เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุกเพื่อการขยายพันธุ์[1]

In Vitro Propagation of *Amorphophallus oncophyllus*

กษิดิศ ดิษฐบรรจง มงคล เกษประเสริฐ
ชยานิจ ดิษฐบรรจง เสาวนี เขตสกุล

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

Bulbs of elephant jam (*Amorphophallus oncophyllus*) were collected from Chiangmai and planted for new shoots emerging in summer. After the shoot of 5 inches emerged and the sheath still unopened, tissues from the base of stalks, base of leaves and also from the leaves were taken and sterilized followed by cultured on MS media containing 6 levels of BA 0, 5, 10, 15, 20 and 25 μM. The experimental design was 5 replicated 3 x 6 factorial in CRD. It was found that at BA concentration of 5 and 10 μM, explant from the stalk gave the highest shoot induction, i.e. 7.1 - 7.3 microshoots per explant.

Concentration of appropriate plant growth regulator to increase number of microshoot was studied by culturing *in vitro* microshoots induced from base of stalk, base of leaves and leaves on MS media containing 0, 5, 10, 15 and 25 μM of BA. The result indicated that the base of microshoots showed the highest shoot induction, 7.8 - 8.2 shoots per explant on 5 and 10 μM BA within 2 months. When the root immerged after 2 - 3 months later, the shoots of 8 - 10 cm. were planted in the pots in greenhouse condition for acclimatization. Survival rate was 90 - 95 percent.

บทคัดย่อ

รหัสกิจกรรม 05-01-47-05
รหัสการทดลอง 05-01-47-0507

รวบรวมหัวพันธุ์บุกเนื้อทรายจาก จ.เชียงใหม่ มาปลูกเพื่อรอให้แทงหน่อในฤดูร้อน หลังจากหน่ออ่อนยาวประมาณ 5 นิ้ว ในขณะที่กาบใบยังไม่เปิด นำส่วนต่างๆ ได้แก่ โคนต้น โคนใบ และใบ มาฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของ BA ที่ระดับต่างๆ 6 ระดับ ได้แก่ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 μM วางแผนการทดลองแบบ 3 x 6 factorial in CRD 5 ซ้ำ พบว่า ความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 5 - 10 μM ส่วนโคนต้นมีจำนวนยอดรวมสูงสุด คือ 7.1 - 7.3 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช

ศึกษาความเข้มข้นของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนของบุก โดยการนำ *in vitro* microshoot ที่เกิดจากการชักนำส่วนโคนต้น โคนใบ และใบ มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 μM เพื่อหาอัตราความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ หรือการแตกยอด พบว่าส่วนโคนต้นของ microshoot ชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้ดีที่สุด 7.8 - 8.2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช บนอาหารที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 5-10 μM ภายในเวลา 2 เดือน และสามารถออกรากได้เองเมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 2 - 3 เดือน หลังจากนั้นนำต้นอ่อน ที่สูงประมาณ 8 - 10 ซม.ลงปลูกในกระถางในสภาพโรงเรือนทดลอง เพื่อปรับสภาพแวดล้อม และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงถึง 90 - 95 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

บุกเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเขตร้อนในทวีปเอเชียและอาฟริกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amorphophallus* spp. อยู่ในวงศ์ Araceae จัดเป็นพืชล้มลุกพื้นเมืองของไทย ลักษณะหัวกลมแบน บางชนิดมีเปลือกสีขาวเหลือง บางชนิดสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเหลือง หัวบุกบางชนิดผิวเรียบเกลี้ยง บางชนิดผิวขรุขระ หัวบุกนิยมนำมารับประทานเป็นอาหารของชาวชนบท จัดเป็นพืชอาหารและพืชสมุนไพรของไทยมาแต่โบราณ จากการค้นคว้าทางด้านโภชนาการพบว่าภายในหัวบุกประกอบด้วยแป้งประมาณร้อยละ 90 – 95 และโปรตีนร้อยละ 5 – 6 สารแป้งที่อยู่ในหัวบุก ได้แก่ สารกลูโคแมนแนน ซึ่งเมื่อแตกตัวจะได้กลูโคสและแมนโนส มีคุณสมบัติในการช่วยลดอัตราการดูดซึมของน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิต ลดไขมันในเลือด ในประเทศญี่ปุ่นมีการปลูกบุก *A. konjac* เป็นการค้ามานานแล้ว โดยนำมาแปรรูปเป็นแป้งคอนยัค อาหารเสริมสุขภาพ และนำไปทำผลิตภัณฑ์สำหรับลดน้ำหนักโดยทำในรูปอุตสาหกรรม สำหรับประเทศไทยธุรกิจการซื้อขายหัวบุกได้เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี 2527 อุตสาหกรรมการส่งออกและจำหน่ายบุกและผลิตภัณฑ์จากบุกในประเทศไทย มีปริมาณการซื้อขายอยู่ในระดับ 3,000 ตันต่อปีมาโดยตลอด จนในปี2541 ธุรกิจบุกที่ทวนกระแสเศรษฐกิจโลก สูงขึ้นเป็น 4,000 - 5,000 ตัน ถ้าความต้องการยังเป็นเช่นนี้อีกไม่นานบุกจะขาดแคลน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมและธุรกิจเกี่ยวเนื่องมูลค่าหลายร้อยล้าน จึงควรส่งเสริมให้มีการปลูกอย่างจริงจังแทนการเก็บจากป่า โดยควรส่งเสริมให้มีการปลูกบุกพันธุ์ที่สารใยอาหารสูงถึง 8 – 10 % ของน้ำหนักบุกสด ซึ่งพบอยู่ 4 ชนิดคือ บุกเนื้อทราย บุกเขา บุกเหลือง และบุกเตียงหัวลม (มงคล, 2547)

การขยายพันธุ์บุกทำได้โดยการแยกหน่อหรือใช้เมล็ด การใช้เมล็ดจะได้ต้นบุกมี่เติบโตช้ามาก ส่วนการแยกหน่อเป็นการขยายพันธุ์ที่ง่ายแต่จะต้องใช้หัวพันธุ์ที่ปลอดโรค โรคที่สำคัญของบุกที่ทำให้ผลผลิตลดลง คือโรคหัวเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในดินและติดมากับหน่อที่เกิดจากหัวที่เป็นโรค การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์บุกจะได้ต้นบุกที่ปลอดโรคจำนวนมากในระยะเวลาสั้น

อุปกรณ์และวิธีการ

<u>การทดลองที่ 1</u> การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของพืช

1.1 รวบรวมหัวของบุกเนื้อทราย (*Amorphophallus oncophyllus* Prain) จากจังหวัดเชียงใหม่ มาล้างให้สะอาด ใส่ไว้ในตะกร้าโดยไม่ต้องนำลงปลูกในดิน ทิ้งไว้จนกระทั่งมีการแตกหน่อหรือยอด ซึ่งตามปกติบุกจะมีการพักตัวในฤดูหนาว และจะเริ่มแตกหน่อประมาณเดือนมีนาคม – เมษายน โดยหัวของบุก 1 หัว จะแตกหน่อ 1 หน่อ

1.2 ตัดหน่อขนาดประมาณ 5 นิ้ว ออกจากหัว ลอกเปลือกหุ้ม นำมาล้างให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Haiter® Bleach (sodium hypochloride as available chlorine 6% w/w) ความเข้มข้น 15% (v/v) นาน 15 นาที

1.3 ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 - 4 ครั้ง ตัดแบ่งชิ้นส่วนพืชไปทำการทดลอง โดยแบ่งหน่อหรือยอดอ่อนเป็นตำแหน่งต่างๆ 3 ตำแหน่ง คือ โคนต้น โคนใบ และใบ นำมาเลี้ยงในอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่มีการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช 6–Benzylaminopurine (BA) 6 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 μM วางแผนการทดลองแบบ 3 x 6 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 5 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 20 ชิ้น ต่อซ้ำ รวมแต่ละสิ่งทดลองมีชิ้นส่วนพืช 100 ชิ้น

<u>การทดลองที่ 2</u> การเพิ่มปริมาณ *in vitro* microshoot

นำ *in vitro* microshoot ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดหน่อ/หน่ออ่อน (ข้อ 1) มาเพิ่มปริมาณ โดยตัดแบ่ง *in vitro* microshoot เป็นตำแหน่งต่างๆ 3 ตำแหน่ง คือ โคนต้น โคนใบ และใบ นำมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช BA 6 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 μM วางแผนการทดลองแบบ 3 x 6 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 5 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง มีชิ้นส่วนพืช 20 ชิ้น ต่อซ้ำ รวมแต่ละสิ่งทดลอง มีชิ้นส่วนพืช 100 ชิ้น

การย้ายปลูกต้นกล้า

นำขวดที่เพาะเลี้ยงบุก มาเลี้ยงไว้ในที่มีแสง ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน หลังจากนั้นจึงนำต้นบุกออกจากขวด ล้างน้ำให้อาหารวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมด นำมาปลูกในโรงเรือนเพาะชำ ในกระบะขนาด 2 x 2 นิ้ว วัสดุปลูก ทราย แกลบ ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 2:2:1 นาน 1 เดือน แล้วย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 10 นิ้ว ใช้ ดิน ขุยมะพร้าว ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2:2:1 บันทึกข้อมูล อัตราการเลี้ยงรอด

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของ BA และชนิดของชิ้นส่วนพืชต่อจำนวนยอดรวม (multiple shoot) ของบุก

BA ที่ระดับ 5 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมสูงสุด ทั้ง 3 ชนิด (ตำแหน่ง) ของชิ้นส่วนพืช (7.1 ยอด, 6.5 ยอด และ 2.3 ยอด จากโคนต้น โคนใบ และใบ ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาตำแหน่งของชิ้นส่วนพืช พบว่า โคนต้นที่ระดับ 5-10 μM มีจำนวนยอดรวมสูงสุด คือ 7.1 - 7.3 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ส่วนใบให้จำนวนยอดรวมต่ำสุด คือ 1.4 - 2.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และพบว่ายอดอ่อนสามารถงอกรากได้เองบนอาหารที่มี BA เป็นส่วนผสม

การทดลองที่ 2 ผลของ BA ต่อการเกิดยอดรวมของ *in vitro* microshoot

BA ที่ระดับ 5-10 μM สามารถชักนำให้ส่วนโคนต้นของ *in vitro* microshoot เกิดยอดรวมสูงสุดคือ 7.8 - 8.2 ยอด/ชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 2) ชิ้นส่วนพืชในตำแหน่งโคนใบและใบของ microshoot ให้จำนวนยอดระหว่าง 1.0 - 1.8 ยอด/ชิ้นส่วนพืช

วิจารณ์ผลการทดลอง

บุกเนื้อทราย สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมโดยใช้หน่ออ่อนหรือยอดอ่อนที่แตกจากหัวบุกโดย ใช้ BA เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต การทดลองนี้ยอดอ่อนบุกสามารถงอกรากได้เองบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดรวม จึงเป็นการลดขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก สามารถนำต้นอ่อนย้ายปลูกในสภาพเรือนทดลองได้เลย ในการทดลองขยายพันธุ์บุก *A. campanulatus* สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้จากตาข้าง (lateral bud) ของต้นบุกซึ่งเก็บในสภาพไร่ (Irawati, 1986) สำหรับการทดลองนี้ พบว่า การเก็บรวบรวมตาข้างจากสภาพไร่นามาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียอย่างมาก จึงหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนโดยนำหน่ออ่อน ซึ่งเพิ่งงอกจากหัวบุกมาทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผลจากการนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาทำการทดลองพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อยมาก วิธีการนี้จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการแก้ไขอุปสรรคการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในการขยายพันธุ์บุกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สรุปผลการทดลอง

การขยายพันธุ์บุกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถทำได้โดยการนำส่วนโคนต้น หรือโคนใบ จากหน่ออ่อน ซึ่งงอกจากหัวบุกขนาดประมาณ 5 นิ้ว มาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี BA 5 - 10 μM ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูง 5.5 - 7.3 ยอด/ชิ้นส่วนพืช หลังจากนั้นสามารถนำส่วนโคนต้นของ *in vitro* microshoot มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร MS ที่มี BA 5 - 10 μM ซึ่งสามารถขยายเพิ่มปริมาณได้อย่างน้อย 1 ปี โดยไม่สูญเสียความสามารถในการเพิ่มปริมาณ นอกจากนี้ พบว่า อัตราการอยู่รอดของต้นอ่อนบุกหลังการย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน ประมาณ 90 - 95% (รูปที่ 2)

เอกสารอ้างอิง

Irawati, J. Arditti, and L.P. Nyman. 1986. In vitro propagation of the elephant yam, *Amorphophallus campanulatus* var. hortensis Backer (Araceae). Ann. Bot. 57. 11-17.

มงคล เกษประเสริฐ. 2547. บุกและการใช้ประโยชน์จากบุกในประเทศไทย. เอกสารวิชาการลำดับที่ 22/2547 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

ตารางที่ 1 ผลของ BA และตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชต่อจำนวนยอดรวม (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) ของบุก

ความเข้มข้นของ BA (μM)	จำนวนยอดรวม ตำแหน่งของชิ้นส่วนพืช[1]		
	โคนต้น	โคนใบ	ใบ
0	1.0 e	1.3 e	1.4 b
5	7.1 a	6.5 a	2.3 a
10	7.3 a	5.5 b	2.5 a
15	4.6 b	4.8 c	1.7 b
20	2.8 c	2.5 d	1.4 b
25	2.2 d	2.1 d	1.4 b

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 2 ผลของ BA และตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชต่อ จำนวนยอดรวม (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) ของ *in vitro* microshoot ของบุก

ความเข้มข้นของ BA (μM)	จำนวนยอดรวม ตำแหน่งของชิ้นส่วนพืช[1]		
	โคนต้น	โคนใบ	ใบ
0	1.1 d	1.3[2]	1.4[2]
5	8.2 a	1.4	1.7
10	7.8 a	1.8	1.2
15	4.0 b	1.7	1.7
20	2.1 c	1.5	1.2
25	2.1 c	1.2	1.8
30	1.2 d	1.1	1.9
		ns	ns

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

[2] ns - ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

รูปที่ 1 การเกิดยอดรวม (multiple shoot) ของบุกโดยใช้โคนต้นอ่อนเป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นบนอาหาร MS ที่มี BA 5-10 μM

รูปที่ 2 แสดงต้นบุกในสภาพโรงเรือนหลังจากการย้ายปลูก