อิทธิพลของ BA และ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัสจากใบบอนสีหลวงราชเสน่หา

Effect of BA and 2,4-D on Callus Induction of Caladium “Luangrachsaneha” (*Caladium bicolor* Vent.) Leaf

นางสาวรอฮานี ปิดอเลาะ	**รหัสนักศึกษา 6160601018**
นายอดินันท์ ปะจู	**รหัสนักศึกษา 6160601037**

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาปัญหาพิเศษ (06-354-261)
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
ปีการศึกษา 2564

อิทธิพลของ BA และ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัสจากใบบอนสีหลวงราชเสน่หา Effect of BA and 2,4-D on Callus Induction of Caladium “Luangrachsaneha” (*Caladium bicolor* Vent.) Leaf

นางสาวรอฮานี ปิดอเลาะ	**รหัสนักศึกษา 6160601018**
นายอดินันท์ ปะจู	**รหัสนักศึกษา 6160601037**

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาปัญหาพิเศษ (06-354-261)
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
ปีการศึกษา 2564

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
ปีการศึกษา 2564

เรื่อง อิทธิพลของ BA และ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัสจากใบบอนสีหลวงราชเสน่หา

นักศึกษา นางสาวรอฮานี ปิดอเลาะ รหัสนักศึกษา 6160601018
นายอดินันท์ ปะจู รหัสนักศึกษา 6160601037

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาการศึกษาวิชาปัญหาพิเศษ ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2564

…..………………………………ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุไลมาน เจ๊ะอาบู)
……./……./…….

……..…………..…………กรรมการ
(อาจารย์ จักรพงศ์ จิระแพทย์)
……./……./…….

……..…………..…………กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นราธิษณ์ หมวกรอง)
……./……./…….

……………..………………….อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.ราฮีมา วาแมดีซา)
……./……./…….

………………………………….อาจารย์ประจำวิชา
(อาจารย์ ดร.โรสลาวาตี โตะแอ)
……./……./…….

……………………………..................หัวหน้ากลุ่มวิชาพืชศาสตร์
(อาจารย์ ดร.สุไลมาน เจ๊ะอาบู)
……./……./…….

เรื่อง	อิทธิพลของ BA และ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัสจากใบบอนสีหลวงราชเสน่หา
นักศึกษา	นางสาวรอฮานี ปิดอเลาะ รหัสนักศึกษา 6160601018
	นายอดินันท์ ปะจู รหัสนักศึกษา 6160601037
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.ราฮีมา วาแมดีซา

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสใบอ่อนของบอนสีหลวงราชเสน่หาที่ได้จากการเพาะอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 และ 2 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 45 วัน พบว่าทุกสิ่งการทดลองให้อัตราการอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ การเติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 mg/L ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 55.55 % รองลงมาคือ การเติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 ร่วมกับ BA 2 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 44.44% อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/L ร่วมกับ การเติม BA 1 และ 2 mg/L ให้จำนวนก้อนแคลลัสเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุดคือ 2.0 ก้อนต่อชิ้นส่วน และพบว่า การเติม 2,4-D 0.5 mg/L ร่วมกับ การเติม BA 2 mg/L ส่งผลให้ขนาดแคลลัสต่อก้อนมีค่าเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.28 มิลลิเมตร

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยง บอนสีหลวงราชเสน่หา แคลลัส ใบอ่อน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับสำเร็จลงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ราฮีมา วาแมดีซา อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลอง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. โรสลาวาตี โตะแอ อาจารย์ประจำวิชา ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาติดตามการดำเนินงานการทำปัญหาพิเศษจนบรรลุตามวัตถุประสงค์รายวิชา

ขอขอบคุณกรรมการสอบปัญหาพิเศษอาจารย์ ดร. สุไลมาน เจ๊ะอาบู อาจารย์ ดร.นราธิษณ์ หมวกรอง และอาจารย์จักรพงศ์ จิระแพทย์ ที่สละเวลาสอบปัญหาพิเศษ และให้คำแนะนำแก้ไขให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการศึกษาทดลองตลอดจนการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ตลอดการทดลอง ขอบคุณเพื่อนคณะเกษตรศาสตร์ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในระหว่างที่ศึกษาและทำการทดลองมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดามารดาและพี่น้องทุกคนในครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

รอฮานี ปิดอเลาะ
อดินันท์ ปะจู
มิถุนายน 2565

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (1)

กิตติกรรมประกาศ (2)

สารบัญ (3)

สารบัญตาราง (4)

สารบัญภาพ (5)

บทที่ 1 บทนำ 1

- 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
- 1.2 วัตถุประสงค์ 1
- 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2

- 2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง 2
- 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 8

- 3.1 วัสดุอุปกรณ์ 8
- 3.2 วิธีการทดลอง 9
- 3.3 การบันทึกข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล 10
- 3.4 ระยะเวลา และสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย 10

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 12

- 4.1 ผลการทดลอง 12
- 4.2 วิจารณ์ผล 14

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 16

- 5.1 สรุป 16
- 5.2 ข้อเสนอแนะ 16

เอกสารอ้างอิง 17

ภาคผนวก 18

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสม ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 และ3 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 และ 6 mg/L	10
4	ผลของ BA และ 2,4 D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่ห์หา หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 45 วัน	12

ตารางผนวกที่

1	การเตรียมสต็อคสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตรพื้นฐาน MS	20

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**
1 หลวงราชเสน่หา 3
2 A แสดงใบของบอนสีหลวงราชเสน่หา B ใบบอนสีหลวงราชเสน่หาที่ยังม้วนอยู่ 8
3 การตัดชิ้นส่วน 9
6 การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วน 11
7 จำนวนและขนาดการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่หา เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน 12

ภาพผนวกที่ **หน้า**
1 ชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่หา เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน 19

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ไม้ดอกไม้ประดับของประเทศไทยในปัจจุบันถือได้ว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากในด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพืชที่มีลักษณะสวยงาม มีทั้งไม้ล้มลุก ไม้พุ่ม และไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ จึงนิยมมาปลูกเป็นไม้ประดับในอาคารสถานที่ต่าง ๆ เช่น บอนสี

บอนสีเป็นไม้ดอกไม้ประดับอีกชนิดหนึ่งที่สร้างสีสันโดยมีเอกลักษณะอยู่ที่ใบ เสน่ห์ของบอนสีนอกจากรูปทรงและสีสันแล้วลวดลายที่ปรากฏบนใบตลอดจนก้านใบเป็นงานศิลปะของธรรมชาติที่สร้างความประทับใจแก่ผู้ที่พบเห็นจนได้รับสมญานามจากผู้คนทั่วโลกว่า ราชินีแห่งไม้ใบ

บอนสีหลวงราชเสน่หา มีความสูงก้านใบ 26 เซนติเมตร ความยาวใบ 21.5 เซนติเมตร ความกว้างใบ 14.3 เซนติเมตร ความยาวหูใบ 5.5 เซนติเมตร ใบยาว ปลายใบแหลม พื้นใบสีชมพูเข้มเส้นใบสีแดง กระดูกสีเขียวเข้ม ขอบใบสีชมพูเข้ม มีเสี้ยน ไม่มีสะพาน เป็นบอนสีพันธุ์ไทยแท้ ราคาขายเฉลี่ยกระถาง 8 นิ้ว ราคาเริ่ม 400 บาท ปัจจุบันกำลังได้รับความนิยมและมีโอกาสผลิตเป็นไม้ประดับเพื่อการส่งออกได้ในอนาคต (Patjastuas,2012)

ในการขยายพันธุ์บอนสีหลวงเสน่หาเพื่อรองรับตลาดต่างประเทศในอนาคต จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งนับว่าเป็นวิธีการที่สำคัญเนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้รวดเร็วเพียงพอกับความต้องการของตลาด ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ประสบความสำเร็จประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญคือ การฟอกฆ่าเชื้อ การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้น การชักนำราก และการอนุบาลต้นหลังออกจากขวด อย่างไรก็ตามพบว่า ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลรายงานการเพาะเลี้ยงบอนสีราชเสน่หา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาขั้นตอนเบื้องต้นสำหรับการชักนำแคลลัสจากใบของหลวงราชเสน่หา ทั้งนี้เพื่อสามารถนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดต้น และรากต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต N6-Benzyladenine (BA) และ2,4 D dimethylammonium ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสีหลวงราชเสน่หา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสของใบหลวงราชเสน่หา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบอนสี

บอนสีเป็นพืชในวงศ์ Araceae ซึ่งเป็นวงศ์ใหญ่ ประกอบด้วยสกุลต่างๆถึง 105 สกุล มากกว่า 3,300 ชนิด กระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนมีทั้งพวกที่ขึ้นได้บนดินบางพวกอยู่ในน้ำ และบางพวกก็เลื้อยเกาะต้นไม้ เป็นไม้พุ่ม เป็นพืชที่มีลำต้นใต้ดินมีลักษณะเป็นเหง้า (rhizome) หรือหัว (tuber) มีทั้งกลุ่มที่มีใบเดี่ยว (simple leaf) และ ใบประกอบ (compound leaf) เส้นใบแบบร่างแห (net-veined) ดอกมีลักษณะเป็นแบบช่อเชิงลดมีกาบ (spadix) มีรังไข่เหนือวงกลีบ (hypogynous) มีเพศเดียว(unisexual flower) หรือดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) พวกที่มีความสำคัญทาเศรษฐกิจ (Bumee, 2010)

บอนสีหลวงราชเสน่หาไทยแท้ มีความสูงก้านใบ 26 เซนติเมตร ความยาวใบ 21.5 เซนติเมตร ความกว้างใบ 14.3 เซนติเมตร ความยาวหูใบ 5.5 เซนติเมตร ใบยาว ปลายใบแหลม พื้นใบสีชมพูเข้มเส้นใบสีแดง กระดูกสีเขียวเข้ม ขอบใบสีชมพูเข้ม มีเสี้ยน ไม่มีสะพาน (Patjastuas,2012)

ภาพที่1 หลวงราชเสน่หา

ที่มา: Patjastuas, (2012)

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่งโดยนำชิ้นส่วนของพืชได้แก่ ลำต้น ตาข้าง ยอด ดอก ใบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาวะที่ควบคุมในเรื่องของความปลอดเชื้อ อุณหภูมิ และแสง เพื่อให้ชิ้นส่วนเหล่านั้นสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ สามารถนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกได้ต่อไป

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. คัดเลือกชิ้นส่วนพืช ส่วนของพืชแทบทุกส่วนไม่ว่าจะเป็นส่วนของลำต้น ตา ดอก ราก แม้กระทั่งเนื้อเยื่อเซลล์หรือโปรโตพลาสต์สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพัฒนาให้เกิดเป็นต้นพืชได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิดพืช และวัตถุประสงค์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การทำความสะอาดชิ้นส่วนที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรเป็นชิ้นส่วนที่สะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังนั้นจึงต้องนำมาฆ่าเชื้อด้วยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อแล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3. การตัดเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนพืชที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางลงบนอาหารสังเคราะห์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. การบ่มเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนพืชวางบนชั้นที่มีแสงสว่าง 2,000-4,000 ลักซ์ วันละ 12-16 ชั่วโมง ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งชิ้นส่วนของพืชมีการพัฒนา เป็นต้นที่สมบูรณ์

5. การตัดแบ่งและเลี้ยงอาหาร ตัดแบ่งชิ้นส่วนพืชและเปลี่ยนอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณของต้นพืชทุก 1-2 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและระยะการเจริญเติบโตทำการเปลี่ยนอาหารจนกระทั่งพืชเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์

6. การย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติ นำต้นพืชที่มียอดและรากที่สมบูรณ์ออกจากขวดล้างวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมดด้วยน้ำสะอาดและผึ่งลมให้แห้ง แช่น้ำยาป้องกันกำจัดเชื้อรานำไปปลูกในวัสดุที่โปร่ง สะอาด ระบายน้ำได้ดีวางไว้ในที่ร่ม และพรางแสง 60 เปอร์เซ็นต์ประมาณ 4 สัปดาห์หรือจนกระทั่งต้นพืชตั้งตัวได้ (Department of Agricultural Extension, 2016)

ธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในอาหารสังเคราะห์ประกอบด้วยธาตุอาหารที่มีความจำเป็นสำหรับการทำงานและการเจริญเติบโตของพืช ดังนี้

1. ธาตุอาหารหลัก (Macro หรือ Major element) เป็นแร่ธาตุที่พืชต้องการในปริมาณที่มากกว่า 0.5 m mol l^{-1} ได้แก่ C H O N P K S Mg และ Ca

2. ธาตุอาหารรอง (Micro element) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการเล็กน้อยในปริมาณน้อยกว่า 0.5 m mol^{-1} ได้แก่ Fe Mn Cu Zn B และ Mo

3. วิตามิน (Vitamins) เพื่อการเสริมสร้างการเจริญเติบโต วิตามินที่สำคัญ ได้แก่วิตามิน B1 (Thiamine) วิตามิน B6 (Pyridoxine) วิตามิน B3 (Nico-tinic acid) วิตามิน B5 (Calcium pantothenate) และ Inosital

4. กรดอะมิโน (Amino acid) ที่นิยมใช้คือ L-glycine กรดอะมิโนอื่นใช้บางในบางกรณี เช่น Glutamic acid และ Aspartic acid เป็นต้น

5. น้ำตาล (Sugar) เป็นแหล่งที่ให้พลังงาน น้ำตาลที่นิยมใช้คือ Sucrose พืชบางชนิดเจริญได้ดีในน้ำตาล Glucose และ Fructose นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลชนิด อื่นเช่น Sorbitol, Maltose, Galactose, Mannose และ Lactose น้ำตาลที่ใช้ใน อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ประมาณ 2-5 เปอร์เซ็นต์

6. สารอินทรีย์อื่น ๆ เป็นสารซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ของพืชซึ่งไม่รู้องค์ประกอบที่แน่นอน ทำหน้าที่ ส่งเสริมการเจริญเติบโตเช่น น้ำมะพร้าว Casein hydrolysate (CH) น้ำมะเขือเทศ มันฝรั่ง กล้วย ส่วนสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ซึ่งสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืชมักมีปริมาณและคุณภาพไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับอายุและสายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองควรหลีกเลี่ยงไปใช้กรดอะมิโนอื่นที่รู้องค์ประกอบที่แน่นอนแทน เช่น L-Asparagine, L-Glutamine เป็นต้น

7. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth hormones หรือ Growth regulators) เป็นสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงขบวนการทางสรีระบางอย่างของพืช ซึ่งมีผลต่อ

การเจริญเติบโตของพืชการแบ่งเซลล์ การขยายตัวของเซลล์พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Auxin มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และยืดตัวของเซลล์ ยับยั้งการเจริญของตาข้าง (Apical dominance) กระตุ้นการเกิดราก สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ NAA (Naptha-lene acetic acid), IBA (Indolebutyric acid) 2,4 D dimethylammonium

2. Cytokinin มีผลต่อการแบ่งเซลล์ การขยายตัวของเซลล์ กระตุ้นให้เกิดยอดกระจุก ยับยั้งการเกิดตายอด สารในกลุ่มนี้ได้แก่ BAP (6-Benzylamino purine), 2-IP (Isonentenyl adenine), Kinetin (6- Furfurylamino purine) BA (6-benzyladenine)

3. Gibberellins มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ ที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ GA3 (Gibberellin A3) โดยปกติทั่วไปมักใช้ GA รวมกับ auxin และ cytokinin ชนิดอื่น (Department of Agricultural Extension, 2016)

รูปแบบของการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเจริญได้เป็น 3 แบบใหญ่ ๆ อย่างใดอย่างหนึ่ง คือ

1. เกิดแคลลัส (Callus formation)

แคลลัส คือ กลุ่มเซลล์พาเรนไคมา (Parenchyma) ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นรากหรือลำต้น อาจจะอยู่กันหลวมๆ หรือ เกาะกันแน่น มีได้หลายสี เช่น สีขาว เหลือง ม่วง แดงเขียว โดยขึ้นกับรงควัตถุต่าง ๆ ภายในเซลล์ แคลลัสสามารถถูกชักนำให้เป็นต้นได้โดยการเปลี่ยนสัดส่วนความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินในอาหารเลี้ยงให้เหมาะสม โดยถ้าสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนินก็จะชักน าให้เกิดราก ในทางกลับกันถ้ามีไซโตไคนินมากกว่าออกซินก็จะพัฒนาไปเป็นยอด ต้นที่เจริญมาจากแคลลัสนี้มีจุดกำเนิดได้ 2 แบบ คือ เจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวโดยที่หนึ่งเซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือเจริญมาจากกลุ่มเซลล์ข้างเคียงกัน โดยที่กลุ่มเซลล์เหล่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ แล้วเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

2. เกิดออร์แกโนเจนเนซิส (Organogenesis)

ออร์แกโนเจนเนซิสเกิดขึ้นจากกลุ่มเซลล์พาเรนไคมามีการแบ่งตัวในอัตราสูง ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นจุดกำเนิดของยอดหรือราก ซึ่งเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน ขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อหรือเซลล์นั้นได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญเป็นส่วนใด การเชื่อมต่อระหว่างยอดและรากในการเกิด ออร์แกโนเจนเน

ซิสเป็นขบวนการเกิดที่อิสระต่อกัน รากอาจจะเกิดต่างบริเวณกับที่เกิดของยอด จึงอาจจะไม่ติดต่อกันได้แต่บางครั้งเกิดขึ้นใกล้เคียงกันมากจนท่อน้ำท่ออาหารเชื่อมติดกันก็ได้

3. เกิดเอ็มบริโอเจนนีซิส (Embryogenesis)

เกิดเอ็มบริโอเจนนีซิสกลายเป็นเอ็มบริออยด์ (Embryoid) เอ็มบริออยด์มีพัฒนาการเหมือนเอ็มบริโอแต่ต่างกันตรงจุดกำเนิด คือ เอ็มบริโอได้จากการที่ละอองเรณู (Pollen grain) เข้าผสมกับโอวูล (Ovule) ได้เป็นไซโกต (Zygote) แล้วเจริญเป็นเอ็มบริโอ หลังจากนั้นเอ็มบริโอจะมีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ คือ จากเอ็มบริโอก็เป็นรูปกลม (Globular stage) รูปหัวใจ (Heartstage) รูปตอร์ปิโด (Torpedo stage) และต้นกล้า (Plantlet) ตามลำดับ แต่เอ็มบริออยด์นั้นมีจุดกำเนิดจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร (Kanchanapoom.1999)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ratana et al. (2017) ได้การศึกษาอิทธิพลขอ N6-Benzyladenine (BA) และ α-Naphthalene acetic acid (NAA) ต่อการเพาะเลี้ยง ใบอ่อนบอนสีสายพันธุ์ Strawberry Star ในสภาพปลอดเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. บนอาหาร สังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog, 1962 (MS) ที่เติม BA เข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 mg/L ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0 และ 0.5 mg/L เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 mg/L สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบอ่อนมีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ที่สุดร้อยละ 50 และพบว่ามีการสร้างยอดจากแคลลัสร่วมด้วย จากนั้นทำการย้ายแคลลัส และยอดมาเพาะเลี้ยงบน อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 mg/L ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0 และ 0.5 mg/L เพื่อการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนบอนสี เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Madeeyah et al. (2017) ได้ทำการศึกษาผลของไซโตไคนินและความเข้มข้นต่อการเกิดยอดและจำนวนยอดของบอนสี *Caladium bicolor* Vent. ในสภาพปลอดเชื้อ ผลของไซโตไคนินและความเข้มข้นต่อการเกิดยอดและจำนวนยอดของบอนสี Caladium bicolor Vent. ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำส่วนต่าง ๆ ของบอนสีได้แก่ ปลายยอด ส่วนใบที่มีก้านใบ ส่วนใบที่ไม่มีก้านใบ และส่วนก้านใบ เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA ความเข้มข้น 3 mg/L น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 1.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ส่วนบอนสีที่มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุดคือส่วนปลายยอด โดยมีเปอร์เซ็นต์ การเกิดยอดรวมสูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวมเฉลี่ยสูงสุด 22.85 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วนพืช ส่วนระดับความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดใหม่ของบอนสีนั้น โดยการนำส่วน ยอดเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติม BA ที่มี 4 ระดับความเข้มข้น

(0 1 3 และ 5 mg/L) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า BA ระดับความเข้มข้น 5 mg/L ไม่เฉพาะที่จะสามารถชักนำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่สูงสุดแล้ว 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังทำให้เกิดจำนวนยอด สูงสุดรวมเฉลี่ย 18.08 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชอีกด้วย

(Bumee, 2010) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสีสายพันธุ์ Jackie Suthers โดยใช้ชิ้นส่วนใบ และก้านใบเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ซึ่งอาหารที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส คืออาหารที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ (2,4-D- dimethylammonium) ความเข้มข้น 0.1 mg/L น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และใช้อาหาร MS สูตรที่เติม BA ความเข้มข้น2.0 mg/L NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/L เพื่อชักนำให้เกิดยอด โดยสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดได้ 68.6 เปอร์เซ็นต์ และย้ายยอดที่ได้ลงอาหาร MS ที่ไม่มีสารเร่งการเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดรากก่อนนำปลูกในกระถาง

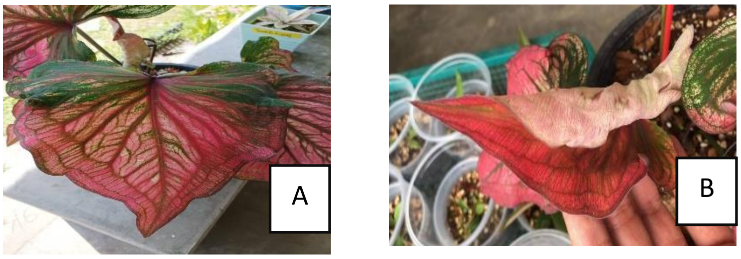
บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 พืชทดลอง

ต้นบอนสีหลวงราชเสน่หา โดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนที่ยังม้วนอยู่ตัว



ภาพที่ 2 A แสดงใบของบอนสีหลวงราชเสน่หา B ใบบอนสีหลวงราชเสน่หาที่ยังม้วนอยู่

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

3.1.2.1. เครื่องชั่ง (Balance)

3.1.2.2. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

3.1.2.3 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

3.1.2.4. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น บิกเกอร์, กระบอกตวง, แท่งแก้ว, ขวดปรับปริมาณ, หลอดทดลอง, กรวย, และปิเปต เป็นต้น

3.1.2.5. เครื่องทำน้ำกลั่น (distill water apparatus)

3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.3.1. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air flow cabinet)

3.1.3.2. ชั้นวางสำหรับขวดเนื้อเยื่อ

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

3.1.4.1. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตรสังเคราะห์

- MS (Murashige and Skoog 1962)

3.1.4.2. สารเติมฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่

- BA(6-benzyladenine)
- 2,4 D dimethylammonium

3.1.4.3. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

-ไฮเตอร์

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารเคมีและอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การฟอกฆ่าเชื้อบอนสี

. ตัด ชิ้นส่วนของใบแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายไฮเตอร์ครั้งที่1 แช่สารละลายทีมีความเข้มข้น 10 % นาน 5 นาที ล้างน้ำสะอาด แล้วทำครั้งที่ 2 แช่สารละลายที่มีความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที (เขย่าตลอดเวลา) หรืออาจใช้เครื่องเขย่า

2. การเตรียมอาหาร

ดูดสารสต็อกของสูตรอาหาร MS มาละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำตาล 30 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นหลังจากนั้นทำการปรับ pH ให้ได้ประมาณ 5.6- 5.8 เติมวุ้น นำไปต้มให้เดือดแล้วทำ การกรอกอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปิดฝาให้สนิท และนำอาหารมาทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 25 นาที

3. การเตรียมอาหารที่เติมสารเติมฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA, 2,4 D

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS เช่นเดียวกันกับการเตรียมอาหารในข้อ 2 แล้วเติมฮอร์โมนเติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L

3.2.2 การทดสอบสูตรอาหารเบื้องต้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส

นำชิ้นส่วนใบอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำมาวางบนอาหาร ดังนี้

ภาพที่ 3 การตัดชิ้นส่วน

ตารางที่ 2 ทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส นำชิ้นส่วนใบ มาย้ายลงในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 1 เดือน ดังนี้

Treatment	2,4-D mg/L	BA mg/L
1	0	0
2	0.5	0
3	1	0
4	0	1
5	0.5	1
6	1	1
7	0	2
8	0.5	2
9	1	2

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) สิ่งทดลองละ 9 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ขวดละ 1 ชิ้น ใบอ่อน เพาะเลี้ยง นำไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เพาะเลี้ยงระยะเวลา 2 เดือน

3.3 การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

1.การปนเปื้อนและการรอดชีวิตของชิ้นส่วนบอนสี ทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลานาน 2 เดือน

2. บันทึกภาพลักษณะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนทุกสัปดาห์

3. บันทึกขนาดและจำนวนก้อนแคลลัสต่อชิ้นส่วนทุกสัปดาห์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการเจริญเติบโตขนาดและจำนวนก้อนแคลลัสต่อชิ้นส่วนไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี DMRT (Duncan’s Multiple Range Test)

3.4 ระยะเวลาและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

เริ่มต้นตั้งแต่ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2565 ถึง เดือนมิถุนายน 2565

สถานที่ทำการวิจัย ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

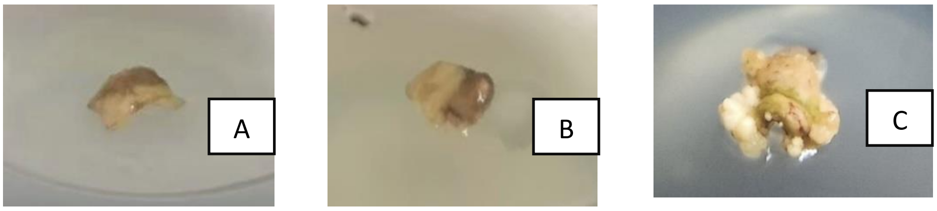
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลของ BA และ 2,4 D ต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนบอนสีใบอ่อนหลวงราชเสน่หา

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสีหลวงราชเสน่หาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L ระยะเวลานาน 2 เดือน พบว่าทุกสิ่งการทดลองให้อัตราการอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงคือบางชิ้นเกิดการบวม ม้วนงอ ไม่เกิดแคลลัส บางชิ้นมีการเกิดแคลลัส เป็นต้น (ภาพที่ 4 , ตารางที่ 4)



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วน A. ชิ้นส่วนยังไม่เกิดแคลลัส B. ชิ้นส่วนเกิดการบวม ม้วนงอ C. ชิ้นส่วนมีการเกิดแคลลัส

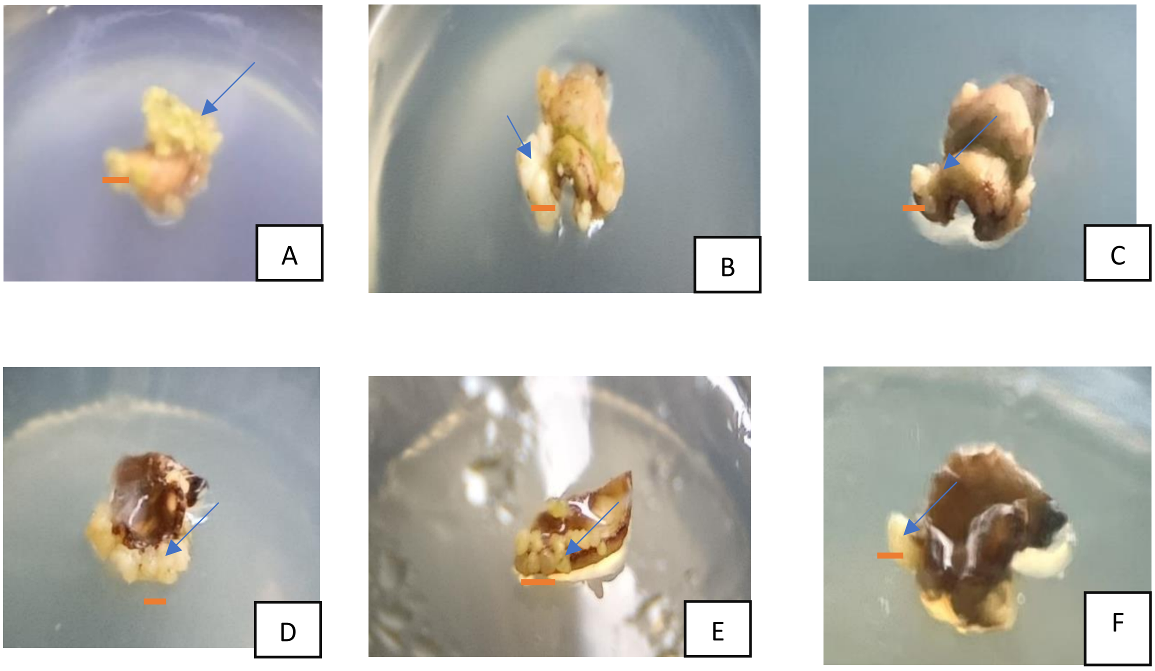
ผลของ BA และ 2,4 D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่หา

นำชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสีหลวงราชเสน่หาที่ได้จากการเพาะอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 45 วัน พบว่าสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ปริมาณ 0.1 และ 0.5 mg/L เติมหรือไม่เติม BA มีการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยพบว่าการเติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 mg/L ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 55.55 % รองลงมาคือ การเติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 mg/L ร่วมกับ BA 2 mg/L ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 44.44%

เมื่อพิจารณาจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/L ร่วมกับการเติม BA 1 และ 2 mg/L ให้จำนวนก้อนแคลลัสเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุดคือ 2.0 ก้อนต่อชิ้นส่วน สำหรับขนาดของแคลลัสพบว่า การเติม 2,4-D 0.5 mg/L ร่วมกับ การเติม BA 2 mg/L ส่งผลให้ขนาดแคลลัสต่อก้อนมีค่าเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.28 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของ BA และ 2,4 D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่หา หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 45 วัน

สิ่งทดลอง	สูตรอาหาร		อัตราการรอดของชิ้นส่วน/เปอร์เซ็นต์	แคลลัส			
	2,4 D	BA		เปอร์เซ็นต์การเกิด	จำนวนเฉลี่ย/ชิ้นส่วน (จำนวน)	ขนาดมิลลิเมตร/ก้อน (มิลลิเมตร)	สีของแคลลัส
1	0	0	100	0	0	0	-
2	0.5	0	100	55.55	2.00 ± 0.82	0.18 ± 0.15	สีเหลืองปนเขียวอ่อน
3	1	0	100	22.22	1.50 ± 0.71	0.20 ± 0.14	เหลือง
4	0	1	100	0	0	0	-
5	0.5	1	100	11.11	2.00 ± 0.00	0.20 ± 0.00	เหลืองอ่อน
6	1	1	100	22.22	1.50 ± 0.71	0.10 ± 0.00	เหลืองอ่อน
7	0	2	100	0	0	0	-
8	0.5	2	100	44.44	2.00 ± 1.15	0.28 ± 0.22	เหลืองอ่อน
9	1	2	100	11.11	1.00 ± 0.06	0.10 ± 0.00	เหลืองอ่อน



ภาพที่ 5 จำนวนและขนาดแคลลัสที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่หา เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

A. สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ทีมี่ความเข้มข้น 0.5 mg/L

B. สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ทีมี่ความเข้มข้น 1 mg/L.

C. สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/L. และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L

D. สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L. และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L

E. สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/L. และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 2 mg/L

F. สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L. และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 2 mg/L

↙ ลูกศรสีน้ำเงินแสดงแคลลัสที่เกิดขึ้น

▬ บาร์สีแดง เท่ากับ 1 มิลลิเมตร

4.2 วิจารณ์ผล

จากการนำชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่หา ลงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L เป็นเวลา 45 พบว่าทุกสิ่งการทดลองให้อัตราการอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Buddharak et al. (2012) ซึ่งรายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศ และบอนสี โดยการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหัวว่านสี่ทิศมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 5 นาที สามารถทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศปลอดเชื้อมากที่สุด 85.71 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำชั้นส่วนเนื้อเยื่อหัวว่านสี่ทิศที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (Murashigeand Skoog, 1962) ดัดแปลง ที่เติม Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1.0 mg/L ร่วมกับ N6 - benzyl adenine(BA) ความเข้มข้น 0.5, 0.75, และ 2 mg/L พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และรากได้ในเวลา 6 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิตถึง 80 เปอร์เซ็นต์

จากการนำชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสีหลวงราชเสน่หา ลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 45 วัน พบว่าสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ปริมาณ 0.1 และ 0.5 mg/L เติมหรือไม่เติม BA มีการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยพบว่าการเติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 mg/L ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 55.55 % รองลงมาคือ การเติม 2,4-D ปริมาณ 0.5 ร่วมกับ BA 2 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 44.44% การเติม 2,4-D ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เนื่องจากว่า 2,4-D เป็นสารกลุ่มออกซิน ซึ่งมีผลต่อการแบ่งเซลล์ดังนั้นการเติม 2,4-D ในอาหารจึงส่งผลโดยตรงต่อการเกิดแคลลัส ในขณะที่อาหารที่ไม่เติม 2,4-D ไม่มีการเกิดแคลลัสแต่อย่างใด สอดคล้องกับ (Bumee, 2010) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสีสายพันธุ์ Jackie Suthers โดยใช้ชิ้นส่วนใบ และก้านใบเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ซึ่งอาหารที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส คืออาหารที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และใช้อาหาร MS สูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 mg/L NAA ความเข้มข้น 0.2 mg/L เพื่อชักนำให้เกิดยอด โดยสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดได้ 68.6 เปอร์เซ็นต์

Hussain et al. (2010) รายงานว่า พันธุกรรม ชนิดของอาหาร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส การเกิดลักษณะและรูปร่างของแคลลัสควบคุมด้วยชนิดและระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโต ในการศึกษาส่วนนี้ใช้ปริมาณสาร

ควบคุมการเจริญเติบโตทั้งออกซินและไซโตไคนินในสัดส่วนที่เท่ากันเพราะต้องการชักนำให้เกิดเฉพาะแคลลัสและยับยั้งจุดกำเนิดของอวัยวะ

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสใบอ่อนของบอนสีหลวงราชเสน่หาที่ได้จากการเพาะอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 และ 2 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 45 วัน พบว่าการทดลองทุกทรีตเมนต์มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/L จำนวนเฉลี่ยมากที่สุด 55.55 เปอร์เซ็นต์ และขนาดเฉลี่ยมากที่สุด ของแคลลัส มีขนาด 0.80 มิลลิกรัม/ชิ้นส่วน สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 0. mg/L. และเติม BA ปริมาณ 2 mg/L. ลักษณะของแคลลัสมีเหลือง สีเหลืองอ่อน และแคลลัสเป็นแบบเกาะกันแน่นมากขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1. ทำการทดลองต่อเนื่องจนกว่าแคลลัสจะมาออกเป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Bunmee, K. 2010. In vitro tuber induction of caladium caladium bicolor vent. Cv. Motaya. [Master's thesis, Silpakorn University.]. Silpakorn University. http:/202.28.75.7/xmlui/handle/123456789/10161 .pdf (in Thai)

Department of Agricultural Extension. (2016). Plant tissue culture method Tissue culture. (p.11). The Agricultural Cooperative Federation of Thailand. Limited.

Hussain, Z., M. H. Khan, R. Bano, H. Rashid, & Z. Chaudhry. 2010. Protocol optimization for efficient callus induction and regeneration in three Pakistani rice cultivars. Pak. J. Bot. 42, 879-887.

Kanchanapoom k., (1999) Plant tissue culture [Master's thesis, Chulalongkorn University]. Chulalongkorn University http://www.facagri.cmru.ac.th/research/subject_file/20200622102010.pdf (in Thai)

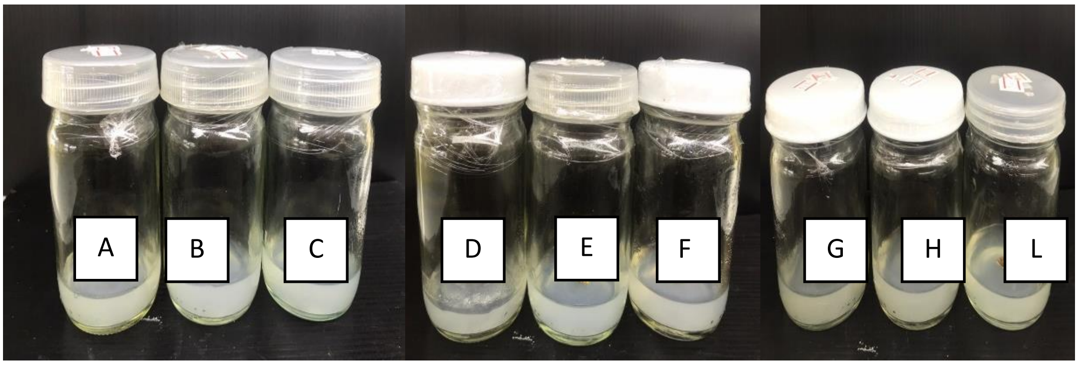
Madeeyah, N., Peeya, R., & Sahoh, S. 2017. Effects of Cytokynins and Concentrations on Development and Number of Multiple Shoots of In Vitro Culture of Caladium bicolor Vent. Journal of Science and Technology 2(2): 57-65. (in Thai)

Patjastuas, P. 2012. Biomimicry for visual communication design: caladium [Master's thesis, Silpakorn University]. Silpakorn University. http://www.sure.su.ac.th/xmlui/bitstream/handle/123456789/3558/fulltext.pdf?sequence2 &isAllowedy (in Thai)

Buddharak, P., Chundet, R., & U-kong, W. 2012. Micropropagation of Caladium bicolor Vent., Kalanchoe blossfeldiana Poellnitz. and Kakanchoe pinnata Pers. Journal of Science Ladkrabang 21(2): 1-15. (in Thai)

Rattana K., Supavee S., & Munglue P. 2017. Effect of BA and NAA on in Vitro Culture Young Leaf of Caladium bicolor Vent. [Master's thesis, Ubon Ratchathani Rajabhat University]. Ubon Ratchathani Rajabhat University. https://www.thaiscience.info/Journals/Article/SDUJ/10986830.pdf (in Thai)

ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 ชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีหลวงราชเสน่หา เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

หมายเหตุ A = อาหารสูตร MS ใช้เป็นสิ่งทดลองควบคุม, B = สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ทีมีความเข้มข้น 0.5 mg/L,C สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มี่ความเข้มข้น 1 mg/L , D = สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L, E = สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/L และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L, F = สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L , G = สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L H = สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/L. และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 2 mg/L L = สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม 2,4 D ที่มีความเข้มข้น 1 mg/L และเติม BA ที่มีความเข้มข้น 2 mg/L

ตารางผนวกที่ 1 การเตรียมสต็อคสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตรพื้นฐาน MS

องค์ประกอบ	สูตรพื้นฐาน MS (1000 มิลลิลิตร) (กรับต่อลิตร)
กลุ่มที่1 (A)	
$NH_4\ NO_3$	1.650
KNO_3	1.900
KH_2POA_4	0.170
$CaCp_{12}.2H,0$	0.440
$MgSO_4.7H,0_2$	0.370
กลุ่มที่ 2 (B)	
H_3BO_3	0.0062
KI	0.00083
$MnSO_4.H_2O$	0.0169
$ZnSO_4.7H_2O$	0.00614
$CuSO_4.5H_2O$	0.000025
$CoCL_2.6H_2O$	0.000025
$NaMoO_4.2H_20$	0.00025
กลุ่มที่ 3 (C)	
$FeSO_4.7H_2O$	0.0278
Na_2EDTA	0.0373
กลุ่มที่ 4 (D)	
Nicotinic acid	0.0005
Pyridoxine HCI	0.0005
Thiamine HCI	0.0001
Glycine	0.0020
น้ำตาล 30 กรัม วุ้น 7.5 กรัม ปรับ pH 5.7-5.8	