บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การเจริญในภาวะแวดล้อมธรรมชาติ

จากการศึกษาเปรียบเทียบ แหล่งที่อยู่ของกวาวเครือขาว ในสภาพธรรมชาติที่พบตามป่าผลัดใบ ในภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ บริเวณดอยเต่า และสบก๋าย จังหวัดเชียงใหม่ ในแต่ละบริเวณสภาพป่าจะให้ต้นที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป โดยบริเวณดอยเต่าซึ่งมีลักษณะเป็นพื้นที่ลาดชัน มีดินหินและกรวดปน สภาพพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้ง มีความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิกลางคืนกับกลางวันค่อนข้างสูง ต้นกวาวที่พบมักเกาะกับต้นไม้ใหญ่เช่น ต้นสัก และออกดอกติดฝักที่บริเวณปลายยอดของต้นไม้นั้น ลำต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง กวาวเครือขาวที่พบบริเวณนี้ให้ลำต้นค่อนข้างอวบสมบูรณ์ ช่วงข้อค่อนข้างห่าง ลำต้นเกิดจากหัวกวาวบริเวณใต้ดิน การเจริญเติบโตช่วงแรกเป็นการเจริญเพื่อสร้างลำต้น หลังจากนั้นในบริเวณแต่ละข้อจะเริ่มเจริญ และอาจแตกกิ่งแขนงบ้างแต่ไม่มากนัก กวาวเครือขาวบริเวณนี้ให้ฝักแก่ช่วงประมาณกลางเดือนเมษายน ส่วนกวาวบริเวณสบก๋าย สภาพดินจะมีลักษณะร่วนซุย มีความอุดมสมบูรณ์สูง กวาวมีลำต้นขนาดเล็กและช่วงข้อถี่ กว่าการเจริญเติบโตของลำต้นและใบเกิดขึ้นพร้อมกัน ลักษณะต้นที่ได้คล้ายกับต้นที่ปลูกในเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ยุทธนา (unpublish data) พบว่าหัวกวาวเครือขาวจากบริเวณดอยเต่า ซึ่งมีสภาพค่อนข้างแห้งแล้ง ให้สารฤทธิ์เอสโตรเจนต่อน้ำหนักหัวกวาวที่เท่ากันสูงกว่าบริเวณอื่น

ชิ้นส่วนพืชทดลอง

จากการทดลองนำชิ้นส่วนพืชจากต้นในเรือนเพาะชำ และต้นเพาะจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น พบว่าแคลลัสจากต้นในเรือนเพาะชำมีปัญหา

ในการทำให้ท่อนพันธุ์ปราศจากเชื้อได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียบริเวณท่อลำเลียงของพืชและในช่วงฤดูที่เกิดการพักตัวของพืช (ช่วงธันวาคมถึงกุมภาพันธ์) พืชจะมีอัตราการเจริญต่ำกว่าปกติ ทำให้ตอบสนองต่ออาหารชักนำการเจริญเติบโตได้น้อย ในพืช Euomymus europacus พบว่าเนื้อเยื่อพืชจากฤดูกาลที่แตกต่างจะมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อนจะเป็นช่วงที่เหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากธรรมชาติ (Bonneau et al.,1994) นอกจากนี้ไม้เนื้อแข็งจะตอบสนองต่ออาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตต่ำกว่าพืชอวบน้ำใบเลี้ยงคู่ (Rao and Lee,1986) การเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชทดลองจากต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ จึงช่วยลดปัญหาในการปนเปื้อนของเชื้อโรค ชิ้นส่วนพืชมีความสม่ำเสมอต่อการทดลองมากกว่า ไม่มีปัญหาในเรื่องการพักตัวของพืช เนื่องจากฤดูกาลที่แตกต่าง และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากต้นอ่อนนี้ตอบสนองต่ออาหารและสารเร่งการเจริญได้ดีกว่าเนื้อเยื่อจากสภาพแวดล้อมภายนอก เนื่องจากเนื้อเยื่อมีลักษณะพร้อมที่จะเจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ได้ Ammirato (1983) พบว่าชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการทดลองมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้น (somatic embryogenesis)ในพืชแต่ละชนิด และมักนำเนื้อเยื่ออ่อนมาใช้ทำการทดลอง ลักษณะทางสรีระวิทยามีผลต่อการเกิดฟีโนลิก Aitken-Christie และ Connett (1992) พบว่าเนื้อเยื่อจากต้นอ่อนขยายพันธุ์ง่าย และเนื้อเยื่อมีลักษณะที่สามารถพัฒนาได้ง่ายในอาหารและวิธีการที่เหมาะสม นอกจากนี้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากต้นอ่อนจะเกิดสารประกอบฟีโนลิก น้อยกว่าจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากต้นในเรือนเพาะชำ ซึ่งแก่กว่า เนื้อเยื่อกวาวเครือขาวจะเกิดสารประกอบฟีโนลิกได้ง่าย ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากเนื้อเยื่อพืชสร้างสารต่อต้านโมเลกุลสิ่งแปลกปลอม ที่ไม่สามารถสลายได้ สารประกอบนี้เมื่อถูกออกซิไดซ์จะเกิดเป็นสารประกอบควิโนนิก (quinonic) ซึ่งมีสีน้ำตาล และแพร่กระจายเข้าไปในอาหาร ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และทำลายชิ้นเนื้อเยื่อ ในกวาวเครือขาวพบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการเกิดสารประกอบฟีโนลิก คือลักษณะทางพันธุกรรมของพืชเอง ส่วนประกอบอาหารเพิ่มเติมบางอย่าง สารเร่งการเจริญเติบโตที่สูงเกินความต้องการของพืช และช่วงระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารที่นานเกินไป ล้วนมีผลต่อการเกิดสารประกอบฟีโนลิกทั้งสิ้น ดังนั้นการเลือกชิ้นเนื้อเยื่อจากต้นอ่อนเหมาะสมจะช่วยประหยัดเวลาชิ้นส่วนพืชและแรงงาน (Bonga,1981) ส่วนสภาพแสงในที่มืด

ไม่ให้ผลในการลดสารประกอบฟีโนลิกเหมือนในพืชชนิดอื่น (Hu and Wang 1983) การเติมผงถ่านลงในอาหารมีรายงานว่า ช่วยดูดสารประกอบฟีโนลิกในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยืนต้นเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน (Han and Liu 1990) แต่กลับมีผลทำให้ทั้งแคลลัสและชิ้นส่วนพืชของกวาวเครือขาว ตายภายใน 2-3 สัปดาห์ คาดว่าผงถ่านอาจจะดูดสารอาหารในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ไม่เพียงพอต่อการเลี้ยงเนื่อเยื่อ

สารเร่งการเจริญเติบโตต่อทิศทางการชักนำให้เกิดแคลลัสและเอมบริโอเจนีซีส

สารเร่งการเจริญกลุ่มออกซินที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในกวาวเครือขาว พบว่า NAA ให้แคลลัสลักษณะดี ในปริมาณมากกว่า 2,4-D และ IAA ให้ผลคล้ายกับ Lonicera japonica ซึ่งเป็นพืชไม้เนื้อแข็งตระกูลถั่ว (Georges et al.,1993) เช่นเดียวกับกวาวเครือขาว ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งชนิดอื่นมักจะใช้ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (Ammirato,1983) จากการทดลองพบว่า 2,4-D ในความเข้มข้นต่ำ 1-2 มก.ต่อลิตร (4.5-9 ไมโครโมล) มีผลต่อการเกิดสารประกอบฟีโนลิกของชิ้นเนื้อเยื่อในขณะที่ชิ้นส่วนพืช Eucalyptus grandis ใช้ได้สูงถึง 6 มก.ต่อลิตร (27.1ไมโครโมล) ส่วน IAA เป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นออกซินที่ได้จากธรรมชาติ ให้ฤทธิ์ออกซินน้อยที่สุดและสลายได้ง่าย จึงให้ผลต่อเนื้อเยื่อน้อยมากหรือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเลย

2,4-D เป็นออกซินที่มักใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อเอมบริโอ และชักนำให้เกิดรากในแคลลัส แต่ไม่พบการใช้ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดเอมบริโอ ออกซินมีผลต่อทิศทางการเกิด โซมาติก เอมบริโอเจเนซิส โดยจะพบการเกิดโซมาติก เอมบริโอ ในอาหารชักนำที่มี IAA หรือ NAA มักไม่พบใน IBA หรือ 2,4-D อาจเป็นผลมาจากการยับยั้งของสารประกอบ ในการพัฒนาของเอมบริโอ ในระยะตั้งแต่ โกลบิวล่า โปรเอมบริโอ NAA ให้เอมบริโอของถั่วเหลือง ที่มีรูปร่างลักษณะปกติมากกว่า 2,4-D (Bonneau,1994)

เมื่อนำวิธีการทดลองที่ใช้ NAA มาศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำงานร่วมกับ BAP พบว่าให้แคลลัสปริมาณและคุณภาพดีกว่าการใช้ NAA เพียงอย่างเดียว เนื่องจากการทำงานร่วมกันของ NAA และ BAP จะมีผลชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัสดียิ่งขึ้น

สารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน จำเป็นสำหรับการเกิดเป็นต้นอ่อนในระยะแรก แต่ไม่จำเป็นสำหรับการพัฒนาและการงอกของต้นอ่อน (Bonneau,1994)

เนื้อเยื่อส่วนยอด ข้อและเมล็ด จะตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสค่อนข้างดี ให้แคลลัสสีเขียวปนเหลืองในช่วงของสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสม (NAA:BAP, 1.0-0.5 มก.ต่อลิตร) ส่วนใบให้แคลลัสลักษณะไม่สม่ำเสมอ มักจะให้แคลลัสเนื้อแข็งและเกิดสารประกอบฟีโนลิกสูง และแตกต่างกับพืชไม้ประดับเนื้อแข็ง Lonicera japonica cv."Hall's Prolific" ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบได้ดี และสามารถชักนำให้เกิดการงอกใหม่ได้ (Georges et al.,1993)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอด ในการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงและชักนำให้เกิดการงอกใหม่ เนื่องจากแคลลัสมีความสม่ำเสมอและให้แคลลัสลักษณะยุ่ยมากกว่าส่วนข้อ ซึ่งมีอัตราการเกิดแคลลัสแบบแข็งมากกว่า ส่วนแคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดงอกใหม่จะค่อนข้างมีปัญหา ในเรื่องการชักนำให้เกิดการงอกทำได้ไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากโครงสร้างเปลือกของเมล็ดแข็งและเมล็ดพันธุ์มีจำกัด

พืชตระกูลถั่วในเขตร้อนกึ่งแห้งแล้ง เช่นเดียวกับกวาวเครือขาวคือ (Cajanus cajan L.) จะชักนำแคลลัสจากส่วนยอดได้ดี ให้แคลลัสสีเขียวปนเหลือง ลักษณะกลม สามารถพัฒนาเป็นโกลบิวลาร์ เอมบริโอ และชักนำให้เกิดการงอกใหม่ได้ (George and Eapen,1994)

ภาวะมีแสงและไม่มีแสงให้ปริมาณแคลลัสในการชักนำไม่ต่างกันมากนัก แต่มีผลต่อคุณภาพแคลลัสโดยในภาวะมีแสงให้แคลลัสคุณภาพดี คือมีสีเขียวปนเหลืองทั้งสองภาวะ มีผลต่อการเกิดสารประกอบฟีโนลิกไม่แตกต่างกัน โดยการเกิดฟีโนลิกจะขึ้นกับเนื้อเยื่อพืช ที่ทำการทดลองมากกว่า การเลี้ยงแคลลัสในภาวะมีแสงจะให้แคลลัสที่เจริญเติบโตเร็วกว่าในภาวะไม่มีแสง ซึ่งเหมือนกับ Lonicera japonica (George et al.,1993) ซึ่งเป็นพืชไม้เนื้อแข็งเหมือนกัน ในขณะที่แคลลัสส่วนใหญ่การชักนำและเลี้ยงแคลลัสในภาวะไม่มีแสงจะให้การเจริญที่ดีกว่า

อาหารสูตร MS ให้แคลลัสสีเขียวปนเหลืองลักษณะยุ่ย (compack callus และ friable callus) มากที่สุด เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของอาหารสูตร MS พบว่าที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าสูตรอาหารปกติ 1.25 และ 1.5 เท่า ให้

แคลลัสลักษณะดี สีค่อนข้างเขียว ในปริมาณมาก พบแคลลัสลักษณะยาวกว่าในช่วงแรกของการชักนำและเซลล์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นลักษณะของระยะเริ่มแรกของต้นอ่อน (proembryoids)

ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ทำงานร่วมกับ NAA 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร ไม่ให้ผลในการชักนำให้เกิดการงอกใหม่จากแคลลัส (Kinetin ในช่วง 0-8 มก.ต่อลิตร TDZ ในช่วง 0-8 มก.ต่อลิตร) ส่วน BAP ในช่วง1-2 มก.ต่อลิตร พบการเกิดออร์แกโนเจเนซิส จากการเลี้ยงแคลลัสในช่วงการเปลี่ยนอาหารครั้งที่ 2 ถึง 5 บ้างแต่เกิดน้อยมาก ไม่สามารถบันทึกผลการทดลองได้และแคลลัสลักษณะค่อนข้างผิดปกติ เมื่อนำไปชักนำให้เกิดรากด้วย NAA 1 มก.ต่อลิตร พบว่าในกรณีที่เกิดรากได้จะได้ต้นที่ลักษณะบิดเบี้ยวผิดปรกติ แต่โอกาสเกิดรากได้ค่อนข้างต่ำ

การเพิ่มการพัฒนาของโปรเอมบริโอ ด้วยการปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมในพืชแต่ละชนิดต้องการสูตรอาหาร ระดับความเข้มข้นและการทำงานร่วมกันของสารเร่งการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (Aitken-Christie and Connett 1992)แต่ในกวาวเครือขาวยังไม่สามารถหาภาวะที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรเอมบริโอ โดยแม้ว่าจะได้ศึกษาถึงการทำงานของสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีผลโดยตรงได้แก่ ออกซิน ไซโตไคนิน และที่มีผลทางอ้อมได้แก่ ABA GA_3 นอกจากนี้ยังได้เพิ่มเติมและเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของสารอาหารหลายชนิดได้แก่ น้ำตาล กลีเซอรอล ไมโอ-อิโนซิทอล เคซีน-ไฮโดรไลเซต ผงถ่าน ซิลเวอร์ไนเตรท เมส(MES) กรดอะมิโนและการปรับภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่น การปรับสภาพความเข้มแสง จากการศึกษารายงานการทดลองพบว่าสิ่งเหล่านี้สามารถช่วยให้เกิดการพัฒนาของโปรเอมบริโอได้ ในพืชไม้เนื้อแข็งทั่วไปหลายชนิด (Chen and Evans,1990;Aitken-Christe and Connett,1992)

จากการศึกษาลักษณะแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะเซลล์ที่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น นิวเคลียสขนาดใหญ่ ผนังเซลล์หนาขึ้นและเซลล์กลมที่มีการแบ่งตัว ดังที่ Thorpe (1982) กล่าวว่าในพืชที่มีการเกิดออร์แกโนเจเนซิสจากเซลล์เดี่ยวในกลุ่มแคลลัส พื้นฐานการเกิดเนื้อเยื่อเจริญจะเกิดจากเซลล์กลมขนาดเล็ก ซึ่งมีไซโตพลาสเข้มข้น นิวเคลียสขนาดใหญ่และอัตราส่วนของไซโทพลาสซึมต่อแวคคิวโอสูง ในระหว่างที่เลี้ยงแคลลัสกวาวเครือขาวยังพบการเกิดออร์แกโนเจเนซิสบ้างแต่ในปริมาณน้อยมาก แสดงว่าแคลลัสกวาว

เครือขาว อาจจะสามารถชักนำให้เกิดการงอกใหม่ได้ในปริมาณสูงกว่านี้ ถ้าอยู่ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ซึ่งจะต้องศึกษาอีกต่อไป โดยทั่วไปพืชไม้เนื้อแข็งจะชักนำให้เกิดโซมาติก เอมบริโอเจนีซิสได้ยาก เนื่องจากมีช่วงระยะเวลาหรือฤดูกาลจำกัดที่เนื้อเยื่อจะสามารถพัฒนาได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้เวลานานในการเกิดการงอกใหม่(regeneration) มักจะเกิดสารประกอบฟีโนลิก ยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อและต้องการวิจัยในระยะเวลานาน (Thrope,1986) นอกจากนี้การนำกวาวเครือขาวที่มีแหล่งกำเนิดมาจากป่าโดยตรง ไม่ได้ผ่านการคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์มาใช้ในการทดลอง พบว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ในพืชไม้เนื้อแข็ง Hevea brasiliensis พบว่าสายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะมีผลกระทบต่อการสะสมและย่อยสลายฮอร์โมนได้แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลถึงประสิทธิภาพในการเกิดเอมบริโอเจนีซีส (Cazaux and Auzac,1994) ยอดกวาวเครือขาวที่เกิดจากระบบออร์แกโนเจนีซิสที่ได้ บางยอดมีลักษณะผิดปกติและไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ หรือสามารถเกิดรากได้แต่ได้ต้นลักษณะบิดเบี้ยวผิดปกติ การชักนำยอดจากแคลลัสของไม้เนื้อแข็ง แต่มีรายงานการทดลองใน Pinus eldarica และ Engelmann spruce (Picea engelmannii Parry) (Phillips and Gladfelter,1991;Harry and Thorpe,1991) และในไม้เนื้อแข็งจำนวนมากใน peanut (Arachis Hypogaea L.) พบว่าโซมาติก เอมบริโอซึ่งพัฒนาจากใบอ่อนไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน (plantlets) ในอาหารที่ชักนำให้เกิดการงอกใหม่ แม้จะทำการชักนำต้นอ่อนให้เกิดรากโดยเกิดเพียงร้อยละ 0.59 (Chenglrayan et al., 1994) นอกจากนี้ยังมีหลายการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าเอมบริโอ ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ ซึ่งเกิดจากการพัฒนาของยอดแบบผิดปกติ เมล็ดเทียมของไม้เนื้อแข็งจะเกิดการงอกของโซมาติกเอมบริโอได้ต่ำร้อยละ 1-2 (Gupta et al.,1991) และยังเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่าย (Georges et al,1993)

การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนพืชทดลองโดยตรง (Shoot multiplication)

การชักนำให้เกิดยอด จากชิ้นส่วนพืชทดลองโดยตรง ถึงแม้ว่าจะต้องใช้วิธีการหลายขั้นตอนในการชักนำให้เกิดต้นอ่อน แต่ต้นอ่อนที่ได้มีความสม่ำเสมอทั้งปริมาณและ

คุณภาพมากกว่า จึงได้ทำการขยายพันธุ์โดยวิธีการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนพืชทดลองโดยตรง

BAP เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิส ในพืชตระกูลถั่ว การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินในพืชตระกูลถั่วเขตร้อน Cajanus cajen พบว่า BAP ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดรองลงมาได้แก่ ไคเนติน (Kinetin) ซีเอติน (Zeatin) และอดีนีน (adenin) ตามลำดับ (Shiva et al.,1994) นอกจากนี้มีรายงานว่า BAP มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อส่วนยอด และส่วนข้างในไม้เนื้อแข็งหลายชนิด รวมทั้งในพืช Madhuca longifolia (Koening) MacBrid var.lotifolia Roxb (Rout and Das,1993) จึงใช้สารนี้เร่งการเจริญ ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดในกวาวเครือขาวและพบว่า BAP ให้ผลชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ 0.25 มก.ต่อลิตร ในขณะที่พืชไม้เนื้อแข็งชนิดอื่นให้ผลชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดที่ BAP ประมาณ 1 มก.ต่อลิตร เช่น Prunus serotina (Tricoli et al., 1985) Syzygium cuminii และ Madhaca longifolia (Koening) MacBride Var. lotifolia Roxb (Rout and Das,1993)

BAP ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 มก.ต่อลิตรขึ้นไป ให้ยอดลักษณะผิดปกติและเป็นมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ BAP Harry และคณะ (1987) พบว่าการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนพืชต้นอ่อน (juvenile tree)ใช้ BAP ความเข้มข้นประมาณ 0.5-5.0 มก.ต่อลิตร ที่ความเข้มข้นสูงทำให้อัตราการเจริญเติบโตและเกิดตายอดลดลงและต้องใช้เวลาในการยืดตัวของตายอดนาน

สารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มอื่นไม่มีความจำเป็นต่อการชักนำให้เกิดยอดมากนัก แต่บางครั้งพบว่าออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่ำจะมีผลช่วยชักนำการเกิดยอดเพิ่มขึ้น และจะให้ผลดีในออกซินชนิด NAA (0.1 มก.ต่อลิตร) มากกว่า IAA และ IBA ในพืชไม้เนื้อแข็ง เช่น Madhuca longifolia (Koening) MacBride var latifolia Roxb Eucalyptus species และ Dalbergia latifolia (Rout and Das,1993) จากการทดลองใช้ NAA และ 0.1 และ 0.2 มก.ต่อลิตร ในพืชทดลอง พบว่า ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือ NAA ช่วยเพิ่มการชักนำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้น กว่าวิธีการที่ไม่ใช้ NAA

เล็กน้อย

NAA ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญของยอด และทำให้อัตราการยืดตัวของยอดต่ำ นอกจากนี้ยังชักนำให้เกิดแคลลัสที่ฐานของชิ้นส่วนพืชใน Eucalyptus และ Pterocapus santalinus (Sita,1981)

การทดลองที่ใช้ TDZ (Thidiazuron) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ไซโตไคนินต่อแคลลัส ในช่วงระดับความเข้มข้น 0-16 มก.ต่อลิตร รวมกับ NAA 0.5 มก.ต่อลิตร และ NAA:BAP เท่ากับ 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจนีซิส ส่วนการทดลองที่ใช้ TDZ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็ง พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า BAP โดยใช้ TDZ ในช่วง 0.5-10 ไมโครโมล กระตุ้นโซมาติกเอมบริโอเจนีซิส จากใบเลี้ยงของ White ash (Preece & Bates,1990;Bates et al.,1992),eastern blac walnut Rubus Grape โดยพืชเหล่านี้จะให้ทั้งโซมาติก เอมบริโอและชักนำให้เกิดยอด (Fiola et al.,1990;Bates et al.,1992) แต่ TDZ ให้ผลในการชักนำให้เกิดยอดมากกว่าโซมาติกเอมบริโอ (Huetteman and Preece,1993)

เนื้อเยื่อส่วนข้อของกวาวเครือขาวจะตอบสนองต่อ BAP ในการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าเนื้อเยื่อส่วนยอดโดยจะให้จำนวนยอดมากกว่าและลักษณะยอดปกติดีกว่า ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันในพืชไม้เนื้อแข็ง Syzygium cuminii และ Madhuca longifolia (Koening) MacBride Var.latifolia Roxb (Rout and Das, 1993) เนื้อส่วนข้อมีตาข้างที่มีลักษณะโครงสร้างของชิ้นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์กว่า ทำให้มีความพร้อมในการตอบสนองต่อ BAP และชักนำให้เกิดยอดจากส่วนตายอด การเลือกเนื้อเยื่อพืชที่มีสรีรวิทยาและระยะในการพัฒนาที่เหมาะสมจะเป็นสิ่งกำหนดความสำเร็จของการชักนำให้เกิดยอด (Hutchison,1981) การเกิดยอดมักจะเกิดจากชิ้นส่วนพืชที่มีเนื้อเยื่อเจริญของตาอยู่แล้ว (Aitken-Christic and Connett,1992)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกอาหารสูตร WPM เป็นสูตรอาหารเพื่อทำการทดลองชักนำให้เกิดยอดต่อไป แม้ว่าอาหารสูตรนี้จะให้ปริมาณยอดค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS และ SH แต่อาหารสูตร WPM จะให้ยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด เนื่องจากยอดที่สมบูรณ์ให้ผลต่อการชักนำให้เกิดรากและเกิดต้นอ่อนที่สมบูรณ์กว่า (Goldfarb et al., 1991)

การเลือกชิ้นส่วนพืช ชนิด และระดับความเข้มข้นของไซโตไคนินจะมีความสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดมากกว่าองค์ประกอบของธาตุอาหาร แต่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการยืดตัวของตายอด การเพิ่มจำนวนยอด และการชักนำให้เกิดรากพบว่าธาตุอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและคุณภาพของยอด (Aitken-Christie and Connett, 1992)

ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) เพิ่มขึ้น (200 มิลลิโมลต่อลิตร) จากอาหารสูตร WPM ปกติมีผลช่วยในการชักนำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้นเนื่องจากอาหารสูตรที่มีระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุต่ำ อาจจะไม่เพียงพอสำหรับช่วยการชักนำให้เกิดยอดทำให้การเจริญลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่มีระดับความเข้มข้นที่มีแร่ธาตุสูง ในต้น Poplar และ Walnut พบว่าอาหารสูตร WPM ที่เพิ่มแอมโมเนียมไนเตรทจะช่วยเพิ่มการเจริญของยอด (Mccown and Sellmer,1987) ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) ต่ำในระยะที่เซลล์มีการเจริญต่ำ (stationary phase) และจะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีอัตราการเจริญสูงขึ้น (log phase) จากการศึกษาในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ Sycamore (Jessup,1977)

การเพิ่มระดับความเข้มข้นน้ำตาลมีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนยอดและช่วยในการยืดตัวของยอด เนื่องจากในช่วงการแบ่งเซลล์อัตราการใช้พลังงานจะสูงขึ้นในขณะที่การสร้างพลังงานในพืชไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลภายนอกเพิ่มเติม

GA_3 (0-4 มก.ต่อลิตร) มีผลทำให้การยืดตัวของยอดกวาวเครือขาวลดลงจากวิธีการทดลองที่ไม่ใช้ GA_3 ซึ่งให้ผลแตกต่างจากไม้เนื้อแข็งอื่น เช่น Quercus acutissima (Kim et al.,1994) และให้อัตราการเกิดรากต่ำกว่าวิธีการทดลองที่ไม่ใช้ GA_3 หลังจากย้ายไปในอาหารชักนำให้เกิดราก

การชักนำให้เกิดราก

จากการทดลองศึกษาถึงผลของสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ต่อเนื้อเยื่อส่วนข้อและยอด ในช่วงแรกพบว่า NAA ช่วงที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากคือ 1-2

มก.ต่อลิตร ในอาหารสูตร MS แต่ที่ 2 มก.ต่อลิตรจะมีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดแคลลัสมากกว่าที่ 1 มก.ต่อลิตร และที่ระดับน้ำตาลร้อยละ 2 จะชักนำให้เกิดรากดีขึ้น เช่นเดียวกับรายงานการทดลองของ Berlyn และคณะ (1991)ที่ระดับน้ำตาลร้อยละ 1 ให้ผลการชักนำยอดต่ำที่สุด ที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลสูงร้อยละ 3 จะทำให้มีทิศทางการพัฒนาของเนื้อเยื่อแบบแคลลัสมากกว่าการเกิดราก ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำร้อยละ 1 อาจจะไม่เพียงพอต่อการเจริญและพัฒนาของตาราก

เมื่อเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดรากพบว่าอาหารสูตร WPM ซึ่งมีปริมาณแร่ธาตุอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่ำชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่าอาหารสูตร SH และ MS ที่มีปริมาณแร่ธาตุอาหารที่ระดับความเข้มข้นสูง ในขณะที่ใช้ระดับน้ำตาลและ NAA เท่ากัน คือร้อยละ 2 และ 1 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ มีรายงานการทดลองถึงการย้ายเนื้อเยื่อยอดจากอาหารสูตรที่มีปริมาณแร่ธาตุอาหารระดับความเข้มข้นสูงไปต่ำ จะชักนำให้เกิดรากได้ดี (Horgan and Aitken,1981) และการชักนำให้เกิดยอดและรากมักใช้อาหารสูตรเดียวกัน (Jelaska and Libby,1987)

ระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกันในสูตรอาหารเดียวกัน การลดระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารให้ต่ำกว่าปรกติ (0.5 เท่า) จะมีผลต่อการชักนำให้เกิดรากเพิ่มขึ้นเฉพาะในสูตรที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารสูง (สูตร MS) แต่ไม่มีผลในอาหารสูตรที่มีระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารต่ำอยู่แล้ว (สูตร WPM)

จากการทดลองพบว่าอาหารสูตร WPM ที่มีน้ำตาลร้อยละ 2 ร่วมกับ NAA 1 มก.ต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากดีที่สุดในระยะเวลาสั้นที่สุด โดยจะให้จำนวนรากสูงสุดถึงร้อยละ 91.67 ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

การชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชกวาวเครือขาว โดยการใช้แบคทีเรีย Agrobacterium rhizogenes สายพันธุ์ A_4 A_4RSII A_4RSII$_{GUS}$ ATCC 15834 และ R 1601 พบว่าเนื้อเยื่อพืชไม่ตอบสนองต่อการชักนำของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ คาดว่าอาจเกิดจากเนื้อเยื่อกวาวเครือขาวมีความสามารถในการสร้างสารประกอบที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรืออาจไม่เกิดการ Conjugation ระหว่างแบคทีเรียกับเซลล์กวาว

การศึกษาทิศทางการควบคุมการสังเคราะห์สาร เพื่อการจัดการผลิตสารทุติยภูมิ

ต่อไป โดยอาจจะศึกษาถึงระดับโมเลกุล เช่นการศึกษาถึงการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ โดย mRNA นอกจากนี้อาจจะเพิ่มยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ที่ต้องการ

เมื่อศึกษาเงื่อนไขในการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราก พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงรากแบบเซลล์แขวนลอย อาหารสูตรที่มีแร่ธาตุอาหารสูง (MS SH) จะให้การเจริญของรากดีกว่าสูตรที่มีแร่ธาตุอาหารต่ำ (WPM B5)

อัตราการเจริญของรากต่ำในช่วง 1-2 สัปดาห์แรก (lag phase) หลังจากนั้นอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 3-4 (log phase) หลังจากนั้นอัตราการเจริญเริ่มลดลง จากการทดลองพบว่ารากที่ได้จากการชักนำด้วย NAA จะให้อัตราการเจริญดีกว่ารากจากการเพาะเมล็ดในธรรมชาติ Hashimoto และ Yamada (1991) พบว่า IAA ในรากพืชส่วนใหญ่ได้รับมาจากส่วนยอด เมื่อตัดรากมาเลี้ยงในอาหารเหลว IAA ลดลงอย่างรวดเร็วในวันแรก ๆ ของการเลี้ยง ดังนั้นจึงต้องอาศัยสารเร่งการเจริญเติบโตจากภายนอก

จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาล พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการเพิ่มจำนวนรากอย่างไม่แน่นอน โดยน้ำตาลร้อยละ 3 ให้ปริมาณรากมากที่สุด และน้ำตาลร้อยละ 5 ให้ปริมาณรากน้อยที่สุด ความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่าร้อยละ 6 ไม่มีผลต่อการสะสมของสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) ในการเลี้ยงรากพืช Lupinus ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเป็นสาเหตุให้การเจริญเติบโตลดลง และปริมาณของไอโซฟลาโวนอยด์ลดลงด้วย (Berlin et al.,1990)

ความเข้มข้นของ NAA ต่ำ มีผลช่วยให้เกิดการเจริญของรากดีขึ้น ส่วนที่ความเข้มข้นสูง มีผลให้ลักษณะรากเปลี่ยนไป และเกิดสารประกอบฟีโนลิกสูง

ออกซินที่ความเข้มข้นต่ำจะมีผลทำให้รากยืดตัว ส่วนที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการยืดตัวของราก รากจะตอบสนองต่อออกซินมากกว่า ดังนั้นเมื่อรากได้รับออกซินเกินความเหมาะสมสำหรับการยืดตัวของรากแก้ว ออกซินจะควบคุมและเปลี่ยนแปลงการเจริญของรากอย่างรวดเร็ว (Hashimato and Yamada,1991)

เมื่อนำต้นที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดและรากในสภาพปลอดเชื้อ ไปปลูกในดิน พบว่าสามารถเจริญได้อย่างปกติ เหมือนต้นจากการเพาะเมล็ดหรือจากหัวธรรมชาติ และรากจากการชักนำด้วยออกซินสามารถให้หัวได้ตามปกติ เมื่อนำไปปลูกในดินอัตราการอยู่

รอดในสภาพเรือนเพาะชำ ร้อยละ 60 หลังจากการนำไปปลูกในระยะเวลา 2 เดือน ในขณะที่การขยายพันธุ์โดยใช้ท่อนพันธุ์จากป่าเชียงใหม่ไม่ประสบผลสำเร็จ

มีรายงานว่า ผลผลิตต้นไม้ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากพันธุกรรมของต้นไม้ชนิดนั้น (USDA Forest Service,1971) ดังนั้นระบบการคัดเลือกและทดสอบต้นไม้ในสภาพทดลอง จึงประสบผลสำเร็จและนำมาปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกได้ตามปกติ (Durzan,1982)

กล่าวโดยสรุป การศึกษาและพัฒนาวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาว เพื่อเพิ่มจำนวนในสภาพปลอดเชื้อ สามารถให้ผลผลิตครบวงจรได้ถึง 2 แนวทางด้วยกัน คือ

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส ภายใต้การกระตุ้นด้วยสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่องต่อไป และสามารถกระตุ้นด้วยสารเร่งการเจริญเติบโต ทำให้ได้ต้นอ่อน สำหรับการนำไปเลี้ยงภายนอก ถึงแม้ว่าผลผลิตที่ได้จะต่ำจึงเป็นการเปิดโอกาสให้มีการศึกษาการเพิ่มผลผลิตต่อไป

2. การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดจากเนื้อเยื่อส่วนข้อ ด้วยสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้มาก และนำยอดไปชักนำให้เกิดรากด้วย ทำให้ได้ต้นสมบูรณ์สำหรับการเจริญในสภาพแวดล้อมภายนอก

ต้นจากการขยายพันธุ์ในสภาวะปลอดเชื้อ เมื่อนำไปปลูกในเรือนเพาะชำ นอกจากจะสามารถให้ต้นและรากที่พัฒนาเป็นรากสะสมอาหาร (tuberus root) ได้เช่นเดียวกับ ต้นจากการเพาะเมล็ด รากสะสมอาหารที่ได้ยังให้การผลิตสารเคมีที่เหมือนกันอีกด้วย ซึ่งจะให้สารมากชนิดกว่า แคลลัสและรากในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากต้นพืชในเรือนเพาะชำสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ มีใบสังเคราะห์อาหารและเปลี่ยนแปลงสารที่ผลิตขึ้นได้ ไปเป็นสารทุติยภูมิมาเก็บที่รากสะสมอาหารซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Terry (1987) ที่พบว่าการเลี้ยงรากพืชไม้เนื้อแข็งมักจะขาดผลผลิตจากการสังเคราะห์แสง ซึ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเนื้อเยื่อ เจริญของรากที่ไม่ได้เจริญร่วมกับต้นพืช เนื่องจากที่ภาวะแวดล้อมภายนอกอาจจะมีผลกระตุ้นต่อการสังเคราะห์สาร จึงไม่พบหัวกวาวเครือขาวจากต้นในสภาพปลอดเชื้อ แต่เมื่อนำต้นออกไปปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก (เรือนเพาะชำ) ต้นกวาวเครือขาวก็สามารถให้หัวกวาวเครือขาวได้ตามปกติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้

1. เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตพืชสมุนไพรชนิดนี้ ในเชิงพาณิชย์แบบครบวงจร คือสามารถผลิตต้นจากสภาพปลอดเชื้อและนำไปปลูกในสภาพภายนอก เพื่อผลิตรากสะสมอาหารนำไปสกัดสารฤทธิ์เอสโตรเจน

2. แนวทางในการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารเคมีที่สร้างได้ ระหว่างเนื้อเยื่อจากสภาพปลอดเชื้อกับรากสะสมอาหาร ซึ่งจะเปิดโอกาสให้มีการพัฒนาการผลิตสารทุติยภูมิในเนื้อเยื่อที่เหมาะสมของพืชต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตของกวาวเครือขาวในธรรมชาติ พบว่า มักจะขึ้นในภาวะแวดล้อมที่แห้งแล้ง มีหินและกรวดปน บริเวณที่มีความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิกลางวันและกลางคืนสูง บริเวณพื้นที่ลาดชัน

2. การใช้ชิ้นส่วนพืชทดลองในภาวะปลอดเชื้อ จะให้การตอบสนองต่ออาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตได้ดี ช่วยลดอัตราการเกิดสารประกอบฟีโนลิก อัตราการปนเปื้อนของท่อนพันธุ์จากเชื้อโรคต่าง ๆ และลดปัญหาการพักตัวของพืชในช่วงฤดูกาลพักตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ชิ้นส่วนจากพืชที่เพาะเลี้ยงในเรือนเพาะชำ

3. การชักนำแคลลัสจากส่วนเนื้อเยื่อยอดบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA: BAP 0.5 มก.ต่อลิตร จะให้แคลลัสสีเหลืองปนเขียว ลักษณะยุ่ย ซึ่งเป็นแคลลัสที่มีคุณภาพดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่น

4. การเพาะเลี้ยงแคลลัสได้รับผลดีมากที่สุด เมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองเพิ่มขึ้นเป็น 1.25 เท่าของสูตรปกติร่วมกับ NAA:BAP 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ซึ่งจะให้อัตราการเพิ่มแคลลัสสีเหลืองปนเขียวสูงกว่าการใช้อาหารสูตรอื่น

5. มีแนวโน้มการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสบนอาหารสูตร 1.25xMS รวมกับ NAA ในช่วง 0.5-1.0 มก.ต่อลิตร และ BAP 1.0-2.0 มก.ต่อลิตร

6. การชักนำให้เกิดยอดลักษณะสมบูรณ์ โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อบนอาหารสูตร WPM รวมมีธาตุเหล็กเพิ่ม 0.5 เท่า กับ BAP 0.25 มก.ต่อลิตร

7. แอมโมเนียมไนเตรท 200 มิลลิโมล ซูโครสและน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sorbitol) 60:50 มิลลิโมล และ NAA 0.2 มก.ต่อลิตร สามารถช่วยการชักนำยอดเพิ่มขึ้นบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอด

8. ชักนำให้เกิดการยืดตัวของตายอดโดยใช้ระดับน้ำตาลค่อนข้างต่ำ (ร้อยละ 1.5-2) บนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดยอด ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต

9. อาหารสูตร WPM ร่วมกับ NAA 1 มก.ต่อลิตร และน้ำตาลร้อยละ 2 ให้อัตราการเกิดรากร้อยละ 96 ใน 4 สัปดาห์

10. การนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกของพืชจากสภาพปลอดเชื้อ พบว่ามีอัตราการรอดประมาณร้อยละ 60 ในระยะเวลา 2 เดือน และสามารถให้หัวสะสมอาหารได้ ในระยะเวลา 6 เดือน

11. เนื้อเยื่อกวาวเครือขาวไม่ให้ผลในการชักนำให้เกิดรากด้วย Agrobacterium rhizogenes สายพันธุ์ A_4, A_4 RSII, A_4 $RSII_{GUS}$, ATCC 15834 และ R 1601

12. การเลี้ยงรากชักนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี NAA ประมาณ 0.5-1.0 มก.ต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มเนื้อเยื่อรากสูงสุด

13. รากและแคลลัสจากสภาพปลอดเชื้อสามารถสังเคราะห์สารได้น้อยชนิดกว่ารากพืชที่พัฒนาเป็นหัวสะสมอาหารภายหลังการเพาะปลูกในเรือนเพาะชำ