การขยายพันธุ์โมกพวง พุดจีบ รักขาว และรักม่วง โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

MICROPROPAGATION OF WRIGHTIA RELIGIOSA BENTH., TABRNAE MONTANADIBARICATA LINN., CALOTROPIS PROCERA (AITON) W.T.AITON. AND CALOTROPIS GIGANTEA LINN. BY IN VITRO CULTURE

ภพเก้า พุทธรักษ์, *วารุต อยู่คง*
Phopgao Buddharaksa*, Warut U-kong*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
Department of Biology, Faculty of Science, University of Phayao.

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ดอกไม้ประดับ 4 ชนิด คือ โมกพวง พุดจีบ รักขาว และรักม่วง ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงพบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนโมกพวงที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม benzyl adenine (BA) 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 8.40 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น สำหรับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใบอ่อนพุดจีบที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม Thidiazuron (TDZ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-Dichlorophenoxyaceticacid (2, 4-D) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 3.0 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น และชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนรักขาว และรักม่วงที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 8.20 และ 8.40 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นตามลำดับ

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Benzyl adenine Thidiazuron 2, 4-Dichlorophenoxyaceticacid

Abstract

Four ornamental plants (*Wrightia religiosa*, *Tabernae montanadivaricata*, *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*) were *in vitro* cultured on modified MS medium. *In vitro* culture of *Wrightia religiosa* on modified MS medium supplemented with benzyl adenine (BA) 4 mg/L produced 8.40 shoot per explants. *In vitro* young leaf culture of *Tabernae montanadivaricata* on modified MS medium supplemented with Thidiazuron (TDZ) at 0.5 mg/L and 4-Dichlorophenoxyaceticacid (2, 4-D) at 0.1 mg/L could induced 3.0 shoot per explants. *In vitro* culture of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* on modified MS medium supplemented with BA at 3 mg/L could produce 8.20 and 8.40 shoot per explants, respectively.

Keywords: *In vitro* culture, Benzyladenine, Thidiazuron, 2, 4-Dichlorophenoxyaceticacid

บทนำ

ปัจจุบันพบว่ากลุ่มเกษตรกรหันมานิยมปลูกไม้ดอกไม้ประดับกันเป็นจำนวนมาก ซึ่งไม้ดอกไม้ประดับเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากกลุ่มหนึ่งในประเทศไทย การส่งออกไม้ดอกไม้ประดับในช่วง 9 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2549 มูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับของไทยเท่ากับ 68.72 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปีก่อนแล้วเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.7 ซึ่งในช่วงระยะ 5 ปีที่ผ่านมามูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับของไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากมูลค่า 46.89 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ ในปี พ.ศ. 2544 เป็น 88.38 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ ในปี พ.ศ. 2548 หรือโดยเฉลี่ยมีอัตราการขยายตัวของมูลค่าการส่งออกร้อยละ 17.7 ต่อปี แม้ว่าเมื่อเทียบกับมูลค่าการค้าไม้ดอกไม้ประดับในตลาดโลกซึ่งมีมูลค่าเฉลี่ยปีละ 13,011.52 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ แล้วมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับของไทยคิดเป็นสัดส่วนเพียงร้อยละ 0.7 เท่านั้น และมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับของไทยนั้นเป็นอันดับหนึ่งของเอเชีย [1]

ไม้ดอกไม้ประดับของไทยนั้นยังมีโอกาสในการขยายตลาดในต่างประเทศได้อีกมากรัฐบาลจึงมีการกำหนดนโยบายเพื่อพัฒนาทั้งด้านการผลิต และการตลาดไม้ดอกไม้ประดับตั้งแต่แผนพัฒนาฯ ฉบับที่ 7 โดยดำเนินการวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตของไม้ดอกไม้ประดับโดยเน้นการวิจัย และพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะแปลกใหม่ ให้ผลผลิตสูง คุณภาพดี อายุการใช้งานนาน ทนทานต่อการเข้าทำลายของโรค และแมลง และทนทานต่อการขนส่ง เพื่อจะเป็นการช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการผลิต และการตลาดของไม้ดอกไม้ประดับของไทย สำหรับการส่งออกก็ต้องเผชิญการแข่งขันที่รุนแรงมากขึ้น โดยประเทศคู่แข่งทั้งรายเก่า และรายใหม่เจาะขยายตลาดส่งออกเพื่อแย่งชิงส่วนแบ่งตลาดจากไทย ผู้ประกอบการ

ของไทยต้องอาศัยการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต การคิดค้นพันธุ์ใหม่ๆ ทั้งในด้านสีสัน และรูปทรง รวมทั้งการเน้นการขยายประเภทการส่งออกไม้ดอกและไม้ประดับเมืองร้อนประเภทอื่นๆ ทั้งนี้เพื่อให้มีความหลากหลาย เน้นการตอบสนองความต้องการของตลาดให้มากขึ้น [2]

การผลิตไม้ดอกไม้ประดับในประเทศไทยมักจะพบปัญหาเรื่องของโรค และแมลงศัตรูพืชทำร้ายต้น และดอก และปัญหาการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด แม้จะเป็นวิธีที่ง่ายแต่ถ้าเก็บเมล็ดไว้ปลูกโดยไม่รู้จักเลือกเก็บแล้ว ต้นใหม่ที่ได้มักไม่คงลักษณะเด่นของต้นแม่ไว้ เนื่องจากเมล็ดได้มาจากการผสมของเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย ซึ่งต่างก็มียีนควบคุมลักษณะจำนวนมากด้วยกัน เมื่อจับคู่กันใหม่จึงทำให้ได้ลักษณะไม่เหมือนเดิม เรียกว่า การกลายพันธุ์ และมักจะกลายไปในทางไม่ดี [3] จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไม้ดอกไม้ประดับสามารถทำรายได้ให้แก่กลุ่มเกษตรกร และยังมีแนวโน้มขยายตลาดได้มากขึ้นด้วย แต่จะต้องมีการศึกษาแก้ไขปัญหาในเรื่องของโรค และแมลง และต้องมีการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะแปลกใหม่ มีสีที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งวิธีการหนึ่งที่จะช่วยมาแก้ไขปัญหาเหล่านี้ได้คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพราะสามารถผลิตต้นพืชที่ปลอดโรค และแมลงได้ ผลิตต้นพืชได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว ผลิตต้นพันธุ์ที่ตรงตามสายพันธุ์เดิมได้ และสามารถเป็นวิธีการหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ด้วยวิธีการส่งถ่ายยีนด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์ และเพิ่มปริมาณพืชไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญทางเศรษฐกิจกิจ ได้แก่ โมกพวง พุดจีบ รักขาว และรักม่วง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาความเข้มข้นของสารฟอกขาวที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (โมกพวง, พุดจีบ, รักขาว และรักม่วง)

เลือกชิ้นส่วนปลายยอดโมกพวง, รักขาว, รักม่วง และใบอ่อนพุดจีบในสภาพธรรมชาติมาทำการทดลอง นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหล หลังจากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (clorox®) ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 เป็นเวลา 15 นาที พร้อมทั้งหยด polysorbate 20 1-2 หยด แล้วเขย่า ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 2×2 เซนติเมตร และยอดอ่อนตัดให้ได้ขนาด 1 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS [4] ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่มีน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพได้รับแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกการปนเปื้อนจุลินทรีย์ การตายของเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ โดยคำนวณค่าร้อยละจากจำนวนซ้ำที่เกิด การปนเปื้อนจุลินทรีย์ การตายของเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ

2. การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดโมกพวง รักขาว รักม่วง และใบอ่อนพุดจีบ

2.1 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดโมกพวง

นำชิ้นส่วนปลายยอดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต benzyl adenine (BA) ความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสงแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการบันทึก ร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอด ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

2.2 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดรักขาว และรักม่วง

นำชิ้นส่วนปลายยอดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็น วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการบันทึกร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอด ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

2.3 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจีบ

นำชิ้นส่วนใบอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-Dichlorophenoxyaceticacid (2, 4-D) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกร้อยละการเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด และความยาวยอด ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

ผลการวิจัย

1. การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟอกขาวที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (โมกพวง พุดจีบ รักขาว และรักม่วง)

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อปลายยอดโมกพวง

จากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดโมกพวง ที่เก็บจากต้นในธรรมชาติ เมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที พบว่าสามารถฟอกให้ชิ้นส่วนปลายยอดปลอดเชื้อ

จุลินทรีย์ได้ถึงร้อยละ 80 มีการรอดชีวิตร้อยละ 75 เมื่อสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 10 นาที สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 20 ส่วนการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 20 และ 25 นาที สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ถึงร้อยละ 40 และ 100 ตามลำดับ แต่ปลายยอดมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล และช้ำตาย (ตารางที่ 1)

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อปลายยอดรักขาว และรักม่วง

จากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดของรักขาว และรักม่วง พบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที สามารถฟอกให้ชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนปลอดเชื้อจุลินทรีย์ถึงร้อยละ 80 มีการรอดชีวิตถึงร้อยละ 90 และการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 10 และ 20 นาที สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 20 และ 60 ตามลำดับ การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 25 นาที ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ แต่ลักษณะปลายยอดเกิดเป็นสีน้ำตาล และช้ำตาย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนโมกพวงโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่างๆ

กรรมวิธี	สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ร้อยละ)	ระยะเวลา (นาที)	การปนเปื้อน (ร้อยละ)	การปลอดเชื้อ (ร้อยละ)	การรอดชีวิต (ร้อยละ)
1	15	10	80	20	0
2	15	20	60	40	0
3	15	25	0	100	0
4	10 และ 5	10 และ 5	20	80	75

ตารางที่ 2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดรักขาว และรักม่วงโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่างๆ

กรรมวิธี	สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ร้อยละ)	ระยะเวลา (นาที)	การปนเปื้อน (ร้อยละ)	การปลอดเชื้อ (ร้อยละ)	การรอดชีวิต (ร้อยละ)
1	15	10	80	20	0
2	15	20	40	60	0
3	15	25	0	100	0
4	10 และ 5	10 และ 5	20	80	90

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อใบอ่อนพุดจีบ

จากการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนพุดจีบ เมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 15 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 100 และ การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 15 เป็นเวลา 15 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 80 และ 48 ตามลำดับ การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 15 นาที ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ แต่ใบอ่อนพุดจีบถูกทำลายทำให้ชีด และช้ำตาย ส่วนการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 20 และมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 80 (ตารางที่ 3)

2. การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดโมกพวง รักขาว รักม่วง และใบอ่อนพุดจีบ

2.1 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนยอดอ่อนโมกพวง

จากการนำชิ้นส่วนปลายยอดโมกพวงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า สูตรอาหารทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดได้ โดยสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 10.40 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (ตารางที่ 4 และภาพที่ 1 A)

ตารางที่ 3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนของพุดจีบโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆ

กรรมวิธี	สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ร้อยละ)	ระยะเวลา (นาที)	การปนเปื้อน (ร้อยละ)	การปลอดเชื้อ (ร้อยละ)	การรอดชีวิต (ร้อยละ)
1	5	15	100	0	0
2	10	15	80	20	0
3	15	15	40	60	0
4	20	15	0	100	0
5	10 และ 5	10 และ 5	20	80	80

ตารางที่ 4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดโมกบนสูตรอาหาร MS ที่ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ

BA (mg/l)	จำนวนยอดเฉลี่ย	ร้อยละการเกิดยอด
0	1.4±0.24[a]	100
1	3.4±0.24[b]	100
2	4.6±0.24[c]	100
4	8.4±0.67[d]	100

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมน์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

2.2 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดรักขาว และรักม่วง

จากการนำชิ้นส่วนปลายยอดรักขาว และรักม่วงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดของรักขาว และรักม่วง โดยสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณรักขาวและรักม่วงได้มากที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 8.2 และ 8.4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นตามลำดับ (ตารางที่ 5, 6 และภาพที่ 1 B, C)

ตารางที่ 5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดรักขาวบนสูตรอาหาร MS ที่ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ

BA (mg/l)	จำนวนยอดเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
0	1.2±0.20[a]	100
1	3.8±0.37[b]	100
3	8.2±0.37[c]	100
5	5.8±0.80[d]	100

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมน์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

ตารางที่ 6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดรักม่วงบนสูตรอาหาร MS ที่ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ

BA (mg/l)	จำนวนยอดเฉลี่ย	ร้อยละการเกิดยอด
0	1.6±0.24[a]	100
1	3.6±0.24[b]	100
3	8.4±0.40[c]	100
5	7.0±0.44[d]	100

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมน์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

2.3 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจีบ

จากการนำชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจีบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ ที่ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2, 4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด callus และยอด โดยมียอดเฉลี่ย 2.6 และ 3.0 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นตามลำดับ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 1 D)

ตารางที่ 7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนพุดจีบบนสูตรอาหาร MS ที่ดัดแปลงเป็นเวลา 3 เดือน

TDZ (mg/l)	2,4-D (mg/l)	ร้อยละการเกิดแคลลัส	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย	ร้อยละการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย
0	0	0	0[a]	0	0[a]
0.2	0	100	0.3±0.01[b]	0	0[a]
0.3	0	100	0.4±0.03[b]	0	0[a]
0.4	0	100	0.5±0.03[cd]	0	0[a]
0.5	0	100	0.4±0.03[bc]	0	0[a]
0.2	0.1	100	0.4±0.03[cd]	0	0[a]
0.3	0.1	100	0.3±0.02[b]	0	0[a]
0.4	0.1	100	0.5±0.02[d]	80	2.6±0.67[b]
0.5	0.1	100	0.5±0.02[d]	90	3.0±0.31[b]

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมน์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนโมกพวง รักขาว และรักม่วงพบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 10 นาที และ 15 นาที ชิ้นส่วนปลายยอดยังมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อยู่ และไม่มีการรอดชีวิตเนื่องจากเวลาอาจไม่เพียงพอต่อการฟอกฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับงานวิจัยของดาธิกา ไชยลังกา [5] ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 10 นาที การฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนบอนสีมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 100 ส่วนการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 25 นาที ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ แต่ปลายยอดมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล และช้ำตาย ซึ่งอาจเป็นเพราะใช้เวลานานและความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มากเกินไป เช่นเดียวกับงานวิจัยของนฤพร หรรษคุณาฒัย [6] ที่ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 20 ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อออริกาโนช้ำตายเช่นกัน ที่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที ให้ผลดีที่สุด มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์น้อย และมีร้อยละการรอดชีวิตสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของอัศวิน ธะนะปัด [7] ที่ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 14.29 ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนพุดจีบพบว่า ที่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 15 นาที ชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจีบมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ร้อยละ 100 เนื่องจากความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการฟอกฆ่าเชื้อ ที่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 15 เป็นเวลา 15 นาที มีร้อยละการปนเปื้อนเท่ากับ 80 และ 40 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าร้อยละการปนเปื้อนลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นที่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 15 นาที พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจีบถูกทำลายและช้ำตาย ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นมากเกินไป เช่นเดียวกับงานวิจัยของปุณณภา ยาวีระ [8] ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชมในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 พบว่าชวนชมแห้งตายเกือบทั้งหมด ดังนั้นในการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจีบควรใช้ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 นาที จึงจะให้ผลดีที่สุด

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดโมกพวง เมื่อเพาะเลี้ยงปลายยอดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 1.0, 2.0

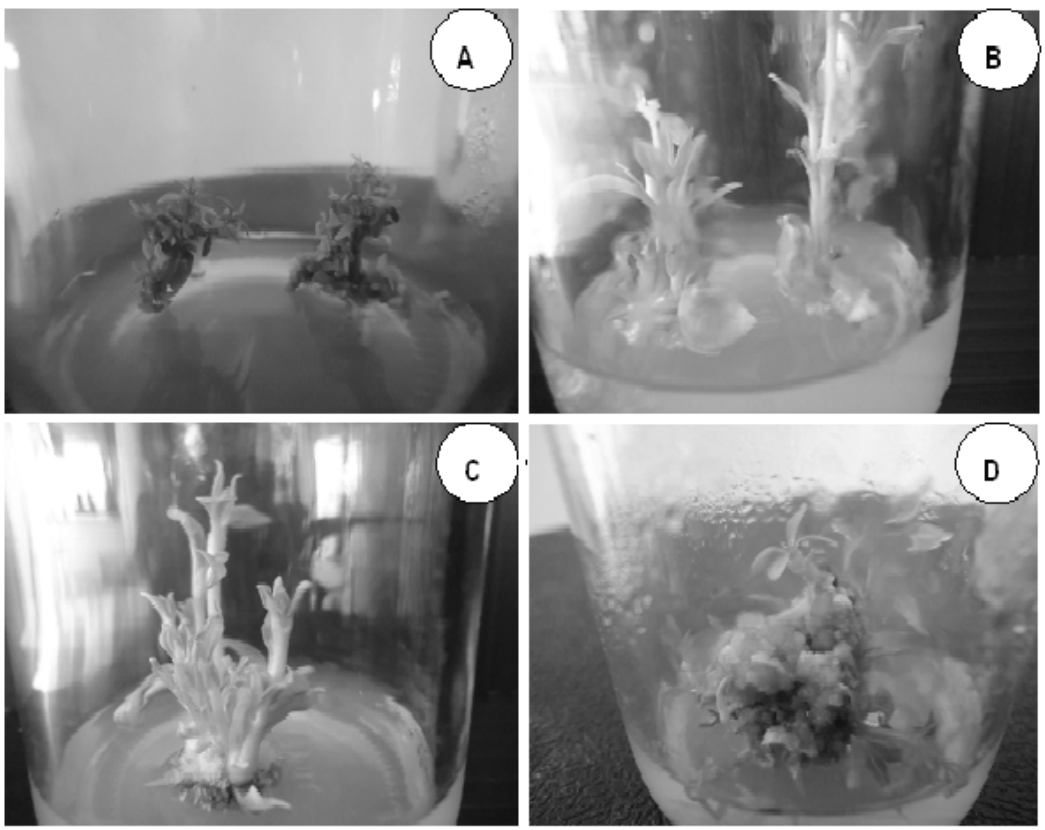
และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหารทุกสูตรอาหารสามารชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนได้ โดยสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 8.40 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kusey ; et al. [9] ซึ่งรายงานว่าเมื่อมีการเติม BA ลงในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจิบโซฟิลลาจะสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดยอด และแคลลัสได้ ส่วน Tanimoto & Harada [10] รายงานว่าเมื่อเติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงทอรีเนีย สามารถกระตุ้นให้เกิดตายอดจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้ 95-100 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนของรักขาว และรักม่วง เมื่อเพาะเลี้ยงปลายยอดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหารทุกสูตรอาหารสามารชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดอ่อนได้ โดยสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดของรักขาว และรักม่วงโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 8.2 และ 8.4 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้นตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์ [11] ซึ่งรายงานว่า นำชิ้นส่วนปลายยอดของเจตมูลเพลิงแดงมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดขนาดเล็กจำนวนมากสูงสุดถึงเฉลี่ย 201.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจีบ เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2, 4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2, 4-D สามารถชักนำให้เกิด callus สอดคล้องกับงานวิจัยของณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย [12] ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อบัวหลวงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ และ 2, 4-D สามารถชักนำให้เกิด callus ยกเว้นสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิด callus ส่วนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด callus และยอดได้ โดยมีปริมาณยอดเฉลี่ย 2.6 และ 3.0 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นตามลำดับ จากการทดลอง Lin & Chang [13] ได้ทำการขยายพันธุ์ไผ่ *Bambusa edulis* Carr. โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อมาเพิ่มจำนวนยอดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถสร้างยอดได้ โดยที่ 2, 4-D เป็นฮอร์โมนชนิดออกซินที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีคุณสมบัติดียิ่งในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ และใช้ได้

ผลดีในการเพิ่มจำนวน และรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัส [14] ส่วน TDZ จัดเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนินสังเคราะห์ที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ [15] มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ และให้ร้อยละการเกิดแคลลัสสูงสุด ดีกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น [16] ทำให้ TDZ มีความเสถียร และออกฤทธิ์คล้าย adenine-type cytokinins สาร TDZ ความเข้มข้นต่ำจึงมีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับ ไซโตไคนินในกลุ่มสารประกอบ purine ที่ถูกทำลายได้ง่าย [17] TDZ จึงมี activity ดีกว่า BA, kinetin, 2ip และ zeatin [18]

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ ซึ่งการขยายพันธุ์รักขาว และรักม่วงเป็นงานวิจัยแรกที่ยังไม่เคยมีใครศึกษามาก่อน และงานวิจัยนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ด้วยวิธีการส่งถ่ายยีนด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*



ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดอ่อนโมกพวง, รักขวา, รักม่วง และใบอ่อนพุดจีบ A. จำนวนยอดอ่อนโมกพวงที่เกิดยอดบนอาหาร MS ที่เติม BA 4 mg/L B. จำนวนยอดอ่อนรักขาวที่เกิดยอดบนอาหาร MS ที่เติม BA 3 mg/L C. จำนวนยอดอ่อนรักม่วงที่เกิดยอดบนอาหาร MS ที่เติม BA 3 mg/L D. จำนวนยอดอ่อนพุดจีบที่เกิดยอดบนอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 mg/l ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 mg/l

เอกสารอ้างอิง

[1] อร่าม คุ้มทรัพย์. (2543). *ไม้ประดับเชิงธุรกิจ*. กรุงเทพฯ: อักษรไทย.

[2] ไสว ระโหฐาน. (2554). *ศูนย์พันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับออนไลน์ที่ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย*. สืบค้นเมื่อ 12 กันยายน 2554, จาก http://www.maipradabonline.com/index.htm

[3] นันทิยา สมานนท์. (2535). *คู่มือการปลูกไม้ดอก*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

[4] Murashige, T.; & Skoog, F. (1962, October). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(1): 473-497.

[5] ดาธิกา ไชยลังกา. (2554). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของบอนสี*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). พิษณุโลก: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร.

[6] นฤพร หรรษคุณาฒัย. (2541). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกาในสภาพปลอดเชื้อ*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (พืชสวน). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[7] อัศวิน ธะนะปัด. (2553). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและใบอ่อนของมะลิ (Jasminum spp.)*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). พิษณุโลก: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร.

[8] ปุณณภา ยาวีระ. (2552). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชมในสภาพปลอดเชื้อ*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[9] Kusey, E.W.; Hammer, A.p.; & Weiler, T.C. (1980, August). *In vitro* propagation of *Gypsophila paniculata* L. Bristol Fairy. *Hortscience*. 15(5): 600-601.

[10] Tanimoto, S.; & Harada, H. (1981, April). Chemical factors controlling floral bud formation of Torenia stem segment cultured *in vitro* I. Effects of mineral nutrients and sugar. *Plant and cell physiol*. 22(8): 1553-1560.

[11] สุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์. (2547). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง (Plumbago indica L.) เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (พืชสวน). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[12] ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย. (2539). *ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง (Nelumbo nueifera Gaerth.)*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (พฤกษศาสตร์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[13] Lin, C.S.; & Chang, T. (1998, August). Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field grown culms and flowering of regeneration plantlets. *Plant Cell Reports*. 17: 617-620.

[14] รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. (2540). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[15] Huetteman, C.A.; & Preece, J.E. (1993, June). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 33(1): 105-119.

[16] Lbanez, A.; Valero, M.; & Morte, A. (2003, October). Influence of cytokinins and subculturing on proliferation capacity of single-axillary-bud microcuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon. *Anales de Biologia*. 25(1): 81-90.

[17] Mok, M.; et al. (1987, April). Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *Hortscience*. 22(6): 1194-1197.

[18] Sujatha, M.; & Reddy, T.P. (1998, October). Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Reports* 17(1): 561-566.