



การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศ และบอนสีในสภาพปลอดเชื้อ ภพแก้ว พุทธิรักษ์ จินตนา แก้วดวงดี และ วารุต อยู่คง*

In vitro culture of *Hippeastrum johnsonii* Bury and *Caladium bicolor* Vent.

Phopgao Buddhakaksa, Chintana Kaewdungtip and Warut U-Kong*

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

*Corresponding Author. E-mail address: nu48330105@hotmail.com

Received 14 February 2011; accepted 4 August 2011

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศ และบอนสี โดยการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 5 นาที สามารถทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศปลอดเชื้อมากที่สุด 85.71 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลง ที่เติม Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ N6 - benzyl adenine (BA) ความเข้มข้น 0.5, 0.75, และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และรากได้ในเวลา 6 สัปดาห์ การย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน มีอัตราการรอดชีวิตถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสี โดยนำเนื้อเยื่อบอนสีมาทำการฟอกฆ่าด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 5 นาที พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ และรอดตาย 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำชิ้นส่วนที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดที่ 12.0 ยอด ต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดบอนสี และรากได้ การย้ายปลูกสู่โรงเรือน โดยใช้วัสดุ ดินร่วน: ทราย: ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1: 1: 1 แล้วควบคุมความชื้นในระยะแรก การย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน มีอัตราการรอดชีวิตถึง 80 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ว่านสี่ทิศ บอนสี NAA BA

Abstract

In vitro culture of to be Hippeastrum johnsonii Bury. and *Caladium bicolor* Vent. The bulbscales explants were surface sterilize with clorox 10 percent for 10 min followed by clorox 20 percent 5 min, explants were 85.71 percent free from contamination. The sterilized bulbscales explants were culture on modified MS medium supplemented with Naphthalenecetic acid (NAA) at concentration of 1.0 mg/l. with N6-benzyl adenine (BA) at 0.5, 0.7, and 2 mg/l. The results showed that modified MS medium concentration BA 1.0 mg/l and NAA 2.0 mg/l were the best for induction shoots and plantlets with 6 weeks and grow well under environment with heights percentage of 80. *In vitro culture of Caladium bicolor* young leaf explants were sterilize with clorox 10 percent for 10 min to be followed by clorox 5 percent for 5 min resulted in success 80 percent. The sterilized young leaf explants were culture on modified MS medium supplemented with BA of the concentration 0.1, 0.5, 1.0 mg/l. and NAA 2 mg/l. The result showed that modified MS medium concentration of BA 0.5 mg/l with NAA 2 mg/l was the best for induction mean number of shoot averaged of 12 shoot per explants. Plantlets transferred to greenhouse condition at for 6 weeks of culture period were found to be 80 percent survival.

Keywords: *In vitro* cultures, *Hippeastrum johnsonii*, *Caladium bicolor*, NAA, BA

บทนำ

ปัจจุบันไม้ดอกไม้ประดับมีความจำเป็นต่อชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์มากขึ้น ในการจัดตกแต่งประดับจานอาหาร โต๊ะอาหารในภัตตาคารต่างๆ จึงเห็นได้ว่า การผลิตไม้ดอกไม้ประดับเพื่อการค้านั้นจะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศมากขึ้นมีมูลค่าของผลิตภัณฑ์สูงเท่าเทียมกับผลิตผลทางการเกษตรชนิดอื่นๆ และเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ทำให้เกิดอุตสาหกรรมต่างๆ ยิ่งก่อให้เกิดอุตสาหกรรมการท่องเที่ยวและไม้ดอกไม้ประดับสามารถส่งเป็นสินค้าออกของประเทศไทยได้อีกด้วย (Anuntalabhochai et al., 2007)

ว่านสี่ทิศเป็นไม้ดอกประเภทหัวชนิด true bulb อยู่ในสกุล *Hippeastrum* วงศ์ Amaryllidaceae ว่านสี่ทิศมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนและกึ่งร้อนของทวีปอเมริกา มีประมาณ 80 ชนิดด้วยกัน แต่จากการปรับปรุงพันธุ์ในต่างประเทศสามารถสร้างพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นมามากมาย ซึ่งมีลักษณะขนาดต้นและสีของดอกแตกต่างกันไป มีทั้งพันธุ์ที่มีกลีบดอกชั้นเดียว และดอกซ้อนจึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย พันธุ์ที่นิยมปลูกกันทั่วไปโดยเฉพาะในแถบภาคเหนือของประเทศไทย มีสีของดอกสี่สีคือ ขาว ชิดแดง ส้ม ชมพู และแดง การใช้ประโยชน์ของว่านสี่ทิศดังกล่าวข้างต้นอยู่เพียงการใช้เป็นไม้ประดับสนามและไม้ประดับกระถาง (Huxley, 1992) ในตลาดโลกมีว่านสี่ทิศเป็นไม้ตัดดอก

ประเภทหัวอยู่ใน 10 อันดับ ปัจจุบันผู้ปลูกเลี้ยงว่านสีทศในประเทศไทยขยายวงเพิ่มมากขึ้นทำให้มีความต้องการว่านสีทศเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ดังจะเห็นได้ว่าการนำเข้าหัวพันธุ์ว่านสีทศจากต่างประเทศเป็นปริมาณมากเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเป็นการค้าทำให้สูญเสียเงินตราออกนอกประเทศมาก ส่วนบอนสีเป็นไม้ประดับที่มีความสวยงามโดยเฉพาะใบที่มีรูปทรง และสีสันสวยงามแปลกตาจนได้ชื่อว่าเป็น “ราชินีแห่งไม้ใบ” เป็นพืชในวงศ์ Araceae สกุล *Caladium* มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปอเมริกาใต้ และประเทศในเขตร้อนทั่วไป การผลิตบอนสีเพื่อการส่งออกโดยมีการส่งออกหัวบอนสีและต้นมีรายได้เข้าประเทศไม่ต่ำกว่า 5.4 ล้านบาท ส่งออกประเทศญี่ปุ่นมากที่สุดถึง 80 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังส่งไปมาเลเซีย สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย อินโดนีเซีย เป็นต้น บอนสีจึงเป็นสินค้าเกษตรที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีความแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับมากขึ้นเรื่อยๆ อีกทั้งมีตลาดรองรับในต่างประเทศค่อนข้างมาก การแข่งขันน้อย เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่อาจจะสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรไทยได้ไม่น้อยในอนาคต แต่พบปัญหาในการเพาะเลี้ยงที่เกิดจากโรคราเม็ดผักกาดที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ทำให้บริเวณรากถูกทำลาย เนื้อเยื่อเกิดเป็นสีน้ำตาล และตาย และโรคโคนเน่าเกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. เชื้อจะเข้าทำลายท่อน้ำท่ออาหารทำให้ต้นพืชแห้งตาย (พัฒน์, 2549)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพิ่มปริมาณยอดของว่านสีทศ และบอนสี โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนนินชนิด BA ความเข้มข้นต่างๆ เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนนินที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์และเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยมีบทบาทส่งเสริม การสังเคราะห์ RNA และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์จึงมีผลให้เพิ่มปริมาณยอด (Taiz and Zeiger, 2002) โดยการทดลองของ Corr (1993) รายงานว่าการเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดคาลาลิลส์ได้จำนวนมาก Norton และ Skiruin (2001) ศึกษาการขยายพันธุ์ของว่านสีทศโดยนำชิ้นส่วนตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถสร้างยอดจากตาข้างได้จำนวนมาก และผลของออกซินชนิด NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีผลกระตุ้นให้เกิดราก โดยชักนำให้เนื้อเยื่อท่ออาหาร แคมเบียม และพิทของลำต้น เกิดเป็นจุดกำเนิดราก และเจริญเติบโตเป็นรากได้ (Hopkins, 1999) โดย Yamamoto และ Mutsumoto (1988) รายงานว่า สูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้จากยอดของบัวหลวง

อุปกรณ์ และวิธีการ

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อส่วนหัวว่านสีทศ และใบอ่อนบอนสี

นำชิ้นส่วนหัวว่านสีทศมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10, 15, 20, 30 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 10 นาที และสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 5 นาที และใบอ่อนบอนสีมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 10 นาที และสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 5 นาที เติม Tween 20 ประมาณ 1-2 หยด หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดให้ได้ขนาด 1 x 1 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อศึกษาเปอร์เซนต์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และอัตราการรอดชีวิต

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนหัวว่านสีทศ และใบอ่อนบอนสี

นำชิ้นส่วนหัวว่านสีทศที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ N6 - benzyl adenine (BA) 0.5, 0.75 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด, จำนวนใบ และจำนวนราก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

นำชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด, จำนวนใบ และจำนวนราก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

การศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อนออกปลูก

นำต้นอ่อนของว่านสีทศ และบอนสี ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อมาปรับสภาพในอุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูก หลังจากนั้นนำมาย้ายปลูกในวัสดุปลูกในกระถางที่ประกอบด้วย ดินร่วน ทราย และขุยมะพร้าว

มะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 รดน้ำให้ชุ่มแล้วเอาใส่ในถุงพลาสติกใส มัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ แล้วค่อยเจาะถุงให้เป็นรูขนาด 1.5 นิ้ว ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จากนั้นเปิดปากถุงไว้ 1 สัปดาห์ก่อนการบันทึกข้อมูล

ผลการศึกษา

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อส่วนหัวว่านสีทศ และใบอ่อนบอนสี

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหัวว่านสีทศ พบว่า สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

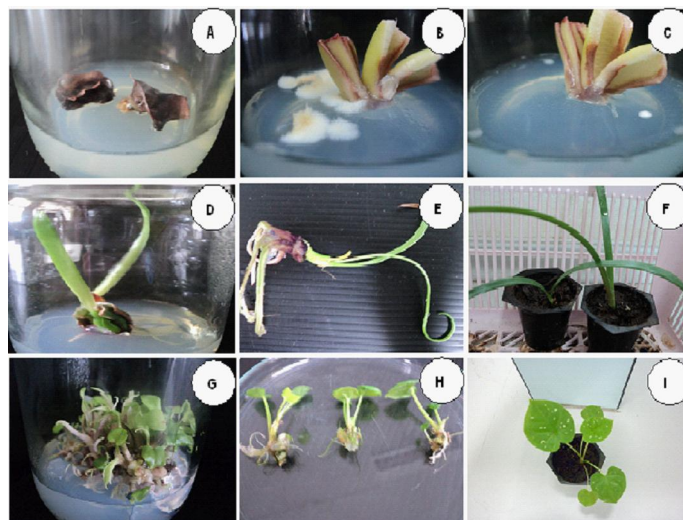
ระยะเวลา 5 นาที สามารถลดการปนเปื้อนได้ถึง 85.71 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะชิ้นส่วนหัวเป็นสีเขียว และสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ไม่สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ (ตารางที่ 1, รูป 1 B และ C) ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของใบอ่อนบอนสี เมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 5 นาที พบว่าสามารถลดการปนเปื้อนได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) และความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการปนเปื้อนได้แต่เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำ (รูปที่ 1 A)

ตารางที่ 1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหัวว่านสีทศโดยใช้สารละลายคลอโรกซ์

กรรมวิธี	คลอโรกซ์ (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลา (นาที)	การปลอดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
1	10	10	0	0
2	15	10	14.28	100
3	20	10	57.15	100
4	30	10	100	0
5	10 และ 20	10 และ 5	85.71	85.71

ตารางที่ 2 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีโดยใช้สารละลายคลอโรกซ์

กรรมวิธี	คลอโรกซ์ (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลา (นาที)	การปลอดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
1	5	10	70	40
2	10	10	80	50
3	15	10	80	0
4	20	10	100	0
5	10 และ 5	10 และ 5	90	90



รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสีทศ และบอนสีในสภาพปลอดเชื้อ A: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใบอ่อนบอนสีที่ตายเกิดจากการใช้ระดับความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่สูง B: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหัวว่านสีทศปนเปื้อนเชื้อรา C: ชิ้นส่วนหัวว่านสีทศปนเปื้อนแบคทีเรีย D: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหัวว่านสีทศที่เกิดยอดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร E: ต้นกล้าที่เจริญเติบโตพร้อมออกปลูก F: ต้นกล้าที่ย้ายออกปลูกลงวัสดุปลูก G: จำนวนยอดอ่อนบอนสีที่เกิดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร H: ต้นที่สมบูรณ์ แข็งแรงมีราก ลำต้น และพร้อมออกปลูก I: การนำต้นที่สมบูรณ์ย้ายออกปลูกลงวัสดุปลูก

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนหัวว่านสีทึบ และใบอ่อนบอนสี

นำชิ้นส่วนหัวว่านสีทึบมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 0.75, 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น

2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มีปริมาณยอดเฉลี่ย 4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (ตารางที่ 3, รูปที่ 1 D) และการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบอนสีบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 12 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (ตารางที่ 4 รูปที่ 1 G)

ตารางที่ 3 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวว่านสีทึบบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

กรรมวิธี	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การ เกิดยอด	ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด ต่อ ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น	ความสูง เฉลี่ย	จำนวนใบ เฉลี่ย	จำนวนราก เฉลี่ย
1	0	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2	0.5	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	0.75	0	20	1.4±0.24 ^b	3.8±0.37 ^b	1.8±0.37 ^b	0 ^a
4	2	0	20	1.4±0.24 ^b	4.4±0.40 ^b	2.0±0.32 ^b	0 ^a
5	0.5	1	20	2.6±0.40 ^c	5.8±0.49 ^c	2.0±0.32 ^b	2.4±0.5 ^b
6	0.75	1	50	4.6±0.40 ^d	6.4±0.68 ^c	2.4±0.25 ^b	7.0±1.2 ^c
7	2	1	80	5.0±0.32 ^d	8.6±0.51 ^d	2.4±0.40 ^b	6.6±0.9 ^c

* วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Duncan's multiple test จะบอกถึงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE (standard error) ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์จะให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนบอนสีบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

กรรมวิธี	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การ เกิดยอด	ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด ต่อ ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น	ความสูงเฉลี่ย	จำนวนใบเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย
1	0	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2	0.1	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	0.5	0	20	4.4±0.40 ^b	1.1±0.07 ^b	4.0±0.00 ^c	1.9±0.10 ^a
4	1	0	50	5.1±2.21 ^b	1.9±0.66 ^c	3.0±0.36 ^c	5.5±0.26 ^a
5	0.1	2	10	4.0±0.00 ^b	1.8±0.10 ^c	3.0±0.00 ^c	5.0±0.00 ^a
6	0.5	2	60	12.0±1.28 ^c	1.6±0.15 ^c	8.9±1.59 ^b	7.9±0.50 ^b
7	1	2	30	3.0±0.00 ^b	1.8±0.20 ^c	2.9±0.10 ^c	2.0±0.00 ^{ab}

* วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Duncan's multiple test จะบอกถึงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE (standard error) ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์จะให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อนออกปลูก

จากการนำต้นว่านสีทึบ และบอนสีที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แข็งแรง และเกิดราก ปลูกลงดิน ร่วนทราย และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 ในสภาพโรงเรือน (greenhouse) เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิต (survival rate) เมื่อย้ายปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าต้นว่านสีทึบ และบอนสีมีการเจริญเติบโตดี โดยมีการแตกของใบใหม่เกิดขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปได้ประมาณ 1 สัปดาห์ ซึ่งช่วงเวลาที่ใบใหม่คลี่กางออกนั้น สังเกตพบการแตกออกของรากใหม่เกิดขึ้นด้วย โดยว่านสีทึบ และบอนสีมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงไปเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (รูปที่ 1 E, F, H และ I)

สรุป และอภิปรายผลการศึกษา

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปัญหาสำคัญที่พบ คือการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์นั้นทำได้ยาก เนื่องจากในสภาพธรรมชาติส่วนต่าง ๆ ของพืชจะมีเชื้อจุลินทรีย์ติดอยู่ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรีย อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน (contamination) เพื่อให้การฟอกฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นจึงได้นำสารเคมีเข้ามาช่วยในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยสารเคมีที่นิยมนำมาใช้มากชนิดหนึ่งคือ คลอโรกซ์ (Clorox) เพราะเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไป ซึ่งเป็นสารละลายที่มีส่วนผสมของ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)

(ประศาสตร์, 2538) จึงไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายมากนัก แต่การใช้สารเคมีในการพอกฆ่าเชื้อมักพบกับปัญหาการตายของเนื้อเยื่อเมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจากการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่มีผลต่อการพอกฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนหัวว่านสี่ทิศ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนหัวมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เนื่องจากความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการพอกฆ่าเชื้อที่สารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ 14.28 และ 57.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้นสูงขึ้นไป 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชิ้นส่วนหัวถูกทำลาย ทำให้หัวมีสีน้ำตาลและชำรุดซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นมากเกินไป ดังนั้นในการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหัวว่านสี่ทิศ ควรใช้สารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 5 นาที จึงได้ผลดีที่สุด ส่วนการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่มีผลต่อการพอกฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสี พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการปลอดเชื้อ 80 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วย ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 5 นาที มีอัตราการปลอดเชื้อ 90 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ 5, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีอัตราการปลอดเชื้อ 70, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ส่วนใหญ่จะเกิดจากการปนเปื้อนเชื้อรา และตาย สอดคล้องกับงานวิจัยของอัศวิน (2553) พบว่า การใช้คลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สูงทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่สูงมีอัตราการปลอดเชื้อสูงแต่อัตราการรอดชีวิตต่ำ

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของว่านสี่ทิศ นำเนื้อเยื่อส่วนหัวไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 0.75 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งหมด 7 สูตร นาน 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พืชไม่มีการตอบสนองต่ออาหารไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยส่งผลให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยนำมาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดนั้น พบว่าแต่ละระดับความเข้มข้นเกิดยอดไม่เท่ากัน สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด คือ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA

ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งลักษณะที่ได้มีความสมบูรณ์แข็งแรง มีการเจริญเติบโตได้ดี และมีปริมาณยอดที่เกิดขึ้นมากกว่าระดับความเข้มข้นอื่นๆ อาจเป็นเพราะ BA เป็นสารที่ใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตประเภท Cytokinin ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ การแตกยอดใหม่ได้ (Taiz and Zeiger, 2002) ส่วน NAA เป็นสารที่ใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตประเภท Auxin ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการขยายเซลล์ และชักนำให้เกิดราก (Hopkins, 1999) โดยเมื่อนำมาใช้ร่วมกัน จึงทำให้ BA และ NAA มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของว่านสี่ทิศ ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดบอนสี โดยนำส่วนใบอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งหมด 7 สูตร นาน 6 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ชิ้นเนื้อเยื่อซีดจางและแห้งตาย ส่วนอาหารที่เติมฮอร์โมน BA และ NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดมากขึ้นตามลำดับ โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดนั้น พบว่าแต่ละระดับความเข้มข้นเกิดยอดไม่เท่ากัน สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดคือ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ โดยสูตรอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและรากร่วมด้วย อีกทั้งลักษณะของยอดสมบูรณ์แข็งแรง มีการเจริญเติบโตได้ดี และมีปริมาณยอดที่เกิดขึ้นมากกว่าระดับความเข้มข้นอื่นๆ มีรายงานการศึกษาถึงผลการใช้ฮอร์โมนไซโตไคนิน ร่วมกับออกซิน โดยเฉพาะ BA ร่วมกับ NAA ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดการแตกตายอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วน hypocotyls ของ *Portulaca grandiflora* (Hassani and Zryd, 1995) การกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Lycium barbarum* (Hu et al., 2001) การชักนำให้เกิดการสร้างยอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วน Cotyledons และ Hypocotyls ของพืชสกุลกะหล่ำปลีลูกผสม (Yang et al., 2004) และ Kusey et al. (1980) รายงานว่าเมื่อเติม BA และ NAA ร่วมกันในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชฟิลลา จะสามารถกระตุ้นการเกิดยอด และรากได้ นอกจากนี้พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนิน ทุกสูตรสามารถชักนำให้บอระเพ็ดสร้างยอดใหม่ได้ โดย BA กระตุ้นการแตกยอดได้ดีกว่า kinetin จากการทดลองที่ยืนยันว่า BA ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินจะสามารถชักนำให้เกิดยอดและต้นในสภาพปลอดเชื้อได้ดี จากรายงานการทดลองของ Branca et al. (1991). ยืนยันได้ว่าไซโตไคนินเพียงชนิดเดียวมีผลทำให้เซลล์ยืดยาวขึ้นได้แต่ควรใช้ออกซินร่วมด้วยเนื่องจากการทำงานของออกซินจะส่งเสริมการเกิดยอดและรากของเนื้อเยื่อได้

ในการย้ายวุ้นสีทึบ และบอนสีออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของต้นวุ้นสีทึบ และต้นบอนสี มีแนวโน้มในการอยู่รอด และเจริญเติบโตได้ดีในโรงเรือน ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงระยะเวลาที่มีการย้ายปลูกรุ่น ต้นวุ้นสีทึบ และต้นบอนสีมีการเข้าทำลายโดยเชื้อแบคทีเรีย น้อย จึงทำให้มีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการส่งถ่ายยีนเข้าไปในพืชโดยตรงเพราะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถทำให้พืชหลายชนิดที่ได้รับยีนเข้าไปสามารถพัฒนา และเกิดเป็นต้นใหม่ได้ การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวุ้นสีทึบ และบอนสี จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณ และเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์วุ้นสีทึบ และบอนสี จึงนับเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาการผลิตต้นพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะสีดอกที่สวยงาม และแตกต่างไปจากเดิม ดังนั้น หากสามารถปรับปรุงพันธุ์วุ้นสีทึบ และบอนสีให้มีความต้านทานต่อโรค และแมลงได้ ก็จะเป็นวิธี หรือทางเลือกหนึ่งที่จะเพิ่มมูลค่าสินค้า ตลอดจนการพัฒนาการใช้ประโยชน์ร่วมกับด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

พัฒน์ พิชาน. 2549. ราซินีแห่งไม้ใบบอนสี. บริษัทฮาซันพรินติ้ง จำกัด. กรุงเทพฯ. หน้า 4.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์โอ. เอส. พรินติ้ง เฮาส์. กรุงเทพฯ. หน้า 54.

อัศวิน ณะปะต. 2553. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและใบอ่อนของมะลิ (*Jasminum* spp.). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา. หน้า 34-38.

Anuntalabhochai, S., Sitthiphrom, S. and Thongtaksin W. 2007. Hybrid detection and characterization of *Curcuma* spp. Using sequence characterized DNA markers. *Scientia Horticulturae*, 111: 389-393.

Branca, C., Bucci, G., Domiano, P., Ricci, A., Torelli, A., and Bassi, M. 1991. Auxin structure and activity on tomato morphogenesis. *Plant cell. Tissue and Organ Culture*, 24(2):105-114.

Corr, B.E. 1993. *Zantedeschia*. Research in the United Staed; Past, Present and Future. *Acta. Hort.* 337: 177-188.

Hopkins, G.W. 1999. Introduction to plant physiology. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A. 30-32 p.

Hassani, B.D.R. and Zyrd, J.P. 1995. In vitro culture and regeneration of large flowered purslane. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 41, 281-283.

Hu, Z., Guo, G.Q., Zhao, D.L., Li, L.H. and Zheng, G.C. 2001. Shoot regeneration from cultured leaf explants of *Lycium barbarum* and *Agrobacterium*-mediated transformation. *Russian J. Plant Physiol.*, 48(4), 453-458.

Huxley A. 1992. The new Royal Horticultural Society dictionary of gardening. Volume 1. New York: Stockton Press. 815 p.

Kusey, E.W.Jr., Hammer, A.P., and Weiler, T.C. 1980. In vitro propagation of *Gypsophila paniculata* L. "Bristol Fairy". *Hort Science* 15(5) : 600-601.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Norton, M. A. and Skirouion, R.M. 2001. Micropropagation 'Norton' wine grape Hort. Tech. 11206-208.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California. 45-54 p.

Yamamoto, Y. and Mutsumoto, D. 1988. Tissue culture of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) I: Culture media for inducing plantlet from apical meristem. *Bull. Yamaguchi Agri. Expt. Stn.* 40: 44-48.

Yang, Z.H., Jin, H., Plaha, P., Woong, B.T., Jiang, G.B., Woo, J.G., Yun, H.D., Lim, Y.P. and Lee, H.Y. 2004. An improved plant regeneration protocol using cotyledonary explants from inbred lines of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *J. Plant Biotechnol.*, 6(4), 235-239.