วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2560 : 35 (2) : 95 - 103

ผลของสารฟอกฆ่าเชื้อและสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำบูเซป *Bucephalandra sp.*

Effect of Disinfectants and Plant Growth Regulator in Aquatic Plant *Bucephalandra sp.* Micropropagation

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] อัจฉรี เรืองเดช[1] สมเกียรติ สีสนอง[2] และสมชาย หวังวิบูลย์กิจ[1]
Nongnuch Laohavisuti[1*], Uscharee Ruangdej[1], Somkiat Seesanong[2] and Somchai Wangwibulkit[1]

บทคัดย่อ

พรรณไม้น้ำบูเซป (*Bucephalandra* spp.) เป็นพรรณไม้น้ำสวยงามชนิดใหม่ที่ถูกค้นพบในเกาะเบอร์เนียว มีลักษณะเด่น คือ มีจุดสว่างหรือที่เรียกว่ามุกบนใบ จากลักษณะเด่นดังกล่าวจึงทำให้ราคาขายต่อต้นของพรรณไม้น้ำชนิดนี้สูงมาก แต่พรรณไม้น้ำชนิดนี้มีข้อจำกัดคือขยายพันธุ์ได้ช้าและยังต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถูกนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ การศึกษาชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำบูเซป พบว่าการฟอกกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวภายนอกของชิ้นเนื้อเยื่อต้นบูเซปที่เหมาะสม ได้แก่ การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 10 % 20 นาที และฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) 0.1 % นาน 10 นาที เลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดสูงถึง 90 % และไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อมาเพิ่มปริมาณโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยศึกษาผลของ adenine sulfate (Ads) ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 75 mg/L ร่วมกับ 6-benzylaminopurine (BAP) ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/L ต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อตายอดของต้นบูเซป เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อน จำนวน 2.45±0.15 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบใหม่ 15.25±0.92 ใบ มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากนั้นนำมาศึกษาความเข้มข้นของ NAA ที่ 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 mg/L ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการชักนำให้เกิดรากและเพิ่มขนาดของต้นบูเซป เป็นระยะ 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA สามารถชักนำให้ต้นบูเซปเกิดจำนวนรากมากได้มากที่สุด จำนวน 8.45±0.67 ราก และมีการเจริญเติบโตดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นๆ

คำสำคัญ : บูเซป การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารฟอกฆ่าเชื้อ สารควบคุมการเจริญเติบโต

Abstract

Bucephalandra spp. is a new type of aquatic plants which found in Borneo. These aquatic plants have bright spot, known as pearl on the leaves. As this aquatic plant species is very expensive, slow propagation and imported from abroad. The propagation technique through tissue culture would hypothesis help to solve this problem. Four experiments were conducted to find out the optimum conditions for *Bucephalandra* sp. growth. The first experiment aimed to determine the optimum kind and concentration of surface sterilization method. The result showed that using 10% NaOCl for 20 minutes followed by 0.1% $HgCl_2$ for 10 minutes was the best result. After 4 weeks of culturing on MS medium, it provided the highest of survival (90%) and non-contamination. The second experiment aimed to determine

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[2] ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
* Corresponding author: E-mail: nonmgnuch.la@kmitl.ac.th; Tel. 0 2329 8517

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the optimum concentration of growth regulators. The axenic tissue were cultured using the combination of adenine sulfate (Ads) at 0, 25, 50, 75 mg/L and 6-benzylaminopurine (BAP) at 0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/L supplemented in MS semi-solid medium. The media contain BAP 0.5 mg/L showed the increase of plantlets (2.45±0.15 shoot/explant) and new leaves (15.25±0.92) significantly ($P<0.05$). The third experiment attempted to evaluate the optimum concentration of NAA (0, 0.1, 0.3, 0.5 and 0.7 mg/L) to induce roots. After 8 weeks, the MS semi-solid medium with no NAA showed the best increment of roots (8.45±0.67).

Keywords: in vitro, *Bucephalandra* sp., adenine sulfate, 6-benzylaminopurine

คำนำ

พรรณไม้น้ำสกุลบูเซป (*Bucephalandra* spp.) เป็นพรรณไม้น้ำสวยงามชนิดใหม่ ที่นิยมใช้ตบแต่งตู้พรรณไม้น้ำเนื่องจากมีลักษณะเด่นคือ มีจุดสว่างหรือที่เรียกว่ามุกบนใบ และมีความทนทานสามารถปลูกประดับอยู่ในตู้ได้เป็นเวลานาน จึงมีความต้องการของผู้เลี้ยงพรรณไม้น้ำชนิดนี้มีทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ และจากความนิยมดังกล่าวจึงทำให้ราคาขายต่อต้นของพรรณไม้น้ำชนิดนี้สูงมาก โดยมีราคาตั้งแต่หลักร้อยบาทถึงหลักหลายพันบาท หนึ่งในเหตุผลหลักที่ทำให้มีราคาสูงนั้น มีสาเหตุจากพรรณไม้ชนิดนี้เป็นไม้ป่าที่พบและเจริญเติบโตเฉพาะในบริเวณเกาะบอร์เนียว ทั้งในพื้นที่ของประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย แต่ส่วนใหญ่แล้วพรรณไม้น้ำบูเซปที่ใช้ในปัจจุบันถูกเก็บรวบรวมจากธรรมชาติและนำเข้ามาจากอินโดนีเซีย ซึ่งตามธรรมชาติแล้วพรรณไม้ชนิดนี้เจริญเติบโตได้ในบริเวณที่ชื้น มีร่มเงาของไม้ใหญ่ช่วยพรางแสง จึงพบเห็นได้ในบริเวณริมชายน้ำโดยเกาะอยู่กับก้อนหินหรือขอนไม้ ทั้งยังขยายพันธุ์ได้ช้า ดังนั้นการหาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อสร้างต้นพันธุ์และหาวิธีการเพิ่มจำนวนโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นบูเซป จะเป็นสามารถเพิ่มผลผลิตของต้นบูเซป และข้อมูลที่ได้สามารถส่งเสริมอาชีพเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงพรรณไม้น้ำของไทย ตลอดจนสามารถผลิตในระบบฟาร์มเพื่อทดแทนต้นไม้ที่เก็บจากธรรมชาติ และส่งเสริมธุรกิจการส่งออกพรรณไม้น้ำเพิ่มมูลค่าการส่งออกของประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำบูเซป

วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) โดยเลือกชนิดและความเข้มข้นของตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อในพรรณไม้น้ำ (นงนุช และคณะ, 2546; Kane *et al*., 1990) การใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวต้นบูเซปในอัตราความเข้มข้นต่างๆ กัน 7 สูตร สูตรละ 10 ต้น ได้แก่ สูตรที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 5 % สูตรที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วย NaOCl 10 % สูตรที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) 0.1 % สูตรที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วย $HgCl_2$ 0.2 % สูตรที่ 5 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้ NaOCl 10 % ครั้งที่ 2 ใช้ NaOCl 5 % สูตรที่ 6 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้ NaOCl 10 % ครั้งที่ 2 ใช้ $HgCl_2$ 0.1 % และสูตรที่ 7 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้ NaOCl 10 % ครั้งที่ 2 ใช้ $HgCl_2$ 0.2 % จากนั้นนำต้นบูเซปมาล้างทำความสะอาดล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อตามสูตรต่างๆ โดยเติมสารลดแรงตึงผิวของน้ำ คือ tween-20 จำนวน 2 หยด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อ การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้เวลานาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ใช้เวลานาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นใช้มีดที่คมและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดรอยแผลบริเวณที่สัมผัสกับสารฟอกฆ่าเชื้อ หรือส่วนที่เซลล์ถูกทำลายทิ้งไป แล้วตัดชิ้นส่วนตายอดต้นบูเซปให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1962) และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดการปนเปื้อน (contaminate) ทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ รวมทั้งถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นระยะ

ศึกษาระดับความเข้มข้นของ Ads (Adenine sulfate) และ BAP (6–Benzylaminopurine) ต่อการเกิดต้นอ่อนของต้นบูเซป

วางแผนการทดลองแบบ 4x4 factorial experiment in CRD โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ สาร Ads ความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 75 mg/L และ BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/L ที่ใช้ร่วมกันในอาหารสูตร MS ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ นำต้นบูเซปมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมกับลักษณะของเนื้อเยื่อจากการทดลองแรก แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เพื่อเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ หลังจากเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อแล้ว นำเนื้อเยื่อลงเลี้ยงในอาหารสูตรอาหาร MS ที่เติมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ Ads และ BAP ในลักษณะใช้ร่วมกันทั้งหมด 16 ชุดการทดลอง แล้ววางขวดเนื้อเยื่อในห้องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสงวันละ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกวันที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ทุกชุดการทดลอง ลักษณะการเจริญเติบโตการพัฒนา ความแข็งแรงและจำนวนของต้นอ่อนที่ได้ในแต่ละชุดการทดลอง รวมทั้งถ่ายภาพการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเป็นระยะ

ศึกษาความเข้มข้นของ NAA ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการชักนำให้เกิดราก และเพิ่มขนาดของต้นบูเซป

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้ความเข้มข้นของ NAA 4 ระดับ 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 mg/L ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ นำต้นอ่อนของต้นบูเซป ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มี Ads และ BAP ที่เหมาะสมจากการทดลองที่แล้ว มาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำขวดเนื้อเยื่อไปวางในห้องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสงวันละ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกวันที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ทุกชุดการทดลอง ลักษณะการเจริญเติบโตการพัฒนา ความแข็งแรงและจำนวนของต้นอ่อนที่ได้ในแต่ละชุดการทดลอง รวมทั้งถ่ายภาพการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเป็นระยะ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นบูเซป

จากการนำชิ้นส่วนของตายอดของต้นบูเซปมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยใช้ชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อที่ต่างกัน 7 ชุดการทดลอง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อครั้งแรกด้วย 10% NaOCl เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วย 0.1% $HgCl_2$ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ต้นบูเซปมีอัตราการรอด 90.00±6.88 % มีค่ามากที่สุดกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และต้นบูเซปมีความแข็งแรงดังภาพใน Figure 1 รองลงมาคือชุดการทดลองที่ 7, 3, 4, 5, 1 และ 2 โดยมีอัตราการรอดเฉลี่ยเท่ากับ 70.00±10.51, 50.00±11.47, 30.00±10.51, 10.00±6.88, 0.00±0.00, 0.00±0.00 % ตามลำดับ (Table 1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่าชุดการทดลองที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ นั้นพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อยมาก หรือไม่พบการปนเปื้อนเลยบนชิ้นเนื้อเยื่อเลย แต่อย่างไรก็ตามการใช้ $HgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นสูงและใช้ระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อที่นานขึ้น ทำให้ภายหลังการฟอกแม้ไม่พบอัตราการปนเปื้อน แต่พบว่ามีอัตราการตายของเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น เนื่องจากได้รับอันตรายจาก $HgCl_2$ ซึ่งสารชนิดนี้เป็นยาฆ่าเชื้อโรค (disinfecting) ในเนื้อไม้ ผัก และต้นอ่อนของมันฝรั่ง (Budavari, 1989) มีรายงานว่าใช้ในการป้องกันและฆ่าเชื้อโรคพืชในประเทศแคนาดา โดยใช้เป็นยากำจัดเชื้อราในหญ้า (Worthing and Walker, 1983) และใช้ในการทำความสะอาดตัวอย่างเนื้อเยื่อที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้ปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-1.0 % นาน 2-10 นาที (ประศาสตร์, 2538) ชุดการทดลองที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl 10 % 20 นาที และตามด้วย $HgCl_2$ 0.1 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

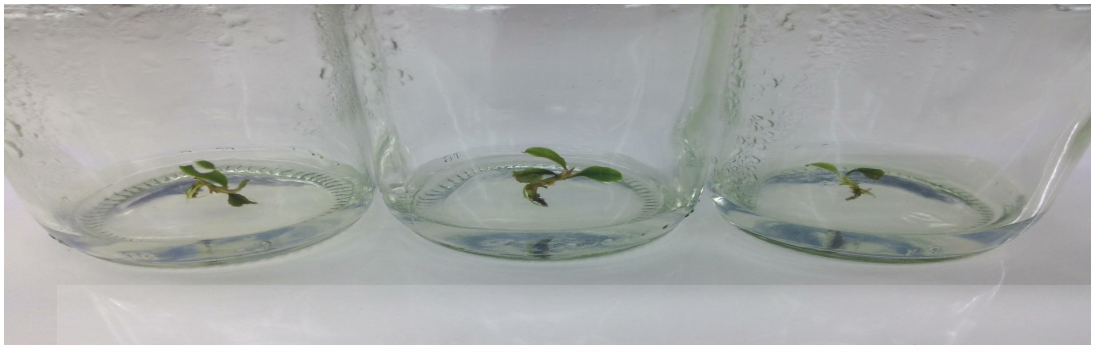

Figure 1 *Bucephalandra* sp. 4 weeks culture on MS medium after first sterilization using 10% NaOCl for 20 minute followed by 0.1% $HgCl_2$ for 10 minutes.

นาน 10 นาที ในการฟอกกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวภายนอกของชิ้นเนื้อเยื่อต้นบูเซป มีอัตราการรอดสูงถึง 90 % หลังจากเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้ $HgCl_2$ 0.2 % นาน 10 นาที และตามด้วย NaOCl 10 % 20 นาที ในการฟอกกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวภายนอกของชิ้นเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne wendtii* และ *C. becketti* มีอัตรารอดเพียง 50 % (Stanly *et al*., 2011) ซึ่งประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อพรรณไม้น้ำยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างนอกจากชนิด ความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อ และระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ชนิดของเนื้อเยื่อนั้นมีความสำคัญเช่นกัน เช่น ถ้าชิ้นส่วนพืชหนา และแข็งมาก อาจจะใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง และแช่ไว้เป็นเวลานาน ในทางกลับกันถ้าชิ้นส่วนพืชบาง และอ่อนมาก อาจจะใช้ความเข้มข้นของสารน้อยลงและลดระยะเวลาการในฟอก (บุญยืน, 2547) ดังนั้นจึงควรเลือกชนิดและความเข้มข้นของสาร รวมทั้งระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อให้เหมาะสมต่อชิ้นส่วนของพืชด้วย

Table 1 Percentage of contamination of microbial, dead tissue and survival rate of *Bucephalandra* sp. after 4 weeks of culturing on MS medium.

Treatments	First sterilization (20 min.)	Second sterilization (10 min.)	Contamination of microbial (%)	Dead tissue (%)	Survival rate(%)
1	5% NaOCl	-	100.00±0.00^{a}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}
2	10% NaOCl	-	100.00±0.00^{a}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}
3	0.1% $HgCl_2$	-	0.00±0.00^{c}	50.00±11.47^{a}	50.00±11.47^{bc}
4	0.2% $HgCl_2$	-	35.00±10.94^{b}	35.00±10.94^{ab}	30.00±10.51^{cd}
5	10% NaOCl	5% NaOCl	90.00±6.88^{a}	0.00±0.00^{c}	10.00±6.88^{d}
6	10% NaOCl	0.1% $HgCl_2$	0.00±0.00^{c}	10.00±6.88^{bc}	90.00±6.88^{a}
7	10% NaOCl	0.2% $HgCl_2$	0.00±0.00^{c}	30.00±10.51^{abc}	70.00±10.51^{ab}

Means ± SE values in each column followed by different superscript letters are significantly different ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเข้มข้นของ Ads และ BAP ต่อการเกิดต้นอ่อนของต้นบูเซป

จากการทดลองนำเนื้อเยื่อตายอดของต้นบูเซปมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS โดยการเติม Ads ที่ระดับ 0, 25, 50 และ 75 mg/L ร่วมกับ BAP ที่ระดับ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า Ads และ BAP อิทธิพลร่วมกัน (interaction) ต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อน จำนวนใบ และความสูงต้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยต้นบูเซปที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม Ads 0 mg/L และ BAP 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อน (2.45±0.15 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ) และใบใหม่ (15.25±0.92 ใบ) มากที่สุด ภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ (Table 2 และ Figure 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติม BAP หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวสามารถกระตุ้นให้เกิดต้น อ่อนและใบใหม่ได้ เนื่องจากไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์โปรตีน จึงส่งเสริมการแบ่งเซลล์ทำให้ส่วนต่างๆ ของพรรณไม้น้ำ เช่น ใบ และลำต้นมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น (สมบุญ, 2538) สอดคล้องกับงานทดลองของพรรณไม้น้ำชนิดอื่นที่เติมสารกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ อเมซอนใบแดง *Echinodorus barthii* (นงนุช และคณะ, 2546) อะโกลนีม่า (*Aglaonema symplex*) (นงนุช และมัลลิกา, 2548) *Cryptocoryne wendtii* และ *C. becketti* (Stanly *et al*., 2011) *Anubias barteri* var. *Nana* (Kanchanapoom *et al*., 2012) *Anubias barterii* Var. Nana petite. (Sheeja *et al*., 2015) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนั้น Ads และ BAP มีอิทธิพลร่วมกันต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อน แต่พบว่าปริมาณ Ads ที่สูงขึ้นมีผลทำให้จำนวนต้นอ่อนของต้นบูเซปลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการเติม Ads เพิ่มลงในสูตรอาหารจะช่วยส่งเสริมให้เนื้อเยื่อเกิดยอดได้ดีขึ้น Ads ที่มีคุณสมบัติเหมือนสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน (Wroblewska, 2012) ช่วยกระตุ้นการเกิดยอด ซึ่งเป็นสารพวกอนุพันธ์ของเพียวรีน (purine) หรือ 6-อะมิโนเพียวรีน (6-aminopurine) เป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งที่เป็นแหล่งให้ไนโตรเจน ที่พืชสามารถรับได้เร็วกว่าสารอนินทรีย์ชนิดอื่นในอาหาร ทำให้มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะได้ดีขึ้น

Table 2 Effect of various concentrations of Ads and BAP on plant height, shoot and leaf numbers after 8 weeks from *Bucephalandra* sp. culture.

Factor	Treatment	Plant height (mm.)	Shoot numbers	Leaf numbers
Ads (A)	0	9.07±0.48^{ab}	2.11±0.11^{a}	10.90±0.64^{a}
	25	8.07±0.42^{bc}	1.33±0.11^{b}	8.41±0.51^{b}
	50	10.25±0.45^{a}	0.74±0.10^{c}	8.48±0.44^{b}
	75	7.11±0.32^{c}	0.48±0.07^{c}	4.84±0.38^{c}
BAP (B)	0	10.00±0.45^{a}	1.01±0.10^{a}	7.13±0.37^{a}
	0.5	9.03±0.40^{ab}	1.15±0.13^{a}	8.54±0.61^{a}
	1.0	7.55±0.45^{c}	1.31±0.13^{a}	8.51±0.65^{a}
	1.5	7.91±0.40^{bc}	1.18±0.11^{a}	8.18±0.54^{a}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2 (continued).

Factor	Treatment	Plant height (mm.)	Shoot numbers	Leaf numbers
A×B	0×0.0	12.52±0.97^{a}	1.45±0.20^{bcd}	9.25±0.63^{bc}
	0×0.5	8.74±0.52^{abcd}	2.45±0.15^{a}	15.25±0.92^{a}
	0×1.0	8.77±0.96^{abcd}	2.30±0.23^{ab}	10.65±1.57^{ab}
	0×1.5	6.23±0.79^{de}	2.25±0.20^{ab}	8.45±1.29^{bcd}
	25×0.0	8.94±0.85^{abcd}	1.30±0.22^{cde}	7.10±0.67^{bcde}
	25×0.5	8.67±0.84^{bcd}	1.10±0.25^{cdef}	7.25±1.00^{bcde}
	25×1.0	7.07±0.64^{cde}	1.65±0.23^{abc}	9.65±1.21^{bc}
	25×1.5	7.59±0.97^{cde}	1.25±0.18^{cde}	8.55±1.09^{bc}
	50×0.0	10.24±0.97^{abc}	0.65±0.20^{def}	6.85±0.72^{bcde}
	50×0.5	11.48±0.90^{ab}	0.65±0.20^{def}	7.80±0.63^{bcde}
	50×1.0	10.08±0.94^{abc}	0.75±0.20^{cdef}	10.35±0.85^{b}
	50×1.5	9.20±0.74^{abcd}	0.90±0.18^{cdef}	8.90±1.08^{bc}
	75×0.0	8.29±0.53^{bcd}	0.65±0.15^{def}	5.30±0.72^{cde}
	75×0.5	7.22±0.57^{cde}	0.40±0.15^{ef}	3.85±0.45^{de}
	75×1.0	4.29±0.43^{e}	0.55±0.14^{def}	3.40±0.70^{e}
	75×1.5	8.64±0.58^{bcd}	0.30±0.11^{f}	6.80±0.87^{bcde}
A×B		*	*	*

Means ± SE values within a column followed by different superscript letters are significantly different ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

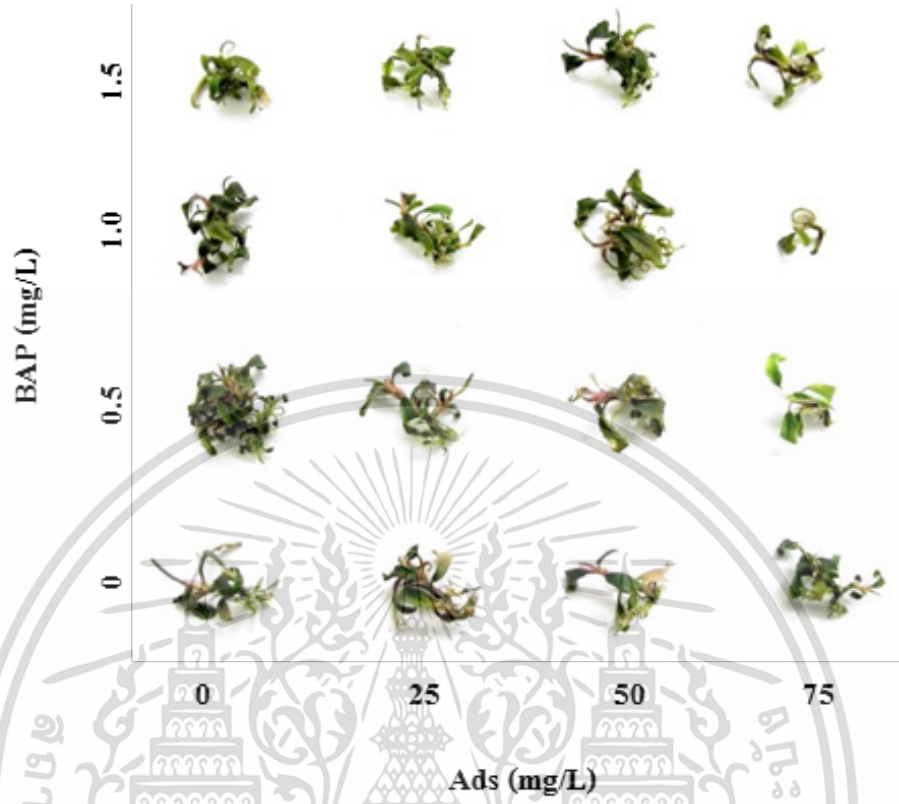

Figure 2 Effect of Ads and BAP on apical tissue development of *Bucephalandra* sp.

ความเข้มข้นของ NAA ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการชักนำให้เกิดราก และเพิ่มขนาดของต้นบูเซป

จากการทดลองนำต้นบูเซปมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 mg/L เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA สามารถชักนำให้ต้นบูเซปเกิดจำนวนรากมากที่สุด เท่ากับ 8.45±0.67 ราก โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นๆ รองลงมาคือระดับความเข้มข้นที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 mg/L โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 4.45±0.51, 3.70±0.62, 3.20±0.43 และ 2.85±0.41 ราก ตามลำดับ (Table 3) นอกจากนี้อาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA สามารถทำให้ต้นบูเซปมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีความสูง (8.06±0.54 มม.) จำนวนต้นอ่อน (2.65±0.25 ต้น) และจำนวนใบ (7.95±0.56 ใบ) มากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นๆ (Table 3)

จากผลการศึกษาการเกิดรากของต้นบูเซปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้นของ NAA ต่างๆ พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม NAA สามารถทำให้ต้นบูเซปเกิดจำนวนรากได้มากที่สุด (8.45±0.67) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจาก NAA จะเป็นฮอร์โมนที่อยู่ในกลุ่มออกซิน (auxins) ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของเซลล์พืช และช่วยให้เกิดรากในพืช (รังสฤษฏ์, 2540) แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงตายอดของต้นบูเซปในอาหารสูตร MS มีธาตุอาหารเพียงพอแล้ว ที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ และอาจเนื่องมาจากฮอร์โมนที่อยู่ในพรรณไม้น้ำเอง เพราะปกติฮอร์โมนพืชเป็นอินทรียสารที่เกิดขึ้นเองในพืชได้ แม้ว่าจะเกิดในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีรวิทยาต่างๆ ของพืชได้ (สมบุญ, 2538) นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นได้ว่าต้นบูเซปมีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน อาจเป็นเพราะเนื้อเยื่อตายอดที่นำมาศึกษาเป็นเนื้อเยื่อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Ads 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองที่ 2 ซึ่งภายในเซลล์เนื้อเยื่อของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นบูเซปยังคงมีปริมาณของสาร Ads อยู่ ที่สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นบูเซปได้ ทำให้มีความสูงต้น จำนวนต้นอ่อนและจำนวนใบที่เพิ่มขึ้นด้วย

Table 3 Effect of NAA on plant height, root, shoot and leaf numbers after 8 weeks.

NAA (mg/L)	Root numbers	Plant height (mm.)	Shoot numbers	Leaf numbers
0.0	8.45±0.67[a]	8.06±0.54[a]	2.65±0.25[a]	7.95±0.56[a]
0.1	4.45±0.51[b]	3.62±0.46[b]	1.05±0.26[b]	2.75±0.40[b]
0.3	3.70±0.62[b]	3.17±0.33[b]	0.30±0.15[c]	1.65±0.30[b]
0.5	3.20±0.43[b]	4.00±0.49[b]	0.30±0.13[c]	1.75±0.28[b]
0.7	2.85±0.41[b]	3.37±0.40[b]	0.25±0.12[c]	1.85±0.33[b]

Means ± SE values in each column followed by different superscript letters are significantly different ($p<0.05$)

สรุป

การฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อเนื้อเยื่อตายอดของพรรณไม้น้ำสกุลบูเซป คือ การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 โดยใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที และครั้งที่ 2 ใช้ 0.1% $HgCl_2$ นาน 10 นาที เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดสูงถึง 90% และไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตายอดของต้นบูเซป ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 mg/L เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อน จำนวน 2.45±0.15 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบใหม่มากที่สุด จำนวน 15.25±0.92 ใบ และอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม NAA สามารถชักนำให้ต้นบูเซป เกิดจำนวนรากมากที่สุด จำนวน 8.45±0.67 ราก และมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีความสูง จำนวนต้นอ่อน และจำนวนใบมากที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

เอกสารอ้างอิง

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์, มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และ อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2546. การขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำอเมซอนใบแดง *Echinodorus barthii* เพื่อการส่งออกโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อ. การสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2546 วันที่ 7-9 กรกฎาคม, กรมประมง. กรุงเทพฯ. หน้า 417-421.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และมัลลิกา มิตรน้อย. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอะโกลนีม่า (*Aglaonema symplex*). หน้า 267-274. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 158 หน้า.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. เทคโนโลยีเบื้องต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อพัฒนาพืช. ภาควิชาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 207 หน้า.

รังสฤษฎ์ กาวีตั๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2538. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพมหานคร. 206 หน้า.

Budavari, S. 1989. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological. Rahway, N.J., U.S.A: Merck.

Kanchanapoom, K., P. Anchanapoom, K. Chunui and K. Kanchanapoom. 2012. Micropropagation of *Anubias barteri* var. *Nana* from shoot tip culture and the analysis of ploidy stability. Not. Bot. Horti. Agrobo. 40(2): 148-151.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kane, M.E., Gilman, E.F. Jenks, M.A. and T.J. Sheehan. 1990. Micropropagation of the aquatic plant *Cryptocoryne lucens.* HortScience 25(6): 687-689.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant 15: 473-497.

Sheeja , G., J. Aneykutty and A. Korathb. 2015. *In vitro* propagation of an ornamental aquatic plant, *Anubias barterii* Var. Nana petite. Int. J. Curr. Sci. 18:1-12.

Stanly, C., A. Bhatt and C. L. Keng. 2011. An efficient in vitro plantlet regeneration of *Cryptocoryne wendtii* and *Cryptocoryne becketti* through shoot tip culture. Acta Physiologiae Plantarum DOI: 10.1007/s11738-010-0541-7.

Worthing, C.R., and S.B. Walker (eds.). 1983. The pesticide manual: a world compendium. 7th ed. The British Crop Protection Council, Croydon, UK.

Wroblewska, K. 2012. The influence of adenine and benzyladenine on rooting and development of *Fuchsia* hybrid cuttings. Acta Agrobotanica 65(4): 101-108.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้