

การฟอกฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงตาข้างบนในหลอดทดลอง[†]Surface Sterilization and Axillary Bud Culture of *Mesua ferrea* L. In Vitroสุภาพร วงษ์วาศ¹, พรพรรณ ทิมทอง¹, ชลดา เดชาเกียรติไกร อีการณวงศ์² และ วราภรณ์ ชูฉาย^{3,*}Supaporn Wongwat¹, Pornpan Thimthong¹, Chonlada Dechakiatkrai Theerakarunwong² and Waraporn Chouychai^{3,*}¹หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 60000²สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 60000³สาขาวิชาชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 60000

*อีเมล: waraporn.c@nsru.ac.th

บทคัดย่อ

บนาคเป็นพืชสมุนไพรที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดได้ยาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มจำนวนบนาคได้ จึงศึกษาการขยายพันธุ์บนาคซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ปลูกในสวนพฤกษศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ โดยนำตาข้างของบนาคมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Chlorox และอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วย Chlorox เข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 20 นาที ให้ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์หลังการฟอกฆ่าเชื้อ 7 วันต่ำที่สุด การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร MS พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ ตาข้างบนาคเกิดตาเพียง 2 ตาต่อชิ้นเท่าเดิม แต่การใช้ NAA อย่างเดียวหรือ NAA ร่วมกับ BA มีแนวโน้มชักนำให้ตาข้างพัฒนาไปเป็นแคลลัส จึงเลือกทดสอบผลของการใช้ไซโทไคนินชนิดเดียวคือ BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร MS พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้เช่นกัน แต่ การใช้ BA ความเข้มข้น 3 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการรอดชีวิตและสภาพของเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ TDZ ส่วนผลการเพาะเลี้ยงในอาหาร WPM หรือ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ แต่การใช้อาหารสูตร WPM ทำให้การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อสูงขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ อาหารสูตร WPM ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ต้องพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากหรือเร่งการเจริญของตาข้างให้เป็นยอดที่สมบูรณ์พร้อมออกรากต่อไป

คำสำคัญ: การฟอกฆ่าเชื้อ, ไซโทไคนิน, พืชสมุนไพร, อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์

Abstract

Mesua ferrea is a medicinal herb that their propagation by seed is difficulty successful. Tissue culture is promise to be an alternative way to propagate this species. The propagation of *Mesua ferrea*, which is medicinal plant in Chalemphrakiat 80 Pansa Botanic Garden Nakhon Sawan Rajabhat University Yanmatsi Center, were studied by sterilized the lateral bud with different concentration and contact time of Chlorox solution and titanium dioxide nanoparticles. The result showed that surface sterilization with 20 % Chlorox for 20 minute decrease percentage of microbial contamination on day 7 after sterilization more than other treatments. Supplement of 0, 0.5, and 1 mg/l BA and 0, 0.1 and 0.5 mg/l NAA in MS medium could not induce multiple shoots. Two lateral buds of *Mesua ferrea* was developed to be 2 shoots per explant. However, supplement of NAA only or NAA and BA trend to induce callus from lateral bud. The cytokinin, that were 0, 1, 3 and 5 mg/l BA or 0, 0.1, 0.5 and 1 mg/l TDZ, in MS medium was used to induce multiple shoots. Both cytokinin could not induce multiple shoots also but 3 - 5 mg/l BA could induce tissue survival more than TDZ. The culture of lateral bud in WPM and MS medium supplement with 0, 1, 3 and 5 mg/l BA could not induce multiple shoots but the

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

survival of tissue increased clearly in WPM media. With these results, the appropriate media was WPM media supplement with 5 mg/l BA. However, the method for induction multiple shoots or accelerate the bud growth to rooting shoot have been developed in further study.

Keywords: Surface sterilization, Cytokinin, Medicinal herb, Titanium dioxide nanoparticle

บทนำ

บุนนาค (*Mesua ferrea* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของยาหอมและพิกัดยาเกรสทั้งห้าซึ่งมีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย บุนนาคมีสารออกฤทธิ์ทางยาจำนวนมาก สารสกัดหยาบจากดอกบุนนาคมีสารกลุ่มแอนทราควิโนน อัลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และคูมาริน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (กชกร ทองมาก และคณะ, 2564) นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากบุนนาคมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อเมทิซิลลิน (Methicillin) ได้หลายสายพันธุ์ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าแบคทีเรียได้ (MBC) อยู่ระหว่าง 15.63 - 31.25 และ 125 - 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Pacharapruethipakorn et al., 2012) อย่างไรก็ตามบุนนาคจัดเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ได้ยากชนิดหนึ่ง การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดตามธรรมชาติมีความงอกเพียงร้อยละ 10 ส่วนการทำผลที่เมล็ดก่อนเพาะ แม้จะช่วยเพิ่มร้อยละการงอกได้ แต่ก็ทำให้มีการงอกเพียงร้อยละ 20 เท่านั้น (ดวงเดือน คุณยศยิ่ง และคณะ, 2553) ดังนั้นการขยายพันธุ์บุนนาคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์บุนนาคได้

ในพื้นที่สวนพฤกษศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์มีการปลูกพืชสมุนไพรหลายชนิดเพื่อการอนุรักษ์ และบุนนาคเป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับความนิยมด้วย ในการดำเนินงานสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ได้กำหนดให้มีการศึกษาวิจัยการขยายพันธุ์เพื่อการปลูกรักษาพืชสมุนไพรที่รวบรวมไว้ จึงได้เลือกต้นบุนนาคมาศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้าง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการพอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์และอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ได้แก่ เบนซิลอะดีนีน (Benzyladenine; BA) ไทเดียซูรอน (Thidiazuron; TDZ) และ BA ร่วมกับกรดแนฟทาเลินอะซิติก (Naphthaleneacetic acid; NAA) รวมทั้งผลของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ต่างกัน ได้แก่ อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) และ Woody plant medium (WPM) (McCown & Lloyd, 1981) ต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงตาข้างบุนนาคในหลอดทดลองเพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ต้นใหม่จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การพอกฆ่าเชื้อ

เก็บตัวอย่างพืชมาจากสวนพฤกษศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ ศูนย์การศึกษายานมตรี นำกิ่งบุนนาคมาตัดเป็นท่อน ล้างด้วยน้ำยาล้างจานใสสะอาด จากนั้นนำมาตัดระหว่างตาข้างยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ให้ 1 ท่อนมี 1 ข้อ นำไปแช่แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และกรดแอสคอร์บิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที จากนั้นพอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox เข้มข้นร้อยละ 15 และ 20 เป็นเวลา 20 และ 30 นาที และไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่กระตุ้นด้วยรังสียูวีก่อน 30 นาที จุ่มแช่พืชเป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่อุณหภูมิ 20 - 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ โดยมีตำแหน่งการจัดวางต่างบริเวณกันในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นบล็อกมี 3 บล็อก แต่ละทรีทเมนต์มี 10 ซ้ำต่อบล็อก นับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดการติดเชื้อซึ่งมีการเจริญของเชื้อราหรือแบคทีเรียที่บริเวณเนื้อเยื่อ นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD

ผลของ BA ร่วมกับ NAA ต่อการชักนำตาข้างที่เพาะเลี้ยง

นำชิ้นส่วนตาข้างมาพอกฆ่าเชื้อโดยการให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที ก่อนนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที และกรดแอสคอร์บิกร้อยละ 0.1 ตามด้วยคลอโรกซ์ร้อยละ 20 ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 20 นาที ก่อนล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นย้ายตาข้างบุนนาคไปเลี้ยงในอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่เข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ 3x3 Factorial in Completely Randomized Design ทั้งหมด 9 ทรีทเมนต์ ๆ ละ 30 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้น บันทึกร้อยละการรอดชีวิตของตาข้างและจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ผลของ BA และ TDZ ต่อการชักนำตาข้าง

การพอกฆ่าเชื้อทำตามการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงตาข้างบนขนาดที่พอกฆ่าเชื้อแล้วในอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ เข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทั้งหมด 8 ทรีทเมนต์ ๆ ละ 30 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้น บันทึกร้อยละการรอดชีวิตของตาข้าง และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อการชักนำตาข้าง

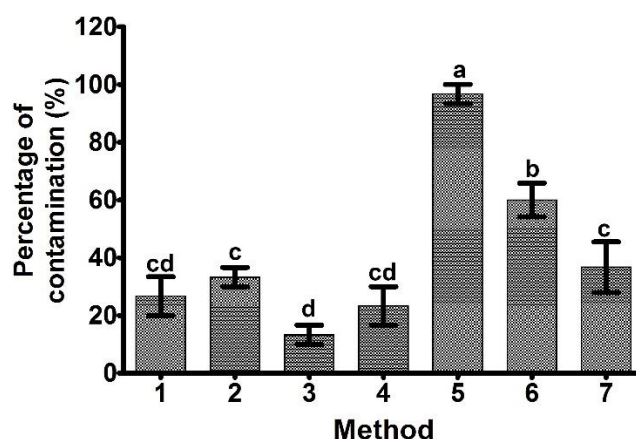
การพอกฆ่าเชื้อทำตามการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงตาข้างบนขนาดที่พอกฆ่าเชื้อแล้วในอาหาร WPM และ MS ที่เติม BA เข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ 2x3 Factorial in Completely Randomized Design ทั้งหมด 8 ทรีทเมนต์ ๆ ละ 30 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้น บันทึกร้อยละการรอดชีวิตของตาข้าง และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลและอภิปรายผล

การพอกฆ่าเชื้อ

การฆ่าเชื้อตาข้างของบนขนาดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์หรือ Clorox กับไทเทเนียมไดออกไซด์ให้ผลต่างกันอย่างชัดเจน การแช่ตัวอย่างพืชในไทเทเนียมไดออกไซด์ที่กระตุ้นด้วยรังสีวิทยาก่อน 30 นาที โดยแช่ด้วยเวลาน้อยกว่า 30 นาที ทำให้ตัวอย่างพืชเกิดการปนเปื้อนมากกว่าการพอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ภาพที่ 1) วิธีที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนน้อยที่สุดคือ Clorox ร้อยละ 20 นาน 20 นาที

การพอกฆ่าเชื้อด้วยอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่กระตุ้นด้วยรังสีวิทยาก่อน 30 นาที มีรายงานว่า สามารถใช้พอกฆ่าเชื้อได้ไม่ต่างจากการใช้ไฮเตอร์ร้อยละ 10 เช่น การพอกฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วเขียวด้วยอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่กระตุ้นด้วยรังสีวิทยาก่อน 30 นาทีที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที ให้ประสิทธิภาพการพอกฆ่าเชื้อได้ไม่ต่างจากการใช้ไฮเตอร์ร้อยละ 10 20 นาทีและตามด้วยไฮเตอร์ร้อยละ 5 10 นาที (Theerakarunwong and Chouychai, 2013) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ แม้จะใช้อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น แต่มีประสิทธิภาพในการพอกฆ่าเชื้อต่ำกว่า Clorox ร้อยละ 20 20 นาที และไม่สามารถลดระยะเวลาการพอกฆ่าเชื้อให้ต่ำกว่า 30 นาทีได้ อาจเป็นเพราะส่วนตาข้างของบนขนาดมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์เริ่มต้นจากธรรมชาติมากกว่าในเมล็ด การใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่สูงขึ้นหรือเพิ่มระยะเวลาการพอกฆ่าเชื้อให้นานขึ้นไม่ส่งผลดีในการการลดต้นทุน แม้ว่าเนื้อเยื่อตาข้างที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อด้วยอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์จะมีรอยช้ำบนส่วนก้านหรือรอยสีน้ำตาลตรงรอยตัดน้อยกว่าการใช้ Clorox ร้อยละ 20 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้การพอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox ร้อยละ 20 20 นาทีทั้งหมด

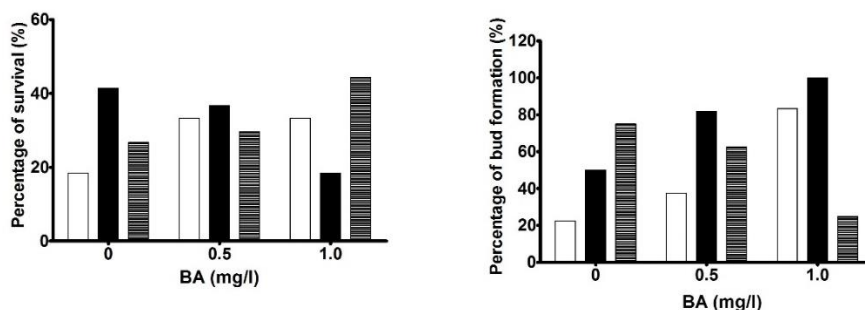


ภาพที่ 1 ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของตาข้างบนขนาดที่พอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

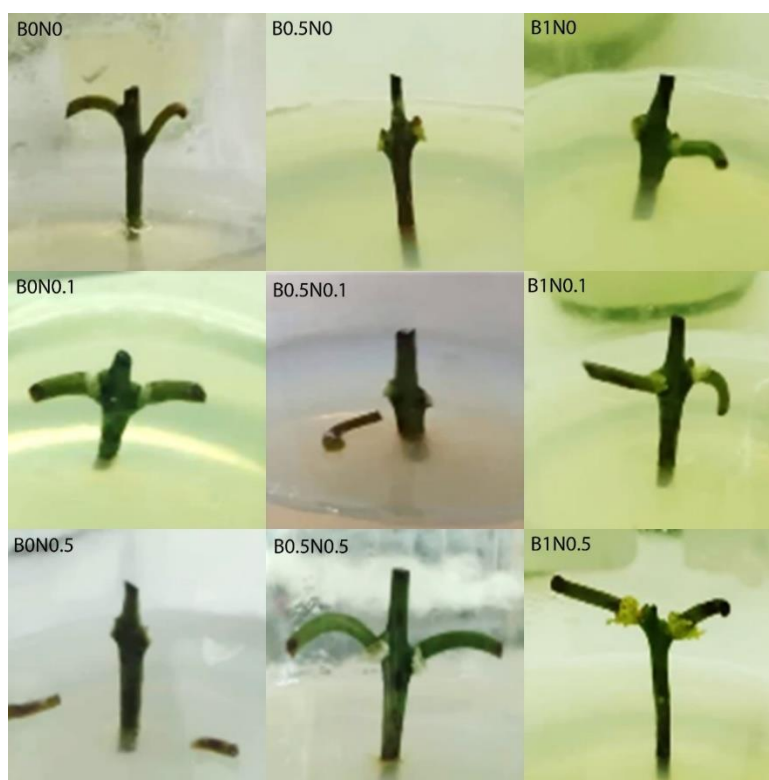
ผลของ BA ร่วมกับ NAA ต่อการชักนำตาข้าง

เมื่อนำชิ้นส่วนพืชที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบรอดชีวิตของบนขนาดมากที่สุดรอดชีวิตร้อยละ 44.4 บนอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ รอดชีวิตร้อยละ 41.4 บนอาหารที่เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างเดียว (ภาพที่ 2) บนขนาดที่รอดชีวิตทั้งหมดให้จำนวนตาข้าง 2 ตาต่อชิ้น (ภาพที่ 3) โดยร้อยละของการเกิดตาข้างมากที่สุด ร้อยละ 100 บนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 1

มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ร้อยละ 83.3 บนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 2) นอกจากนี้พบชิ้นส่วนจำนวนหนึ่งในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ตาข้างพัฒนาไปเป็นแคลลัส แคลลัสที่ได้มีลักษณะฟู มีขนสีขาวกอนสีเขียว เกิดขึ้นบริเวณรอยต่อของโคนก้านใบ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 ร้อยละการรอดชีวิตและการเกิดตาข้างของต้นบอนนาในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์; สัญลักษณ์ □ ไม่เติม NAA; ■ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร; ▨ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



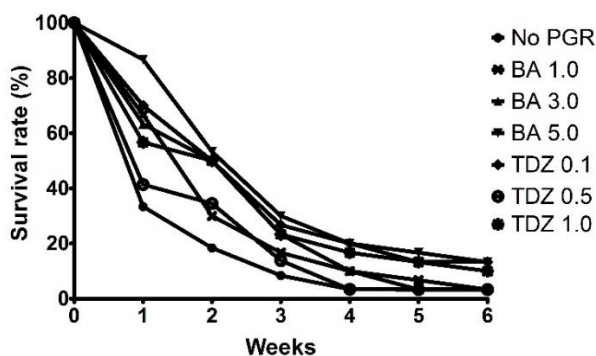
ภาพที่ 3 ลักษณะของตาข้างบอนนาที่ชักนำในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หมายเหตุ: ตัวอักษร B คือ BA ตัวอักษร N คือ NAA

ผลของ BA หรือ TDZ ต่อการชักนำตาข้าง

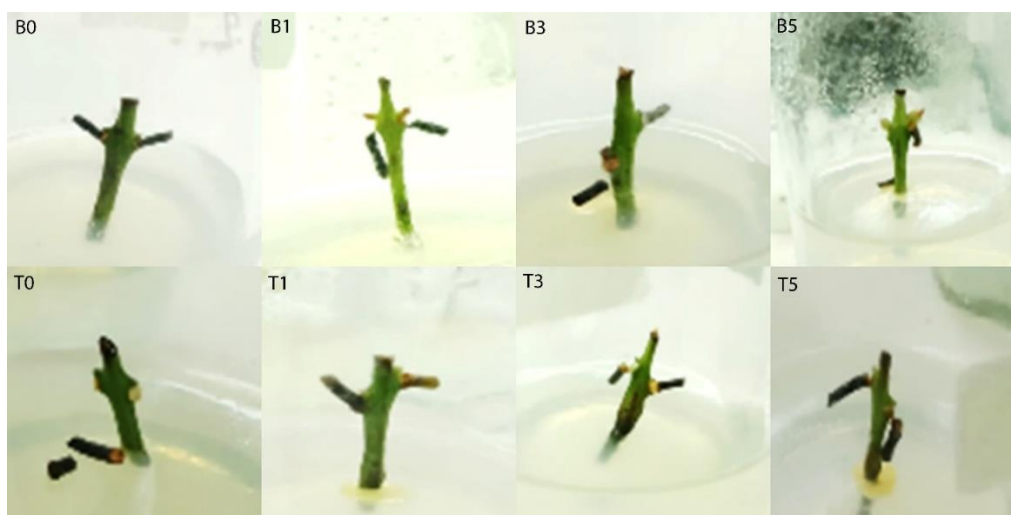
เมื่อใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น การรอดชีวิตของตาข้างบอนนาลดลงอย่างเห็นได้ชัด การเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยให้การรอดชีวิตของตาข้างบอนนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ร้อยละการรอดชีวิตของตาข้างบอนนาสูงสุดบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อลิตร โดยรอดชีวิตร้อยละ 30 ที่เวลา 3 สัปดาห์ รองลงมาคือ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร รอดชีวิตร้อยละ 26.7 (ภาพที่ 4) บอนนาที่รอดชีวิตทั้งหมดให้จำนวนตาข้าง 2 ตาต่อชิ้น (ภาพที่ 5) ชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตทั้งหมดจะเห็นการพัฒนาของตาข้างชัดเจนทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 3 ยกเว้น

ตาข้างในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือเติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นการพัฒนาของตาข้างชัดเจนทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 4 อย่างไรก็ตามตาข้างทั้งหมดในอาหารที่เติม TDZ ทุกสูตรมีลักษณะบวม (ภาพที่ 5) และในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มีลักษณะเป็นขนสีขาว เกิดขึ้นบริเวณรอยต่อของโคนก้านใบ ซึ่งแคลลัสเหล่านี้จะเริ่มฝ่อไปในสัปดาห์ที่ 3

การใช้ BA มีรายงานว่า สามารถชักนำให้เกิดจากตาข้างของพืชได้ดี เช่น การเพาะเลี้ยงข้อของกระดังงาจีน บนอาหารสูตร MS พบว่าเกิดยอดได้ต้นอาหาร ที่เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (กิตติ โพธิ์ปัทมะ และคณะ, 2558) แต่ในกรณีของบุนนาค ระดับความเข้มข้นของ BA เข้มข้น 1 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ ไม่ชักนำให้ตาข้างเกิดเป็นแคลลัส และเพิ่มการรอดชีวิตของตาข้างได้ดี ส่วน TDZ ซึ่งเป็นไซโทไคนินชนิดพิโนลยูเรียที่มีฤทธิ์แรงกว่าไซโทไคนินที่เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน และสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในไม้ยืนต้นได้ดีกว่า (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) แต่การเกิดอาการผิดปกติที่ทำให้ตัวอย่างบวม ฉ่ำน้ำ เหลือง เป็นลักษณะที่พบได้ในการใช้ TDZ มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การชักนำให้เกิดยอดจากข้อสักรับอาหารแข่งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0.0 - 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.1 - 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เกิดยอดน้อยกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว ยอดส่วนใหญ่ มีขนาดเล็กและฉ่ำน้ำ สีเขียวอมเหลือง (เสริมศิริ จันทรเปรม และคณะ, 2561) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้พบว่า TDZ ไม่เหมาะที่จะใช้ในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของบุนนาค



ภาพที่ 4 การรอดชีวิตของตาข้างบุนนาคที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์



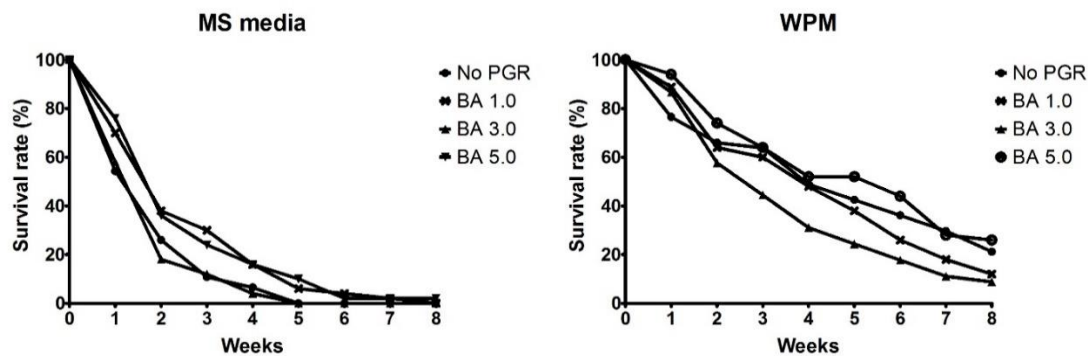
ภาพที่ 5 ลักษณะของตาข้างบุนนาคที่เจริญในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หมายเหตุ: B คือ BA; T คือ TDZ

ผลของ BA และสูตรอาหารต่อการชักนำตาข้าง

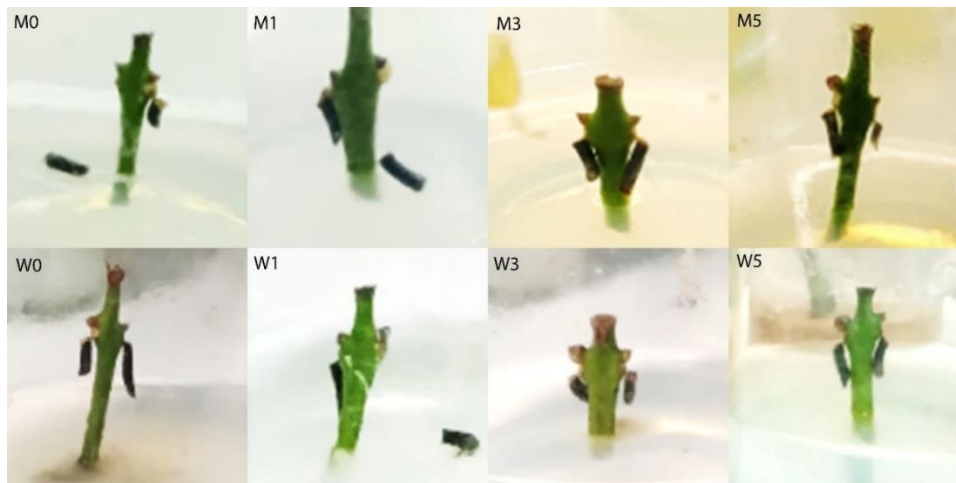
การรอดชีวิตของตาข้างบุนนาคต่างกันอย่างชัดเจนแม้จะได้รับการควบคุมการเจริญเติบโตชนิดเดียวกัน ตาข้างบุนนาคที่เลี้ยงในอาหารสูตร WPM มีร้อยละการรอดชีวิตสูงกว่าตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยร้อยละการรอดชีวิตของตาข้างมากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร รอดชีวิตร้อยละ 64 ในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อเวลาผ่านไป การรอดชีวิตของตาข้างลดลงต่อเนื่องอย่าง

เห็นได้ชัด (ภาพที่ 6) การรอดชีวิตของตาข้างในอาหารสูตร MS ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงสัปดาห์ที่ 2 - 3 ตาข้างที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 1 รอดชีวิตร้อยละ 70 แต่ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 3 การรอดชีวิตลดลงเหลือเพียงร้อยละ 38 และ 30 ตามลำดับ ส่วนตาข้างที่เลี้ยงในสูตรอาหาร WPM เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 1 รอดชีวิตร้อยละ 88 ส่วนในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 3 รอดชีวิตร้อยละ 64 และ 60 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ตาข้างบนขนาดที่รอดชีวิตทั้งหมดให้จำนวนตาข้าง 2 ตาต่อชิ้น (ภาพที่ 7 และ 8) ในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า ชิ้นส่วนบนขนาดในอาหารทุกสูตรมีการพัฒนาของตาข้างทั้งหมด (ภาพที่ 7) และในสัปดาห์ที่ 8 ตาข้างมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 8)

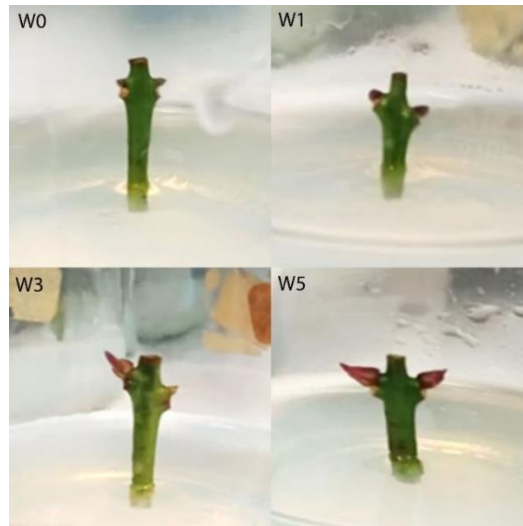
อาหารสูตร WPM เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ยืนต้น เช่น การเพาะเลี้ยงยอดมะเดาะบนสูตรอาหาร WPM เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดจำนวน 2.9 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 2.76 เซนติเมตร (พรทิพย์, 2557) แต่ในพืชบางชนิดการใช้สูตรอาหาร MS กับ WPM ก็ให้ผลไม่ต่างกัน เช่น การเพาะเลี้ยงไซโกตเอ็มบริโอของมะรุม พบว่า อาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ให้ร้อยละการรอดชีวิตสูงสุดคือ ร้อยละ 93.33 รองลงมาคือ อาหารสูตร WPM และอาหารสูตร MS ซึ่งรอดชีวิตร้อยละ 80 และ 76.67 ตามลำดับ (ฤทัยชนก ชิตเดชะ และคณะ, 2561) อย่างไรก็ตามสำหรับตาข้างบนขนาดอาหารสูตร WPM ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตได้อย่างชัดเจน และควรเลือกใช้ในการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 6 การรอดชีวิตของต้นบนขนาดใน สูตรอาหาร MS และ WPM เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 7 ลักษณะของตาข้างบนขนาดในอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์
หมายเหตุ: ตัวอักษร M คือ MS ตัวอักษร W คือ WPM



ภาพที่ 8 ลักษณะของตาข้างบนขนาดที่เจริญในอาหารสูตร WPM ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์
หมายเหตุ: ตัวอักษร W คือ WPM

สรุปผล

การฟอกฆ่าเชื้อส่วนข้อของบนขนาดที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือใช้ Chlorox เข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 20 นาที ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ในการทดลองนี้ ทุกชิ้นส่วนเกิดตาเพียง 2 ตาต่อชิ้นเท่าจำนวนตาที่มีอยู่เดิม การใช้ NAA เข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างเดียวหรือร่วมกับ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร MS ชักนำการพัฒนาของตาข้างให้เป็นแคลลัส สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้ชิ้นส่วนตาข้างรอดชีวิตมากที่สุดคือ อาหาร WPM ที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ควรย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 3 - 4 สัปดาห์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

บรรณานุกรม

- กชกร ทองมาก, ธารรัตน์ จันทน์พัฒน์, รติมา จันแดง, วิทวัส หมาดอี, และ กุสุมาลย์ น้อยผา. 2554. การศึกษาสารพฤษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพื้กัดเสกทั้งห้า. *วารสารหมอยาไทยวิชัย*, 7(2), 61-74.
- กิตติ โพธิ์พินะ, สมโภชน์ น้อยจินดา, สุริยา ฤทธาทิพย์, สร้อยทิพย์ ประเสริฐสงค์, และ เสาวรส พนมชัย. (2558). การชักนำให้เกิดกลุ่มยอดจากตาข้างของกระดังงาจีน. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 46(พิเศษ3), 185-188.
- ดวงเดือน คุณยศยิ่ง, สตีเฟน เอลเลียต, และ ประสิทธิ์ วัชภคพัฒน์วงศ์. (2553). การกระตุ้นการงอกของเมล็ดไม้ต้นหายากบางชนิดเพื่อการฟื้นฟูป่าในภาคเหนือของประเทศไทย. *วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 15(10), 951-964
- พรทิพย์ เทิดบารมี. (2557). ผลของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนและสูตรอาหารที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะแมแดง (*Antidesma bunius* (L.) *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 42(1), 191-202.
- ฤทัยชนก ชิตเดชะ, พิมพ์โพยม บุญมา, ผการัตน์ โรจน์ดวง, และ สุภาวดี รามสูตร. (2561). การขยายพันธุ์มะยมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (*Moringa oleifera* Lam.). *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*. 37 (2), 86-95.
- วรารณ ฤทัย. (2552). บทบาทของ Thidiazuron ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา*. 4(2), 123-135.
- เสริมศิริ จันทน์เปรม, เยาวพรรณ สนธิกุล, ประกาย อ่อนวิมล, และ สนธิชัย จันทน์เปรม (2561). การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของสักในสภาพหลอดทดลอง. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 36(2), 126-134.
- McCown, B. H., & Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM) - A mineral formation for microculture of woody plant species. *Horticultural Science*, 16, 453.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Pacharapruethipakorn, N., Chaijaroenkul, W., Na-Bangchang, K., Itharat, A., & Aunpad, R. (2012). Screenings test of traditional medicinal herbs for bactericidal activity and their effects determination. *Journal of Health Research*, 26(Special), S53-S57.
- Theerakarunwong, C. & Chouychai, W. 2013. Efficiency of titanium dioxide on mungbean seed sterile and their nanotoxicity to mungbean growth *in vitro*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 15, 1039-1042.