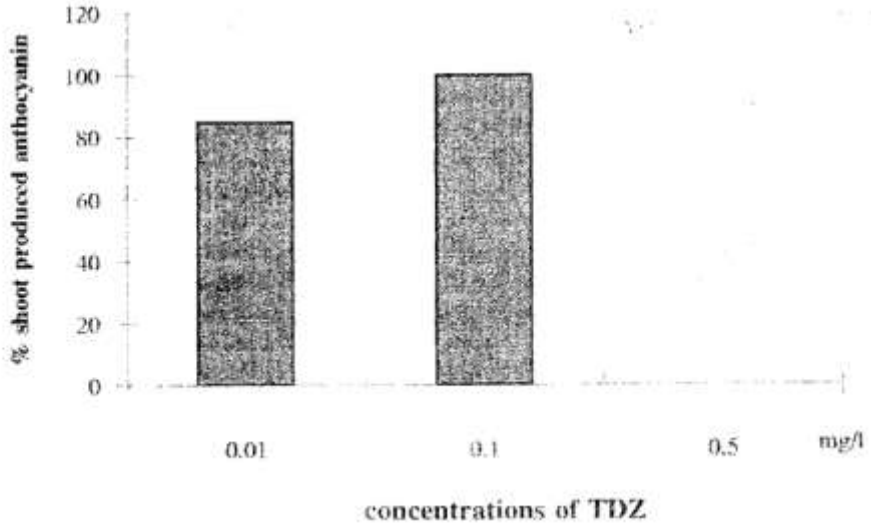



**Figure 2 Effect of TDZ concentrations on anthocyanin production.**

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อความสามารถในการชักนำราก**

จากการตัดแยกยอดผลิตรากหรืออายุ 6 สัปดาห์ ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำราก สูตรต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร 1/2 MS ไม่เติมผงถ่านสามารถชักนำการสร้างรากได้สูงที่สุดคือ 86.67 เปอร์เซ็นต์ รากที่ชักนำได้มีขนาดเล็ก ยาว และมีจำนวนมาก ในขณะที่รากที่ชักนำได้บนอาหารสูตร 1/2 MS เติมผงถ่านและสูง MS เติมและไม่เติมผงถ่านมีขนาดเล็ก ยาว และมีจำนวนเพียง 1-2 รากเท่านั้น (ตารางที่ 3)

เมื่อย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ไม่เติมผงถ่าน เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารเติม NAA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล สามารถชักนำการสร้างรากได้สูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับอาหารเติม NAA ร่วมกับ PG ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ในขณะที่อาหารเติม PG ร่วมกัน IBA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ชักนำการสร้างรากได้ต่ำที่สุดคือ 39.17 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามรากที่ชักนำได้บนอาหารทุกสูตร ให้รากขนาดเล็ก ยาว และมีจำนวนมาก (ตารางที่ 4)

**Table 3 Effect of medium compositions and activated charcoal on percentage of callus forming shoot.**

| Medium | %root induction |
|---|---|
| 1/2MS no AC | 86.67 a |
| 1/2MS add AC | 37.50 b |
| MS no AC | 33.33 b |
| MS add AC | 20.83 b |
| C.V.(%) | 19.30 |

Mean within column with different superscript differ significantly at P<0.05

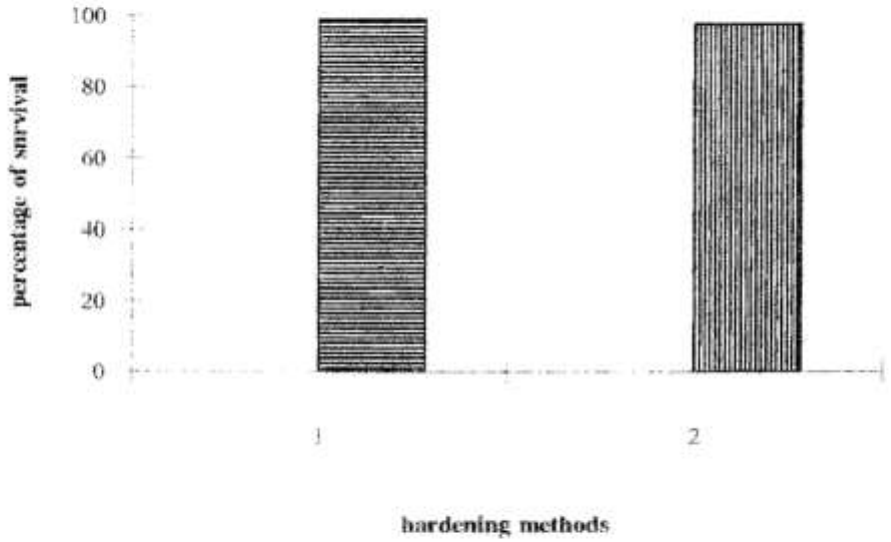
**Table 4 Effect of auxins and other PGRs supplemented in 1/2MS on percentage of root induction.**

| Medium | %root induction |
|---|---|
| NAA (0.5)+ PG (0.5) | 93.33 a |
| NAA (0.5) + IBA (0.5) | 100.00 a |
| PG (0.5) + IBA (0.5) | 38.17 b |
| C.V.(%) | 10.67 |

Mean within column with different superscript differ significantly at P<0.05

**การอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก**

ต้นผีเสื้อราตรีอายุ 3 สัปดาห์ หลังจากชักนำราก เมื่อย้ายลงดินปลูกซึ่งเป็นดินผสมที่ประกอบด้วย ทราย : แกลบ : ดิน อัตราส่วน 1:1:1 และทำการอนุบาลต้นกล้าโดยการครอบด้วยแก้วพลาสติกเป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงเปิดแก้วออกและไม่ครอบแก้วพลาสติก พบว่าหลังจากอนุบาลต้นกล้าเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของต้นผีเสื้อราตรีในทั้งสองหน่วยการทดลองไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3)




1)cover, 2) non cover with plastic cup

**Figure 3** Effect of the two different hardening methods on percentage of survival seedling.

## วิจารณ์ผลการทดลอง

การขยายพันธุ์ต้นผีเสื้อราตรีในหลอดทดลอง สามารถทำได้โดยผ่านกระบวนการชักนำพืชต้นใหม่ 2 กระบวนการคือ กระบวนการชักนำพืชต้นใหม่โดยทางตรง และโดยทางอ้อม การชักนำพืชต้นใหม่โดยทางตรงสามารถทำได้โดยการวางเลี้ยงก้านใบความยาว 0.5 เซ็นติเมตร บนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1.0 มก/ล และ TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำยอดได้ 3.30 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนการชักนำพืชต้นใหม่โดยทางอ้อมทำได้โดยวางเลี้ยงก้านใบบนอาหารเติม IAA เข้มข้น 1.0 มก/ล และ KN เข้มข้น 5.0 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม IAA เข้มข้น 1.0 มก/ล และ TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 6.20 ยอดต่อต้น และได้ยอดที่สมบูรณ์ประกอบด้วยใบ และก้านใบที่มีสีม่วงของแอนโธไซยานิน ส่วนการชักนำรากทำได้โดยการตัดแยกยอดเดี่ยวไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม IBA และ NAA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์

สมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ออกซินมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก การยืดตัวของเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการเพิ่มปริมาณเซลล์ ไซโตไคนินมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นยอด ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นหากอัตราส่วนออกซินและไซโตไคนินเท่ากันส่งเสริมการสร้างแคลลัส หากไซโตไคนินสูงกว่าออกซินส่งเสริมการสร้างยอด และในทางตรงข้ามหากออกซินสูงกว่าไซโตไคนินส่งเสริมการสร้างราก (สมปอง, 2540) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้เป็นการวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบผีเสื้อราตรีบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินในรูปของ IAA หรือ NAA ร่วมกับไซโตไคนินในรูปของ KN หรือ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ร่วมกับ TDZ อัตราส่วน 1.0:0.1 เหมาะสมต่อการชักนำยอดรวม ในขณะที่สารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปของ IAA ร่วมกับ KN อัตราส่วน 1:5 เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส นอกจากนี้พบว่าอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.1 มก/ล ส่งเสริมการชักนำยอดรวม การสร้างและการสะสมแอนโธไซยานินที่ก้านใบและใบ การศึกษาในครั้งนี้เห็นได้ว่าไซโตไคนินในรูป TDZ เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ (0.1 มก/ล) มีประสิทธิภาพในการชักนำยอดรวมได้สูงกว่าไซโตไคนินในรูปของ BA หรือ KN หรือ 2i-P ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับการศึกษาในองุ่นพันธุ์มัสคาดีน (*Vitis rotundifolia* Michx) โดย Sudarsono and Goldy (1991) พบว่าตาที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 ถึง 4.5 ไมโครโมลาร์ ให้น้ำหนักเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การชักนำยอดที่ประกอบด้วยข้ออย่างน้อย 3 ข้อ สูงที่สุด สูงกว่าการใช้ BA หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน และการเลี้ยงกอในอาหารสูตรเดิมเติม TDZ ร่วมกับ BA หรือ KN ให้น้ำหนักสดยอดสูงกว่าอาหารเติม BA หรือ KN ตามลำพัง หรือ BA ร่วมกับ KN นอกจากนี้พบว่าการเลี้ยงตาบนอาหารเติม TDZ อย่างเดียวเพียงพอสำหรับการชักนำการเกิดยอด โดยที่ไม่ส่งเสริมการสร้างแคลลัส

Matsubara (1990) รายงานว่า ไซโตไคนินในรูปต่างๆ ให้ผลในการเกิดยอดในหลอดทดลองได้แตกต่างกัน BA, KN และ 2i-P เป็นไซโตไคนินที่อยู่ในรูปของอะดีนีน ($N^R$ -sustituted adenine) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไซโตไคนินในกลุ่มอะดีนินด้วยกันแล้ว Horgan (1987) พบว่า 2i-P มีประสิทธภาพต่ำที่สุด ต่ำกว่า BA และ KN ตามลำดับ ส่วน TDZ เป็นอนุพันธ์ของยูเรียที่มีกิจกรรมของไซโตไคนิน และออกซินร่วมอยู่ด้วยในระดับต่ำ สามารถนำมาใช้แทน BA ในการชักนำยอดรวมในหลอดทดลองในพืชจำพวกไม้เนื้อแข็งหลายชนิดได้เป็นอย่างดี (Kerns and Meyer, 1986; van Nieuwderk *et al.*, 1986; Ellis *et al.*, 1991) นอกจากนี้มีรายงานถึงประสิทธิภาพของ TDZ ที่เหนือกว่า BA ในการชักนำยอดรวมของ *Vitis* spp. (Gray and Klein, 1989) การขยายพันธุ์ของผีเสื้อราตรีในการศึกษานี้ประสบความสำเร็จอย่างสูงจากการใช้ TDZ เพียงลำพัง หรือใช้ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1 มก/ล

## เอกสารอ้างอิง


สมปอง เตชะโต. 2540. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Cooke, R.C. 1977. Tissue culture propagation of african violets. Hort. Sci. 12:549.

Custers, J.B.M. and J.H.W. Bergervoet. Micropropagation of Gloriosa : Towards a practical protocol. Sci. Hort. 57 : 323-334.

Dantu, P.K. and S.S. Bhojwani. 1987. *In vitro* propagation and corm formation in gladiolus. Gartenbauwissen.

Ellis, D.D., H. Barczynska, B.H. McCown and N. Nelson. 1991. A comparison of BA, Zeatin and Thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27 : 281-287.

Gray, D.J. and C.M. Klein. 1989. *In vitro* micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. Proc. Fla. State Hort. Soc. 102 : 221-223.

Greco, B., O.A. Tanzarella, G. Carrozzo and B. Blanco. 1984. Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuum* L.) Plant Sci. Letters 36 : 73-77.

Horgan R. 1987. Plant growth regulators and the control of growth and differention in plant tissue cultures. *In* Plant Biology (*eds.* Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. and Biesboer D.D), Vol. 3., pp. 135-149. New York:Alan R.Liss, Inc.

Kerns, H.R. and M.M Meyer. 1986. Tissue culture propagation of *Acer x freemanii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. Hort. Sci. 21 : 1209-1210.

Matsubara, S. 1990. Structure-activity relationships of cytokinins. Crit. Rev.

Nugent, G., T. Wardley-Richardson, C.Y. Lu. 1991. Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Plant Cell Reports 10 : 477-480.

Rout, G.R. and P. Das. 1997. Recent trends in biotechnology of chrysanthemum : a critical review. Sci. Hort. 69 : 239-257.

Sudarsono and R.G. Goldy. 1991. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia* Hort.Sci. 26 : 304-307.

Takayama, S. and M. Missawa. 1982. Factors affecting differentiation and growth *in vitro* and a mass-propagation scheme for *Begonia x Hiemalis* Hort. Sci. 16 : 65-75.

van Nieuwkerk J.P., R.H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. Hort.Sci. 21 : 516-518.