หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการหาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้สามารถผลิตต้นหญ้าหวานได้จำนวนมากในเวลาจำกัด รวมถึงการวิเคราะห์หาปริมาณสตีวีโอไซด์จากพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับพืชในธรรมชาติ

การเพาะเลี้ยงต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การใช้ต้นปลอดเชื้อเป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อหลีกเลี่ยงจากการตกค้างของสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิว ซึ่งอาจจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อหรือมีผลต่อการพัฒนาของพืชในการใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นจากธรรมชาติโดยตรง ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้การเพาะเมล็ด และการเพาะเลี้ยงส่วนกิ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากในการเพาะเมล็ดสามารถทำการฆ่าเชื้อที่ผิวได้ง่าย ส่วนการใช้ส่วนกิ่งจากต้นธรรมชาติเนื่องจากไม่ต้องเสียเวลาในการปลูกต้นใหม่ การเพาะเมล็ดพันธุ์ที่ทำการเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส พบว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีการเก็บรักษาในช่วง 1 ถึง 3 ปีแรกสามารถงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่มีอายุการเก็บรักษาในช่วงปีที่ 4 ไม่สามารถงอกเป็นต้นได้ อาจเนื่องจากเมล็ดจะมีความแข็งแรงสูงคงที่อยู่ชั่วระยะเวลาหนึ่งแล้วค่อย ๆ ลดลงเนื่องจากมีการเสื่อมสภาพของเมล็ด (Harrington, 1972) ในการเพาะเลี้ยงส่วนกิ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อต่ำเพียง 14 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากชิ้นส่วนเริ่มต้นมีขนาดใหญ่เกินไปมีเชื้อจุลินทรีย์ติดอยู่มากทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้ยาก ซึ่ง Murashige (1974) รายงานว่าชิ้นส่วนของพืชที่มีขนาดใหญ่จะทำให้ปลอดเชื้อได้ยากกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก แต่อัตราการอยู่รอดและการเจริญจะสูงกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก

การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชต่อขนาดภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

1. ในการเพาะเลี้ยงต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อในภาชนะเพาะเลี้ยงแบบต่าง ๆ ให้ต้นมีการเจริญเติบโตที่ดีนั้น จะต้องทำการถ่ายขวดเพื่อเปลี่ยนอาหารใหม่ในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้พืชมีการเจริญที่หยุดชะงักหรือหยุดการเจริญเติบโต ที่เกิดจากข้อจำกัดของอาหารและขนาดหรือรูปทรงของภาชนะเพาะเลี้ยง พบว่าภาชนะเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่พืชจะมีระยะเวลาในการเจริญได้นานกว่าในภาชนะขนาดเล็ก ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายขวดจึงยาวนานกว่า พืชที่ทำการถ่ายขวดในระยะเวลาที่กำหนดจะมีการเจริญเติบโตดี

2. ในการผลิตต้นหญ้าหวานเพื่อให้ได้จำนวนมาก หลังจากการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากแล้ว จะนำยอดเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดรากเป็นระยะเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ก่อนย้ายไปยังวัสดุปลูกชนิดอื่น จึงได้ทำการศึกษาหาความหนาแน่นที่เหมาะสม สำหรับการปักยอดเดี่ยวในภาชนะเพาะเลี้ยงแบบต่าง ๆ พบว่ายอดมีการพัฒนาทางความสูงมาก ซึ่งอาจเกิดจากการปลูกพืชชิดกันมาก ทำให้พืชพยายามยืดตัวเข้าหาแสง จึงทำให้ต้นมีความสูงมากกว่าต้นที่ปลูกห่างกัน (Bushman, 1983) และสภาวะที่เหมาะสมในการปักยอดเดี่ยว เพื่อชักนำให้เกิดรากคือ การปักยอดในขวดทรงตรง โดยมีระยะห่างระหว่างยอด 1.5 เซ็นติเมตร

การเพิ่มจำนวนต้นโดยการตัดยอดอย่างต่อเนื่อง

การตัดยอดอย่างต่อเนื่องเป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มจำนวนต้น จากผลของการตัดยอดทั้ง 2 กลุ่ม ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้เป็น 2 เท่าของจำนวนยอดเริ่มต้น ในทุกช่วงเวลา 30 วัน ในระยะแรก แต่การเพิ่มจำนวนต้นมีแนวโน้มลดลงทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งอาจเกิดจากเนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกตัดตายและต้นไม่สมบูรณ์

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง คือการเลือกชนิดของเนื้อเยื่อพืช (Murashige, 1974) จากผลของการเพาะเลี้ยงส่วนยอด ใบ ลำต้น และราก พบว่าส่วนใบและยอดมีการชักนำการสร้างแคลลัสสูง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงได้เลือกใช้ส่วนใบและยอดเป็นแม่แบบในการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากเนื้อเยื่อส่วนใบ

จากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสม ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ชนิดและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดของสารอาหาร รวมทั้งสภาวะการเพาะเลี้ยงในที่มีแสงและที่มืด โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนคู่ที่ 1 และ 2 การเลือกเนื้อเยื่อใบที่ยังอ่อนมาเพาะเลี้ยงเนื่องจาก เนื้อเยื่อพืชที่ยังอยู่ในระยะการเจริญจะมีโอกาสประสบความสำเร็จในการหวนกลับเป็นต้นสูง (Murashige, 1974)

1. การหาชนิดและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีความจำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะการพัฒนาของเซลล์เพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสม (Devlin และ Witham, 1980) เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ NAA ใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA และ Kinetin ในระดับ 0, 0.02, 0.2, 2.0, 4.0 มก./ล. และแปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 2, 4-D ใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA และ Kinetin ในระดับ 0, 0.1, 0.5, 1.0 มก./ล.

พบว่าการชักนำการสร้างแคลลัสจะเกิดขึ้นได้ดี จำเป็นต้องอาศัยการทำงานเสริมกันของทั้งออกซิน (NAA, 2, 4-D) และไซโตไคนิน (BA, Kinetin) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และคะแนนการเกิดแคลลัสให้ผลสอดคล้องกันว่าเนื้อเยื่อใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสดีที่สุดคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปลี่ยนไปใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินเป็น Kinetin พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดต่ำกว่าเมื่อใช้ BA เล็กน้อยคิดเป็น 85 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อใช้ 2, 4-D ปริมาณ 0.5 มก./ล. ร่วมกับไซโตไคนิน (BA, Kinetin) 0.5 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงคิดเป็น 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงใช้สูตร MS ที่เสริมด้วย NAA ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. เป็นสูตรมาตรฐานเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป

2. ชนิดของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบในอาหาร 3 สูตรคือ อาหารสูตร MS, B5 และ N6 ที่เสริมด้วย NAA ปริมาณ 2 มก./ล. และ BA ปริมาณ 2 มก./ล. พบว่าเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS จะชักนำการสร้างแคลลัสดีที่สุด เนื่องจากอาหารสูตร MS มีสารอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ มีสารจำพวก microelements ที่จำเป็นต่อพืชในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น ๆ

3. การศึกษารูปแบบการเจริญของแคลลัส

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA (2 มก./ล.) ร่วมกับ BA หรือ Kinetin (2 มก./ล.) พบว่าจะใช้เวลาในการปรับตัวโดยมีการเจริญช้าเป็นช่วงระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะเพิ่มอัตราการเจริญเร็วขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 2 แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 6 อาหารและสารควบคุมการเจริญเริ่มหมด แคลลัสจะมีอัตราการเจริญช้าลง และเกือบคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 เป็นต้นไป

4. การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของแคลลัส

จากการศึกษาพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดมีการเจริญสูงกว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง โดยทั่วไปแสงไม่จำเป็นต่อการเจริญของแคลลัส เพราะแคลลัสจะได้รับพลังงานจากน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามแสงก็มีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ทำให้เซลล์พืชเจริญแตกต่างกับในที่ไม่มีแสง (Mantell และ Smith, 1983) มีผู้รายงานถึงอิทธิพลของแสงต่อการเจริญว่า แสงสีขาวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้ เนื่องจากแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 450 นาโนเมตร จะมีผลกระทบต่อปฏิกิริยาของระบบตอบสนองต่อแสงของเนื้อเยื่อพืช (Seibert และคณะ, 1975)

5. การชักนำให้เกิดการหวนกลับเป็นต้น

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ในสภาวะที่มีแสง จะมีการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นได้ การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในอัตราส่วนที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยงมีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาเป็นต้นพืช โดยแสงมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดต้น (Pareddy, 1985) และการพัฒนาของใบและยอดต้องได้รับการกระตุ้นจากแสงที่มีความเข้มเพียงพอ (Dixon, 1987) นอกจากนี้ยังเกิดการพัฒนาไปเป็นรากในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เสริมด้วยออกซิน (NAA, 2, 4-D) ร่วมกับ Kinetin ซึ่ง Kinetin เป็นไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป ทำหน้าที่ให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวและเสริมการสร้างยอดให้แก่แคลลัส (Murashige, 1984)แต่จากผลการศึกษากลับพบว่าเมื่อมี Kietine ในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากเท่านั้น ไม่มีการพัฒนาเป็นยอด

6. การศึกษาชนิดของวิตามินที่เหมาะสมต่อการหวนกลับเป็นต้น

จากการศึกษาเปรียบเทียบการพัฒนาไปเป็นยอดและรากจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่ใส่วิตามินตามสูตร MS และสูตร Nitsch พบว่าอาหารที่ใส่วิตามินตามสูตร Nitsch สามารถชักนำให้เกิดการ

หวนกลับเป็นต้นได้สูงกว่าที่ใส่วิตามินตามสูตร MS ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ferreira และ Handro (1987) ซึ่งรายงานว่าการใช้วิตามินตามสูตร Nitsch สามารถชักนำให้แคลลัสของหญ้าหวานสามารถหวนกลับเป็นต้นได้

7. การชักนำให้เกิดราก

จากการย้ายแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นยอดแล้วมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 0.1 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ เนื่องจากคุณสมบัติของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินมีผลต่อการชักนำให้เกิดราก ถ้าระดับของออกซินภายในต้นพืชต่ำ ก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อชักนำให้เกิดราก (Fonnesbench, 1980) Freytag และคณะ (1989) สามารถชักนำให้ถั่วเหลืองเกิดการสร้างรากที่สมบูรณ์ได้โดยใช้ IBA ในอาหารเพาะเลี้ยง

<u>การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด</u>

ในการผลิตต้นหญ้าหวานให้ได้จำนวนมากด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพดีเสียก่อนในการทดลองนี้เลือกใช้ส่วนยอดอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นเนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและมีรายงานความสำเร็จมาบ้าง (Tamura และคณะ, 1984)

1. อิทธิพลของสูตรอาหารต่อการชักนำการสร้างแคลลัสและยอดจำนวนมาก

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อนในอาหาร 6 สูตร พบว่าอาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงได้สำเร็จคืออาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย kinetin 8 มก./ล. ซึ่งการเกิดยอดจำนวนมากเป็นผลจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ที่กระตุ้นให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการเกิดยอดจำนวนมาก (Bhojwani และ Razdan, 1983) Chevreau และคณะ (1989) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของ

Pyrus sp.โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน(thidiazuron) ร่วมกับ NAA ในอัตราส่วนที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้

2. การศึกษาความเข้มข้นของไคนีตินที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจำนวนมาก

จากการที่อาหารสูตร MS เสริมด้วย Kinetin 8 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ จึงได้ศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของ Kinetin ต่อการชักนำการสร้างยอดจำนวนมาก พบว่าส่วนยอดที่เจริญในอาหารที่เสริมด้วย Kinetin ในระดับ 4 มก./ล. มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้โดยมีอิทธิพลสูงในระดับตั้งแต่ 6 มก./ล. ขึ้นไป โดยปริมาณ Kinetin ที่เหมาะสมต่อการชักนำการสร้างยอดจำนวนมากได้ดีที่สุด คือในระดับ 12 มก./ล. ซึ่งในสภาวะเช่นนี้แคลลัส 1 ชิ้น สามารถชักนำให้เกิดยอดโดยเฉลี่ยจำนวน 60 ยอด ภายในระยะเวลาประมาณ 12 สัปดาห์ ซึ่งยอดจำนวนมากที่เกิดขึ้นเมื่อทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม สามารถเกิดยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง ในเวลา 1 ปีจะได้ต้นจำนวนประมาณ 12,960,000 ต้นจากยอดเริ่มต้น 1 ยอด

การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การย้ายแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากแล้ว มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่แปรผันปริมาณ NAA ในระดับ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดในอาหารที่เสริมด้วย NAA ในปริมาณ 0.01 มก./ล. การเกิดรากลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ NAA เป็นปริมาณ 0.5 และ 1.0 มก./ล. โดย NAA ในปริมาณสูงจะชักนำให้เกิดรากลักษณะสั้นและหนา ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ferreira และ Handro (1987) ซึ่งรายงานว่าออกซิน (IBA) ในปริมาณ 1.0 มก./ล. มีผลยับยั้งการเกิดรากและการย้ายแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นยอดแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Dixon (1987) รายงานว่า แคลลัสที่มีการพัฒนาหวนกลับเป็นต้น โดยวิธีการแบบ somatic

embryogenesis เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน และให้แสงพอเหมาะ somatic embryo จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชโดยมียอดกับรากเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ได้

การวิเคราะห์ปริมาณสตีวีโอไซด์

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสตีวีโอไซด์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นและมีความแม่นยำสูง สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสตีวีโอไซด์ของสารสกัดจากตัวอย่างใบ ลำต้น ราก ของพืชได้ จากการศึกษาปริมาณสตีวีโอไซด์จากใบของพืชในธรรมชาติ พบว่าใบอ่อน 5 คู่แรกมีปริมาณสตรีโอไซด์สูงกว่าใบคู่ที่เหลือจากกิ่งเดียวกัน โดยต้นหญ้าหวานอายุ 2 ปี มีปริมาณสตีวีโอไซด์สูงกว่ากลุ่มอายุอื่น และต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาณสตีวีโอไซด์ต่ำกว่าต้นในธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Tamura และคณะ (1984) แต่สำหรับในแคลลัสซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของเซลล์แตกต่างออกไป จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์เพื่อแยกพีคของสตีวีโอไซด์ออกจากองค์ประกอบอื่น

การย้ายต้นลงปลูกในดิน

สามารถใช้ดินเป็นเครื่องปลูกได้ โดยไม่ต้องย้ายไปปลูกในเครื่องปลูกอื่นต่อไป โดยได้ต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย