

การชักนำให้เกิดหลายยอดจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของกุหลาบปารากวัยในสภาพปลอดเชื้อ

Multiple shoot induction from young leaves of Ghost plant *in vitro* culture

มณฑล สงวนเสริมศรี¹, รัฐพร จันทรเดช¹, พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์¹, วารุต อยู่คง¹ และ ภพเก้า พุทธรักษ์^{1*}
Mondhon Sanguansermisri¹, Ruttaporn Chundet¹, Pheravut Wongsawad¹, Warut U-kong¹ and
Phopgao Buddharak^{1*}

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงใบอ่อนกุหลาบปารากวัย (*Graptopetalum paraguayense* E. Walther) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายคลอรีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย สารละลายคลอรีนเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เป็นสภาวะของการฟอกฆ่าเชื้อที่ดีที่สุด มีประสิทธิภาพสามารถฟอกฆ่าเชื้อได้สูงสุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดหลายยอดจากใบอ่อน โดยการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่เติม N⁶ benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA (α -naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการเกิดหลายยอดดีที่สุดที่ 9.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

คำสำคัญ : กุหลาบปารากวัย, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, การชักนำให้เกิดหลายยอด

Abstract

In vitro young leaves cultur of Ghost plant (*Graptopetalum paraguayense* E. Walther) to optimize condition for appropriate surface sterilization was carried out. The leaf surface sterilization by using 10 percent Clorox for 10 minutes followed by 5 percent Clorox for 5 minutes was the best condition with the effectiveness up to 80 percent. The induction of multiple shoot from young leaves was conducted. Young leaves were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with N⁶ benzyladenine (BA) in different of concentrations 0, 1.0, 3.0 and 5.0 mg/L in combination with α -naphthalene acetic acid (NAA) at 0.1 mg/L for a period 6 weeks. The results showed that the MS medium supplemented with 1.0 mg/L BA in combination with 0.1 mg/L NAA caused the best multiple shoots induction with a maximum of 9.6 shoots per explants.

Keywords: Ghost plant, *in vitro* culture, multiple shoot induction

¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

¹ School of Science, University of Phayao, Phayao Province 56000

* Corresponding author e-mail : su_buddha@hotmail.com

Received : 31 July 2012; Accepted: 1 April 2013

บทนำ

กุหลาบปารากวัย *Graptopetalum paraguayense* (N.E. Brown) Walther วงศ์ Crassulaceae มีถิ่นกำเนิดมาจากเม็กซิโก ลักษณะทั่วไปเป็นไม้ล้มลุกสูงได้ถึง 30 เซนติเมตร ใบเรียงเวียนซ้อนกันหลวมๆ คล้ายดอกกุหลาบ ช่อดอกออกตามง่ามใบ กลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอกมีสีขาว มีจุดสีแดงเป็นแถบตามขวางของกลีบ ซึ่งจัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีรูปร่างสวย [7] การขยายพันธุ์ กุหลาบปารากวัยใช้วิธีปักชำแต่ใช้เวลานาน การเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในเวลาที่ยาวนาน นั้นสามารถนำเทคโนโลยีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว ในการขยายพันธุ์กุหลาบปารากวัยจึงทำการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากใบอ่อนของกุหลาบปารากวัยในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อใบอ่อนของกุหลาบปารากวัย

เลือกใบอ่อนกุหลาบปารากวัย ไม่เป็นโรค หรือมีแมลงรบกวน แล้วนำชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบปารากวัย มาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วยสารละลายคลอริกซ์ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ผสม Tween 20 1-2 หยด เป็นเวลา 10 นาที และสารละลายคลอริกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอริกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อใบให้ได้ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงเพาะบนอาหารสูตร Murashige and Skoog [9] ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกการปนเปื้อน จุลินทรีย์ การตายของเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ โดยทำการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนซ้ำที่เกิด (การปนเปื้อน จุลินทรีย์ การตายของเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ) หาค่าด้วยจำนวนซ้ำทั้งหมดคูณด้วยร้อย

การชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกุหลาบปารากวัย

นำเนื้อเยื่อใบอ่อนกุหลาบปารากวัยที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA (N^6 -benzyladenine) ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA (α -naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และจำนวนราก วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ด้วยพิสัยเชิงพหุของดันแคน (Duncan's Multiple Range Test)

การนำต้นอ่อนกุหลาบปารากวัยออกปลูก

นำต้นอ่อนกุหลาบปารากวัยที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อนำออกปลูกลงในกระถางที่ประกอบด้วยดินร่วน ทราย และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1: 1: 1 ในสภาพโรงเรือน รดน้ำให้ชุ่มแล้วเอาใส่ในถุงพลาสติกใสมัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้นเป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ แล้วค่อยเจาะถุงให้มีรูขนาด 1 นิ้ว ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จากนั้นเปิดปากถุงไว้ 1 สัปดาห์ก่อนการบันทึกข้อมูล

ผลการศึกษา

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อใบอ่อนกุหลาบปารากวัย

จากการทดสอบการฟอกฆ่าเชื้อผิวใบอ่อนกุหลาบปารากวัย พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายคลอริกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยคลอริกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที มีประสิทธิภาพต่อการฟอกฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียได้ดีถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และการใช้สารละลายคลอริกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไม่สามารถลดการปนเปื้อนได้ ซึ่งมีการปนเปื้อน 80 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายคลอริกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที สามารถลดการปนเปื้อนได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1 A)

การชักนำให้เกิดยอดจากใบอ่อนกุหลาบปารากวัย

จากการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบปารากวัย เมื่อเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบปารากวัยสามารถชักนำให้เกิดยอดและ

รากได้ บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ทุกสูตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก โดยเฉพาะสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด จำนวน 9.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 1 B) และเกิดรากร่วมด้วย (ภาพที่ 1 C)

ตารางที่ 1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบปารากวัย โดยใช้สารละลายคลอริกซ์

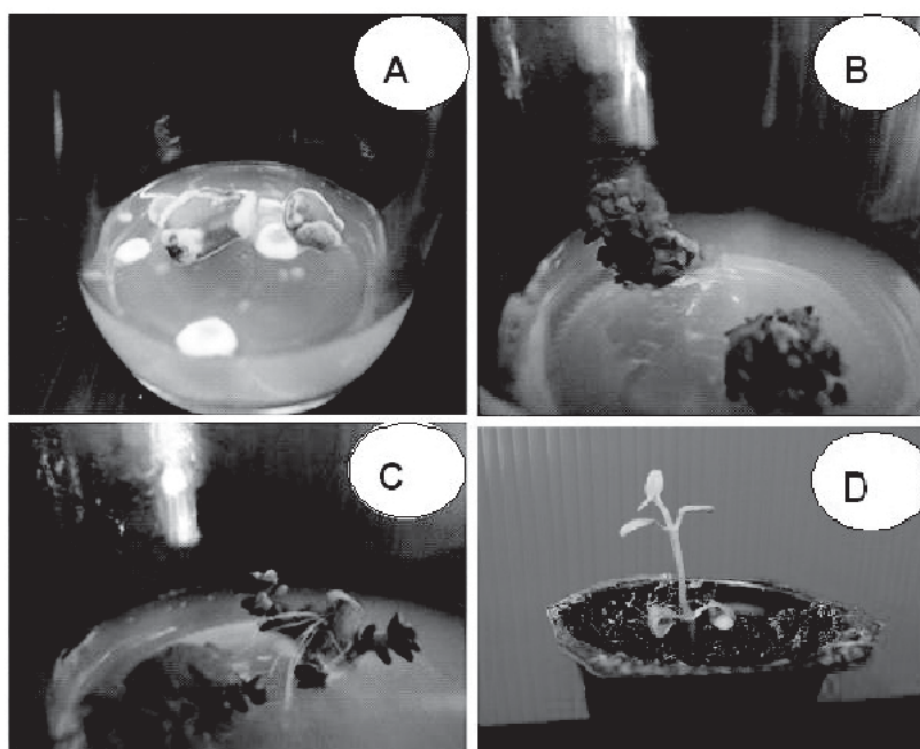
คลอริกซ์ (เปอร์เซ็นต์)	เป็นเวลา (นาท)	การปนเปื้อน (เปอร์เซ็นต์)	การปลอดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
5	10	80 ^c	20 ^a	20 ^b
10	10	70 ^c	30 ^a	30 ^b
20	10	0 ^a	100 ^c	0 ^a
10 และ 5	10 และ 5	20 ^b	80 ^b	80 ^c

ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยทดสอบแบบพหุเชิงพหุของดันแคน (Duncan's Multiple Range Test)

ตารางที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนกุหลาบปารากวัย บนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่างๆ

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นตัวอย่างพืช)	ความยาวยอด เฉลี่ย (ความยาวต่อ ต้นพืช)	จำนวนใบ เฉลี่ย (ใบต่อ ต้นพืช)	จำนวนราก เฉลี่ย (รากต่อ ต้นพืช)
0	0	2.4±0.22 ^b	0.9±0.48 ^{ab}	2.6±0.24 ^b	3.4±0.24 ^b
1.0	0.1	9.6±0.21 ^d	1.5±0.15 ^c	4.6±0.24 ^c	4.6±0.24 ^c
3.0	0.1	4.6±0.23 ^c	1.2±0.12 ^{bc}	3.6±0.24 ^{bc}	3.4±0.24 ^b
5.0	0.1	1.6±0.24 ^a	0.5±0.21 ^a	1.4±0.60 ^a	2.8±0.48 ^a

ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยทดสอบแบบพหุเชิงพหุของดันแคน (Duncan's Multiple Range Test)



ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบปารากวัย A. ชิ้นเนื้อเยื่อใบอ่อนปนเปื้อนเชื้อรา B. ยอดที่เกิดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร C. รากของต้นของต้นกุหลาบปารากวัยที่เกิดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร D. ต้นกุหลาบปารากวัยที่นำออกปลูกลงกระถาง

การปรับสภาพต้นอ่อนกุหลาบปารากวัยออกปลูก ในโรงเรือน

จากการนำต้นอ่อนปารากวัยที่มีลำต้น ใบ และ ราก ออกปลูกลงในกระถางที่ประกอบด้วย ดินร่วนทราย และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1: 1: 1 ในสภาพโรงเรือน เมื่อย้ายปลูกเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ่อนปารากวัยเจริญเติบโตได้ดี โดยมีการแตกของยอดใหม่เกิดขึ้น และมีชีวิตรอดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1 D)

วิจารณ์และสรุปผล

จากการการฟอกฆ่ากุหลาบปารากวัย พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายคลอริกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยคลอริกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที มีประสิทธิภาพต่อการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีถึง 80 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของอัศวิน [8] ที่ใช้สารละลายคลอริกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และตามด้วย

สารละลายคลอริกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที สามารถฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นสารละลายคลอริกซ์ที่ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไม่สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของภาพแก้วและวารุต [3, 4, 5 และ 6] ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไม้ดอกไม้ประดับ และที่สารละลาย คลอริกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที สามารถฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ นฤพร [1] ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกานในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอริกซ์สูงขึ้นตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปจะไม่สามารถทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตต่อไปได้และตายในที่สุด

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบปารากวัยบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น

0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลทำให้จำนวน และความยาวยอดของกุหลาบปารากวัยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ใบอ่อนกุหลาบปารากวัย มีการสร้างยอดจำนวนมากที่สุดคือ 9.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อเช่นกับงานวิจัยของปิยะพร และ นุชมะณี [2] ที่ศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการเกิดแคลลัสและยอดของผักชีข้าง โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นแคลลัสให้เกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างยอดได้ 4.60 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างยอดได้ 1.60 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ มีรายงานการศึกษาถึงผลการใช้สารควบคุม การเจริญ เติบโตชนิดไซโตไคนินร่วมกับออกซิน โดยเฉพาะ BA ร่วมกับ NAA ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดการแตกตายอดใหม่ จากการเลี้ยงชิ้นส่วน hypocotyls ของ *Portulaca grandiflora* [10] การกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Lycium barbarum* [11]

เอกสารอ้างอิง

1. นฤพร พรรษคุณาพัฒน์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกาโนในสภาพปลอดเชื้อ. [ปัญหาพิเศษปริญญาตรี] ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2541.
2. ปิยะพร แสนสุข และ นุชมะณี สุดดี. อิทธิพลของ NAA และ BA ต่อการเกิดแคลลัส และยอดของผักชีข้าง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 2547; 9(2):39-31.
3. ภพแก้ว พุทธิรักษ์ และวารุต อยู่คง. การขยายพันธุ์โมกพวง พุดจิบ รักขาว และรักม่วงโดยเทคนิค

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2555; 4(7): 7-13.

4. ภพแก้ว พุทธิรักษ์ และวารุต อยู่คง. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อน และปลายยอดโมกพวงในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิชาการเกษตร. 2554; 29 (3). 1-6.
5. ภพแก้ว พุทธิรักษ์ และวารุต อยู่คง. การอนุรักษและการขยายพันธุ์มะคังขาว และผักหวานบ้านด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร. 2554; 19(3): 1-7.
6. ภพแก้ว พุทธิรักษ์ และวารุต อยู่คง. อิทธิพลของ Thidiazuron (TDZ) และ 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และยอดของใบอ่อนพุดจิบ (*Tabernaemontana divaricata* L.) ในสภาพปลอดทดลอง. วารสารวิชาการเกษตร. 2554; 2 (29): 161-169.
7. ราชบัณฑิตยสถาน. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: เพื่อนพิมพ์; 2538.
8. อัศวิน ธาระปัด. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและใบอ่อนของมะลิ (*Jasminum* spp.). [ปัญหาพิเศษปริญญาตรี] สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2553.
9. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 1962; 15:73-497.
10. Hu Z, Guo GQ, Zhao DL, Li LH. Zheng GC. Shoot regeneration from cultured leaf explants of *Lycium barbarum* and *Agrobacterium*-mediated transformation. Russian J. Plant Physiol 2001; 48(4):453-458.
11. Yang ZH, Jin H, Plaha P, Woong BT, Jiang GB, Woo JG, Yun HD, Lim YP, Lee HY. An improved plant regeneration protocol using cotyledonary explants from inbred lines of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). J. Plant Biotechnol 2004; 6(4):235-239.