ว. วิชาการ กษ. 4 : 181–185 (2529)

การชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วย

เบญจมาศ ศิลาย้อย[1] และ O.L. Gamborg[2]

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงแคลลัส เซลล์ หรือโพรโทพลาสต์ อาจทำให้เกิดการผันแปรมากกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดของกล้วย การเกิดการผันแปรที่เกิดในลักษณะที่ดีเป็นที่ต้องการอย่างยิ่งของนักปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนั้น การทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วย โดยใช้ชิ้นส่วนของแผ่นใบ ก้านใบ และราก มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ B_5 ที่เพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D; 2,4,5-T, IAA, NAA และ Dicamba ที่ความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 ppm ทุก ๆ ความเข้มข้นเพิ่ม BA เข้มข้น 0.5, 2 และ 5 ppm ตามลำดับ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26°ซ แสงประมาณ 2,000 ลักซ์. จากผลการทดลองพบว่าเฉพาะแผ่นใบเท่านั้นที่มีแคลลัสเกิดขึ้น โดยเกิดประมาณ 50% และสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้คือ MS ที่เพิ่ม NAA และ BA เท่านั้น และความเข้มข้น (ppm) ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส คือ 1NAA + 5BA, 2.5NAA + 2BA, 2.5NAA + 5BA, 5NAA + 5BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 50% ส่วน 1NAA + 2BA และ 5NAA + 2BA เกิดแคลลัสได้ 20% เมื่อนำเอาแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เพิ่ม BA พบว่า BA มีความเข้มข้น 2.5 ppm สามารถกระตุ้นให้เกิดต้นได้ 30% และเมื่อย้ายต้นอ่อนลงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ พบว่าทุกต้นสามารถเกิดรากได้ดี

กล้วยเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชีย แต่ปัจจุบันจะเห็นได้ว่ามีการปลูกกล้วยอยู่ทั่วไปในแถบที่มีอากาศร้อนแล่ะชื้น เช่น แถบอเมริกากลาง อเมริกาใต้ และออสเตรเลีย การวิวัฒนาการและการกระจายพันธุ์ของกล้วยได้เกิดขึ้นมานานแล้ว จากกล้วยที่มีเมล็ดมากมายมาเป็นกล้วยที่ไม่มีเมล็ดในปัจจุบัน ทั้งนี้เพราะเกิดจากการผสมพันธุ์ กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ทำให้ได้พันธุ์กล้วยที่ดีหลายพันธุ์ด้วยกัน (Simmonds, 1962) ปัจจุบันได้มีการทดลองผสมพันธุ์กล้วยเพื่อให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดและโรคตายพรายกันอย่างมากในแถบที่มีโรคระบาด เช่น ในแถบอเมริกากลาง แต่ยังไม่ได้พันธุ์ที่ดีตามความต้องการ ดังนั้น การได้พันธุ์ที่มีคุณภาพดีและต้านทานโรคจึงเป็นที่ปรารถนาของนักปรับปรุงพันธุ์กล้วย (Rowe and Richardson, 1975) การทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้ได้กล้วยพันธุ์ใหม่ ดังเช่น De Guzman et al. (1980) ได้ทำการอาบรังสีแกมมากับหน่อกล้วย แล้วนำปลายยอดไปทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และปาริชาติและคณะ (2525) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดกล้วยแล้วอาบรังสีแกมม่า พบการกลายพันธุ์เกิดขึ้นที่ลักษณะใบและลำต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยเป็นวิธีการที่ดีในการขยายพันธุ์กล้วย เพราะเป็นการเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และได้ผลตรงตามพันธุ์ (ปาริชาติและคณะ, 2525; Cronauer and Krikorian, 1984; Damasco and Barba, 1984) จากการเพิ่มปริมาณได้อย่างมากนี้เองทำให้ Hwang and Ko (1986) แห่งสาธารณรัฐจีนพบว่าการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดของกล้วยสามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้ในกล้วยหอมถึง 3% จากต้นที่ได้ทั้งหมด 46,260 ต้น ลักษณะที่เกิดการผันแปร ได้แก่ ลักษณะของลำต้น ใบ และเขายังพบต้นที่มีความต้านทานต่อโรคตายพรายซึ่งกำลังระบาดอยู่ในสาธารณรัฐจีนอีกด้วย จะเห็นได้ว่า ความผันแปรที่เกิดขึ้นในทางที่ดีเป็นที่ต้องการอย่างยิ่งของนักปรับปรุงพันธุ์พืช ความผันแปรหรือการกลายพันธุ์นี้พบมากในการเพาะเลี้ยงแคลลัส เซลล์ โพรโทพลาสต์ มากกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอด (Krikorian, 1986) การเพาะเลี้ยงแคลลัสจะประสบความสำเร็จถ้าหากเลือกใช้ชิ้นส่วนของพืชที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและสาร

[1]รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กท. 10903

[2]Associate Director, Tissue Culture for Crop Projects, Colorado State University, Fort Collins, CO. 80523, USA.

ควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ (Evan et al., 1981) อาหารสูตร MS และ B_5 ได้ผลดีมากกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์ สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ได้ผลดีกับการเลี้ยงแคลลัสคือ 2,4-D ในความเข้มข้น 1-5 μM นอกจากนี้ 2, 4,5-T และ Picloram ร่วมกับ Kinetin จะช่วยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น อนึ่ง การใช้น้ำมะพร้าว 2% และ L-glutamin 2-4 mg/l ให้ผลดีกับพืชบางชนิด (Gamborg and Shyluk 1981; Gamborg, 1984)

การทดลองครั้งนี้จึงมุ่งหวังให้ได้แคลลัสของกล้วยเพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการขยายพันธุ์ และการทำให้เกิดการผันแปรในกล้วยเพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยที่ดีต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. **การชักนำให้เกิดแคลลัส** ตัดแผ่นใบขนาด 2 x 6 มม. ก้านใบและรากของกล้วยหอม (AAA, ที่ได้จากการปลูกในสภาพปลอดเชื้อ) ยาว 2 มม. เลี้ยงในอาหารกึ่งเหลวสูตร MS และ B_5 (Evan et al., 1981) ซึ่งเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชคือออกซินผสมกับไซโตไคนิน สำหรับออกซินใช้ 2,4-D, 2,4,5-T, IAA, NAA และ Dicamba ที่ความเข้มข้น 1,2.5 และ 5 ppm ทุกความเข้มข้นของออกซินจะผสมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 2 และ 5 ppm ตามลำดับ ปรับความเป็นกรดเป็นด่างด้วย NaOH ให้ได้ pH 5.8 นำชิ้นส่วนของพืชที่เลี้ยงในอาหารดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 26°ซ แสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ทำการตรวจสอบทุกสัปดาห์ดังนี้

1.1 ชิ้นส่วนของพืชที่สามารถเกิดแคลลัสได้ดี

1.2 สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

2. **การกระตุ้นให้เกิดลำต้นและรากจากแคลลัส**

2.1 การกระตุ้นให้เกิดลำต้น ทำการย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตร MS ที่เพิ่ม BA ที่มีความเข้มข้นดังนี้

1) Control (MS ที่ปราศจาก BA)

2) MS + 2.5 ppm BA

3) MS + 5.0 ppm BA

4) MS + 10.0 ppm BA

2.2 การกระตุ้นให้เกิดราก ทำการย้ายต้นอ่อนจาก 2.1 ลงในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

1.1 การทดลองชิ้นส่วนของพืช

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของแผ่นใบ ก้านใบ และราก ลงในอาหารสูตรต่าง ๆ แล้ว 1 เดือน พบว่าแคลลัสเกิดขึ้นได้บนแผ่นใบเท่านั้น (ภาพที่ 1-A) ไม่พบที่ก้านใบหรือรากเลย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของพืช

ชิ้นส่วนของพืช	จำนวนแคลลัส (%)
แผ่นใบ	50
ก้านใบ	0
ราก	0

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า โอกาสที่แคลลัสเกิดขึ้นได้ที่บนแผ่นใบอย่างเดียวนั้น มีโอกาสเกิดได้เพียง 50% เท่านั้น ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความแก่อ่อนของใบซึ่งมีโอกาสทำให้เกิดแคลลัสได้ต่างกัน แต่สำหรับก้านใบและรากหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ แล้วมีอาการคล้ายคลึงกันคือจะเปลี่ยนสีเป็นสีดำ อาจเนื่องมาจากสาร phenolic ที่อยู่ที่ชิ้นส่วนดังกล่าว

1.2 สูตรอาหาร

จากการเปรียบเทียบสูตรอาหาร MS และ B_5 พบว่า MS มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดแคลลัสบนใบได้ แต่ต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 2) สำหรับ MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชิ้นส่วนของแผ่นใบจะมีอาการเช่นเดียวกันกับ B_5 ที่มีหรือไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ จะมีสีดำเพราะสาร phenolic

ตารางที่ 2 การตอบสนองของชิ้นส่วนของพืชกับอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

สูตรอาหาร	จำนวนแคลลัส (%)
MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต	0
MS + สารควบคุมการเจริญเติบโต	25
B_5 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต	0
B_5 + สารควบคุมการเจริญเติบโต	0

จากตารางที่ 2 แสดงว่าอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้ใบเกิดแคลลัสได้ 25% จำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งจะกล่าวต่อไป

1.3 ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและความเข้มข้นที่เหมาะสม

จากการทดลองที่ 1.2 แสดงให้เห็นว่า MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และจากการทดลองพบว่าเฉพาะ NAA ที่ความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 ppm ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 5.0 ppm จะช่วยชักนำให้เกิดแคลลัส สำหรับออกซินชนิดอื่นไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสบนแผ่นใบกล้วยที่อาหารสูตร MS ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต

BA (ppm)	MS+ 2,4-D (ppm)			2,4,5-T (ppm)			IAA (ppm)			NAA (ppm)			Dicamba (ppm)		
	1	2.5	5	1	2.5	5	1	2.5	5	1	2.5	5	1	2.5	5
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	50	20	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	50	0	0	0

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าถ้าความเข้มข้นของ BA มากกว่า NAA โอกาสเกิดแคลลัสมากกว่า NAA ที่ความเข้มข้นมากกว่า BA

2. การกระตุ้นให้เกิดต้นและรากจากแคลลัส

2.1 การกระตุ้นให้เกิดลำต้น

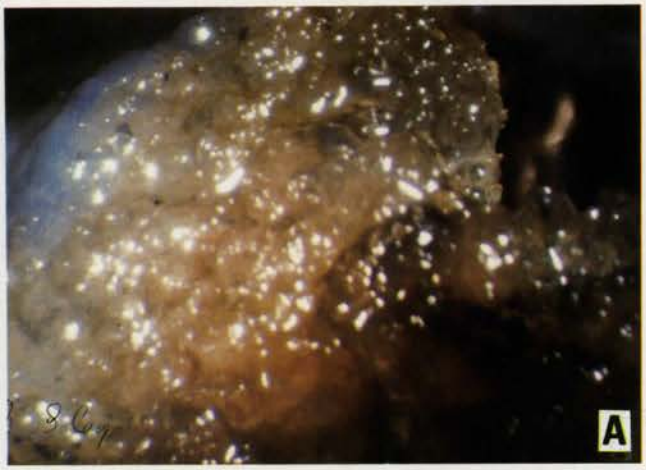
ย้ายแคลลัสที่อายุประมาณ 1 เดือน ลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ผสม BA ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5 และ 10 ppm พบว่าถ้าผสม BA ที่ความเข้มข้น 2.5 ppm ทำให้เกิดลำต้นได้ 30% ส่วนที่ความเข้มข้น 5.0 ppm เกิดลำต้นเพียง 0.50% เท่านั้น และที่ 0 และ 10 ppm ไม่เกิดลำต้นเลย (ตารางที่ 4) ดังนั้นการกระตุ้นให้เกิดลำต้นควรใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้นประมาณ 2.5 ppm (ภาพที่ 1–B)

ตารางที่ 4 อัตราการเกิดลำต้นจากแคลลัส

สูตรอาหาร	จำนวนต้น (%)
OMS	0
MS + 2.5 ppm BA	30.0
MS + 5 ppm BA	0.5
MS + 10 ppm BA	0

2.2 การกระตุ้นให้เกิดราก

หลังจากย้ายต้นอ่อนลงในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าต้นอ่อนดังกล่าวเกิดรากได้ดีทุกต้น (ภาพที่ 1–C)



ภาพที่ 1 *(A, B และ C)* **การเกิดแคลลัส ลำต้นและรากของกล้วยจากการชักนำและเพาะเลี้ยง**

A. **แคลลัสที่เกิดขึ้นบนแผ่นใบ (32 *x*)**

B. **การเกิดลำต้นจากแคลลัส (8 *x*) และ**

C. **การเกิดราก**

สรุป

การทดลองครั้งนี้พบว่า การใช้ชิ้นส่วนของแผ่นใบกล้วยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA และ BA สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้ และแคลลัสสามารถกระตุ้นให้เกิดลำต้นได้มากที่อาหารสูตร MS ซึ่งผสม BA ที่ความเข้มข้น 2.5 ppm และลำต้นจะเกิดรากได้ก็เมื่อย้ายลงในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

เอกสารอ้างอิง

ปาริชาติ นุกูลการ เบญจมาศ ศิลาย้อย และ อรดี สหวัชรินทร์. 2525. ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์กับการเพาะเลี้ยงกล้วยหอมในสภาพปลอดเชื้อ รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 22 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Cronauer, S.S. and A.D. Krikorian. 1984. Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. Hort. Science 19(2): 234-235.

De Guzman, E.V., A.C. Decena and E.M. Ebald. 1980. Plantlet regeneration from unirradiated and irradiated banana shoot tip tissue cultured *in vitro*. Phil. Agric. 63: 140-146.

Domasco, O.P. and R.C. Barba. 1984. *In. vitro* culture of SABA banana (*Musa sp.* CV SABA BBB). Phil, Agric. 67: 351-358.

Evan, D.A., W.R. Sharp, and C.E. Fleck. 1981. Growth and behavior of cell culture embryogenesis and organogenesis. In. Plant Tissue culture Method and Application in Agriculture. Ed. Thorpe, T.A. Academic Press. pp. 45-113.

Gamborg, O.L. and J.P. Shyluk. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue culture. In. Plant Tissue culture Method and Application in Agriculture. Ed. Thorpe, T.A. Academic Press. pp. 21-44.

Gamborg, O.L. 1984. Plant cell culture: nutrition and media. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Ed. Vasil, I.K. Academic Press, pp. 19-26.

Hwang, S.C. and W.H. Ko. 1986. Somaclonal variation *in vitro* of banana and its application for screening for resistance to *Fusarium* wilt. In: ACIAR Proceedings No. 21, pp. 151-156.

Krikorian, A.D. 1986. Callus and cell culture, somatic embryogenesis, androgenesis and related techniques for banana improvement. In: ACIAR Proceedings No. 21, pp. 128-135.

Rowe, P.R. and D.L. Richardson. 1975. Breeding bananas for disease resistance, fruit quality and yield. Bull. SIATSA, Hondurus 2.

Simmonds, N.W. 1962. The Evaluation of the Banana. Longman. London.

Callus Induction in Banana

By

Benchamas Silayoi and O.L. Gamborg

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen, Bangkok, Thailand 10900

ABSTRACT

Greater plantlet variability is obtained from culture based on callus induction and protoplast procedures, relative to the culture of meristem and shoot tips. This study aimed to determine the optimal growth regulator concentrations for the induction of callus from banana explants. Leaf blades, petioles and root material were cut into segments and cultured in MS and B_5 media with treatments of 1, 2.5 and 5 ppm of 2,4 -D, 2,4,5-T, IAA, NAA and Dicamba. Superimposed on these treatments was BA in concentrations of 0.5, 2 and 5 ppm. All cultures were initiated under light conditions of about 2,000 lux and a temperature of 26°C. Callus induction was observed after one month. Calli occurred in 50 percent of the leaf blade cultures, while petiole and root cultures turns black and died.

The most suitable media for callus induction was MS with NAA or BA. A rate of 50 percent induction was achieved in MS with 1 ppm NAA + 5 ppm BA, 2.5 ppm NAA + 2 ppm BA, 2.5 ppm NAA + 5 ppm BA, 5 ppm NAA + 5 ppm BA; a 20 percent callus induction rate was obtained in the MS media with 1 ppm NAA + 2 ppm BA, and 5 ppm NAA + 2 ppm BA.

When the calli were transferred to regeneration media, 30 percent were regenerated in the MS media with 2.5 ppm BA., When the established shoots were transferred to MS media, all rooted.