วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

พันธุ์เฮลิโคเนียที่ใช้ทดลอง

1. พันธุ์ Golden Torch (*Heliconia psittacorum* L.f. X *H.spathocircinata* Aristeguieta) (Berry and Kress, 1991) (ภาพ 3ก) เป็นพันธุ์ที่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว และมีต้นอยู่ชิดกันเป็นกอแน่น ในการทดลองส่วนใหญ่จึงใช้พันธุ์นี้เป็นต้นแบบในการขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง (micropropagation) เมื่อได้สูตรและวิธีการที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดแล้ว จึงจะนำมาใช้ขยายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตช้าและขยายพันธุ์ได้ช้า

2. พันธุ์ Nickeriensis (*H.* x *nickeriensis* Maas & derooij, *H. psittacorum* x *H. marginata*) (ภาพ 3ข) เป็นพันธุ์ที่คล้าย Golden Torch และมีการเจริญเติบโตคล้ายกัน แต่มีต้นสูงกว่าจึงใช้พันธุ์นี้ขยายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงตาด้วยในบางครั้ง

3. พันธุ์ Rainbow (*H. wagneriana* Petersen) (ภาพ 3ค) เป็นพันธุ์ที่มีต้นและดอกขนาดใหญ่ ขยายพันธุ์ได้ค่อนข้างช้า ดอกมีหลายสีในดอกเดียวกันคล้ายสีรุ้ง เหมาะที่จะนำมาจัดประดับและปลูกตกแต่งสวน

4. *H. stricta* Huber (ภาพ 3ง) ไม่ทราบชื่อพันธุ์แน่นอน พันธุ์นี้มีต้นและดอกขนาดปานกลาง จึงนำมาจัดประดับหรือจัดแจกันได้สวยงาม การขยายพันธุ์ได้ค่อนข้างช้า พันธุ์นี้มีกาบรองดอกขนาดใหญ่เกยทับ ปิดหุ้มส่วนที่อยู่ในภายในดอกได้ดี จึงใช้ส่วนของช่อดอกในการชักนำแคลลัส

การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ

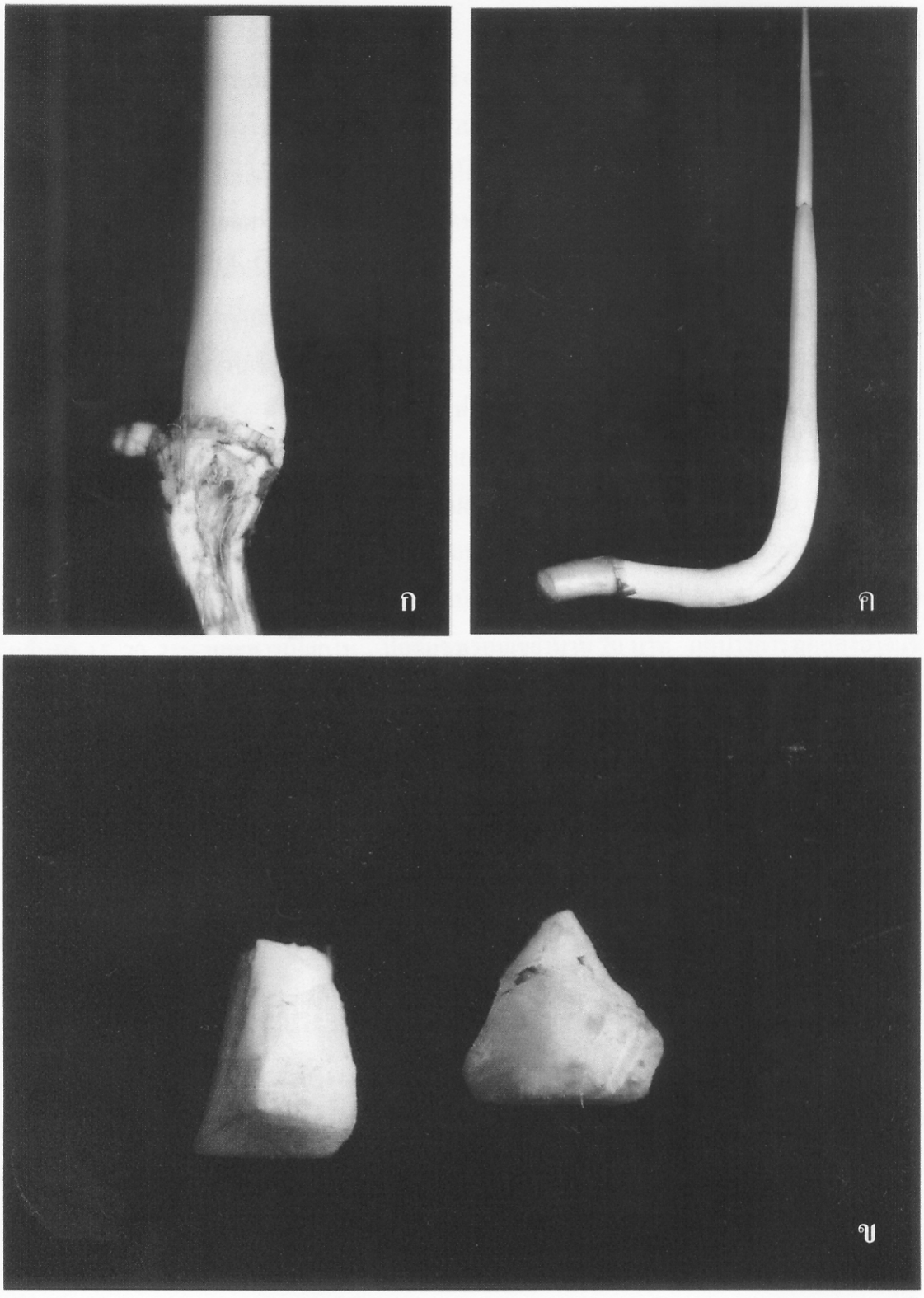
1. การเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้าง

ส่วนใหญ่ใช้พันธุ์ Golden Torch ในการทดลอง ส่วนพันธุ์อื่นๆ นำมาใช้ในบางครั้ง ถ้ามีจำนวนต้นมากพอ โดยเฉพาะพันธุ์ Nickeriensis

1.1 การเตรียมชิ้นส่วนต้นพืช

ขุดเหง้า (rhizome) ที่มีต้นติดมาด้วย ตัดใบและรากทิ้งหมดทิ้ง นำมาล้างทำความสะอาดโดยใช้แปรงขัดเศษดินที่ติดมากับเหง้าออกให้หมด พร้อมทั้งลอกกาบใบด้านนอกออก 2-3 กาบ แล้วตัดเหง้าออกให้เหลือเฉพาะส่วนที่ติดกับยอดยาวประมาณ 10-20 ซม. (ภาพที่ 4 ก) นำส่วนพืชที่เตรียมไว้ไปแช่ในยากันรา (Benlate) ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วผึ่งให้แห้ง (1 คืน) หลังจากนั้นนำมาเตรียมตามวิธีของ Nathan และคณะ (1992) โดยนำชิ้นส่วนพืชมาใส่ถุงพลาสติก รัดปากถุงหลวมๆ แล้วเก็บไว้ในห้องปรับอุณหภูมิ (~25°C) หลังจากนั้นประมาณ 2-3 สัปดาห์จะมีตาข้างเจริญยืดยาวออกมาขนาดประมาณ 0.5 ซม. จึงตัดตานี้มาใช้เป็นชิ้นส่วนพืช (explant) ในการทดลอง (ภาพที่ 4 ข)

ภาพที่ 3 ลักษณะดอกของเฮลิโคเนีย ก. พันธุ์ Golden Torch ข. พันธุ์ Nickeriensis ค. พันธุ์ Rainbow ง. *Heliconia stricta* Huber



ภาพที่ 4 ก. ต้นที่ตัดแต่งแล้วก่อนนำมาใส่ถุงพลาสติค เพื่อให้ตาข้างที่โคนต้นเจริญยืดยาวและตัดมาเพาะเลี้ยง ข. ชิ้นส่วนตาข้างที่ตัดแต่งแล้ว พร้อมจะนำมาเลี้ยงบนอาหาร ค. หน่ออ่อนที่นำมาตัดปลายยอดไปเพาะเลี้ยง

อีกวิธีใช้หน่ออ่อนที่มีกาบใบหุ้มอยู่ (ภาพที่ 4 ค) โดยตัดส่วนเหง้าที่สัมผัสกับดินออกให้หมด ตัดกาบใบให้เหลือประมาณ 6-7 ซม. แล้วนำมาล้างทำความสะอาด พร้อมทั้งลอกกาบใบด้านนอกออก 2-3 กาบ นำไปผึ่งให้แห้ง วันรุ่งขึ้นนำส่วนพืชมาตัดแต่งบางส่วน ลอกกาบใบออกให้เหลือเท่าที่จำเป็น แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นตัดส่วนที่สัมผัสสารฟอกฆ่าเชื้อออก พร้อมทั้งเอากาบใบออกอีก ชิ้นส่วนยอดที่นำมาเลี้ยงจะมีขนาดประมาณ 0.5 ซม.

1.2 การฟอกฆ่าเชื้อ

เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่มีตายอดและตาข้างเป็นส่วนที่อยู่ในดิน ทำให้มีการปนเปื้อนมากโดยเฉพาะเชื้อรา ส่วนเชื้อแบคทีเรียคงจะมีเช่นกัน แต่เนื่องจากเชื้อราเจริญเติบโตเร็วมาก จึงสังเกตไม่เห็นเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องทดลองฟอกฆ่าเชื้อวิธีต่างๆหลายแบบ สรุปได้ดังนี้

ฆ่าเชื้อและกำจัดไข (wax) ออกจากผิวโดยแช่ใน ethyl alcohol 70% ประมาณ 5-10 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำมาแช่ในยากันรา (Benlate มี Benomyl 0.5%) ความเข้มข้น 0.5% ถึง 2.5% และใส่สารเปียกใบ 2-3 หยด พร้อมทั้งเขย่านาน 10-30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วแช่ใน $HgCl_2$ 0.1% นาน 7-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วแช่ใน Clorox (มี NaOCl 5%) เข้มข้น10, 15, 20, 25% และสารเปียกใบ ปกติแช่พร้อมเขย่านาน 20 นาที แต่บางการทดลองอาจแช่นานถึง 25 และ 30 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง แล้วตัดแต่งชิ้นส่วนพืชพร้อมนำไปเลี้ยงขวดละ 1 ยอด

2. การชักนำแคลลัสจากช่อดอก

การทดลองนี้ใช้ *H. stricta* เพราะมีกาบรองดอกขนาดใหญ่และดอกอ่อนมีกาบรองดอกซ้อนเกยทับกันห่อหุ้มส่วนที่อยู่ข้างใน ตัดต้นที่มีช่อดอกโผล่พ้นกาบใบเพียงเล็กน้อย ลอกกาบใบออก นำช่อดอกมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วตัดเป็น 2-3 ส่วน นำไปฟอกฆ่าเชื้อ โดยแช่และเขย่าใน ethyl alcohol 70% นาน 5-10 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วแช่ใน Clorox 25% ผสมสารเปียกใบ เขย่านาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2-3 ครั้ง

ชิ้นส่วนที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นแกนกลาง (rachis) ของช่อดอก โดยตัดส่วนอื่นออกให้เหลือชิ้นส่วนขนาดประมาณ 1 ซม. นำไปเพาะเลี้ยงขวดละ 1 ชิ้น โดยกดให้ชิ้นส่วนจมในอาหารประมาณ 1/3 ของความสูง

3. การเตรียมและส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง

3.1 อาหารชักนำยอด

เตรียมอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลง (ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองดูภาคผนวก) ธาตุเหล็กใช้ FeNaEDTA 40 mg/l ส่วนประกอบอื่นๆ มีดังนี้ Thiamine. HCl 0.5 mg/l, $NaH_2PO_4.2H_2O$ 170 mg/l, myo-inositol 100 mg/l, sucrose 3%, น้ำมะพร้าว 150 ml/l และผงวุ้น 0.7% ปรับ pH 5.7 หรือ 5.8 ก่อนใส่ผงวุ้น หลังจากใส่ผงวุ้นแล้วต้มให้ละลาย

แล้วใส่ในขวดโดยใส่อาหารขวดละประมาณ 15 ml หลังจากนั้นฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 15 lb/inch^2 (121°C) เป็นเวลา 15 นาที

ใน การทดลองชักนำยอดใช้ BA ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ BA 0, 2,4,6,8 และ10 mg/l

3.2 อาหารชักนำแคลลัส

ใช้อาหาร MS สูตรดัดแปลงคล้ายสูตรชักนำยอด โดยใช้ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองเช่นเดียวกัน แล้วใส่สารเสริมดังนี้ thiamine. HCl 0.5 mg/l, nicotinic acid 1.0 mg/l, pyridoxine. HCl 1.0 mg/l, sucrose 3%, casein hydrolysate 1000 mg/l และผงวุ้น 1.0%

สารควบคุมการเติบโตของพืชที่ใช้ชักนำแคลลัสใช้ 2,4 –D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10 และ 20 mg/l