

การเพิ่มจำนวนกาบหอยแครงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation of *Dionaea muscipula* by Tissue Culture

อัญชลี จาละ* และสโรธร ไพฑูรย์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

กาบหอยแครง (*Dionaea muscipula*) เป็นพืชกินแมลงที่ดักจับและย่อยกินเหยื่อที่จับได้ ปัจจุบันมีการปลูกเลี้ยงและใช้เป็นไม้ประดับมากขึ้นเนื่องจากความสวยงามของกาบ แต่การขยายพันธุ์ยังทำได้ยาก ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเพิ่มจำนวนด้วยการนำส่วนของกาบและใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร $1/2$ Murashige and Skoog (MS) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต benzyl adenine (BA) ที่ 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อ กาบหอยแครงสามารถพัฒนาเป็นแคลลัส เกิดขึ้นที่บริเวณขอบและผิวหน้าของเนื้อเยื่อ กาบและใบอ่อน และอาหารสูตร $1/2$ MS ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยปริมาณแคลลัสและความเข้มของสีแดงของแคลลัสสูงที่สุด และเมื่อย้ายแคลลัสสีแดงนี้ลงอาหารสูตรเดิมอีก 3 ครั้ง ทุก ๆ 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร $1/2$ MS ที่เติม 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA มีผลทำให้แคลลัสพัฒนาเกิดเป็นต้นและรากได้สูงสุด

คำสำคัญ : กาบหอยแครง, benzyl adenine (BA)

Abstract

Dionaea muscipula is a carnivorous plant. This plant is widespread and more ornamental due to their beauty and distinctive features of the leaves. Recently, interested in *Dionaea muscipula* has been rising and resulting in developing systemic propagation for it. This study aimed to employ tissue culture system to propagate them. Young leaves of *Dionaea muscipula* were used as explants for in vitro propagation. Explants were cultured on $1/2$ Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various concentration (0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 mg/l) of benzyl adenine (BA). After cultured explants for 6 weeks, red callus had occurred at the edge and surface of explants. $1/2$ MS supplemented with 1.0 mg/l BA was the best medium which gave the highest average number and red callus. When subcultured red callus every 3 weeks for 3 times into the same medium, shoots and roots were developed from red callus and the best medium for developed shoot and root was $1/2$

MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA.

Keywords: *Dionaea muscipula*, benzyl adenine (BA)

1. คำนำ

Dionaea muscipula เป็นพืชที่อยู่ในอันดับ Caryophyllales และอยู่ในวงศ์ Droseraceae สกุล *Dionaea* ซึ่งบรรพบุรุษนั้นมีรูปร่างคล้ายกับสกุล *Drosera* หรือชื่อไทยว่า “หยาดน้ำค้าง” ซึ่งเป็นหนึ่งในพืชกินแมลงเช่นกัน

Beebe (1980) ได้ศึกษาการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตในกาบหอยแครง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ซึ่งประกอบไปด้วย NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^{-5} - 1×10^{-8} โมลาร์ ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^{-5} - 1×10^{-7} มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสนั้นสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นพร้อมรากได้ ต่อมา Jang และคณะ (2003) ได้เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกาบหอยแครง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเพื่อชักนำให้เกิดยอด โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินและออกซิน พบว่าอาหารสูตร $1/3$ MS ที่ประกอบไปด้วยไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เป็นจำนวนมาก หลังจากนั้นย้ายเปลี่ยนอาหารที่มีการใส่ออกซินเพื่อศึกษาการเกิดรากของกาบหอยแครง พบว่าอาหารสูตร $1/3$ MS ที่ประกอบไปด้วย IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดสูงถึง 22 % ส่วน Grevenstuck และคณะ (2010) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนในต้นหยาดน้ำค้าง โดยการใส่โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) และใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ จากการวิจัยพบว่าต้นหยาดน้ำค้างมีปริมาณการเกิดยอดเป็นจำนวนมาก ในอาหารที่มีสารอาหารต่าง ๆ คือ

อาหารสูตร $1/4$ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไคเนติน พบว่าไม่มีผลต่อการเกิดยอดของต้นหยาดน้ำค้าง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบต้นอ่อนที่มียอดและรากสมบูรณ์สามารถนำออกปลูกในสภาวะแวดล้อมภายนอกได้ และวรรณ (2553) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นปัญจันธ์ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.05, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อมีการพัฒนาเป็นยอดและอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและค่าเฉลี่ยความสูงสูงสุด

2. อุปกรณ์และวิธีการ

กาบและใบอ่อนของกาบหอยแครงฟอกด้วยสบู่เหลวให้ทั่ว และล้างสบู่ออกจากกาบและใบอ่อนออกภายใต้ลำโพงเป็นเวลา 2 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 3 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (sodium hypochlorite) เข้มข้น 20 % เป็นเวลา 20 นาที และฟอกครั้งที่ 2 ด้วยสารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 5 % เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างใบอ่อนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อและส่วนปลายที่สัมผัสสารละลายคลอโรกซ์ออก เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของกาบและใบอ่อนกาบหอยแครงบนอาหารแข็งสูตร $1/2$ MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปรับความเป็นกรด-เบสที่ 5.7 เติม Phytigel® 2.5 กรัมต่อลิตร ฝังเข้าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C เป็นเวลา 20 นาที และนำเนื้อเยื่อต้มภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายเนื้อเยื่อที่เจริญจากใบอ่อนลงอาหารเดิมจำนวน 2 ครั้ง ทุก ๆ 3 สัปดาห์ และหลังจากเกิดแคลลัสแล้วย้ายแคลลัสลงอาหารเดิม จำนวน 3 ครั้ง ทุก ๆ 3 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นอ่อน

วิเคราะห์ผลการวิจัยด้วยวิธีทางสถิติ โดยนำผลที่ได้จากวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มาวิเคราะห์ผลค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยใช้วิธี Tukey test

3. ผลการวิจัย

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของกาบและใบอ่อนของกาบหอยแครงที่พัฒนาไปเป็นแคลลัส พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในด้าน ขนาดและสีแดงของแคลลัสที่เกิดขึ้นบริเวณของและผิวหน้าของกาบและใบอ่อนของกาบหอยแครง ซึ่งการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบและใบอ่อนของกาบหอยแครงบนอาหารสูตร $1/2$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าในสัปดาห์ที่สอง แคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีคล้ำดำหลังจากเปลี่ยนอาหาร 1 ครั้ง พบว่าในสัปดาห์ที่สี่ขนาดของแคลลัสค่อยขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นและสีของแคลลัสก็ค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีแดงขึ้นมา ซึ่งขนาดและสีของแคลลัสที่เกิดขึ้นในแต่ละความเข้มข้นของ BA พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และแคลลัสที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมาก

ที่สุด คือ 0.55 เซนติเมตร และระดับค่าเฉลี่ยความเข้มของสีแดงที่เกิดขึ้นบนแคลลัสเข้มมากที่สุด คือ 2.2 ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของ BA ที่มีต่อขนาดและสีของแคลลัสของกาบหอยแครงหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มล./ล)	ขนาดแคลลัส* (ซม.)	ระดับสีแดง* (สีแดง)*
0.0	$0.0 \pm 0.00c$	$0.0 \pm 0.00c$
0.1	$0.29 \pm 0.28ab$	$1.2 \pm 0.79ab$
0.2	$0.40 \pm 0.42ab$	$0.80 \pm 0.79a$
0.5	$0.16 \pm 0.18a$	$0.90 \pm 0.99a$
1.0	$0.55 \pm 0.25b$	$2.20 \pm 0.79b$

*มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $p \leq 0.05$ Ab ในแถวเดียวกัน เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ความเข้มของสีแดง : 1 - แดงอ่อน, 2 - แดงเข้ม, 3 - แดงเข้มเกือบดำ

หลังจากย้ายแคลลัสสีแดงนั้นลงบนอาหารสูตรเดิม ทุก ๆ 3 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาเป็นต้นพร้อมราก การตรวจนับจำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากที่เกิดขึ้นมาใหม่ในแต่ละความเข้มข้นของ BA เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ไม่ส่งผลต่อความสูงของต้นด้วยดังตารางที่ 2 ซึ่งจากตารางจะเห็นได้ว่าการพัฒนาของแคลลัสเป็นต้นอ่อนพร้อมรากในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 และ 0.5 มล./ล ให้ผลในด้านค่าเฉลี่ยความสูงอยู่ในช่วง 0.96-0.93 ซม. เช่นเดียวกับความยาวราก คือ 0.98 และ 0.96 ซม. ตามลำดับ ส่วนจำนวนใบพบว่า BA เข้มข้น 0.1,

0.2 และ 0.5 มล./ล ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบใกล้เคียงกัน คือ 2.2-2.3 ใบ แต่จำนวนรากพบว่า BA เข้มข้น

0.5 มล./ล ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนรากสูงสุด คือ 5.9 ราก

ตารางที่ 2 ผลของ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของกาบหอยแครงในด้านความสูง จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 9 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มล./ล)	ความสูงของต้น (ซม.) ^{ns}	จำนวนใบ (ใบ) ^{ns}	จำนวนราก (ราก) ^{ns}	ความยาวราก (ซม.) ^{ns}
0.0	0.24 ± 0.23	0.05 ± 0.56	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
0.1	0.96 ± 0.36	2.20 ± 0.42	3.60 ± 2.01	0.98 ± 0.57
0.2	0.85 ± 0.42	2.30 ± 1.06	4.40 ± 3.24	0.69 ± 0.55
0.5	0.93 ± 0.36	2.30 ± 0.67	5.90 ± 2.64	0.96 ± 0.50
1.0	0.58 ± 0.47	1.70 ± 1.34	3.20 ± 3.29	0.69 ± 0.53

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

4.วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาบหอยแครงนี้ ใช้ส่วนของกาบใบและใบอ่อนในการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับ Beebe (1980) และ Minocha (1985) ใช้ส่วนของใบกาบหอยแครง แต่ Teng (1999) ใช้ก้านช่อดอกในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และในการวิจัยครั้งนี้ใช้อาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้นเพียงครั้งเดียว ($1/2$ MS) แต่จากการทดลองของ Tang และคณะ (2003) ใช้อาหารสูตร MS เหมือนกัน แต่ใช้ความเข้มข้นเพียงหนึ่งในสาม ($1/3$ MS) และ Crouch และ van Staden (1988) พบว่าอาหารสูตร MS เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์กาบหอยแครงมากที่สุด และมีการใช้ BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตทดลองชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคลลัสที่มีสีแดงสูงสุด และเมื่อย้ายแคลลัสนี้ลงบนอาหารเดิมอีก 3 ครั้ง ทุก ๆ 3 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อนจำนวนมาก แต่ Tang และคณะ (2003) ใช้ kinetin เข้มข้น 2.3 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิดต้นได้สูงสุด ส่วน Parlman และคณะ (1982) ใช้

อาหารสูตร $1/2$ MS ร่วมกับ NAA 1.9 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงกาบหอยแครง พบว่าสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนของลำต้นใต้ดิน (rhizome) เกิดเป็นต้นใหม่พร้อมรากได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองของ Hutchinson (1984) ใช้ส่วนของยอดกาบหอยแครงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS (Linsmaier and Skoog) (1965) ที่เติม kinetin 10 ไมโครโมล ร่วมกับ NAA 0.5 ไมโครโมล ปรากฏว่าเกิดยอดใหม่สูงสุด ซึ่งการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทำให้เกิดการตอบสนองในระดับเซลล์ โดยไซโตไคนินจะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดยอด ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นจะต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในปริมาณที่พอเหมาะและเหมาะสมต่อเนื้อเยื่อพืชที่ใช้เพราะหากใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มากเกินไป อาจมีผลทำให้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนั้นไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชก็เป็นได้ (พีรเดช, 2529)

5. สรุป

การเพาะเลี้ยงกาบและใบอ่อนของกาบหอยแครงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยขนาดและความเข้มของสีแดงของแคลลัสสูงสุด คือ 0.55 เซนติเมตร และ 2.2 ตามลำดับ และเมื่อย้ายแคลลัสสีแดงนั้นลงบนอาหารสูตรเดิมทุก ๆ 3 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้งพบว่ามียอดอ่อนพร้อมรากเกิดขึ้นสูงสุด และความเข้มข้นของ BA ในแต่ละสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อความสูงของต้น จำนวนใบ จำนวนราก ความยาวรากที่เกิดขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

6. เอกสารอ้างอิง

- พีรเดช ทองอำไพ, 2529, ฮอโรโมนพืชและการสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไดนามิคการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- วรรณมน เพชรพูนภรณ์, 2553, ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, BA และ 2,4-D ที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นปัญจชันในสภาพปลอดเชื้อ, โครงการงานพิเศษ, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Beebe, J.D., 1980, Morphogenetic responses of seedlings and adventitious buds of the carnivorous plant *Dionaea muscipula* in aseptic culture, *Botanical Gazette* 141: 396-400.
- Crouch, I.J. and van Staden, J., 1988, *In vitro* propagation of *Drosera natalensis*, *S. Afr. J. Bot.* 54: 94-95.
- Grevenstuck, T., Coelho, N., Gonçalves, S. and Romano, A., 2010, *In vitro* propagation of *Drosera intermedia* in a single step, *Biologia Plantarum* 54: 391-394.
- Hutchinson, J.F., 1984, *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus Fly Trap), *Sci. Hortic.* 22: 189-194.
- Jang, G.W., Kim, K.S. and Park, R.D., 2003, Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 95-98.
- Jang, G.W. and Park, R.D., 1999, Mass propagation of sundew, *Drosera rotundifolia* L. through shoot culture, *J. Plant Biotechnol.* 2: 97-100.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F., 1965, Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture, *Physiol. Plant* 18: 100-127.
- Minocha, S.C., 1985, *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula*, *Hort. Sci.* 20: 216-217.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 1: 474-497.
- Parlman, B.J., Evans, P.T. and Rupert, E.A., 1982a, Tissue culture of single rhizome explant of *Dionaea muscipula* Ellis ex. L., the Venus Fly-trap, for rapid asexual propagation, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 107: 305-310.
- Parlman, B.J., Evans, P.T. and Mazur, A.R., 1982b, Adventitious bud differentiation and development in leaf culture of

Dionaea muscipula Ellis ex. L. (Venus Fly-trap) cultured *in vitro*, J. Am. Soc. Hortic. Sci. 107: 310-316.

Teng, W.L., 1999, Source, etiolation and orientation of explants affect *in vitro* regeneration of Venus fly-trap (*Dionaea muscipula*), Plant Cell Rep. 18: 363-368.