บทนำ

สมุนไพรไทยเป็นทรัพยากรธรรมชาติภายในประเทศที่สำคัญ และมีการนำทรัพยากรธรรมชาติเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ โดยผ่านทางภูมิปัญญาชาวบ้านที่ถ่ายทอดสืบต่อกันมา แต่การนำทรัพยากรที่มีมาใช้เพื่อให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากลยังขาดการสนับสนุนทางด้านการวิจัยและการพัฒนาเพื่อนำสมุนไพรไทยเหล่านั้นมาประยุกต์ใช้ให้เป็นที่ยอมรับของกลุ่มผู้บริโภคทั่วโลก ในปัจจุบันสมุนไพรได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของประชาชนทั่วไปมากขึ้น ทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ต่างก็ให้ความสำคัญและเห็นถึงคุณประโยชน์ของสมุนไพรมากขึ้น ไม่ว่าจะในรูปแบบของอาหารเสริมสุขภาพ ยาแผนโบราณและเครื่องสำอาง รวมถึงในรูปของสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชและสมุนไพรยังเข้าไปมีบทบาทในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมอาหารเสริม อุตสาหกรรมยารักษาโรค เป็นต้น ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่มีความนิยมและหันมาใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรกันเป็นจำนวนมาก แต่ปัญหาที่สำคัญของการใช้สมุนไพรคือ ยังขาดข้อมูลในการผลิตวัตถุดิบที่จะเป็นหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่างฟ เพื่อให้เกิดการพัฒนาสมุนไพรไทยให้เป็นรูปธรรมอย่างชัดเจน และให้กลุ่มผู้บริโภคมีความเชื่อมั่นในการใช้สมุนไพรทั้งในเรื่องมาตรฐานและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งเพื่อหาแนวทางการส่งเสริมสมุนไพรไทยไปสู่การส่งออกเพื่อให้เป็นที่รู้จักแพร่หลายต่อไป

การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาศักยภาพการผลิตพืชสมุนไพรที่เป็นประโยชน์ในพื้นที่โคกภูตากาเพื่อการอนุรักษ์ที่ยั่งยืน พบว่าตะไคร้เป็นพืชที่ชาวบ้านในพื้นที่ใช้ประโยชน์มากที่สุด ขณะเดียวกันไม่มีการศึกษาถึงพืชเหล่านี้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อการขยายพันธุ์มาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงเทคนิคการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรตะไคร้โดยใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ตาและใบ

อ่อน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการขยายพันธุ์พืชที่เป็นประโยชน์ในพื้นที่โดกภูตากา

ตะไคร้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งโดยปกติแล้วคนทั่วไปจะรู้จักในรูปของพืชสวนครัวที่สามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด แต่ประโยชน์อีกด้านที่สำคัญมากของตะไคร้คือ เป็นพืชสมุนไพร ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (lemon grass oil) เพื่อใช้ในการทำยาทาถูนวด แก้ปวดเมื่อย หัวน้ำหอม ใช้กำจัดแมลงเช่น ยุง เห็บ หมัด แทนการใช้สารเคมีพวกออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) คลอริเนเตดไฮโดรคาร์บอน (chlorinated hydrocarbon) ซึ่งสารเคมีทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอย่างมาก ดังนั้นในปัจจุบันแนวโน้มการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้จึงมีมากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นการลดสารพิษตกค้างที่เป็นอันตรายแก่สิ่งมีชีวิต (ณรงค์และคณะ, 2537)

จากปริมาณการนำเข้าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอม ในปีพ.ศ. 2547 มีการนำเข้าปริมาณ 2,034 ลิตร และในปีพ.ศ. 2548 มีการนำเข้าปริมาณ 348 ลิตร (ถนอมศรี, 2550) ปัจจุบันกระแสความนิยมเรื่องของสปาเพื่อสุขภาพมีมากขึ้น ซึ่งในการดำเนินธุรกิจสปาสิ่งที่สำคัญในธุรกิจนี้คือน้ำมันหอมระเหยจากพืชเช่น ตะไคร้ ใบมะกรูด โดยเฉพาะตะไคร้ มีการนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มาใช้ทั้งในการอบตัว อบไอน้ำ นวดตัว และเป็นน้ำมันหอมระเหยให้กลิ่นหอมในห้องปรับอากาศอีกด้วย หากประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ได้มากขึ้น จะเป็นการลดการนำเข้าได้หรืออาจจะไม่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศเลยก็ได้ เมื่อพิจารณาจากสถิติการนำเข้าแล้วจะเห็นว่ามีแนวโน้มที่เป็นไปได้ แต่ปัญหาที่สำคัญคือ ยังไม่มีแหล่งผลิตตะไคร้ขนาดใหญ่ที่จะรองรับอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันหอมระเหยได้อย่างเพียงพอ แม้ว่าตะไคร้จะเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ได้ง่าย แต่ลักษณะการปลูกส่วนใหญ่จะปลูกตะไคร้เป็นพืชสวนครัวเท่านั้น จึงเป็นปัญหาที่ว่า ถ้าหากอุตสาหกรรมต้องการตะไคร้ในปริมาณมาก ๆ เพื่อผลิตน้ำมันหอมระเหย

ภาคเกษตรกรรมจะผลิตตะไคร้อย่างไรให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาที่จำกัดให้เพียงพอกับความต้องการ (ณรงค์และคณะ, 2537)

การขยายพันธุ์ตะไคร้โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีแยกกอ ตัดลำต้นไปปักชำ ซึ่งการขยายพันธุ์พืชนั้นสามารถทำได้หลายวิธี โดยมีอีกแนวทางหนึ่งของการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้จำนวนมากคือ การเพราะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่เนื่องจากไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตะไคร้มากก่อน ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นแนวทางเบื้องต้น ในการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มจำนวนของตะไคร้ให้ได้มากขึ้นในระยะเวลาอันสั้น ศึกษาหาชิ้นส่วนที่ให้ศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เจริญต่อไปได้ดีที่สุด

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ตะไคร้ (lemon grass) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Gramineae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf. ส่วนชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ มีหลายชื่อ ได้แก่ คาหอม (แม่ฮ่องสอน), ไคร (ภาคใต้), จะไคร (เหนือ), เชิดเกรย, เหลอะเกรย (สุรินทร์), ห่อวอตะโป (กะเหรี่ยง), หัวสิงไคร (ปราจีนบุรี), เฮียงเม้า (จีน) (นิรนาม, 2530ก)

ตะไคร้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในตระกูลหญ้า ขึ้นอยู่กับดินรวมกันเป็นกอ มีข้อและปล้องสั้น และค่อนข้างแข็ง ลำต้นส่วนที่อ่อนจะมีใบเรียงซ้อนสลับกันแน่นมาก ใบมีกาบใบเป็นแผ่นยาวโอบซ้อนกันจนดูแข็งคล้ายลำต้น ตัวใบเรียงยาว ปลายแหลม ยาวได้ถึง 90 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร เนื้อใบมีสีเขียว หยาบ มีขน ออกดอกเป็นช่อยาวมาก ซึ่งประกอบด้วยช่อดอกย่อย ที่มีดอกขนาดเล็กอยู่อีกจำนวนมาก แต่โดยทั่วไปมักไม่ค่อยพบดอกของตะไคร้ เนื่องจากจะตัดไปใช้ประโยชน์ หรือตัดไปขยายพันธุ์ก่อนเห็นดอก (กองวิจัยทางแพทย์, 2527)

ประโยชน์ตองตะไคร้สามารถแบ่งออกได้อย่างกว้าง ๆ เป็น 3 ด้าน (สุธาทิพย์ (2531), นิรนาม (2530ก) คือ

1. ประโยชน์ด้านอาหาร

เนื่องจากมีกลิ่นและรสเฉพาะตัว จึงนิยมนำตะไคร้ไปประกอบอาหาร เพื่อชูรสอาหารหรือดับกลิ่นคาว

2. ประโยชน์ด้านยา

ส่วนที่ใช้คือ ลำต้นแก่หรือเหง้า ใช้ทั้งสดและแห้ง ชงหรือต้มกับน้ำร้อน แก้อาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องอืด ท้องเฟ้อ ปวดท้อง ขับปัสสาวะ แก้เจ็บคอ คัดจมูก ไข้หวัด ไอ ในตะไคร้มีสรรพคุณในการเป็นยาฆ่าเชื้อด้วย

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหย

ในปัจจุบันใช้ใบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่ได้ จะใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมการผลิตสารกำจัดแมลง การผลิตยาหม่อง หัวน้ำหอม

น้ำมันตะไคร้ (lemon grass oil) สามารถสกัดได้หลายวิธี เช่น การใช้น้ำร้อน การใช้ไอน้ำ การใช้ตัวทำละลาย การใช้ไขมัน (อุดมลักษณ์, 2526) แต่วิธีที่นิยมคือ การสกัดด้วยกลั่นไอน้ำ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ในการกลั่นด้วยไอน้ำจะใช้ใบตะไคร้สด 2 กิโลกรัม สามารถกลั่นได้น้ำมันหอมระเหย 2.8 ซีซี ถ้าใช้ใบตะไคร้แห้ง 1 กิโลกรัม (ใบสด 4 กิโลกรัม เมื่อแห้งจะเหลือ 1 กิโลกรัม) จะได้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้เท่ากับ 5.2 ซีซี

จากการศึกษาของณรงค์และคณะ (2537) พบว่า เมื่อผสมน้ำมันตะไคร้กับแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1:16 สามารถกำจัดแมลงเช่น เห็บที่เกาะตัวโคได้ และยังสามารถไล่แมลงชนิดอื่น ๆ ได้อีก เช่น ยุง แมลงวัน หมัด จากคุณประโยชน์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แนวโน้มการใช้สารเคมีจากธรรมชาติที่เสื่อมสลายได้ง่าย แทนสารเคมีกำจัดแมลงสังเคราะห์มีมากขึ้น จึงเป็นการช่วยลดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม

ตะไคร้นิยมขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของลำต้นหรือเหง้าปักชำ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและควรปลูกในที่มีการระบายน้ำดี ไม่น้ำท่วมขัง จะสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบันกำลังเป็นที่นิยม และศึกษากับอย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด โดยชิ้นส่วนที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ใบ ตา เนื้อเยื่อปลายยอด เนื้อเยื่อปลายราก ข้อ ก้านช่อดอก คัพภะ ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีการศึกษาในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็มีหลายชนิด เช่น ข้าว อ้อย ไผ่ เป็นต้น

ถ้าจะกล่าวถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบางชิ้นส่วน เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของใบ ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงใบของพืชแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ใบที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงและสามารถเจริญเติบโตได้มักเป็นใบที่ยังอ่อนอยู่ ประกอบด้วยเซลที่ยังมีกิจกรรม และสามารถแบ่งตัวได้ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อใบสามารถเจริญเป็นแคลลัส (Callus)

หรือเจริญเติบโตเป็นหน่อ (bud) ขึ้นอยู่กับความสามารถของพืชชนิดนั้น ๆ ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตา เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อตาสามารถเจริญเติบโตเป็นแคลลัสหรือหน่อได้เช่นเดียวกัน (บุญยืน, 2527)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) เป็นทั้งสารอินทรีย์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นและที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ถ้าใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถกระตุ้น ยังยั้ง หรือเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีรวิทยาของพืชได้ สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ สารกลุ่มของออกซิน (auxins) และกลุ่มของไซโตไคนิน (cytokinins) (ไพบูลย์, 2524)

กลุ่มออกซินที่ได้รับความนิยมใช้ได้แก่

- Indoleacetic acid (IAA)
- Indolebutyric acid (IBA)
- α-Naphthalene acetic acid (NAA)
- 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)

กลุ่มไซโตไคนิน ที่นิยมใช้ได้แก่

- 6-Furfurylamino acid (kinetin)
- 6-Benzyl amino purine (BA)
- 6-(γ,γ-Dimethyallylamino)-purine (2-ip)

จากการศึกษาของ Scott and Ellen (1990) พบว่า หากเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินด้วยกัน IBA, NAA, 2,4-D มักจะให้ผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ IAA และจากการทดลองพบว่า IBA จะเสถียรภาพกว่า IAA เมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สกัดจากธรรมชาติ เมื่อผ่านความร้อนและแสงจะเสียสภาพได้ง่ายกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตสังเคราะห์ชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน

ได้รายงานการทดลองที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่มคือ ออกซินและไซโตไคนิน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ หน่อไม้ฝรั่ง พิทูเนีย Anterhinum. Torenia และ Perilla พบว่าการเกิดรากสามารถกระตุ้นได้โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและการเกิดยอดสามารถกระตุ้นได้โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินเติมลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการทำงานร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่มนี้ จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการแตกยอดใหม่ได้มากขึ้น (Tanimoto and Harada, 1982)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูลหญ้า (Gramineae) หลายชนิด เช่น *Miscanthus sinensis* ซึ่งเป็นหญ้าประดับชนิดหนึ่งที่ใช้ในการจัดสวน Gawel et al.(1990) พบว่าการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกอ่อน ในอาหารสูตร MS ซึ่งเติม 2,4-D ปริมาตร 9 μM จะให้ผลดี เพราะหลังจากเลี้ยงไว้ 8-12 สัปดาห์จะเกิดแคลลัสเป็นจำนวนมาก จากนั้นย้ายแคลลัสลงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ MS ลงครึ่งหนึ่งจะสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ หลังจากนั้นจะสามารถย้ายปลูกลงดินได้ Prutpangse and Gavinlertvatana (1992) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาที่ข้อของไผ่จำนวน 54 ชนิดจาก 87 ชนิด ในอาหารสูตร MS โดยการเติม BA สามารถชักนำให้เกิดการแตกตาได้ และหากเติม NAA 2.5-5.4 μM จะกระตุ้นให้ไผ่บางชินดเกิดรากได้ เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องนานกว่า 15 เดือน และจากการทดลองของประภา (2532) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวหอมดอกมะลิ 105 เลี้ยงบนอาหรสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เปอร์เซนต์เมล็ดที่สร้างยอดได้จำนวนมากคือ 68 เปอร์เซนต์ และจำนวนยอดข้าวต่อเมล็ดสูงสุดคือ 10.3 ยอดต่อเมล็ด และเมื่อย้ายยอดข้าวเหล่านี้ลงสู่อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม IAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5 กรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างรากได้ 100 เปอร์เซนต์ และเมื่อย้ายต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลูกลงดินในหระถางภายในสภาพเรือนทดลองพบว่า ต้นข้าวนั้นสามารถรอดชีวิตอยู่ได้

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถใช้ชิ้นส่วนพืชได้หลายส่วน อาทิเช่น ตา ใบ ข้อ ก้านช่อดอก สำหรับกรณีการใช้ตาเป็นชิ้นส่วนเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น Chesick et al. (1990) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยง Western Larch (*Larix occidentaris* Nutt.) ชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากได้คือ ตาและลำต้นที่ยังมีสีเขียว โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Schenk and Hildebrant (SH) ที่เติม BA ตั้งแต่ 1-10 µM หากเติม BA ความเข้มข้นที่มากเกินไปจุทำให้เกิดผลน้อยกว่า ส่วนการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซิน (NAA, IAA, IBA) จะชักนำให้เกิดการยืดยาวของต้นมากกว่าจะชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก Miller et al. (1991) ได้ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงของตาดอกคาร์เนชั่น (Dianthus caryophyllus) ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 4-8 µM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4-8 µM สามารถชักนำให้คาร์เนชั่นแตกต้นได้สูงประมาณ 70-275 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาชิ้นส่วนตะไคร้ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชิ้นส่วนตะไคร้ที่ใช้ในการทดลองคือ ตาและใบอ่อน โดยนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาล้างทำความสะอาดแล้วล้างน้ำกลั่นให้สะอาด จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 2 % ที่เติม tween 20 จำนวน 1 หยดต่อน้ำ 50 ซีซี เป็นเวลา 8 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนใบอ่อนมาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนตานำมาตัดให้ได้ขนาด 0.3x0.3 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนไปวางลงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แล้วนำไปเลี้ยงไว้ในที่มีแสง 1,000 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 30 ขวด (replications)

บันทึกผลการทดลองโดยบันทึกอัตราการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์และการพัฒนาของชิ้นส่วนตะไคร้ต่ออาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาตะไคร้

นำชิ้นส่วนตาที่มีขนาด 0.3x0.3 เซนติเมตร มาล้างให้สะอาดแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดอีกครั้ง หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนตามาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรความเข้มข้น 2 % ที่เติม tween 20 จำนวน 1 หยดต่อน้ำ 50 ซีซี เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาผลของออกซิน (auxins) จำนวน 3 ชนิดได้แก่ Napthalene acetic acid (NAA), Indole butylic acid (IBA) และ 2.4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และผลของไซโตไคนิน (cytokinins) จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BA) และ N^6-furfuryladenine (kinetin) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5, 1.0, 3.0และ 5.0 ppm โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แบ่งออกเป็นทั้งหมด 20 หน่วยทดลอง (treatments) แต่ละหน่วยทดลองมี 10 ซ้ำ นำเนื้อเยื่อทั้งหมดไปเลี้ยงไว้ในที่มีแสง1,000 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

หน่วยทดลองทั้งหมด 20 หน่วยทดลองได้แก่

หน่วยทดลองที่ 1 (trt.1) :MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm

หน่วยทดลองที่ 2 (trt.2) :MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm

หน่วยทดลองที่ 3 (trt.3) :MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 ppm

หน่วยทดลองที่ 4 (trt.4) :MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm

หน่วยทดลองที่ 1 (trt.1) :MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของ ออกซิน ได้แก่ NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ **กัน** โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in completely randomized design มีปัจจัยทั้งหมด 2 ปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของ NAA จำนวน 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ความเข้มข้นที่ 1, 3 และ 5 ppm และ ความเข้มข้นของ BA จำนวน 4 ระดับความเข้มข้นได้แก่ความเข้มข้นที่ 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 ppm การทดลองนี้มีทั้งหมด 12 (3x4) หน่วยทดลอง แต่ละหน่วยทดลองมี 10 ซ้ำ แล้วนำไปเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,000 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยหน่วยทดลองต่าง ๆ มีดังนี้คือ

หน่วยทดลองที่ 1 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 ppm ร่วมกับ BA 0.1 ppm

หน่วยทดลองที่ 2 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 ppm ร่วมกับ BA 0.5 ppm

หน่วยทดลองที่ 3 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 ppm ร่วมกับ BA 1.0 ppm

หน่วยทดลองที่ 4 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 ppm ร่วมกับ BA 1.5 ppm

หน่วยทดลองที่ 5 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 3 ppm ร่วมกับ BA 0.1 ppm

หน่วยทดลองที่ 6 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 3 ppm ร่วมกับ BA 0.5 ppm

หน่วยทดลองที่ 7: อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 3 ppm ร่วมกับ BA 1.0 ppm

หน่วยทดลองที่ 8 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 3 ppm ร่วมกับ BA 1.5 ppm

หน่วยทดลองที่ 9 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 ppm ร่วมกับ BA 0.1 ppm

หน่วยทดลองที่10 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 ppm ร่วมกับ BA 0.5 ppm

หน่วยทดลองที่ 11: อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 ppm ร่วมกับ BA 1.0 ppm

หน่วยทดลองที่ 12 : อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 ppm ร่วมกับ BA 1.5 ppm

บันทึกผลการทดลอง โดย บันทึกวันที่ตาเริ่มพัฒนา (จำนวนวัน) ความสูงของต้นเมื่ออายุ 45 วันหลังย้ายลงอาหาร (เซนติเมตร) เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส ต้นอ่อน ราก และค่าเฉลี่ยจำนวนต้นอ่อนและราก เมื่ออายุ 75 วันหลังย้ายลงอาหาร

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาชิ้นส่วนตะไคร้ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตะไคร้โดยใช้ตา และใบอ่อน ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าชิ้นส่วนที่เหมาะสมได้แก่ ชิ้นส่วนตา เนื่องจากจากตารางที่ 1 พบว่าชิ้นส่วนตามีเปอร์เซนต์การปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย 43.3 เปอร์เซนต์ เนื้อเยื่อตาย 6.6 เปอร์เซนต์ และมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 50.1 เปอร์เซนต์ ซึ่งดีกว่าเนื้อเยื่อใบอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตนั้นมีเปอร์เซนต์การแตกยอดสูงถึง 73.3 เปอร์เซนต์ ขณะที่ชิ้นส่วนใบอ่อนไม่มีเนื้อเยื่อที่มีการพัฒนาใด ๆ เลย

ตารางที่ 1 การศึกษาชิ้นส่วนของตะไคร้ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

รายการ	ชิ้นส่วน	
	ตา (%)	ใบอ่อน (%)
การปนเปื้อนของเชื้อ (contamination)	43.3	56.6
ตาย (death)	6.6	0
รอดชีวิต (survival)	50.1	43.4
การแตกยอด(plantlet induction)	73.3	0
การเกิดแคลลัส (callus formation)	0	0

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนตาของตะไคร้

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาถึงอิทธิพลของออกซินจำนวน 3 ชนิดและอิทธิพลของไซโตไคนินจำนวน 2 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

จากการทดลองถึงอิทธิพลของออกซินจำนวน 3 ชนิดได้แก่ NAA, IBA และ 2.4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 ppm และอิทธิพลของไซโตไคนินจำนวน 2 ชนิดได้แก่ BA และ kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 ppm จากตารางที่ 2 พบว่าจำนวนวันที่ชิ้นส่วนตาเริ่มพัฒนาส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 7-9 วัน ยกเว้นในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm จะเริ่มแตกยอดเมื่อเวลาผ่านไป 4-6 วัน ส่วนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 และ 5 ppm และอาหารที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5, 3 และ 5 ppm จะเริ่มแตกยอดเมื่อเวลาผ่านไป 10-12 วัน สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) พบว่าจะเริ่มแตกยอดเมื่อเวลาผ่านไป 10-12 วัน

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 2 จำนวนวันที่เนื้อเยื่อตาตะไคร้เริ่มพัฒนาโดยอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (ppm)	วันที่ตาเริ่มพัฒนา (วัน)			
		0-3	4-6	7-9	10-12
ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)					✓
NAA	0.5			✓	
	1		✓		
	3			✓	
	5			✓	
IBA	0.5			✓	
	1			✓	
	3			✓	
	5			✓	
2,4-D	0.5			✓	
	1			✓	
	3			✓	
	5			✓	
BA	0.5			✓	
	1			✓	
	3				✓
	5				✓
kinetin	0.5				✓
	1			✓	
	3				✓
	5				✓

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การพัฒนาความสูงของต้น

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาตะไคร้ไปได้ 45 วัน ต้นที่เริ่มเจริญเติบโตจะมีความสูงต่าง ๆ กัน จากตารางที่ 3 พบว่า ในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 ppm ต้นอ่อนตะไคร้ที่ได้จะมีความสูง 6.3 เซนติเมตร ส่วนในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm และในอาหารที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ppm พบว่าต้นที่ได้จะมีความสูง 4.96, 3.94 และ 3.10 เซนติเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ความสูงของต้นโดยเฉลี่ย (ซม.) ของต้นอ่อนตะไคร้ที่เพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนตาในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 45 วัน

ความเข้มข้น (ppm)	ความสูงของต้น (ซม.)				
	Auxins			Cytokinins	
	NAA	IBA	2,4-D	BA	kinetin
0.5	0.4	0.5	0.5	5.0	4.0
1.0	0.4	0.5	0.5	6.3	3.1
3.0	0.5	0.4	0.5	2.0	1.6
5.0	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การพัฒนาไปเป็นแคลลัส ต้นอ่อนและราก

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาตะไคร้ไปได้ 75 วัน จากตารางที่ 4 พบว่า มีเพียงอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 ppm เท่านั้น จะสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซนต์ ส่วนหน่วยทดลองอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เลย ในขณะที่มีเพียงหน่วยทดลองเดียวที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 ppm จะชักนำให้เกิดการแตกต้นอ่อนได้ 60 เปอร์เซนต์ เกิดจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยเท่ากับ 7.3 ต้น และเกิดรากได้ 60 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 7.0 ราก ส่วนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm จะสามารถชักนำให้เกิดรากได้ 80 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ย 9.75 ราก และในอาหารที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5 ppm จะชักนำให้เกิดรากได้ 60 เปอร์เซนต์และมีจำนวนรากเฉลี่ย 5 ราก

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส ต้นอ่อน ราก และค่าเฉลี่ยจำนวนต้นอ่อน ราก ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาตะไคร้ที่ได้รับอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 75 วัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (ppm)	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดต้นอ่อน (%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต้น)	การเกิดราก (%)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก)
NAA	0.5	0	0	0	0	0
	1.0	0	0	0	0	0
	3.0	0	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0	0
IBA	0.5	0	0	0	0	0
	1.0	0	0	0	0	0
	3.0	0	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0	0
2,4-D	0.5	0	0	0	0	0
	1.0	0	0	0	0	0
	3.0	100	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0	0
BA	0.5	0	0	0	80	9.75
	1.0	0	60	7.3	60	7.0
	3.0	0	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0	0
kinetin	0.5	0	0	0	60	5.0
	1.0	0	0	0	0	0
	3.0	0	0	0	0	0
	5.0	0	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาถึงอิทธิพลร่วมกันของ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3 และ 5 ppm ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 ppm

จากการศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA (ตารางที่ 5) พบว่า วันที่ตาเริ่มพัฒนาของหน่วยทดลองส่วนใหญ่ จะอยู่ระหว่างวันที่ 7 ถึงวันที่ 9 ยกเว้นในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm และอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 ppm ตาจะเริ่มพัฒนาเมื่อเวลาผ่านไป 4-5 วัน เร็วกว่าหน่วยทดลองอื่น ๆ ส่วนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm จะเริ่มแตกยอดเมื่อเวลาผ่านไป 10-12 วัน ซึ่งใช้เวลานานที่สุด

ตารางที่ 5 จำนวนวันที่เนื้อเยื่อตาตะไคร้เริ่มพัฒนาโดยอิทธิพลร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตระหว่าง NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (ppm)		วันที่ตาเริ่มพัฒนา (วัน)			
NAA	BA	0-3	4-6	7-9	10-12
1	0.1			✓	
1	0.5			✓	
1	1.0			✓	
1	1.5		✓		
3	0.1		✓		
3	0.5			✓	
3	1.0			✓	
3	1.5			✓	
5	0.1			✓	
5	0.5			✓	
5	1.0			✓	
5	1.5				✓

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น
วด
QK
99
.T5
ส841

การพัฒนาความสูงของต้น

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 45 วัน ต้นที่เริ่มเจริญเติบโตจะมีความสูงต่าง ๆ กัน โดยในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm ต้นที่ได้มีความสูงเฉลี่ย 5 เซนติเมตร ส่วนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ต้นที่ได้มีความสูง 4.30 เซนติเมตร และอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 ppm ต้นที่ได้มีความสูง 3.20 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ความสูงของต้นโดยเฉลี่ย (เซนติเมตร) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาตะไคร้ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 45 วัน

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ppm)		ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)
NAA	BA	
1	0.1	0.20
1	0.5	2.20
1	1.0	3.40
1	1.5	5.20
3	0.1	0.90
3	0.5	0.70
3	1.0	0.80
3	1.5	0.80
5	0.1	0.35
5	0.5	0.70
5	1.0	0.96
5	1.5	1.06

การพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนและราก

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 75 วัน (ตารางที่ 7) พบว่า ในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm จะชักนำให้เกิดต้นอ่อน 60 เปอร์เซนต์ จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย 8.33 ต้น ส่วนอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดได้เฉพาะรากมีดังต่อไปนี้คือ อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm ชักนำให้เกิดราก 40 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ย 5.5 ราก ในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm เกิดราก 20 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ย 4.0 ราก อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 ppm เกิดราก 20 เปอร์เซนต์ จำนวนราก เฉลี่ย 5.0 ราก และอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm เกิดราก 20 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ย 2.0 ราก

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์การเกิดหน่อ ราก และจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาตะไคร้ที่ได้รับอิทธิพลร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตระหว่าง NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 75 วัน

NAA (ppm)	BA (ppm)	%การเกิดต้นอ่อน (%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต้น)	% การเกิดราก (%)	จำนวนรากเฉลี่ย(ราก)
1	0.1	0	0	0	0
1	0.5	0	0	20	4.0
1	1.0	0	0	0	0
1	1.5	60	8.33	0	0
3	0.1	0	0	0	0
3	0.5	0	0	40	5.5
3	1.0	0	0	0	0
3	1.5	0	0	0	0
5	0.1	0	0	0	0
5	0.5	0	0	0	0
5	1.0	0	0	20	5.0
5	1.5	0	0	20	4.0

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อภิปรายผล

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาและใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ชิ้นส่วนที่เหมาะสมคือ ชิ้นส่วนตา เนื่องจากเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chesick et al. (1990) ที่ทำการเพาะเลี้ยง Western Larch แล้วพบว่าชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้คือ ตาและลำต้นที่มีสีเขียว เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนอื่น ๆ เช่น ก้านช่อดอกและใบ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงตาของตะไคร้ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโตไคนิน พบว่า วันที่ตาเริ่มพัฒนาเป็นต้นอ่อน ส่วนใหญ่จะใกล้เคียงกันคืออยู่ระหว่างวันที่ 7 ถึงวันที่ 9 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 45 วัน พบว่า สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อตาของตะไคร้พัฒนาได้ต้นอ่อนเพิ่มขึ้น คือสูตรอาหรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ BA และ kinetin ส่วนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA 2,4-D และ IBA ต้นอ่อนที่ได้จะมีความสูงประมาณ 0.35 – 0.55 เซนติเมตร ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวได้สอดคล้องกับรายงานของ Tanimoto and Harada (1982) ที่กล่าวว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินสามารถกระตุ้นให้เกิดต้นและการแตกต้นอ่อนได้ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไป 75 วัน พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 ppm สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อตาเกิดเป็นต้นอ่อนได้ 60 เปอร์เซนต์ จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย 7.3 ต้น ซึ่งผลที่ได้เป็นเช่นเดียวกับการทดลองของ Prutpongse and Gavinlertvatana (1992) ที่รายงานว่าการเติม BA ลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาของไผ่สามารถชักนำให้เกิดการแตกหน่อได้ และการทดลองของประภา (2532) ซึ่งได้รายงานว่าเมล็ดข้าวหอมมะลิ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดหลาย ๆ ยอดได้ สำหรับอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้นั้นมี 3 สูตร

อาหารคือ อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 ppm และ kinetin 0.5 ppm นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 ppm สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อตาเกิดแคลลัสได้ถึง 100 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เป็นเพราะ 2,4-D นั้นจะมีผลกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดการสร้างและการเจริญของแคลลัสได้

จากผลการทดลองดังกล่าวได้ให้ข้อสังเกตว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ให้ผลดีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาของตะไคร้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง BA และ kinetin พบว่า BA จะให้ผลดีกว่า kinetin และระดับความเข้มข้นของ BA ที่ให้ผลดีจะมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.5-1.0 ppm ดังนั้นจึงทำการศึกษาอิทธิพลร่วมกันระหว่าง BA และ NAA โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นของ BA ที่ 0.1, 1.0 และ 1.5 ppm และระดับความเข้มข้นของ NAA ได้แก่ 1.0, 3.0 และ 5.0 ppm ซึ่งสาเหตุที่เลือกใช้ NAA เพราะเมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่นในกลุ่มออกซิน พบว่า NAA สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อตาพัฒนาได้เร็วกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่นในกลุ่มเดียวกัน เมื่อทำการศึกษาวันแรกที่ตาเริ่มพัฒนาพบว่าส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่างวันที่ 7 ถึงวันที่ 9 คือไม่แตกต่างจากหน่วยทดลองที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินหรือในกลุ่มไซโตไคนินเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไป 45 วัน พบว่า อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm จะชักนำให้ต้นสูง 5.2 เซนติเมตร เนื่องมาจากสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงกว่าสมดุล จึงชักนำให้เกิดต้นได้ (Tanimoto and Harada, 1982) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 75 วัน พบว่าอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ 60 เปอร์เซนต์ จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย 8.33 ต้น เนื่องมาจากการทำงานร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่ม จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการแตกยอดใหม่ได้มากขึ้นและเมื่ออัตราส่วนระหว่างไซโตไคนินและออกซิน อยู่ในระดับที่เหมาะสม จะชักนำให้เกิดราก แคลลัสหรือต้นได้ อย่างใดอย่างหนึ่ง สำหรับในหน่วยทดลองอื่นที่ไม่สามารถเกิดหน่อได้นั้น

เป็นเพราะสมดุลระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่มไม่เหมาะสมกาจมีปริมาณของไซโตไคนิน (BA) หรือออกซิน (NAA) มากเกินไป จึงไม่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างหน่อได้ (Tanimoto and Harada, 1982)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของตะไคร้ระหว่างตาและใบอ่อน โดยเนื้อเยื่อจะผ่านการแช่แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 1 นาที และนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 2 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 8 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า เนื้อเยื่อตาสามารถตอบสนองต่ออาหารได้ 73.3 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เนื้อเยื่อใบอ่อนไม่มีการตอบสนองใด ๆ เลย คือ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไปได้ 15 วัน เนื้อเยื่อจะค่อย ๆ กลายเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วนและตายไปในที่สุด อีกทั้งมีการปนเปื้อนของเชื้อเท่ากับ 56.6 เปอร์เซนต์ ซึ่งสูงกว่าเปอร์เซนต์การปนเปื้อนของเชื้อในเนื้อเยื่อตา

จากผลการทดลองดังกล่าว จึงได้นำเนื้อเยื่อตามาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ในกลุ่มออกซินและในกลุ่มไซโตไคนิน พบว่าวันแรกที่ตาเริ่มพัฒนาส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่างวันที่ 7 ถึงวันที่ 9 และวัดความสูงของต้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 45 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยความสูงของต้นจะอยู่ระหว่าง 0.35-0.55 เซนติเมตร ยกเว้นในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1,5 ppm ต้นอ่อนจะมีความสูง 4.96, 6.20, 2.0 เซนติเมตร ตามลำดับ และในอาหารที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1,5 ppm ต้นอ่อนจะมีความสูง 3.94, 3.10, 1.56 เซนติเมตรตามลำดับ

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงได้ 75 วัน พบว่าในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 ppm เนื้อเยื่อตา สามารถเกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซนต์ ลักษณะของแคลลัสมีสีเหลืองอ่อนมีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จับตัวกันอย่างหลวม ๆ ในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 ppm สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ 60 เปอร์เซนต์ จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย 7.3 ต้น และสามารถเกิดรากได้ 60 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ย 7 ราก สำหรับสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้มี

2 สูตรอาหาร ได้แก่ อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ppm\ ชักนำให้เกิดรากได้ 80 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ย 9.75 ราก และอาหารที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5 pm สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 60 เปอร์เซนต์ จำนวนรากเฉลี่ย 5 ราก

และจากการศึกษาอิทธิพลของ NAA ร่วมกับ BA พบว่า วันที่ตาเริ่มพัฒนาส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่างวันที่ 7 ถึงวันที่ 9 และวัดความสูงของต้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 45 วัน อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1,5 ppm พบว่า ต้นจะมีความสูง 5.2 เซนติเมตร ซึ่งให้ผลที่ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 75 วัน พบว่าสูตรอาหารที่สามารถพัฒนาไปเป็นหน่อได้นั้นคือ อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm สามารถชักนำให้เกิดหน่อได้ 60 เปอร์เซนต์ และมีจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย 8.33 ต้น ส่วนอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้มี 4 สูตรอาหารคือ อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 ppm เกิดราก 40 เปอร์เซนต์ และอาหารที่สามารถชักนให้เกิดรากได้ 20 เปอร์เซนต์ ได้แก่ อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 ppm, และอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.5 ppm และเมื่อย้ายต้นอ่อนที่มีรากลงปลูกในสภาพเรือนทดลอง พบว่า ต้นอ่อนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

มหาวิทยาลัยขอนแก่น