Agricultural Sci. J. 49 : 1 (Suppl.) : 270-272 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 1 (พิเศษ) : 270-272 (2561)

การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและการชักนำให้เกิดแคลลัสในกนกนารี
Studies On Surface Sterilization And Callus Induction In *Selaginella*

ปวีณา ภูมิสุทธาผล[1]* สุนิสา สายสืบ[1] และ สุภาภรณ์ รอดประดิษฐ์[2]
Paweena Pumisutapon[1]*, Sunisa Saisueb[1] and Supaporn Rodpradit[2]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290
[2]สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ จ.เชียงใหม่ 50180
[1]Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290
[2]Queen Sirikit Botanic Garden, the Botanical Garden Organization, Chiang Mai 50180
*Corresponding author: paweena.pumisutapon@gmail.com

บทคัดย่อ

พืชสกุลกนกนารี (*Selaginella*) ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นไม้ประดับและพืชสมุนไพร ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อในกนกนารีชนิด *S. siamensis* โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดมาแช่ mercuric chloride 0.1% หรือ Clorox® 15% นาน 5 และ 10 นาที แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการฟอกฆ่าเชื้อ คือ การแช่ mercuric chloride 0.1% นาน 5 นาที ซึ่งมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำที่สุด 40% และมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 60% สำหรับการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทดลองในกนกนารีชนิด *S. uncinata* โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งสูตร ½MS ที่เติม 2,4-D 0-5 μM และเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพมืดและมีแสงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดสามารถเกิดแคลลัสได้ทุกกรรมวิธียกเว้น 2,4-D 0 μM โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ การใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D 5 μM และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพมีแสง ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด 100% และแคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างที่สุด 6.6 มิลลิเมตร

คำสำคัญ: กนกนารี, สารฟอกฆ่าเชื้อ, แคลลัส, ออกซิน

ABSTRACT

Genus *Selaginella* is used as ornamental and medicinal plants. *In vitro* culture of *Selaginella* was studied in this research. The effect of disinfectants on surface sterilization was examined in *S. siamensis*, Shoot-tip explants were immersed in 0.1% mercuric chloride or 15% Clorox® for 5 and 10 min. After that they were cultured on semi-solid ½MS medium for 4 weeks. Results showed that an optimal sterilizing condition was immersion in 0.1% mercuric chloride for 5 min. This sterilizing condition gave the lowest microbial contamination rate at 40% and the highest plant survival rate at 60%. Callus induction experiment was investigated in *S. uncinata.* Shoot-tip explants of were cultured on semi-solid ½MS medium supplemented with 0-5 μM 2,4-D and were kept under dark or light conditions for 12 weeks. All the treatments could induce callus, except 0 μM 2,4-D. The most optimal callus induction condition was culturing on medium containing 5.0 μM 2,4-D under the light, which showed the highest callus induction rate at 100% and the largest callus diameter at 6.6 mm.

Keywords: *Selaginella*, disinfectants, callus, auxin

บทนำ

พืชสกุลกนกนารีมีประโยชน์เป็นไม้คลุมดินรักษาความชุ่มชื้นให้หน้าดิน เป็นไม้ประดับตกแต่งให้ความร่มรื่นสวยงาม ในปัจจุบันมีความสนใจนำพืชสกุลกนกนารีมาใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรมเพิ่มมากขึ้น เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ขยายพันธุ์หรือเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืชเพื่อสกัดสารสำคัญได้ แต่ยังมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุลนี้ค่อนข้างน้อย ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อกนกนารีชนิด *S. siamensis* และศึกษาการเกิดแคลลัสในกนกนารีชนิด *S. uncinata* ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกนกนารีต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อกนกนารีชนิด *S. siamensis*

วางแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial in CRD จำนวน 10 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ ชนิดสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ mercuric chloride 0.1% และ Clorox® 15% และระยะเวลาแช่สารฆ่าเชื้อ ได้แก่ 5 และ 10 นาที นำชิ้นส่วนปลายยอด *S. siamensis* ยาว 2 เซนติเมตร แช่เอทานอล 70% นาน 30 วินาที แล้วแช่สารฆ่าเชื้อตามแผนการทดลอง ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน (40 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$) บันทึกการรอดชีวิตและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์หลังเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของ 2,4-D และแสงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในกนกนารีชนิด *S. uncinata*

วางแผนการทดลองแบบ 11x2 factorial in CRD จำนวน 15 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้น 2,4-D ได้แก่ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 μM และสภาพแสง ได้แก่ มืดและมีแสง นำชิ้นส่วนปลายยอด *S. uncinata* ยาว 1.5 เซนติเมตร ที่ได้จากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ที่เติม 2,4-D และเก็บไว้ในที่มืดหรือมีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน (40 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$) ตามแผนการทดลอง บันทึกการเกิดแคลลัสและเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์

ผลการทดลองและวิจารณ์

สภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ *S. siamensis*

ชิ้นส่วนยอดมีเฉพาะการปนเปื้อนเชื้อราเท่านั้น โดยการแช่ mercuric chloride 0.1% นาน 5 และ 10 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อราน้อยที่สุด 40% ในขณะที่การแช่ Clorox® 15% นาน 5 และ 10 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อราสูงมากถึง 80-100% (Fig 1 A) นอกจากนี้การแช่ mercuric chloride 0.1% นาน 5 นาที มีการรอดชีวิตสูงที่สุด 60% แต่หากเพิ่มระยะเวลาแช่สารเป็น 10 นาที การรอดชีวิตลดลงเหลือ 20% (Fig 1 B) แสดงให้เห็นว่า mercuric chloride สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่า Clorox® โดยเฉพาะการกำจัดเชื้อรา มีงานวิจัยที่นำสารที่มีฤทธิ์แรงอย่าง mercuric chloride มาใช้ฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชต่าง ๆ ได้มีประสิทธิภาพ (Nongalleima *et al*., 2013)

ผลของ 2,4-D และสภาพแสงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสใน *S. uncinata*

ทุกกรรมวิธีสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ยกเว้น 2,4-D 0 μM และพบว่าในที่มีแสงเกิดแคลลัสสูงถึง 100% ในทุกความเข้มข้นของ 2,4-D ในที่มืดเกิดแคลลัส 100% ได้เฉพาะ 2,4-D ความเข้มข้นสูง 3.0-5.0 μM (Fig 2 A) เส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สูงขึ้น ในที่มีแสงมีเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสมากกว่าในที่มืด โดยแคลลัสมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด 6.6 มิลลิเมตร เมื่อใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูงที่สุด 5.0 μM และเพาะเลี้ยงในที่มีแสง (Fig 2 B) แสดงให้เห็นว่าการเกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับความเข้มข้น 2,4-D และสภาพแสง โดย 2,4-D ความเข้มข้นสูงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและขนาดใหญ่ มีรายงานในพืชหลายชนิดที่ใช้ 2,4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ผลดี เช่น พริมโรส (Jia *et al*., 2014) และการเพาะเลี้ยงในที่มีแสงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มืด (Duncan and Widholm, 2004)

สรุป

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอด *S. siamensis* คือ การแช่ mercuric chloride 0.1% นาน 5 นาที และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอด *S. uncinata* เกิดแคลลัส คือ การใช้อาหารที่เติม 2,4-D 5 μM และเพาะเลี้ยงในที่มีแสง

เอกสารอ้างอิง

Duncan, D.R. and J.M. Widholm. 2004. Osmotic induced stimulation of the reduction of the viability dye 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by maize roots and callus cultures. J. Plant Physiol. 161: 397-403.

Jia, Y., Q.X. Zhang., H.T. Pan., S.Q. Wang., Q.L. Liu and L.X. Sun. 2014. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. Sci. Hortic. 176: 273-281.

Nongalleima, K., T.D. Singh, D. Amitabha, L. Deb and H.S. Devi. 2014. Optimization of surface sterilization protocol, induction of axillary shoots regeneration in *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. as affected by season. Biol. Rhythm Res. 45: 317-324.

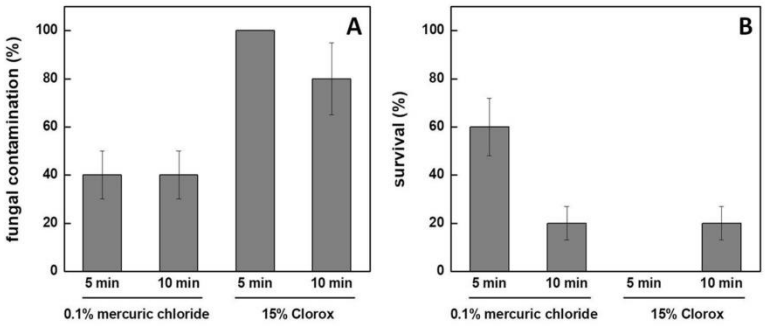

Figure 1 Percentages of fungal contamination (A) and survival (B) of shoot tip explants in *S. siamensis* after sterilization with different disinfectants and immersion periods.

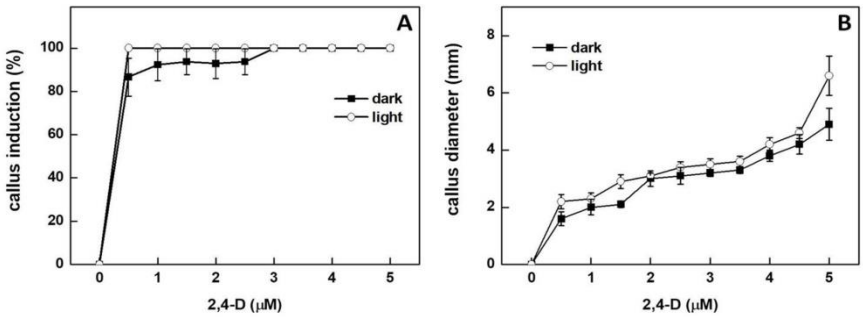

Figure 2 Percentages of callus induction (A) and callus diameter (B) of shoot tip explants in *S. uncinata* after cultivation on semi-solid ½MS medium added with 0-5 μM 2,4-D.