บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้เน้นศึกษาสัณฐานวิทยาของบอนสีที่รวบรวมได้ และศึกษาความสัมพันธ์ในระหว่างสายพันธุ์โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นหลัก การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่บอนสี ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1) การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเฉพาะตำแหน่งของก้านใบเป็นหลัก แบ่งบอนสีที่พบเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีก้านใบค่อนไปบริเวณกลางใบ และกลุ่มที่มีตำแหน่งก้านใบอยู่บริเวณปลายใบ โดยกลุ่มแรกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่มีก้านใบกลมและกลุ่มที่มีก้านใบแบน ขณะที่กลุ่มที่ 2 แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม ตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของใบ ได้แก่ กลุ่มที่มีอัตราส่วนน้อยกว่า 3 เท่า และมากกว่า 3 เท่า การแบ่งในลักษณะดังกล่าวทำให้มีบอนสีกลุ่มย่อยรวม 5 กลุ่ม ได้แก่ 1.กลุ่มใบไทย 2.กลุ่มใบกลม 3.กลุ่มใบกาบ 4.กลุ่มใบไผ่ และ 5.กลุ่มใบยาว
2) ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค AFLP สามารถใช้คู่ไพรเมอร์ M/CAA และ E/AAC ได้ และแม้ว่าจะไม่สามารถจำแนกบอนสีแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้จนสอดคล้องกับการจัดกลุ่มเมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็ตามแต่สามารถจำแนกบอนสีในกลุ่มบอนใบไทยออกจากกันได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้สามารถใช้ความแตกต่างทางพันธุกรรมในลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ copia-like transposon ในการจำแนกพันธุ์บอนสีแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้

อย่างไรก็ดี การตรวจสอบสัณฐานวิทยาจากลำดับดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ M/CAA และ E/AAC และด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการตรวจสอบได้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ทั้งหมดที่ศึกษาได้
3) การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อรองรับการปรับปรุงพันธุ์พบว่าสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อใบอ่อนของบอนสีพันธุ์อิเหนา พัฒนาเป็นแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปเป็นยอดใหม่มากมายได้ไม่จำกัดจำนวนเวลา 2 เดือน
4) สามารถถ่ายยีนไดไฮโดฟลาโวนอล 4-รีดักเทส เข้าสู่บอนสีสายพันธุ์อิเหนา โดยวิธี Agrobacterium mediated transformation ซึ่งตรวจสอบได้จากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินในแคลลัสและสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดได้

สามารถตรวจสอบการปรากฏของชิ้นดีเอ็นเอในจีโนมของบอนสีตัวอย่างได้ด้วยเทคนิค PCR และพบการแสดงออกของยีนในรูป mRNA ได้เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR อย่างไรก็ดี ต้นที่ได้รับยีนยังมีขนาดเล็กอยู่จึงยังไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกทางลักษณะปรากฏได้

จากการทดลองในตอนต้นพบว่า ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกบอนสีส่วนใหญ่ที่อยู่บนใบ ไม่สามารถใช้ในการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจน แม้จะแบ่งกลุ่มได้อย่างหยาบๆ ก็ตาม ที่ผ่านมาทั้งของอุไร (2540) และบุญนาค (2544) ไม่ได้ชี้ชัดและอธิบายถึงเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดแบ่งบอนสีแต่อย่างใด แต่มุ่งอธิบายถึงกลุ่มของบอนสีที่ปรากฏขึ้นในขณะนั้นเป็นการวัดกลุ่มที่แตกต่างกัน โดยใช้ลักษณะของใบเป็นเกณฑ์ในการแบ่งกลุ่ม ในการการศึกษาครั้งนี้ได้จัดรูปแบบบอนสีบนพื้นฐานความสัมพันธ์ตามตำแหน่งของก้านใบ (petiole) ที่เชื่อมติดกับแผ่นใบ (leaf blade) และรูปทรงของก้านใบเป็นหลัก ซึ่งสามารถจัดแบ่งบอนสีออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่มที่มีก้านใบค่อนไปบริเวณกลางใบ และกลุ่มที่มีตำแหน่งก้านใบอยู่บริเวณปลายใบ โดยกลุ่มแรกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่มีก้านใบกลมและกลุ่มที่มีก้านใบแบน ซึ่งแต่ละกลุ่มสามารถแบ่งกลุ่มย่อยต่อได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มใบไทย กลุ่มใบกลม กลุ่มใบกาบ กลุ่มใบไผ่ และกลุ่มใบยาว การแบ่งในลักษณะดังกล่าวช่วยให้เกิดมาตรฐานที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ดีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ในการศึกษาและทำนายความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ได้ ขณะเดียวกันก็ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างที่อาจเกิดจากสภาพแวดล้อมออกจากกันได้ชัดเจนเนื่องจากยังมีข้อมูลอยู่น้อย การวิเคราะห์ทางชีววิทยาโมเลกุลจึงเข้ามามีบทบาท

ที่ผ่านมาแม้ว่า Loh และคณะ (1999) ได้ใช้เทคนิค AFLP ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชในกลุ่ม caladium 4 ชนิด พบว่าสามารถแยก *Caladium humboldii* ออกจาก *Caladium bicolor* ได้ และพบว่า *Caladium bicolor* ใกล้เคียงกับ *Caladium schombegkii* ในกลุ่ม *Caladium bicolor* ด้วยกันพบว่าสามารถแยก *Caladium bicolor* ได้เป็นกลุ่มย่อย 6 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 6 กลุ่มนี้มีรูปทรงใบต่างกันโดยสิ้นเชิง อย่างไรก็ดีไพรเมอร์ที่ Loh และคณะ (1999)ใช้เป็นไพรเมอร์ E/ACG และ M/CAC และ E/ACG และ M/CTA ซึ่งต่างจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้

ความสามารถในการแยกบอนใบไทยออกจากกัน โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M/CAA และ E/AAC ที่เป็นตัวแทนในการทดลองในครั้งนี้ เป็นเพียงข้อสรุปเบื้องต้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้คู่ไพรเมอร์ดังกล่าวตรวจสอบต่อไปยังบอนใบไทยสายพันธุ์อื่นๆ ว่าคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวจะยังคงใช้แยกสายพันธุ์ในกลุ่มบอนใบไทยได้หรือไม่ และยังจำเป็นต้องวิเคราะห์โดยคู่ไพรเมอร์คู่อื่น

ที่อาจให้ผลลัพธ์สอดคล้องกับยีนที่พบได้ อย่างไรก็ดีนอกจากการศึกษาโดยเทคนิค AFLP แล้ว ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ copia-like transposon สามารถใช้เป็นบริเวณอ้างอิงที่แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงในบอนสีแต่ละสายพันธุ์ส่งผลให้ค่า distance มีค่าสูงมาก และค่า distance สูงเกินกว่าจะนำมาใช้ในการจัดบอนสีเป็นกลุ่มได้ อย่างไรก็ดีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ copia-like transposon ครั้งนี้จัดเป็นครั้งแรกที่มีรายงานในบอนสี อย่างไรก็ดีแม้ความแตกต่างจะไม่สามารถใช้ทำนายความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ได้ แต่ความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์อาจเป็นข้อมูลพันธุกรรมที่สามารถใช้พิสูจน์และรับรองสายพันธุ์ได้ ดังนั้นการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวในบอนสีพันธุ์อื่นๆ เพิ่มเติมและเก็บรวบรวมข้อมูลอย่างเป็นระบบจึงมีความสำคัญ

ในการทดลองพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรองรับการถ่ายยีน พบว่าเนื้อเยื่อใบตอบสนองต่ออาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต auxin ทั้งในรูป NAA และ 2,4 D และ cytokinin ในรูป BA ผลการทดลองดังกล่าวมีทั้งที่สอดคล้องและแตกต่างจากที่มีผู้รายงานไว้ Mujib และคณะ (2000) ได้ใช้ส่วนลำต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าชิ้นส่วนลำต้นตอบสนองต่อ 2,4 D หรือ NAA และ BA ที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับต่ำ โดยสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ Zhu Zhi-qing และคณะ ใช้ชิ้นส่วนใบและก้านช่อดอกของบอนสี *Caladium bicolor* เลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 D พบว่าชิ้นส่วนของบอนสีสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้เช่นกัน จากการรายงานที่ผ่านมาแม้ชิ้นส่วนที่นำมาศึกษาจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งมีผลให้เกิดความแตกต่างในระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในเนื้อเยื่อ แต่การใช้ auxin ในรูป NAA และ 2,4 D ในระดับต่ำร่วมกับ BA กับเนื้อเยื่อบอนสีสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

สำหรับการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นยอด พบว่าผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับ Sahavacharin (1982) และ Zhu *et al.* (1992) ที่ใช้ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดในปริมาณมาก โดยในการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณบอนสีอย่างไม่จำกัดภายใน 2 เดือน การเน้นการพัฒนาของเนื้อเยื่อจากส่วนใบให้เจริญเป็นต้น เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบของบอนสีจะให้บอนสีที่ขยายพันธุ์ได้นั้นมีอัตราการกลายพันธุ์น้อยที่สุด (Ahmed และคณะ 2002)

การทดลองการถ่ายยีนในครั้งนี้เลือกวิธี Agrobacterium mediated transformation เนื่องจากมีรายงานการประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน human growth hormone เข้าสู่บอกสีด้วยวิธีเดียวกันในปี 1994 โดย Li และคณะ ซึ่งนับเป็นรายงานชิ้นแรกๆ ต่อมา Li และคณะ (2004) ใช้วิธีเดียวกันถ่ายยีน Lc เข้าสู่บอนสีพันธุ์ Jackie Suthers

การทดลองในครั้งนี้ใช้บอนสีพันธุ์อิเหนา โดยใช้พลาสมิด pDFR 81 ซึ่งมียีนไดไฮโดรฟลาโวนอลรีดักเทส โดยวิธีเดียวกัน สามารถถ่ายยีนเข้าสู่บอนสีได้โดยดูจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และตรวจสอบการแทรกตัวของดีเอ็นเอในจีโนมโดยเทคนิค PCR และการแสดงออกของยีนในรูป mRNA โดยเทคนิค RT-PCR ได้ แม้ Li และคณะ 2004 จะประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสีของบอนสีจากใบสีขาวไปเป็นใบสีแดงป้ายขาว หรือแดงทั้งใบได้ แต่เนื่องจากผลของการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจาก Lc ยีนในข้าวโพดซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกันก็ตาม แต่การถ่ายยีนในการทดลองครั้งนี้ ได้ต้นบอนสีที่ยังมีขนาดเล็กอยู่ จึงยังไม่สามารถประเมินผลผ่านลักษณะที่ปรากฏได้ อย่างไรก็ดี ระบบของยีนที่ใช้มีความแตกต่างกันมาก เนื่องจาก *Dfr* ที่ใช้ในการทดลองได้จากต้น *Gentiana triflora* ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ดังนั้น การตรวจสอบในระยะต่อไปจะมีความสำคัญที่จะพิสูจน์ว่ายีนจากพืชใบเลี้ยงคู่สามารถแสดงออกและทำหน้าที่ในบอนสีซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้หรือไม่