การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Uvaria* บางชนิด

In Vitro Culture of Some Species in Genus *Uvaria*

คำนำ

การบุกรุกทำลายพื้นที่ป่า การแสวงหาประโยชน์จากทรัพยากรป่าไม้ที่มากเกินพอดี ตลอดจนปัญหามลภาวะ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อถิ่นที่อยู่ของพรรณพืชชนิดต่าง ๆ ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชของโลกลดลงอย่างรวดเร็ว (อิศรา, 2539) พืชวงศ์ Annonaceae ก็เช่นกัน แม้ว่าบางชนิดจะมีการปลูกกันอย่างแพร่หลาย เช่น กระดังงา จำปูน และสายหยุด เป็นต้น แต่ยังมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่เป็นที่รู้จัก เนื่องจากเป็นพรรณไม้ป่า ทำให้การปลูกมีน้อย หลายชนิดอยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ และเกือบทุกชนิดมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหาแนวทางในการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าเหล่านี้ไว้อย่างเร่งด่วน (กองเลขานุการโครงการบีอาร์ที, 2541) ในประเทศไทยมีพืชวงศ์ Annonaceae หลายชนิดที่ยังไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลาย หลายชนิดมีดอกและลักษณะลำต้นที่สวยงาม เหมาะที่จะพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับได้ เช่น ในสกุล *Uvaria* ได้แก่ กล้วยไอ้พอน (*U. lurida* Hook.f. & Thomson) ดอกสวยงาม สีแดงสด มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ กล้วยหมูสัง (*U. grandiflora* Roxb. ex Hornem. var. *grandiflora*) ดอกมีขนาดใหญ่ สีแดงเลือดนก มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ มีความสวยงามโดดเด่น และพืพวนน้อย (*U. rufa* Blume) ดอกสีแดงเข้ม มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ อีกทั้งมีคุณค่าทางสมุนไพร เป็นต้น (วงศ์สถิตย์ และคณะ, 2543; ณรงค์, 2544; ปิยะ, 2544)

การขยายพันธุ์ในสภาพธรรมชาติโดยเมล็ดของพืชวงศ์ Annonaceae มีความไม่สม่ำเสมอในแต่ละเขตการกระจายพันธุ์และการงอกของเมล็ดใช้ระยะเวลานาน อีกทั้งไม่ได้ออกดอกตลอดปีจึงทำให้เพิ่มจำนวนได้ช้า (Smet *et al*., 1999) ในทางการค้านิยมขยายพันธุ์พืชวงศ์ Annonaceae ด้วยวิธีการติดตาและการเสียบกิ่งบนต้นตอที่ได้มาจากการเพาะเมล็ด แต่ก็ยังประสบปัญหาเรื่องความแข็งแรงและความต้านทานโรคของต้นตอ สำหรับการตอนกิ่งและการปักชำพืชในวงศ์นี้ต้องใช้ระยะเวลานานและมักไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (ทอม, 2546; George and Nissen, 1987; Rasai *et al*., 1995 a) ดังนั้นจึงนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาใช้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และสามารถคงลักษณะทางพันธุกรรมเดิมไว้ได้ แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Annonaceae มักประสบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนสูง อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์

ภายนอกและที่อยู่ภายในท่อลำเลียงเอง การหลุดร่วงของใบ (leaf abscission) การเกิดสีดำของชิ้นส่วน การปลดปล่อย phenolic compounds ลงในอาหารปริมาณสูง การตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (morphogenesis) ของชิ้นส่วนต่ำ โดยเฉพาะการเกิดราก ทำให้เกิดข้อจำกัดในความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์นี้ (George and Nissen, 1987; Rasai, 1995 a, 1995 c; Lemos and Black, 1996 a; Castro *et al*., 1999; Bridg, 2000) จึงควรมีการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการป้องกันและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์นี้ และเพื่อเป็นการส่งเสริมให้กล้วยไอ้พอน กล้วยหมูสัง และพืชพวนน้อยเป็นที่รู้จักแพร่หลาย เมื่อมีการปลูกกันมากขึ้นจะสามารถพัฒนาให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้มากขึ้น เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยอนุรักษ์พันธุ์ไม้ป่าเหล่านี้ไว้ไม่ให้สูญพันธุ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บชิ้นส่วนข้อของกล้วยไม้พอน กล้วยหมูสัง และพืพวนน้อยมาฟอกฆ่าเชื้อ

2. เพื่อหาชนิดของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในท่อลำเลียงของชิ้นส่วนข้อของกล้วยไม้พอน

3. เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกล้วยไม้พอน กล้วยหมูสัง และพืพวนน้อยเกิดยอด และการป้องกันการหลุดร่วงของใบ

4. เพื่อชักนำให้ยอดของกล้วยไม้พอน และกล้วยหมูสังเกิดราก

5. เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้พอน และพืพวนน้อยเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน

การตรวจเอกสาร

วงศ์ Annonaceae เป็นวงศ์ที่มีความเก่าแก่และมีลักษณะหลายประการแสดงถึงความดึกดำบรรพ์ (primitive) มากที่สุดวงศ์หนึ่งในบรรดาพืชมีดอกเช่นเดียวกับพืชในวงศ์ Magnoliaceae ทั่วโลกมีพืชวงศ์นี้ประมาณ 128 สกุล รวมจำนวน 2,300 ชนิด (Kessler, 1993) เช่น น้อยหน่า น้อยหน่าออสเตรเลีย ทุเรียนเทศ ลำดวน และกระดังงา เป็นต้น ประเทศไทยเท่าที่มีการสำรวจแล้วและจำแนกออกเป็น 41 สกุล รวมจำนวน 195 ชนิด (ปิยะ และคณะ, 2545) หนึ่งในจำนวนนี้คือสกุล *Uvaria* ที่มีลักษณะทั่วไปเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง แตกกิ่งน้อย ใบและดอกมีขนรูปดาว (stellate hairs) ปกคลุม ดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อกระจุก มีสีสันสวยงามและมักมีกลิ่นหอม จากการรายงานของณรงค์ (2544) สามารถจำแนกสกุล *Uvaria* ในประเทศไทยได้ประมาณ 12 ชนิด ในขณะที่ปิยะ (2544) รายงานว่าพบถึง 18 ชนิด

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาพืชในสกุล *Uvaria* 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยไอ้พอน กล้วยหมูสัง และพีพวนน้อย มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

1. *Uvaria lurida* Hook.f. & Thomson **กล้วยไอ้พอน** หรือบัวบก (ชลบุรี)

ไม้เถาเนื้อแข็ง ยาวประมาณ 10 เมตร กิ่งอ่อนมีขนรูปดาวประปราย กิ่งแก่เกลี้ยง **ใบ** หนาคล้ายแผ่นหนัง รูปหอกกลับแกมรูปขอบขนาน ยาว 23.4-27.0 เซนติเมตร กว้าง 8.0-8.3 เซนติเมตร ก้านใบยาว 0.6-0.7 เซนติเมตร หนาและย่น โคนใบมน ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ใบอ่อนด้านบนเกลี้ยงเป็นมัน ด้านล่างมีขนรูปดาวประปราย สีสนิม เกือบเกลี้ยงในใบแก่ มีเส้นแขนงใบ 13-17 คู่ **ดอก** เดี่ยว ออกปลายกิ่งหรือตรงข้ามใบ เส้นผ่านศูนย์กลางดอกบาน 4-6 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 1.5-1.8 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันหุ้มกลีบดอกมิดจนกระทั่งดอกบาน ปลายกลีบเป็นติ่งแหลม เมื่อบานแยกออกจากกันเป็นรูปไข่กว้าง ยาว 1.5 เซนติเมตร กว้าง 1.2-1.4 เซนติเมตร มีขนรูปดาวสั้น ๆ ปกคลุมหนาแน่นทั้งสองด้าน กลีบดอกแยกกันมี 6 กลีบ เรียง 2 ชั้น กลีบดอกรูปไข่กลับ เป็นแผ่นหนา ปลายกลีบดอกม้วนและโค้งเข้าหากลางดอก โคนกลีบเชื่อมติดกัน มีขนรูปดาวสั้น ๆ ปกคลุมหนาแน่นทั้งสองด้าน สีแดงเข้ม กลีบดอกชั้นนอก ยาว 2.5 เซนติเมตร กว้าง 1.7-1.8 เซนติเมตร กลีบดอกชั้นในขนาดเล็กกว่ากลีบดอก

ชั้นนอกเล็กน้อย เกสรเพศผู้ประมาณ 100-200 อัน แต่ละอันเป็นแผ่นรูปขอบขนาน แบน มีอับเรณู 4 พู หันออกด้านข้าง แตกตามยาว ปลายแกนอับเรณูเป็นแผ่นหนา รูปลิ้นสั้น ๆ เกสรเพศเมีย มีคาร์เพลประมาณ 40-60 อัน รังไข่รูปทรงกระบอก ยาว 2.5-3.0 มิลลิเมตร มีขนรูปดาวปกคลุมหนาแน่น ยอดเกสรเพศเมียด้านบนเป็นรูปเกือกม้า ด้านข้างเป็นร่อง มีออวุล 10-12 อัน เรียง 2 แถว ติดทางด้านข้าง **ผล** ออกเป็นช่อโปร่ง มีผลย่อยจำนวนมากเป็นพวงขนาดใหญ่ ผลย่อย 20-30 ผล เป็นรูปทรงกระบอกมีรอยคอดเป็นช่วง ๆ เปลือกเรียบ เกลี้ยง ผลแก่สีเหลือง สุกแล้วมีสีแดง ยาว 7-8 เซนติเมตร กว้าง 2 เซนติเมตร ก้านผลย่อยยาว 4.5-6.0 เซนติเมตร มีเมล็ด 9-11 เมล็ด คล้ายรูปไข่กว้าง แบน ยาว 1.3-1.4 เซนติเมตร กว้าง 1.2 เซนติเมตร (ณรงค์, 2544; Backer and Brink, 1963) (ภาพที่ 1ก)

การกระจายพันธุ์ พบในประเทศอินเดีย ภูมิภาคอินโดจีน และชวา ในประเทศไทยพบในภาคตะวันออกเฉียงใต้ ชลบุรี จันทบุรี และพบได้ทั่วไปในป่าตะวันออก มักพบในป่าดิบชื้นและป่าดิบแล้งที่มีความชื้นสัมพัทธ์ค่อนข้างสูง ระดับความสูง 30-300 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง เริ่มออกดอกเดือนมีนาคมถึงเมษายน ดอกบานเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ผลแก่หลังดอกบาน 4-5 เดือน (กมล, 2544; ปิยะ, 2544)

2. *Uvaria grandiflora* Roxb. ex Hornem. var. *grandiflora* **กล้วยหมูสัง** กล้วยมดสัง กล้วยมุดสัง และย่านนมควาย (ตรัง)

ไม้เถาเนื้อแข็ง ยาวประมาณ 5-15 เมตร กิ่งอ่อนมีขนรูปดาวสีน้ำตาลอ่อนนุ่มปกคลุมหนาแน่น **ใบ** หนาคล้ายแผ่นหนัง รูปรี ยาว 10-18 เซนติเมตร กว้าง 6-9 เซนติเมตร ก้านใบยาว 0.5 เซนติเมตร ใบอ่อนมีขนรูปดาวสีน้ำตาลปกคลุมหนาแน่น ใบแก่ด้านบนมีสีเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างสีเขียวนวลมีขนรูปดาว มีขนสั้นนุ่มทั่วไป บริเวณเส้นกลางใบและเส้นแขนงใบมีขนสั้นนุ่มประปราย มีเส้นแขนงใบ 10-13 คู่ **ดอก** เดี่ยว ออกตรงข้ามใบหรือปลายกิ่ง เส้นผ่านศูนย์กลางดอกบาน 6-11 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง รูปสามเหลี่ยม ยาว 2-3 เซนติเมตร กลีบดอกแยกกันมี 6 กลีบ เรียง 2 ชั้น กลีบดอกรูปขอบขนานแกมรูปไข่ สีแดงเลือดนก โคนกลีบสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมอ่อน ยาว 2.5-4.0 เซนติเมตร กว้าง 1.0-1.5 เซนติเมตร เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก สมบูรณ์ทั้งหมด แต่ละอันเป็นแผ่นรูปขอบขนาน มีอับเรณู 4 พู เรียงข้างละ 2 พู ของแกนอับเรณู เกสรเพศเมียประกอบด้วยคาร์เพลจำนวนมาก รังไข่ทรงกระบอก ยาว 0.8-1.0 เซนติเมตร มีขนรูปดาว

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกของกล้วยไข้พอน (ก) กล้วยหมูสัง (ข) และพืชพวนน้อย (ค)
ที่มา (ก): ปิยะ (2544)

ปกคลุมหนาแน่น ยอดเกสรเพศเมียด้านบนเป็นรูปเกือกม้า ด้านข้างเป็นร่อง ออวุลเรียง 2 แถว ติดทางด้านข้าง **ผล** ออกเป็นช่อ ผลย่อยรูปทรงกระบอกบางตอนคอดเว้าเล็กน้อย ตามผิวมีขนหนานุ่มมีเมล็ดมาก ผลสุกสีเหลืองส้ม ยาว 3-6 เซนติเมตร ก้านผลยาว 1-4 เซนติเมตร (ศุภโชติ, 2540; Backer and Brink, 1963) (ภาพที่ 1ข)

การกระจายพันธุ์ พบในป่าดิบแล้ง ป่าดิบชื้นทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคตะวันตกเฉียงใต้ และภาคใต้ของประเทศไทย ที่ระดับความสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึง 700 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง ออกดอกเดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม ผลแก่หลังดอกบาน 5 เดือน (ปิยะ, 2544)

3. *Uvaria rufa* Blume **พีพวนน้อย** บุหงาใหญ่ (ภาคเหนือ) นมควาย (ภาคใต้) นมแมว (ภาคกลาง) นมแมวป่า (เชียงใหม่) นมวัว (กระบี่ พิษณุโลก) พีพวน (อุดรธานี) ตีนตั่งเครือ (อุบลราชธานี) และสีม่วน (ชัยภูมิ)

ไม้เถาเนื้อแข็ง ยาวประมาณ 10-20 เมตร กิ่งอ่อนมีขนรูปดาวสั้น ๆ สีน้ำตาลปกคลุมหนาแน่น **ใบ** ค่อนข้างหนาและเหนียว รูปหอกแกมรูปขอบขนาน ยาว 8.0-15.5 เซนติเมตร กว้าง 3.5-6.0 เซนติเมตร ก้านใบยาว 0.5 เซนติเมตร แผ่นใบด้านบนสากคายมากกว่าด้านล่าง ใบอ่อนมีขนรูปดาวสีน้ำตาลหนาแน่น และพบประปรายในใบแก่ด้านล่าง เส้นกลางใบด้านบนนูนเล็กน้อย ด้านล่างเป็นสัน มีขนรูปดาวหนาแน่นทั้งสองด้าน เส้นแขนงใบมีประมาณ 12-14 คู่ **ดอก** ออกเป็นช่อกระจุก ตรงข้ามใบ ประกอบด้วยดอกย่อย 1-3 ดอก เส้นผ่านศูนย์กลางของดอกบานประมาณ 1.5-2.3 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้น ยาวไม่เกิน 0.2 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 0.6-0.8 เซนติเมตร มีใบประดับค่อนข้างกลมติดที่โคนก้านช่อดอก กว้างและยาวเท่ากันประมาณ 0.5-0.7 เซนติเมตร และมีใบประดับติดตรงกลางก้านดอก มีขนาดเล็กกว่าใบประดับที่ก้านช่อดอกเล็กน้อย มีขนรูปดาวหนาแน่นทั้งที่ก้านดอกและใบประดับ กลีบเลี้ยงแยกและเรียงขอบจรดกันและเชื่อมติดกันที่ฐาน แต่ละกลีบค่อนข้างกลม ยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร กว้าง 0.4 เซนติเมตร ด้านนอกมีขนรูปดาวหนาแน่นกว่าด้านใน กลีบดอกแยกกันมี 6 กลีบ เรียง 2 ชั้น กลีบดอกรูปขอบขนาน ปลายมนค่อนข้างเท่ากัน สีแดงเข้ม ยาว 0.9-1.3 เซนติเมตร กว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร ขอบกลีบแต่ละชั้นจะเรียงซ้อนเหลื่อมกันในดอกตูม เมื่อดอกบาน กลีบดอกจะโค้งกลับออกด้านนอกจรดก้านดอก มีขนรูปดาวสั้น ๆ ปกคลุมหนาแน่นทั้งด้านในและด้านนอกของกลีบดอกทั้งสองชั้น เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก ชั้นนอกเป็นหมันไม่มีอับเรณู ชั้นในมีอับเรณู 4 พู ยาวประมาณ 0.2 เซนติเมตร เรียงข้างละ 2 พู ของแกนอับเรณู ปลายแกนอับเรณูเป็นแผ่น หนา รูปลิ้น เกสรเพศเมียประกอบด้วยคาร์เพล

จำนวนมาก ยาวประมาณ 0.4 เซนติเมตร รังไข่รูปทรงกระบอกยาวประมาณ 0.3 เซนติเมตร เป็นร่องเล็กน้อยและมีขนค่อนข้างมาก ยอดเกสรเพศเมียสั้น มีออวุล 18-20 อัน เรียง 2 แถว ติดทางด้านข้าง **ผล** ออกเป็นช่อโปร่ง มีผลย่อย 6-15 ผล รูปทรงกระบอก อยู่ห่างกัน เปลือกมีขนรูปดาวสั้น ๆ ปกคลุมหนาแน่น ผลสุกสีแดง ยาว 3.5-6.0 เซนติเมตร กว้าง 2.0-2.5 เซนติเมตร ก้านผลย่อยยาว 2-3 เซนติเมตร เมล็ด 9-10 เมล็ด ทรงรีหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ แบน เปลือกเรียบ เกลี้ยง สีน้ำตาลเข้ม ยาว 1.0-1.4 เซนติเมตร กว้าง 0.7-0.8 เซนติเมตร (ศุภโชติ, 2540; ณรงค์, 2544; Backer and Brink, 1963) (ภาพที่ 1ค)

การกระจายพันธุ์ พบในภูมิภาคอินโดจีนและภูมิภาคมาเลเซีย ส่วนในประเทศไทย พบขึ้นกระจายอยู่แทบทุกภาคในป่าดิบแล้ง ป่าดิบชื้น พื้นที่เปิดโล่ง ที่ราบ ค่อนข้างแห้งแล้ง ระดับความสูง 100-200 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง ออกดอกเดือนกุมภาพันธ์ถึงมิถุนายน ผลแก่หลังจากดอกบาน 4 เดือน (ณรงค์, 2544; ปิยะ, 2544; Ridley, 1922)

<u>ประโยชน์ของพืชวงศ์ Annonaceae</u>

มีการนำพืชวงศ์ Annonaceae ไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น

1. **ใช้ในการก่อสร้าง** ตกแต่งภายใน เป็นไม้แบบ หีบและลังใส่ของ เช่น ตารา (*Polyalthia glauca* (Hassk.) F. Muell) (จำลอง และคณะ, 2534)

2. **ใช้เป็นสมุนไพร** เช่น กลึงกล่อม (*Polyalthia suberosa* (Roxb.) Thwaites) ใบและกิ่งพบสาร suberosol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ที่เป็นสาเหตุของโรคเอดส์ได้ในสภาพหลอดทดลอง พีพวนน้อย (*Uvaria rufa* Blume) ในตำรายาไทยใช้แก่นและรากต้มน้ำดื่มแก้ไข้กลับซ้ำเนื่องจากกินของแสลง รากแก้ผอมแห้งสำหรับสตรีที่อยู่ไฟไม่ได้หลังคลอดบุตร และช่วยบำรุงน้ำนม ผลตำผสมน้ำทาแก้เม็ดผื่นคัน (วงศ์สถิตย์ และคณะ, 2543)

3. **ใช้ทำเครื่องหอม** สกัดน้ำมันหอมระเหยใช้แต่งกลิ่น เช่น กระดังงา (*Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson) มีกลิ่นและน้ำมันหอม ใช้ทำน้ำหอมซึ่งเป็นที่นิยมมากในแถบยุโรป (Hutchinson, 1964)

4. **ใช้เป็นไม้ผล** ผลของพืชสกุล *Annona* เป็นที่รู้จักกันดี ชนิดที่มีการรับประทานกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ น้อยหน่า (*A. squamosa* L.) น้อยหน่าออสเตรเลีย (*A. cherimola* Mill.) ทุเรียนเทศ (*A. muricata* L.) และน้อยโหน่ง (*A. reticulata* L.) (Hutchinson, 1964)

5. **ใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับ** มีดอกสวย มีกลิ่นหอม ทรงพุ่มสวย ให้ร่มเงา เช่น การเวก *(Artabotrys siamensis* Miq.) กระดังงา (*Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson) (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538)

6. **ใช้ย้อมสีผ้า** ผลดิบและผลสดของน้อยโหน่ง (*Annona reticulata* L.) จะให้สีดำและน้ำเงินตามลำดับ (วงศ์สถิตย์ และคณะ, 2543)

7. **ใช้ทำฟืน** เช่น เนื้อไม้หัวเต่า (*Mezzettia parviflora* Becc.) (จำลอง และคณะ, 2515)

8. **เป็นอาหารสัตว์ในป่าธรรมชาติ** เช่น ผลสุกของพีพวนน้อย (*Uvaria rufa* Blume) และกล้วยหมูสัง (*U. grandiflora* Roxb. ex Hornem.) (ศุภโชติ, 2540; ณรงค์, 2544) นอกจากนี้ Plongmai (2001) รายงานว่าบางชนิด เช่น ยางโอน (*Polyalthia viridis* Craib) และสกุล *Uvaria* โดยเฉพาะกล้วยไอ้พอน (*U. lurida* Hook.f. & Thomson) จัดว่าเป็นอาหารสำคัญในฤดูผสมพันธุ์ของนกเงือกในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่

ในปัจจุบันหน่วยงานของภาครัฐและเอกชนบางแห่งได้ให้ความสนใจ เริ่มมีการปลูกพืชวงศ์นี้ไว้เป็นแปลงรวบรวมพันธุ์ ซึ่งนอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อวงการการศึกษา การวิจัย และการใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมแล้ว ยังอาจส่งเสริมให้เป็นสถานที่ท่องเที่ยวเชิงอนุรักษ์ได้อีกทางหนึ่ง

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Annonaceae</u>

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการต่าง ๆ มากมาย เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการเพาะเลี้ยง เพราะแม้ว่าทุกส่วนของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่จะสามารถนำมาทำการเพาะเลี้ยงได้ แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันไป เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัว (activity) ไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อที่มีความเยาว์วัย (juvenile) มากกว่าก็จะมีความสามารถในการพัฒนาและถูกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายกว่า (Pierik, 1998) นอกจากนี้ ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอีกหลายประการ เช่น สูตรอาหาร ชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ สภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรมของพืชนั้น ๆ ส่งผลให้พืชแต่ละชนิดมีความยากง่าย และมีปัญหาในการนำมาเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน (รังสฤษดิ์, 2541; Pierik, 1998) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Annonaceae มักมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนสูง อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ภายนอกและที่อยู่ภายในท่อลำเลียงเอง ซึ่งมักจะแสดงผลภายหลังการเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่ง การเกิดสีดำของชิ้นส่วน การปลดปล่อย phenolic compounds ลงในอาหารปริมาณสูง การหลุดร่วงของใบ (leaf abscission) การตอบสนองต่อการชักนำให้เกิด

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (morphogenesis) ต่ำ โดยเฉพาะการเกิดราก ทำให้เกิดข้อจำกัดในความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงพืชในวงศ์นี้ (George and Nissen, 1987; Rasai *et al*., 1995 a, 1995 c; Lemos and Black, 1996 a; Castro *et al*., 1999; Bridg, 2000; Farooq *et al*., 2002; Zobayed *et al*., 2002; Nagori and Purohit, 2004; Padilla and Encina, 2004)

การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Annonaceae ยังมีอยู่น้อย มีการศึกษาจำเพาะกลุ่มที่เป็นไม้ผล ได้แก่ น้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) น้อยหน่าออสเตรเลีย (*A. cherimola* Mill) ทุเรียนเทศ (*A. muricata* L.) และ atemoya (*A. cherimola* Mill. × *A. squamosa* L.) (Nair *et al.*, 1984 a; Bejoy and Hariharan, 1992; Rasai *et al*., 1994; Encina *et al.*, 1994; Lemos and Black, 1996 b, 1996 c) และไม้ดอกไม้ประดับ ได้แก่ ลำดวน (*Melodorum fruticosum* Lour.) (สุภาวดี, 2540) โดยชิ้นส่วนที่นิยมนำมาใช้เพาะเลี้ยงเพื่อการเพิ่มปริมาณ มักเป็นชิ้นส่วนที่ยังอ่อนอยู่ เนื่องจากสามารถตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดี เช่น ชิ้นส่วนข้อจากยอดที่แตกจากตาข้าง ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง หรือไฮโปคอทิล (hypocotyl) ของต้นกล้าซึ่งเป็นระยะเยาว์วัย และข้อจากยอดที่แตกจากตาข้างของต้นโตเต็มที่ (mature plant) (Tazzari *et al*., 1990; Bejoy and Hariharan, 1992; Encina *et al*., 1994; Lemos and Black, 1996 b, 1996 c; Bridg, 2000) โดยชิ้นส่วนดังกล่าวจะมีความตื่นตัวในการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตสูง

ในขั้นตอนของการฟอกฆ่าเชื้อ (disinfection) ชิ้นส่วนของพืชวงศ์ Annonaceae ทำให้ปลอดเชื้อได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากพืชในวงศ์นี้มักมีขน (trichome และ hair) จำนวนมากตามส่วนต่าง ๆ พืชสกุล *Uvaria* มีขนรูปดาวปกคลุมบริเวณตายอด ตาข้าง กิ่งอ่อน และใบ จึงยากแก่การทำให้ปลอดเชื้อ นอกจากวิธีการทำความสะอาด ความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ช่วงเวลาที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง Castro *et al.* (1999) รายงานว่าในการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของ *A. cherimola* 3 วิธี ได้แก่ การฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween 20 นาน 15 นาที การแช่ในเอทิลแอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ก่อนฟอกซ้ำด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween 20 นาน 10 นาที และการฟอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween 20 นาน 10 นาที พบว่า การฟอกทุกวิธีในช่วงเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายน พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ แต่จะพบการปนเปื้อนเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฟอกในช่วงเดือนธันวาคมและมกราคม Bridg (2000) กล่าวว่า ในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชพวกไม้เนื้อแข็ง (hard wood) มักพบ

การเกิดสีน้ำตาลและดำของชิ้นส่วน (browning and blackening) เสมอ โดยมีสาเหตุจาก phenolic compounds และ tannin ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของ polyphenoloxidase เมื่อพืชถูกทำให้เกิดบาดแผลหรือถูกตัดแยกชิ้นส่วนออกมาจากต้นแม่ พืชในวงศ์ Annonaceae จะมีคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิด phenolic compounds (hypersensitivity) ซึ่งสารกลุ่มนี้จะส่งผลรบกวนการเติบโตและเป็นสาเหตุให้เกิดสีน้ำตาลและดำของชิ้นส่วนในระหว่างการเพาะเลี้ยง และอาจส่งผลยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานอีกด้วย (Martinez-Cayuela *et al*., 1988; Bridg, 2000) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์นี้ จึงมักมีการใช้สารกลุ่ม antioxidant มาช่วยลดปัญหาที่เกิดขึ้น (Castro *et al*., 1999; Bridg, 2000) ตัวอย่างเช่น การใช้ ascorbic acid ความเข้มข้น 50-500 มิลลิกรัมต่อลิตร citric acid ความเข้มข้น 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร polyvinylpyrrolidone (PVP) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการใช้ activated charcoal ผสมลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เพื่อให้สารดังกล่าวช่วยดูดซับ phenolic compounds หรือการเพาะเลี้ยงในที่มืด (Bajaj, 1991; Bridg, 2000)

ปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Annonaceae อีกประการหนึ่ง คือการหลุดร่วงของยอดและใบ (Lemos and Black, 1994, 1996 a; Bridg, 2000) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอธิลีนที่มีผลชักนำหรือกระตุ้นให้เกิดการแก่ชราและการหลุดร่วงของส่วนต่าง ๆ (สัมฤทธิ์, 2544; Reid, 1995) การป้องกันทำได้โดย (Buddendorf-Joosten and Woltering, 1994; Lemos and Black, 1996 a)

1. ใช้สารที่มีสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์เอธิลีน เช่น L-∝-2-aminoethoxyvinylglycine (AVG), amino-oxyacetic acid (AOA) และ cobalt chloride ($CoCl_2$)

2. ใช้สารที่มีสมบัติช่วยดูดซับเอธิลีน เช่น activated charcoal (AC), mercuric perchlorate ($Hg(ClO_4)_2$) และ potassium permanganate ($KMnO_4$)

3. ใช้สารที่มีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอธิลีน เช่น silver nitrate ($AgNO_3$), silver thiosulphate (STS) และก๊าซ 2,5-norbornadiene (NBD)

ตัวอย่างการศึกษาในเรื่องนี้ เช่น การควบคุมการหลุดร่วงของใบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *A. squamosa* โดยใช้ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร STS ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการใช้ก๊าซ NBD ความเข้มข้น 1000 ไมโครลิตรต่อลิตร ซึ่งมีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอธิลีน พบว่าสารกลุ่มดังกล่าวสามารถป้องกันการหลุดร่วงของใบได้ดีกว่าการใช้สารกลุ่มที่ช่วยดูดซับเอธิลีน

เช่น activated charcoal ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร $Hg(ClO_4)_2$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $KMnO_4$ ความเข้มข้น 158 มิลลิกรัมต่อลิตร และดีกว่าการใช้สารที่มีสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์เอธิลีน เช่น AVG ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร AOA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $CoCl_2$ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lemos and Black, 1996 a)

การชักนำให้ชิ้นส่วนของพืชวงศ์ Annonaceae เกิดยอด

สูตรอาหาร

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชวงศ์ Annonaceae เพื่อชักนำให้เกิดยอด นิยมใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) (Bejoy and Hariharan, 1992; Encina *et al.*, 1994; Rasai *et al*., 1994; Maldonado and Ramirez, 2001; Farooq *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้อาหารสูตร Woody Plant Medium (WPM) (Lemos and Black, 1996 b, 1996 c) Nitsch and Nitsch (1969) (NN-69) (Bejoy and Hariharan, 1992; Bridg, 2000) White 's medium (W) Gamborg 's medium (B_5) (Bejoy and Hariharan, 1992) และ Schienk and Hilderbrant (SH) (Farooq *et al*., 2002) ตัวอย่างการทดลองเปรียบเทียบการชักนำยอดบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เช่น Bejoy and Hariharan (1992) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนไฮโปคอทิลของ *A. muricata* บนอาหารสูตร W B_5 NN-69 และ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ พบว่า อาหารสูตร W และ B_5 มีการเกิดยอดใหม่ 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่อาหารสูตร NN-69 และ MS ชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารสูตร MS ทำให้ยอดใหม่มีจำนวนสูงสุด 4.8 ยอด Farooq *et al*. (2002) เปรียบเทียบอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด ได้แก่ kinetin BA และ IAA ในระดับความเข้มข้นที่เท่ากันในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ *A. squamosa* พบว่า อาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่สูงสุด 93.17 เปอร์เซ็นต์ ยอดใหม่มีจำนวน 3-4 ยอด มากกว่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SH และ WPM ซึ่งเกิดยอดใหม่เพียง 1-2 ยอด

สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายชนิด ทั้งที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ 6-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylamino)purine (zeatin) และที่สังเคราะห์

ขึ้น ได้แก่ N^6-benzyladenine (BA) N_6-isopentanyl adenine (2iP) 6-furfurylaminopurine (kinatin) และ N-phenyl-N'-(1,2,3-thidiazurol-5'-yl)-urea (TDZ) เป็นต้น สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างหลักได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ adenine cytokinin และ phenylurea cytokinin ซึ่งโครงสร้างหลักทั้ง 2 แบบนี้จะมีความสัมพันธ์ (correlation) กัน (Mok and Mok, 1994) ตัวอย่างของ adenine cytokinin ได้แก่ BA 2iP zeatin และ kinatin เป็นต้น และ phenylurea cytokinin ได้แก่ TDZ diphenylurea (DPU) และ chloropyridylphenylurea (CPPU) เป็นต้น ไซโตไคนินโดยทั่วไปมีผลกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ชักนำให้เกิดยอดใหม่ เร่งการแตกตาข้าง เนื่องจากมีผลทำลายอิทธิพลของปลายยอด (apical dominance) ส่งเสริมให้มีการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารมากขึ้น ชะลอการสลายตัวของ RNA โดยยับยั้งการสลายตัวของ RNAase มีผลชะลอการแก่ชรา (ลิลลี่ และคณะ, 2548; Taiz and Zeiger, 2002) นอกจากนี้ไซโตไคนินแต่ละชนิดจะมีกลุ่ม free base ในโครงสร้างแตกต่างกัน ทำให้มีสมบัติบางประการที่แตกต่างกัน รวมถึงการมี cytokinin receptor ที่เหมาะสมในแต่ละพืชต่างกัน พืชจึงมีการตอบสนองต่อไซโตไคนินต่างชนิดกันได้แตกต่างกัน (Mok and Mok, 1994; Taiz and Zeiger, 2002) ไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณยอดโดยทั่วไป ได้แก่ BA ความเข้มข้นที่ให้ผลในการตอบสนองที่ดีขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดและตำแหน่งของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง และปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยง สำหรับพืชวงศ์ Annonaceae ความเข้มข้นของ BA ที่ให้ผลดีจะอยู่ในช่วงประมาณ 2.22-17.6 ไมโครโมลาร์ (0.5-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) (George and Nissen, 1987; Tazzari *et al*., 1990, Bejoy and Hariharan, 1992; Encina *et al.*, 1994; Rasai *et al*., 1994; Lemos and Black, 1996 b, 1996 c; Bridg, 2000; Farooq *et al*., 2002; Zobayed *et al*., 2002; Padilla and Encina, 2004) สารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันนี้ที่มีการนำมาใช้ ได้แก่ zeatin kinetin 2iP และ TDZ (Encina *et al.*, 1994; Bridg, 2000; Farooq *et al*., 2002; Padilla and Encina, 2004) ในบางการทดลอง พบว่าการเพิ่มฤทธิ์ของไซโตไคนิน โดยใช้ไซโตไคนินสองชนิดร่วมกันอาจส่งผลในการชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอดได้มากกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว เช่น Bridg (2000) พบว่า การใช้ zeatin ความเข้มข้น 1.36 ไมโครโมลาร์ หรือ kinetin ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของ *A. cherimola* เกิดยอดได้ 2.4 และ 3.5 ยอด ตามลำดับ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม zeatin ความเข้มข้น 1.36 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.65 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เพิ่มขึ้นเป็น 6.7 ยอด และ Farooq *et al*. (2002) รายงานว่าการใช้ BA ร่วมกับ kinetin ให้ผลดีกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว และดีกว่าการใช้ BA ร่วมกับ kinetin และ IAA ในการชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของ *A. squamosa* เกิดยอด แต่ในบางชนิดมีรายงานว่าการใช้ไซโตไคนินร่วมกับออกซิน สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดการเพิ่มปริมาณยอดได้ดี เช่น การใช้ BA

ร่วมกับ α-naphthaleneacetic acid (NAA) ในการชักนำให้ชิ้นส่วนของ *A. muricata* เกิดยอด (Bejoy and Hariharan, 1992; Lemos and Black, 1996 c)

ชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงมักใช้ที่มีความเยาว์วัย เนื่องจากมีความตื่นตัว ง่ายต่อการชักนำ ได้แก่ ไฮโปคอทิลจากต้นกล้าที่มีอายุน้อย ๆ (Bejoy and Hariharan, 1992; Rasai *et al*., 1994; Lemos and Black, 1996 b, 1996 c) และข้อที่เยาว์วัยของต้นที่มีอายุน้อย ๆ (Encina *et al*., 1994) ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Tazzari *et al*. (1990) พบว่าการนำชิ้นส่วนจากต้น *A. cherimola* ที่มีอายุน้อย (3-5 ปี) มาเพาะเลี้ยงจะมีการตอบสนองต่อการชักนำได้ดีกว่าชิ้นส่วนจากต้นที่อายุมาก ๆ (30 ปี) นอกจากนี้ตำแหน่งของชิ้นส่วนที่ใช้ในการทดลองก็มีผลต่อการเพาะเลี้ยงด้วย Rasai *et al*. (1994) พบว่าการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนไฮโปคอทิลของต้นกล้า atemoya cv. African Pride โดยใช้ชิ้นส่วน distal part (ส่วนที่ติดกับรอยต่อของราก) สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากกว่าการใช้ชิ้นส่วน middle part (ส่วนกลาง) และ proximal (ส่วนที่ติดกับข้อใบเลี้ยง) ของไฮโปคอทิล การนำชิ้นส่วนจากต้นโตเต็มที่มาเพาะเลี้ยง นิยมใช้ชิ้นส่วนข้อโดยตัดชิ้นส่วนเป็นข้อเดี่ยว ๆ ที่มี 1 ตา (Rasai *et al*., 1994; Lemos and Black, 1996 b, 1996 c; Maldonado and Ramirez, 2001) แต่ Bridg (2000) พบว่า การนำกิ่ง *A. cherimola* และ *A. muricata* จากต้นอายุ 2 ปี (semiwoody) ที่ตัดเป็นท่อนยาว 5-9 เซนติเมตร มีตา 3 ตา มาเพาะเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าการตัดเป็นท่อนยาว 1-3 เซนติเมตร ที่มีตา 1 ตา

ความเข้มแสง และระยะเวลาการได้รับแสง

Farooq *et al*. (2002) พบว่าความเข้มแสง และระยะเวลาในการได้รับแสง มีส่วนช่วยกระตุ้นให้ยอดใหม่ของ *A. squamosa* เกิดเร็วขึ้น โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมอยู่ที่ระดับ 2,000 ลักซ์ (27 ไมโครโมลต่อตารางเมตร-วินาที) นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน

การชักนำให้ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเกิดราก

ในการขยายพันธุ์พืชวงศ์ Annonaceae โดยการตอนกิ่งและการปักชำ ในสภาพธรรมชาติใช้ระยะเวลานานและมักไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร (ทอม, 2546) และในสภาพเพาะเลี้ยงก็เช่นกัน

การชักนำให้เกิดรากทำได้ค่อนข้างยาก (George and Nissen, 1987; Rasai *et al*., 1995 a; Farooq *et al*., 2002; Padilla and Encina, 2004) โดยความยากง่ายของการชักนำนอกจากขึ้นอยู่กับชนิดพืชแล้ว ยังมีปัจจัยสำคัญอื่น ๆ เช่น

สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่นิยมใช้เพื่อชักนำให้ยอดเกิดราก ได้แก่ indole butyric acid (IBA) indole-3-acetic acid (IAA) และ NAA ความเข้มข้นที่ใช้ชักนำให้ยอดของพืชวงศ์ Annonaceae เกิดรากมีความแตกต่างกันมาก โดย IBA ความเข้มข้นที่ใช้ได้ผลดีอยู่ในช่วงประมาณ 4.9 -980 ไมโครโมลาร์ (1-200 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Bejoy and Hariharan, 1992; Encina *et al*., 1994; Rasai *et al*., 1994; Lemos and Black, 1996 b; Bridg, 2000; Farooq *et al*., 2002; Padilla and Encina, 2004) และความเข้มข้นของ NAA ที่ใช้ได้ผลดีอยู่ในช่วงประมาณ 21.48-5,370 ไมโครโมลาร์ (4-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Lemos and Black, 1996 b, 1996 c; Padilla and Encina, 2004) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดพืช วิธีการ ขั้นตอน และระยะเวลาในการชักนำ (Encina *et al*., 1994; Lemos and Black 1996, c) ส่วน IAA มีผลกระตุ้นการเกิดรากของพืชวงศ์นี้ได้ค่อนข้างต่ำ (Encina *et al*., 1994; Lemos and Black, 1996 c; Bridg, 2000; Padilla and Encina, 2004)

อายุของชิ้นส่วนพืช

ช่วงอายุของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอดที่ใช้ในการชักนำรากก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ โดย Lemos and Black (1996 b, 1996 c) พบว่ายอดที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนเยาว์วัย ได้แก่ ไฮโปคอทิล จะตอบสนองต่อการเกิดรากได้ดีกว่า คือสามารถชักนำให้เกิดรากได้ง่ายและให้จำนวนรากมากกว่ายอดจากชิ้นส่วนข้อของต้นโตเต็มวัย

องค์ประกอบอื่น ๆ ของอาหาร

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของอาหาร เช่น การลดความเข้มข้นของปริมาณธาตุอาหารลงให้เหลือครึ่งหนึ่ง หรือหนึ่งในสี่ของสูตรเดิม การลดปริมาณน้ำตาลในอาหาร และการเติม activated charcoal ประมาณ 1-2 กรัมต่อลิตร รวมถึงการเติม citric acid ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยลดปัญหาจากการปล่อยของเหลวสีน้ำตาลแดง (a brown-red

exudate) จากชิ้นส่วน สามารถส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวรากเพิ่มขึ้นได้ (Encina *et al*., 1994; Lemos and Black, 1996 c; Bridg, 2000; Farooq *et al*., 2002; Padilla and Encina, 2004) และ Lemos and Black (1996 b) ยังพบว่าการใช้น้ำตาล galactose แทน sucrose ทำให้การชักนำรากจากยอด *A. squamosa* เกิดเพิ่มขึ้นได้

ตัวอย่าง เช่น Lemos and Black (1996 c) ทดลองนำยอด *A. muricata* ที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนที่เยาว์วัย (ไฮโปคอทิล) และจากข้อของต้นโตเต็มวัยมาชักนำรากด้วย NAA ความเข้มข้น 21.48-5370 ไมโครโมลาร์ (4-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดย NAA ความเข้มข้นต่ำ 21.48 ไมโครโมลาร์ ใช้วิธีผสมลงในอาหารกึ่งแข็ง เพาะเลี้ยงยอดนาน 4 สัปดาห์ และที่ระดับความเข้มข้น 21.48 85.92 และ 343.68 ไมโครโมลาร์ ใช้วิธีผสมลงในอาหารเหลว เพาะเลี้ยงยอดนาน 5-15 วัน ก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่วนที่ระดับความเข้มข้นสูง 2,685 และ 5,370 ไมโครโมลาร์ ใช้วิธีจุ่มโคนยอดนาน 1-3 นาที เพาะเลี้ยงในที่มืด ก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำรากได้ 8-66 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร WPM ที่เติม activated charcoal ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร นาน 15 วัน เพื่อปรับสภาพก่อนนำไปชักนำราก ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากเพิ่มขึ้นได้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 21.48 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ ยอดที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนที่เยาว์วัยเกิดรากได้ 66 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 2.4 ราก และยอดที่ชักนำได้จากข้อของต้นโตเต็มวัยเกิดรากได้ 58 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 2.2 ราก มากกว่าเมื่อชักนำรากโดยไม่ผ่านการปรับสภาพก่อนซึ่งยอดที่ได้จากชิ้นส่วนที่เยาว์วัยเกิดรากได้ 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 2.4 รากต่อชิ้น และชักนำให้ยอดที่ได้จากชิ้นส่วนข้อจากต้นโตเต็มวัยเกิดรากได้ 42 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 1.5 ราก

<u>การย้ายต้นกล้าออกปลูกในสภาพธรรมชาติ</u>

การย้ายต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติให้มีการรอดชีวิตสูงสุด มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ เช่น วัสดุปลูก การรักษาความชื้นให้พอเหมาะ และการดูแลรักษาที่เหมาะสม การปรับสภาพต้นพืชให้มีความเคยชินกับสภาพอากาศก่อนนำออกปลูกก็เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง Bejoy and Hariharan (1992) ปรับสภาพต้นกล้า *A. muricata* ด้วยการนำไปเก็บในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 27-29 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน ก่อนย้ายปลูกโดยใช้ทรายแม่น้ำเป็นวัสดุปลูก ไว้ในที่มีความชื้นสูง พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิต 65 เปอร์เซ็นต์

ขณะที่ต้นกล้าที่ไม่ได้ปรับสภาพมีอัตราการรอดชีวิต 35 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายปลูกนาน 35-40 วัน ย้ายต้นกล้าลงปลูกในวัสดุผสมระหว่างทรายแม่น้ำและปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1 : 1 ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตดี ในขณะที่ Lemos and Black (1996 c) ปรับสภาพต้นกล้า *A. muricata* โดยการย้ายลงในกล่องพลาสติกสำหรับปลูกที่มีเวอร์มิคูไลด์เป็นวัสดุปลูก วางไว้ในห้องที่มีความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อเมตรวินาที อุณหภูมิ 24 ± 3 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต้นกล้าเริ่มเกิดใบใหม่ จึงค่อย ๆ เปิดฝากล่อง หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ รดด้วยสารละลายธาตุอาหาร พบว่าต้นกล้ามีการรอดชีวิตและเจริญเติบโตดี

ตัวอย่างความสำเร็จในการย้ายปลูกต้นกล้าของพืชวงศ์นี้ ได้แก่ Lemos and Black (1996 b) ย้ายปลูกต้นกล้า *A. squamosa* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในโรงเรือน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ Rasai *et al*. (1994) ย้ายปลูกต้นกล้า atemoya cv. African Pride ในสภาพธรรมชาติ พบว่ามีอัตรารอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Nair *et al*. (1984 a) ย้ายปลูก atemoya มีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์

<u>การชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (morphogenesis)</u>

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (morphogenesis) หมายถึง กระบวนการพัฒนาเป็นโครงสร้างหรืออวัยวะพืชจากภาวะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ (undifferentiation) ไปสู่ภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) โดยอาจเกิดได้ 2 กรณี คือเกิดโดยตรงจากชิ้นส่วน (direct morphogenesis) หรือชิ้นส่วนเกิดแคลลัสก่อนจากนั้นจึงเกิดกระบวนการพัฒนาเป็นโครงสร้างหรืออวัยวะ (indirect morphogenesis) ซึ่งอาจแบ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เป็น 2 ลักษณะ คือกระบวนการเกิดอวัยวะ (organogenesis) และการเกิดโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryogenesis) (รังสฤษดิ์, 2541; Kandasamy *et al*., 1995; Pierik, 1998)

แคลลัส คือ กลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่มีความว่องไวในการแบ่งตัว และยังไม่พัฒนาไปเป็นอวัยวะ มักเกิดบริเวณรอยตัดหรือแผลของชิ้นส่วนพืช แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น เรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวม ๆ เรียกว่า friable callus ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่าง ๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน ชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมีอื่น ๆ ที่เติมลงในอาหาร และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง (รังสฤษดิ์, 2541; Pierik, 1998) ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช

เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ในยี่หุบ (*Magnolia coco*) มณฑิรา (2531) ชักนำให้ชิ้นส่วนใบ ก้านใบ กลีบดอก และกิ่งอ่อนเกิดแคลลัสโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA : BA อัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบว่าเนื้อเยื่อส่วนกิ่งอ่อน และใบอ่อนที่มีส่วนของเส้นกลางใบติดอยู่จะสามารถเกิดแคลลัสได้ ลักษณะแคลลัสมีสีเขียวอ่อนใส เป็นก้อนขนาดเล็กรวมกลุ่มกัน โดยจะเกิดมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA : BA อัตราส่วน 1 : 1, 1 : 2 และ 2 : 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน นิยมใช้ชิ้นส่วนใบ หรือก้านใบ เช่น ใน *A. squamosa* (Nair *et al*., 1984 b) และ *A. cherimola* (Rasai, 1995 b) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และชักนำให้เกิด direct shoot organogenesis ได้ โดยบริเวณที่ตอบสนองต่อการชักนำได้ดี คือ ส่วนฐานใบ เส้นกลางใบ และรอยตัดบริเวณก้านใบ เช่น ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *A. squamosa* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดบนชิ้นส่วนใบสูงสุด และ BA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนใบเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด 15.6 ยอดต่อชิ้นส่วน และพบว่า หากเติม NAA ร่วมกับ BA และ kinetin จำนวนยอดที่ชักนำได้จะลดลง และมักเกิดแคลลัสที่รอยตัดของชิ้นส่วน นอกจากนี้ยังพบว่า อุณหภูมิ และความเข้มแสงมีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนใบเกิดยอด โดยอุณหภูมิและความเข้มแสงที่เหมาะสมในการชักนำให้ชิ้นส่วนใบ *A. squamosa* เกิดยอด คือ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ (13.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที) (Nair *et al*., 1984 b) ในส่วนของ Rasai (1995 b) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบรวมก้านใบของ *A. cherimola* ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casein hydrolysate ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรอง) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของลำดวน สุภาวดี (2540) พบว่าอาหารสูตร WPM ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด แต่แคลลัสที่ได้ไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นยอดได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. พืชทดลอง ได้แก่ กล้วยไอ้พอน (*U. lurida* Hook.f. & Thomson) กล้วยหมูสัง (*U. grandiflora* Roxb. ex Hornem. var. *grandiflora*) และพีพวนน้อย (*U. rufa* Blume) ซึ่งรวบรวมจากร้านพรรณไม้ แล้วนำมาปลูกไว้ในเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

2. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดที่อ่านค่าได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ไมโครเวฟ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ สำหรับเตรียมอาหาร และขวดขนาด 4 ออนซ์พร้อมฝาปิดสำหรับบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง

3. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางผนวกที่ 1)

4. สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ N^6-benzyladenine (BA), N-phenyl-N'-(1,2,3-thidiazurol-5'-yl)-urea (TDZ) กลุ่มออกซิน ได้แก่ α-naphthaleneacetic acid (NAA) และ indole butyric acid (IBA) และกลุ่มจิบเบอเรลลิน ไดแก่ gibberellic acid (GA_3)

5. สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ silver nitrate ($AgNO_3$), ascorbic acid, citric acid และ activated charcoal

6. ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ streptomycin, penocep, tetracycline และ rifampicin

7. สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

8. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อและทำความสะอาด ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ สารละลายคลอรอกซ์ (sodium hypochloride 5.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) สารลดแรงตึงผิว (tween 20) น้ำยาล้างผัก (sodium lauryl ether sulfate 7.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) สำหรับล้างชิ้นส่วนพืช

9. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการย้ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ด้ามมีดผ่าตัด ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 ปากคีบ กรรไกร จานแก้ว เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ และตะเกียงแก๊ส

10. วัสดุสำหรับย้ายปลูก ได้แก่ วัสดุผสมแกลบเผาและขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1

11. อุปกรณ์บันทึกภาพและข้อมูล

<u>การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชิ้นส่วน</u>

1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (stereo microscope) ชนิดเชิงประกอบ (compound microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) พร้อมกล้องถ่ายภาพ

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร เช่น formalin aceto alcohol (FAA) เอทิลแอลกอฮอล์ พาราฟิน และสีย้อม ได้แก่ safanin และ fast green

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM ได้แก่ glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ osmiumtetroxide (OsO_4) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ phosphate buffer (pH 7.2) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ NaOH ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ acetone

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำสไลด์ถาวร เช่น ปากคีบ จานแก้ว สไลด์ กระจกปิดสไลด์ และเครื่องตัดตัวอย่างพืช (microtome)

5. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM เช่น ขวดเก็บตัวอย่าง (vial) ตู้ดูดควัน เครื่องดูดอากาศ ฐานรองตัวอย่าง (stub) เครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤติ (critical point dryer, CPD) และเครื่องฉาบผิว (ion sputter)

<u>วิธีการ</u>

1. <u>การเตรียมชิ้นส่วนพืชทดลอง</u>

ชิ้นส่วนข้อ: นำกิ่งพืชทดลองทั้ง 3 ชนิด ที่มียอดและข้อที่สามารถมองเห็นได้จำนวน 4 ข้อ ตัดเฉพาะข้อที่ 2-4 นับจากยอดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างผักโดยใช้พู่กันทำความสะอาดตามซอกตาเบา ๆ ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดฟอง จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween 20 1-2 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร นาน 10 นาที และฟอกซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10-15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หรือจนกว่าจะหมดฟอง แช่ในสารละลาย ascorbic acid (ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรอง) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 5 นาที ตัดแยกเป็นข้อเดี่ยว ๆ นำไป

เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดปริมาณความเข้มข้นของอาหารลงให้เหลือครึ่งสูตร (½ MS) นาน 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน จากนั้นนำชิ้นส่วนปลอดเชื้อไปใช้ในการทดลอง

ชิ้นส่วนใบ: นำใบอ่อนจากข้อที่ 1 และ 2 ของกล้วยไอ้พอนและพีพวนน้อยมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างผัก จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween 20 1-2 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หรือจนกว่าจะหมดฟอง แช่ในสารละลาย ascorbic acid (ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรอง) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 5 นาที ตัดเป็นชิ้น กว้าง 1.5 เซนติเมตร ยาว 1.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS นาน 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน จากนั้นนำชิ้นส่วนปลอดเชื้อไปใช้ในการทดลอง

2. <u>การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บชิ้นส่วนข้อมาฟอกฆ่าเชื้อ</u>

นำชิ้นส่วนข้อของพืชทดลองทั้ง 3 ชนิด ที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ ฤดูร้อน (เดือนมีนาคม-พฤษภาคม) ฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม-กันยายน) และฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน-มกราคม) มาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีในข้อที่ 1 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS นาน 2 สัปดาห์ ทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 40 ค่าสังเกต ให้ 1 ค่าสังเกตคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อน และรอดชีวิต (ชิ้นส่วนมีสีเขียวสด) แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และรอดชีวิตของชิ้นส่วน

3. <u>การศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในท่อลำเลียงของชิ้นส่วน</u>

นำชิ้นส่วนข้อของกล้วยไอ้พอนมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีในข้อที่ 1 นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS (control) และแช่ในสารละลายยาปฏิชีวนะ ตามวิธีของ Bridg (2000) ชนิดของยาปฏิชีวนะ ได้แก่ streptomycin, penocep (penicillin และ streptomycin), tetracycline และ rifampicin (ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรอง) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 5 นาที ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS นาน 2 สัปดาห์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 29.4 ไมโครโมลาร์ ชิ้นส่วนที่แช่สารละลาย rifampicin นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวที่เททับหรือไม่เททับด้วยสารละลาย rifampicin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร นาน 4 สัปดาห์ ทดลอง 30 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอยตัดที่สัมผัสอาหาร แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

4. <u>การศึกษาผลของ BA ร่วมกับ $AgNO_3$ ในการชักนำให้ชิ้นส่วนข้อเกิดยอด และการป้องกันการหลุดร่วงของใบ</u>

4.1 กล้วยไข่พอนและกล้วยหมูสัง

นำชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0 และ 29.4 ไมโครโมลาร์ (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Lemos and Black, 1996 a) นาน 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและ $AgNO_3$ (basal-MS) นาน 4 สัปดาห์ กล้วยไข่พอน ทดลอง 30 ซ้ำ และกล้วยหมูสัง ทดลอง 15 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 2 × 5 Factorial in Complete Randomized Design (CRD) บันทึกเปอร์เซ็นต์การหลุดร่วงของใบ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด จำนวนข้อของยอดที่ยาวที่สุด (ยอดหลัก) และบันทึกภาพ

4.2 พีพวนน้อย

นำชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 29.4 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร basal-MS นาน 4 สัปดาห์ ทดลอง 21 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD บันทึกจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด จำนวนข้อของยอดหลัก และบันทึกภาพ

5. <u>การศึกษาผลของ GA_3 ต่อการยืดยาวของยอด</u>

นำชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อของกล้วยไข่พอนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 29.4 ไมโครโมลาร์ และ GA_3 ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร basal-MS

นาน 4 สัปดาห์ ทดลอง 30 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD บันทึกจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด จำนวนข้อของยอดหลัก และบันทึกภาพ

6. <u>การศึกษาผลของ TDZ ในการชักนำให้ชิ้นส่วนข้อเกิดยอด</u>

นำชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อของกล้วยไข่พอนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 29.4 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร basal-MS นาน 4 สัปดาห์ ทดลอง 30 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD บันทึกเปอร์เซ็นต์การหลุดร่วงของใบ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด จำนวนข้อของยอดหลัก และบันทึกภาพ

7. <u>การศึกษาผลของ IBA และ NAA ในการชักนำให้ยอดเกิดราก</u>

7.1 ทดลองในสภาพปลอดเชื้อ

7.1.1 นำยอดกล้วยไข่พอนและกล้วยหมูสังที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ที่มีความยาว 2-4 เซนติเมตร ไปเพาะลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ กล้วยไข่พอน ทดลอง 10 ซ้ำ กล้วยหมูสัง ทดลอง 5 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก

7.1.2 นำยอดกล้วยไข่พอนและกล้วยหมูสังที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ที่มีความยาว 2-4 เซนติเมตร ไปเพาะลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0 10 20 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร 3 ระดับ ได้แก่ 5.4 5.8 และ 6.2 นาน 4 สัปดาห์ กล้วยไข่พอน ทดลอง 5 ซ้ำ กล้วยหมูสัง ทดลอง 3 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 5 × 3 Factorial in CRD บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก

7.1.3 นำยอดกล้วยไข่พอนและกล้วยหมูสังที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ที่มีความยาว 2-4 เซนติเมตร ไปชักนำให้เกิดรากโดยดัดแปลงตามวิธีของ Lemos and Black (1996 c) โดยนำยอดไป

เพาะลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0 50 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร basal-MS นาน 2 สัปดาห์ กล้วยไอ้พอน ทดลอง 7 ซ้ำ กล้วยหมูสัง ทดลอง 5 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก

7.1.4 นำยอดกล้วยไอ้พอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ที่มีความยาว 2-4 เซนติเมตร ไปชักนำให้เกิดรากโดยดัดแปลงตามวิธีของ Farook *et al*. (2002); Nagori and Purohit (2004) โดยนำยอดที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม activated charcoal ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ในที่มืด นาน 10 วัน มาจุ่มโคนยอดลงในสารละลาย IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ นาน 30 นาที ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร basal-MS นาน 4 สัปดาห์ ทดลอง 5 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 2 × 2 Factorial in CRD บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก

7.1.5 นำยอดกล้วยไอ้พอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ที่มีความยาว 2-4 เซนติเมตร ไปชักนำให้เกิดรากโดยดัดแปลงตามวิธีของ Encina *et al*. (1994); Lemos and Black (1996 c); Padilla and Encina (2004) โดยนำยอดที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม activated charcoal ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร นาน 10 วัน มาเพาะเลี้ยงโดยแช่โคนยอดลงในสารละลาย IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 20 50 100 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ และความเข้มข้น 2,500 และ 5,000 ไมโครโมลาร์ นาน 1 นาที แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร basal-MS ที่เติม activated charcoal ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมและไม่เติม citric acid ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จนครบ 4 สัปดาห์ ทดลอง 5 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 7 × 2 Factorial in CRD บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก

7.2 ทดลองในสภาพธรรมชาติ

นำยอดกล้วยไอ้พอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ที่มีความยาว 2-4 เซนติเมตร ไปชักนำให้เกิดรากโดยดัดแปลงตามวิธีของ Lemos and Black (1996 c); Nagori and Purohit (2004) โดยนำยอดที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม activated charcoal ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร นาน 10 วัน มาจุ่มโคนยอดลงในสารละลาย IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 2,500 และ 5,000 ไมโครโมลาร์ นาน 1 นาที และความเข้มข้น 5,000 8,000 และ 10,000 ไมโครโมลาร์ นาน 2 นาที ก่อนนำออกปลูก

ในวัสดุผสมแกลบเผาและขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 ทดลอง 5 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ CRD หลังย้ายปลูก 35 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก ความยาวราก และการรอดชีวิต

8. <u>การศึกษาการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชิ้นส่วนใบเมื่อกระตุ้นด้วย BA ร่วมกับ NAA</u>

8.1 กล้วยไข่พอน

นำชิ้นส่วนใบที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 0.50 และ 2.50 ไมโครโมลาร์ (รวม 12 สูตร) เพาะเลี้ยงในที่มืด นาน 8 สัปดาห์ ทดลอง 10 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน เช่น แคลลัส ยอด ราก หรือ โซมาติกเอมบริโอ จำนวนชิ้นส่วนที่มีการปล่อย phenolic compounds ลงสู่อาหาร และจำนวนชิ้นส่วนที่เปลี่ยนเป็นสีดำเกินกว่าครึ่งหนึ่งของชิ้น แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์พร้อมทั้งให้คะแนนการเกิดการเปลี่ยนแปลง

การให้คะแนนการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานทั้งหมดที่เกิดขึ้นบนแผ่นใบ เช่น แคลลัส ยอด ราก หรือ โซมาติกเอมบริโอ

ระดับคะแนน 0 คือ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
ระดับคะแนน 1 คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า ¼ ของแผ่นใบ
ระดับคะแนน 2 คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงประมาณ ¼ ของแผ่นใบ
ระดับคะแนน 3 คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงประมาณ ½ ของแผ่นใบ
ระดับคะแนน 4 คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงประมาณ ¾ ของแผ่นใบ
ระดับคะแนน 5 คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงบนแผ่นใบเต็มแผ่นใบ

8.2 พืพวนน้อย

นำชิ้นส่วนใบที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 0.25 และ 0.50 ไมโครโมลาร์ (รวม 12

สูตร) เพาะเลี้ยงในที่มืด นาน 8 สัปดาห์ ทดลอง 5 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดทดลอง บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน เช่น แคลลัส ยอด ราก หรือ โซมาติกเอมบริโอ จำนวนชิ้นส่วนที่มีการปล่อย phenolic compounds ลงสู่อาหาร และจำนวนชิ้นส่วนที่เปลี่ยนเป็นสีดำเกินกว่าครึ่งหนึ่งของชิ้น แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์พร้อมทั้งให้คะแนนการเกิดและการเปลี่ยนแปลง

การให้คะแนนการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานทั้งหมดที่เกิดขึ้นบนแผ่นใบ เช่น แคลลัส ยอด ราก หรือ โซมาติกเอมบริโอ ใช้เกณฑ์ตามข้อ 8.1

8.3 การศึกษาการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน

นำชิ้นส่วนใบที่เกิดการเปลี่ยนแปลงมาศึกษาลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) โดยเตรียมตัวอย่างที่จะศึกษาด้วย SEM ตามวิธีการของรุจิพร (2541) และศึกษาลักษณะภายในจากสไลด์ถาวรที่ทำด้วยวิธี paraffin technique ตามวิธีการทาง ไมโครเทคนิคพืชของประศาสตร์ (2537) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเชิงประกอบ (compound microscope) เพื่อตรวจสอบการพัฒนาของโครงสร้าง

9. <u>สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง</u>

ทดลองในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในทุกการทดลองให้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ยกเว้นการศึกษาการเกิดการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนใบเมื่อกระตุ้นด้วย BA ร่วมกับ NAA ทดลองในที่มืด

10. <u>การวิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

วิเคราะห์ความแปรปรวนของสิ่งทดลองด้วยโปรแกรม IRRISTAT และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี least significant different test (LSD)

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง	เดือนมิถุนายน 2547
สิ้นสุดการทดลอง	เดือนมีนาคม 2549