



รายงานผลการวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การผลิตไฟลแบบบูรณาการ

Integrated Research on Cassumunar ginger

(*Zingiber Cassumunar* .Roxb.)

โดย

ชลิต พงศ์สุกสมิทธิ สุภัทตร์ ปัญญา เบญจวรรณ สมบูรณ์



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การผลิตไพลแบบบูรณาการ
Integrated Research on Cassumunar ginger (*Zingiber Cassumunar* .Roxb.)

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551
จำนวน 463,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นายชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ
ผู้ร่วมโครงการ นายสุภักดิ์ ปัญญา
นางเบญจวรรณ สมบูรณ์

งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

...../...../.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี จากผู้ร่วมงานสาขาพืชสวนประดับ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ชลิต พงศ์สุภสมิทธิ์

สุภัทตร์ ปัญญา

เบญจวรรณ สมบูรณ์



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	19
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ	20
ผลการวิจัย	21
วิจารณ์ผลการทดลอง	24
สรุปผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	32



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการเกิดหน่อของไพลบนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 1.0 ppm. ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.5 ppm. เป็นเวลา 40, 80 และ 120 วัน	22
2	แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไพลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายครั้งแรกเป็นตัวคำนวณ	26
3	แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไพลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายครั้งที่ 2 เป็นตัวคำนวณ	27
4	แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไพลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายครั้งที่ 3 เป็นตัวคำนวณ	28
5	แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไพลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายเฉลี่ยการตัดขยายครั้งที่ 1 ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 เป็นตัวคำนวณ	29

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	23
แสดงการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไพลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 1 ppm. ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.5 ppm. เป็นเวลา 40 วัน	
2	
แสดงการเจริญเติบโตของต้นไพลที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากย้ายออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำเป็นเวลา 30 วัน	



การวิจัยการผลิตไหลแบบบูรณาการ
Integrated Research on cassumunar ginger
(*Zingiber cassumunar* Roxb.)

ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ¹ สุภักตร์ ปัญญา² เบญจวรรณ สมบูรณ์¹

CHALIT PONGSUPASAMIT SUPAK PUNYA
BENCHAWAN SOMBOON

¹สาขาพืชสวนประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
จังหวัดเชียงใหม่

²สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่

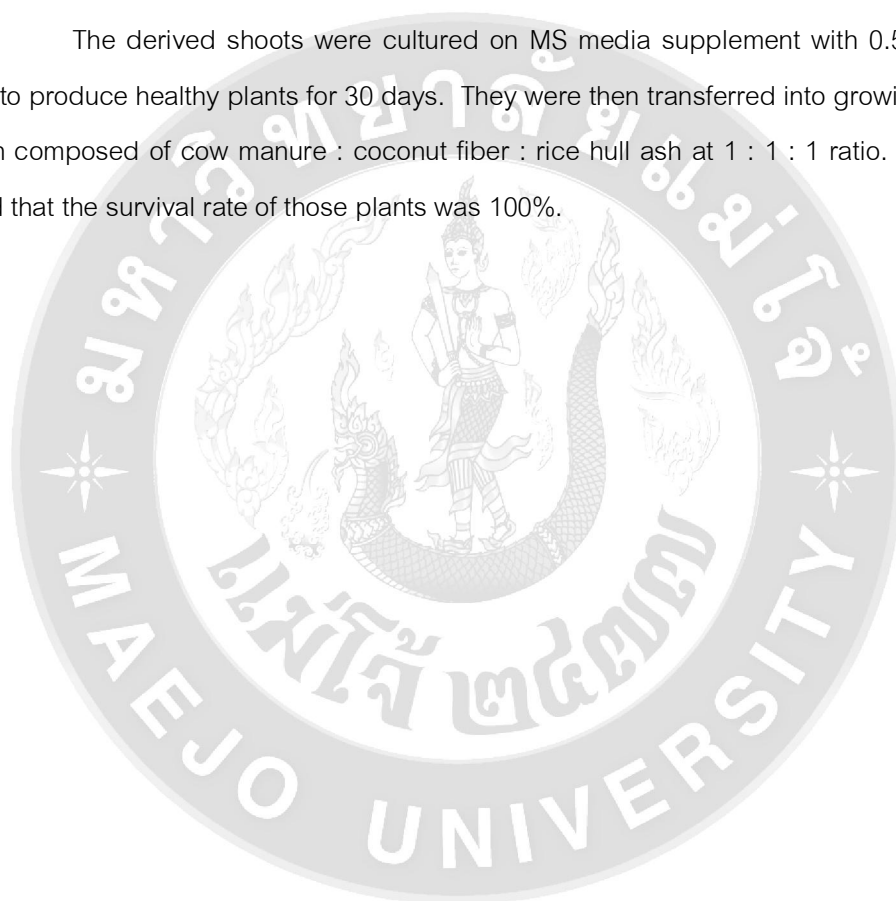
บทคัดย่อ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดไหล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) เพื่อหาอัตราการขยายพันธุ์บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 1.0 ppm. ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.5 ppm. เมื่อทำการตัดขยาย 3 ครั้ง พบว่า มีอัตราการเกิดหน่อเฉลี่ยเท่ากับ 2.57 หน่อ ต่อ 1 ยอด เริ่มต้น ต่อระยะเวลา 40 วัน ดังนั้น ในระยะเวลาเกือบ 1 ปี (360 วัน) จะสามารถขยายหน่อได้จำนวน 4,887.29 ต่อ 1 ยอดเริ่มต้น และเมื่อนำหน่อที่ได้เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 0.5 ppm. เพื่อผลิตต้นพืชที่แข็งแรงเป็นเวลา 30 วัน และย้ายลงปลูกในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วยปุ๋ยคอก ขุยมะพร้าว และแกลบเผา ในอัตรา 1 : 1 : 1 โดยปริมาตร พบว่า ต้นไหลรอด 100 เปอร์เซ็นต์

ABSTRACT

Apical shoots of Cassumunar ginger (*Zingiber cassmunar*) were cultured on modified MS media supplemented with 1 ppm. NAA and 1.5 ppm. BA. After three times of multiplication, it was found that the rate of multiplication the lateral shoot was 2.57 shoots per apical shoot per 40 days and 4,887.29 lateral shoots were produced in one year (360 days).

The derived shoots were cultured on MS media supplement with 0.5 ppm. NAA to produce healthy plants for 30 days. They were then transferred into growing mix which composed of cow manure : coconut fiber : rice hull ash at 1 : 1 : 1 ratio. It was found that the survival rate of those plants was 100%.



คำนำ

ไพลเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในตำราแพทย์แผนโบราณ โดยอาจจะใช้อย่างเดียวหรือผสมกับสมุนไพรตัวอื่นเพื่อรักษาอาการต่างๆ เช่น รักษาอาการอักเสบ แก้เคล็ดขัดยอก ฟกช้ำ เส้นตึง เหน็บชา สมานแผล น้ำมันไพลเมื่อผสมกับแอลกอฮอล์สามารถทาแก้นูนได้ เหง้าใช้กินเป็นยาขับลม ขับประจำเดือน แก้บิด สมานลำไส้ และมีฤทธิ์ระบายอ่อนๆ และแก้ปวด ซึ่งมีผลมาจาก (E)-1-(3, 4-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol (วัธภา, 2520 และ วันดี, 2538) นอกจากนี้ยังพบว่าเหง้าไพลมีสาร 4-(4-hydroxy-1-butenyl) veratrole ซึ่งมีฤทธิ์ในการขยายหลอดลม จึงมีการทดลองใช้ผงไพลกับผู้ป่วยเด็กที่เป็นหืด ปรากฏว่าได้ผลดีมาก ทั้งในรายที่มีอาการหอบหืดอย่างเฉียบพลันและเรื้อรัง ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับพืชวงศ์ Zingiberaceae ที่มีผลต่อต้านสารเร่งการเกิดมะเร็ง โดยใช้สมุนไพร 6 ชนิด คือ ขมิ้น (*Curcuma domestica* Valetton) ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) เปราะหอม (*Kaempferia galanga* L.) ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) และกระเทียม (*Zingiber zerumbet* (L.) Smith) มีผลต้านไวรัสเอดส์แบบบาร์ ด้วยสาร TPA (12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) ซึ่งเป็นสารเร่งการเกิดมะเร็ง (tumour promoter) ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสมุนไพรเพื่อป้องกันมะเร็ง โดยเฉพาะในระยะ tumour promoting stage (ฝ่ายข่าวงานวิจัย, 2539) ปัจจุบันคนได้เริ่มมาสนใจใช้สมุนไพรในการรักษา ป้องกัน และสุขภาพดีกันมากขึ้น เพื่อสนองความต้องการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรได้อย่างสม่ำเสมอและเพียงพอ จึงควรมีการศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันการขาดแคลนสมุนไพร ทั้งนี้เนื่องจากการขยายพันธุ์โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและได้ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรคต่างๆ

การตรวจเอกสาร

ไพลเป็นพืชอยู่ในวงศ์ (family) Zingiberaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber cussumunar* Roxb. (สมภพ, 2544) ภาคเหนือเรียกว่าปูลอย หรือปุลอย (รุ่งรัตน์, 2540) ภาคกลางเรียกว่า ไฟ ชาวเงี้ยวแม่ฮ่องสอน เรียกว่า มั่นสะล่าง (เพียร, 2529, และวันดี, 2538) มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย ตั้งแต่ประเทศอินเดีย พม่า ไทย มาเลเซีย จนถึงอินโดนีเซียเป็นพืชหลายปี (perenial) มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้า (rhizome) แตกแขนงทอดขนานไปกับผิวดินเป็นที่สะสมอาหาร (พวงเพ็ญ, 2532) เหง้ามีสีเหลืองแกมเขียว มีกลิ่นเฉพาะ เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เจริญเป็นกอ หน่อใหม่เจริญทางด้านข้างนอกสุด ในช่วงกลางฤดูหนาวถึงต้นฤดูร้อน ต้นบนดินจะแห้งตาย และจะงอกใหม่ในต้นฤดูฝน (วันดี, 2538) ลำต้นเทียมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 – 1.0 เซนติเมตร สูงประมาณ 80 – 150 เซนติเมตร มีกาบใบหรือโคนใบหุ้ม ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับเป็นสองแถวเป็นรูปหอก (lorate) ตรงช่วงต่อระหว่างตัวใบกับกาบใบจะหักเป็นข้อคอก ดอกเป็นช่อขนาดใหญ่ ก้านช่อดอกยาว โผล่จากดินประมาณ 20-30 เซนติเมตร ช่อดอกเป็นรูปกรวย มีใบประดับซ้อนกันแน่นเรียบ สีของใบประดับเป็นสีเขียว เมื่อยังอ่อนจะปิดแน่น และจะขยายอ้าให้เห็นดอกภายหลัง ดอกบานทีละ 2-3 ดอก จากข้างล่างขึ้นบน กลีบดอกบางสีเหลือง (เพียร, 2529) กลีบดอกและกลีบรองดอกมี 3 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 6 อัน ผลกลมแข็งเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร

ผลทางเภสัชวิทยา

ส่วนหัวหรือเหง้า (rhizome) ของไพลประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย (aromatic oil, curcumin) (สุวรรณ, 2537) สารประกอบเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) (สมภพ, 2544 ; เพียร, 2529) เบต้าซิโตสเตอรอล (B-sitosterol) และในส่วนสกัดด้วยเฮกเซน (Hexane extract) ของไพล ซึ่งแบ่งที่ละลายส่วนที่ละลายได้น้อย ตรวจพบสาร โมโนเทอร์พีน (monoterpene) และสารใหม่ อีก 7 ชนิด คือ A, B, B', C, C', D และ E มีผลทางเภสัชวิทยาดังนี้

1. ด้านอาการอักเสบ จากการศึกษาสารสำคัญของไพลสามารถแยกสารสำคัญ 3 ชนิด จากการสกัดด้วยเฮกเซนที่นำมาสกัดต่อจากสารสกัดเมธานอลของเหง้าไพล พบว่าเป็น terpinene – 4 – 01, α- terpinene และ (E)1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-01 ซึ่งเป็นสารฟีนอลิควิตานอยด์จากเหง้าไพล มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและแก้ไขแก้ปวดในสัตว์ทดลองเมื่อให้ทางปาก จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและบรรเทาปวดผู้วิจัยได้สรุปว่าเป็นผลจากสาร (E)1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-01 มีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้เป็น 2 เท่า ของ

ไดโครฟีแนก (diclofenac) ซึ่งเป็นยาแผนปัจจุบันใช้บรรเทาอาการอักเสบ โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) และไลโปออกซีจีเนส (lipooxygenase) จากการศึกษา ผลของการรักษาอาการอักเสบในสัตว์ทดลองโดยวิธีต่างๆ พบว่าสามารถอาการบวมของอุ้งเท้า หนูจากการฉีดคาราจีแนน และลดอาการอักเสบของหนูจากการทากรดอะราชีนิก (arachidonic acid)

สารอัลฟา-พินีน (- pinene) และเทอร์พีนีน (terpinene-4-O1) ได้มีการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ทั้งที่รับประทานหรือฉีดเข้าช่องท้อง โดยให้ฤทธิ์นานกว่า อินโดเทอร์พีน ส่วนเคอร์คิวมิน (curcumin) พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยออกฤทธิ์เป็นแอนติออกซิแดนท์

2. ฤทธิ์บรรเทาปวด อาจเนื่องจากยาชาเฉพาะที่ โดยมีผลลดความสูงของศักย์ทำงาน (action potential) พบว่า น้ำสกัดไพลในขนาดความเข้มข้น 30, 70, 150, 225 และ 300 มิลลิกรัมต่อซีซี สามารถลดศักย์การทำงานของเส้นประสาท sciatic ได้ภายใน 20 นาที โดยผลการลดขึ้นอยู่กับขนาดที่ใช้ และอาจเนื่องจากมีผู้นิยมใช้ไพลเป็นยาขับเลือดเสีย และขับน้ำคาวปลาภายหลังคลอดบุตร โดยปรุงเป็นยามีชื่อว่ายาประสะไพลซึ่งเป็นยาที่กระทรวงสาธารณสุขประกาศใช้เป็นยาสามัญประจำบ้าน ในอดีตหมอไทยจะปรุงยาชานานี้ติดบ้านไว้เสมอ การที่เป็นยาขับน้ำคาวปลาได้ย่ายนั้นต้องมีฤทธิ์ให้กล้ามเนื้อดลูกบีบตัว สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติได้ทำการทดลองโดยใช้เมล็ดลูกหนู แล้วหยดน้ำต้มไพลลงไป ผลทำให้กล้ามเนื้อดลูกหนูคลายตัวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองทำให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า กล้ามเนื้อดลูกไวต่อไพลมาก จากคุณสมบัตินี้อาจใช้ไพลเป็นยาแก้ปวดมดลูกเวลามีประจำเดือนได้ (นิยดา และคณะ , 2522)

3. ฤทธิ์ต้านฮิสตามีน (histamine) ทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัว อนุพันธ์ฟีนิวบิวตานอยด์ในเหง้าไพล ทำให้กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูตะเภาคลายตัว สามารถต้านฤทธิ์อะเซทิลโคลีน (acetylcholine), นิโคติน (nicotine), และเซโรโทนิน (serotonin) มีรายงานการวิจัยในคนไข้และในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดจากไพลมีฤทธิ์ขยายหลอดลม โดยทดลองใช้กับคนไข้ที่เป็นโรคหอบหืดทั้งเด็กและผู้ใหญ่ จากการศึกษาในผู้ป่วยเด็ก พบว่าการให้รับประทานเหง้าไพลบดแห้งขนาด 11-25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านฮิสตามีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีฤทธิ์น้อยกว่ายาคลอเฟนิรามีน จากการศึกษาพบข้อดีของไพลเมื่อใช้รักษาผู้ป่วยโรคหอบหืดที่มีภาวะภูมิแพ้ที่เยื่อโพรงจมูกร่วมด้วยใช้ได้ดีทั้งขณะหอบและป้องกันการหอบเนื่องจาก compound D และอนุพันธ์ 2 ชนิด ได้แก่ compound D acetate และ

compound D palmitate ซึ่งเป็นสารที่สกัดมาจากไพล ปัจจุบันนำมาทดลองใช้ทำยารักษาโรคหอบหืด ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะดังต่อไปนี้

ก. compound D ลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีเหลืองอ่อน ชื่อทางเคมีคือ 4-(3', 4'-dimethoxy-phenyl) – but-3-en-1-yl สูตรเคมีคือ $C_{12}H_{16}O_3$

ข. compound D acetate ลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีเหลืองอ่อน ชื่อทางเคมีคือ 4-(3',4'- dimethoxy-phenyl) – but-3-en-1-yl acetate สูตรทางเคมีคือ $C_{14}H_{18}O_4$

ค. compound D palmitate ลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี ชื่อทางเคมีคือ 4-(3', 4'-dimethoxy-phenyl) – but-3-en-1-yl palmitate สูตรทางเคมีคือ $C_{28}H_{46}O_4$

4.ต่อต้านสารเร่งการเกิดมะเร็ง โดยสมุนไพร 6 ชนิด ขมิ้น (*Curcuma dimestica* Valetton) ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) เปราะหอม (*Kaempferia galanga* L.) ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) และกระเทียม (*Zingiber zerumbet* (L.) Smith) มีผลต้านไวรัสเอดส์แบบบาร์ ด้วยสาร TPA (12 - o – tetradecamoyl phor-bo 1-13-acetate) ซึ่งเป็นสารเร่งการเกิดมะเร็ง (tumour promoter) ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสมุนไพรเพื่อป้องกันมะเร็ง โดยเฉพาะในระยะ tumour promoting stage (ฝ่ายชีวเภสัชวิทยา , 2539)

5.ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ใช้ทาแผลฝีหนองหรือโรคผิวหนังบางชนิดเนื่องจากไพลมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เป็นสาเหตุของฝีหนอง และเชื้อราบางชนิดได้

6. ใช้เป็นยาทาแก้คันยุงได้ นำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้าไพล เมื่อใช้ทาผิวหนังใช้ป้องกันยุงได้ อาจใช้ผงไพลแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไประเหยให้เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถป้องกันยุงได้ 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังสามารถใช้เหง้ากินเป็นยาขับลม มีฤทธิ์ระบายอ่อน ๆ แก้บิด สมานลำไส้

การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์พืชในวงศ์นี้ทำได้หลายวิธีคือ

การเพาะเมล็ด

การเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับเพาะเมล็ดขนาดกลางของพืชทั่วไป นำเมล็ดมาเพาะในกระบะบรรจุทรายผสมถ่านกลบ อัตราส่วน 1 : 1 โดยให้เมล็ดจมลงในวัสดุปลูก ประมาณ 0.5 – 1.0 เซนติเมตร (สุรวิฑู, 2537)

การแยกเหง้า

โดยการขุดเหง้าจากกอเดิม ตัดลำต้นทิ้งและนำไปปลูกลงหลุมที่เตรียมไว้ ใช้ฟางแห้งคลุมดินเพื่อช่วยรักษาความชุ่มชื้น และป้องกันวัชพืช ในหนึ่งฤดูปลูกเหง้า 1 เหง้าเกิดเป็นลำต้นเทียมซึ่งจะแตกหน่อในหนึ่งฤดูปลูกได้ประมาณ 2-20 หน่อ เมื่อสิ้นฤดูปลูกแล้วแต่ละกอจะมีเหง้าหลายเหง้าเชื่อมติดกันแต่สามารถหักกลุ่มของเหง้าออกเป็นเหง้าเดี่ยวๆ ได้ง่าย (รุ่งรัตน์, 2540 ; สุรวิธ, 2537)

การผ่าเหง้า

วิธีนี้เป็นการนำเหง้าที่ได้จากการแยกเหง้ามายา่ แบ่งตามยาวเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ขึ้นเหง้าที่ได้ควรมีตาที่สมบูรณ์ ไม่น้อยกว่า 1 ตา และมีรากสะสมอาหารติดมาด้วยอย่างน้อย 1 ราก (สุรวิธ , 2537)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำได้สำเร็จ จากการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ (organs) เนื้อเยื่อ (tissues) เซลล์ (cell) หรือส่วนที่ไม่มีผนังเซลล์ที่เรียกว่าโปรโตพลาสต์ (protoplast) โดยใช้ส่วนประกอบของอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulator) และการปรับสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงจนขึ้นส่วนของพืชเหล่านั้นสามารถเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นต้นพืชได้

การขยายพันธุ์พืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด (Culture of shoot apex)

ในช่วงปี 1920 การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดยังไม่ประสบความสำเร็จ ต่อมาในปี 1933 White ได้พยายามนำส่วนปลายยอด *Stellaria media* มาเลี้ยง หลังจากนั้น Loo (1945) ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) โดยเขาได้ตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งที่มีความยาว 5 มิลลิเมตร มาเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ หลังจากเลี้ยงได้ระยะหนึ่งเขาได้เปลี่ยนอาหาร พบว่า หน่อไม้ฝรั่งสามารถเจริญเป็นต้นเล็ก ๆ ได้เป็นจำนวนมาก จากผลงานของ Loo ได้มีผู้ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของเฟิร์น (fern) และแองจิโอสเปิร์ม (angiosperm) พบว่าการยากง่ายของการแยกเนื้อเยื่อส่วนยอดแตกต่างกัน เช่น เนื้อเยื่อของเฟิร์นสามารถเจริญเติบโตได้ง่าย ในขณะที่การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนยอดพวกแองจิโอสเปิร์ม มีความยากง่ายแตกต่างกันออกไป (Wetmore and Morel, 1949, Wetmore,

1953) อย่างไรก็ตาม Ball (1946) ได้รายงานว่เนื้อเยื่อส่วนยอดที่เหมาะสมในการเลี้ยงจะต้องมีจุดกำเนิดใบ leaf (primodia) ติดมาด้วย 3 ใบ จึงจะทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญและพัฒนาได้ดี คือเกิดต้นและรากจนสามารถย้ายปลูกลงดินได้ และวิธีการของเขาได้นำมาเป็นแบบอย่างในการผลิตต้นพืชในเชิงการค้าจนถึงปัจจุบัน ทำให้เขาได้รับการขนานนามว่าบิดาแห่ง micropropagation การคิดค้นเครื่องมือ และอุปกรณ์ตลอดจนเทคนิคต่าง ๆ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดเพื่อผลิตต้นกล้าเป็นจำนวนมากกระทำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดนี้ได้พบวิธีการผลิตต้นพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชหลายชนิด นอกจากวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดสามารถผลิตต้นพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัสได้แล้วยังสามารถทำให้ต้นพืชปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชเช่นกัน จึงเป็นการตัดวงจรชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรค เมื่อนำพืชชนิดนั้น ๆ มาเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด (Morel and Martin, 1952, Styer and Chin, 1984) ในปี 1960 – 1965 Morel ได้รายงานเกี่ยวกับการผลิตต้นกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียม (*Cymbidium*) ที่ปราศจากเชื้อไวรัส และการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญจากส่วนยอด พบว่าสามารถผลิตต้นกล้วยไม้เข็มปีเดียมที่ปราศจากเชื้อไวรัสได้และยังพบต่อไปอีกว่าเนื้อเยื่อเจริญจะมีการเจริญเติบโตมีลักษณะคล้ายคัพภะ หรือต้นกล้วยไม้ที่เพาะจากเมล็ด จึงเรียกคัพภะที่เจริญและพัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญนี้ว่า nonzygotic embryo หรือเป็นที่รู้จักของผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม่ว่า protocorm like bodies สำหรับ Smith and Murashige (1970) ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด โดยนำเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญที่ไม่มีจุดกำเนิดใบติดมาด้วยของต้นยาสูบ (*Nicotina*), *Daucus carota* L. *Tropaeolum majus* L., และกะหล่ำปลี (*Coleus biumei* Benth)

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดนอกจากเพื่อการขยายพันธุ์แล้ว ยังสามารถนำเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดมาเลี้ยงเพื่อผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส จึงทำให้เกิดความเข้าใจผิดกันระหว่างพืชสวนและโรคพืชในเรื่องของการเรียกชื่อเนื้อเยื่อส่วนยอดที่นำมาเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์และเพื่อผลิตต้นพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัส (Murashige, 1974) การใช้คำว่า meristem culture, meristemming และ mericlones ในความหมายทางพืชสวนเคยใช้สำหรับการเลี้ยงส่วนของปลายยอดขนาดใหญ่ เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วยไม้ ซึ่งต้องใช้ขนาดยาว 5 – 10 มิลลิเมตร (Murashige, 1974) แต่ในทางโรคพืชคำว่า meristem culture หมายถึง เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดที่มีขนาดกว้าง 0.1 – 0.2 มิลลิเมตร สูง 0.2 – 0.3 มิลลิเมตร ดังนั้น ในปี 1965 Cutter จึงได้นิยามความหมายของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อปลายยอด (Shoot apex) ไว้ดังนี้ คือ เนื้อเยื่อเจริญ

ส่วนยอด หมายถึง เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดที่ไม่มีจุดกำเนิดใบ (Leaf primordia) ติดมาด้วย ซึ่งจะมีขนาดความกว้าง 0.1 – 0.2 มิลลิเมตร ความสูง 0.2 – 0.3 มิลลิเมตร ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอด หมายถึง ปลายยอดของพืชที่มีขนาดกว้างกว่า 0.2 มิลลิเมตร ความสูงมากกว่า 0.3 มิลลิเมตร ซึ่งขนาดของเนื้อเยื่อที่กล่าวมานี้จะมีส่วนของจุดกำเนิดใบและ/หรือ ใบอ่อน (young leaf) ติดมาด้วย

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อส่วนยอด ขึ้นอยู่กับ (1) ขนาดของเนื้อเยื่อนำมาเลี้ยง (2) ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยง (3) สารควบคุมการเจริญเติบโตและ (4) ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช (Shabde – Moses and Murashige, 1979) กล่าวคือ ขนาดของเนื้อเยื่อจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเจริญ จุดกำเนิดใบ และใบอ่อนที่อยู่ถัดลงมาจากจุดกำเนิดใบ ชนิดของอาหารใช้เลี้ยงที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารต่าง ๆ พบว่า การใช้ธาตุโปตัสเซียมในปริมาณสูงจะทำให้เนื้อเยื่อส่วนยอดมีโอกาสเจริญเติบโตได้ดี (Morel, 1975) การเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน พบว่า บางครั้งจำเป็นแต่บางครั้งไม่จำเป็นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Shabde and Murashige, 1977, Smith and Murashige, 1970) นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตไคนินเป็นตัวยับยั้งอิทธิพลของการข่มตาข้าง (Wickson and Thimann, 1958) ดังนั้นจึงได้ใช้ไซโตไคนินเพิ่มลงในอาหารเพื่อให้เนื้อเยื่อเกิดหน่อเป็นจำนวนมาก ซึ่งเหมาะต่อการขยายพันธุ์ (Murashige and Skoog, 1962, Lloyd and McCown, 1981) นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ยังพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มจิบเบอเรลลิน หรือ Gibberellic acid มีความจำเป็นต่อการเร่งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนยอดบางชนิด เช่น มันฝรั่ง รักเร่ คาร์เนชั่น เบญจมาศ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร (Morel, 1975) สำหรับเนื้อเยื่อส่วนยอดพืชบางชนิดเลี้ยงง่าย บางชนิดเลี้ยงได้ยาก ขึ้นอยู่กับพันธุกรรม การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของพืชยืนต้นหรือไม้เนื้อแข็งต้องการปัจจัยการเจริญเติบโตหลาย ๆ อย่าง เช่น ต้องการอุณหภูมิต่ำก่อนการนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มจิบเบอเรลลินและไซโตไคนิน สำหรับการเจริญเติบโตของยอด ส่วนออกซินจะช่วยให้เกิดราก ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายก่อนการย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ (Morel, 1975)

นอกจากปัจจัยเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้กล่าวมาแล้ว วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการพรางหรือค้ำจุนให้เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่สามารถเจริญได้เหมือนต้นพืชทั่ว ๆ ไปก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยทั่วไปจะใช้วุ้น (บทที่ 2) เป็นตัวช่วยพราง (Smith and Murashige, 1970) อย่างไรก็ตามเรายังสามารถนำกระดาษกรอง (filter paper) มาดัดแปลงเป็นตัวพรางเนื้อเยื่อได้ทำได้โดยตัดกระดาษกรองรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาดให้พอเหมาะกับภาชนะที่ใช้เลี้ยง แล้วพับ

กระดาดังกล่าวเป็นรูปตัว M นำไปใส่ไว้ในภาชนะโดยให้ปลายกระดาดงรูปตัว M ทั้งสองข้างอยู่ที่ก้นภาชนะ นำอาหารเหลวใส่ภาชนะให้ท่วมปลายกระดาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปแช่เชื้อในหม้อนึ่งความดันเหมือนการฆ่าเชื้อในอาหารทั่ว ๆ ไป ทิ้งไว้ให้เย็น นำเนื้อเยื่อส่วนยอดที่จะเลี้ยงมาวางไว้ด้านบนตัว M อาหารเหลวจะซึมผ่านกระดาดงไปทั่วแผ่น กระดาดงจะทำหน้าที่เป็นตัวนำอาหารและพยุ่งเนื้อเยื่อ (Goodwin, 1966) วิธีการนี้เรียกว่า Wick culture

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญและการเลี้ยงส่วนยอด (Meristem and meristem tip culture)

เพื่อไม่ให้เกิดความสับสนระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) และการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (meristem tip culture) จะขอกล่าวในที่นี้ีกว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญหมายถึง การนำเอาเนื้อเยื่อเจริญที่เรียกว่า meristematic dome ซึ่งมีขนาดกว้าง 0.1 – 0.2 มิลลิเมตร สูง 0.2 – 0.3 มิลลิเมตร เท่านั้น ส่วนการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด หมายถึง การนำเนื้อเยื่อเจริญที่มีส่วนของจุดกำเนิดใบติดมาด้วย 1 – 2 ใบ ทำให้ขนาดของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดใหญ่กว่าเนื้อเยื่อเจริญ ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญของพืชหลายชนิดเมื่อนำมาเลี้ยงจะมีโอกาสรอดต่ำมาก และอาจจะเกิดการกลายพันธุ์ได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญเมื่อนำมาเลี้ยงมักจะเจริญและพัฒนาเป็นแคลลัสก่อนจึงจะเกิดต้นที่หลัง จึงนิยมนำเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดมาเลี้ยงแทนเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเมื่อนำมาเลี้ยงอาจจะมีโอกาสรอดสูง มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่ไม่ผ่านการเกิดแคลลัส เนื่องจากมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีส่วนของตาข้างที่กำลังพัฒนา (developing lateral bud) ติดมาด้วย แต่โอกาสจะติดเชื้อไวรัสมีสูงกว่าเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจาก การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญและการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด ต่างก็มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัสและนำไปขยายพันธุ์ต่อไป แต่การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเป็นการพัฒนาเทคนิควิธีการ เพื่อให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายของเนื้อเยื่อสูงขึ้นและต้นพืชที่ได้ปราศจากเชื้อไวรัส โดยการใช้อุณหภูมิสูงหรือสารเคมีเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนหน่อและข้อ (Shoot and node culture)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนหน่อเพื่อการขยายพันธุ์พืชโดยสภาพปลอดเชื้อเป็นที่ยอมรับและปฏิบัติกันมากับพืชหลายชนิด (Kurty et al., 1991) สิ่งที่ได้จากการนำส่วนของหน่อหรือส่วนยอดของพืชมาเลี้ยงคือ ข้อที่ถัดจากส่วนยอดลงมา ซึ่งสามารถนำไปขยายพันธุ์ได้เช่นกัน ดังนั้นการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนหน่อจึงมักทำควบคู่ไปกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อ เนื้อเยื่อทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตยอดได้เหมือนกัน โดยเนื้อเยื่อส่วนหน่อหรือยอดจะเจริญขึ้นไปเรื่อย ๆ ส่วนเนื้อเยื่อ

ส่วนข้อจะแตกตาข้าง โดยปกติตาข้างจะไม่เจริญเนื่องจากถูกตายอดข่มเอาไว้ เมื่อตัดตายอดไปเลี้ยงทำให้ข้อพิพลของการข่มตาข้างหมดไป ตาข้างจึงสามารถเจริญเป็นหน่อใหม่ได้ ซึ่งเป็นไปตามความต้องการหรือวัตถุประสงค์ของการขยายพันธุ์ ในกรณีที่พืชติดเชื้อไวรัสก่อนการขยายพันธุ์จำเป็นต้องทำให้เนื้อเยื่อนำมาเลี้ยงปราศจากเชื้อไวรัสก่อนดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อผ่านการทดสอบว่าเนื้อเยื่อหรือต้นพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อปราศจากเชื้อไวรัสแล้วสามารถนำมาตัดขยายเพื่อเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้การเพิ่มปริมาณเป็นไปอย่างรวดเร็ว จำเป็นต้องให้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน (George, 1993) โดยไซโตไคนินจะไปกระตุ้นให้ตายอดมีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น ขณะเดียวกันจะกระตุ้นให้ตาข้างมีการเจริญและพัฒนาเป็นหน่อจำนวนมากในพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง สามารถย้ายต้นที่สมบูรณ์ออกปลูกและตัดชำต้นขนาดเล็กโดยใช้เพียงข้อเดียว (single node) ก็สามารถผลิตต้นกล้าที่แข็งแรงพร้อมย้ายปลูกในแปลง

ในกรณีต้นพืชที่จะนำเนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อมาเลี้ยงไม่ได้ติดเชื้อไวรัส เราสามารถนำเนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อที่มีขนาดใหญ่มาเลี้ยงได้เลย โดยไม่ต้องตัดเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญ เนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีจุดกำเนิดไปและไปอ่อนติดมาด้วยจะมีโอกาสเจริญและพัฒนาได้ดีกว่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กหรือเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเท่านั้น แต่การฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่จะยากกว่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบข้อดีของการขยายพันธุ์โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อกับเนื้อเยื่อส่วนอื่น พบว่า (1) การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อมีโอกาสที่จะขยายพันธุ์ได้แน่นอนกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่น (2) เนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อมีโอกาสกลายพันธุ์ได้น้อย (3) ดังนั้นต้นที่ได้จะมีลักษณะเหมือนต้นเดิมทุกประการ (Michael, 1996)

ในพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง เนื้อเยื่อส่วนยอดจะเจริญไปเรื่อย ๆ โดยไม่แตกหน่อหรือตาข้างจะไม่เจริญเป็นหน่อ ถึงแม้จะเพิ่มไซโตไคนินลงไปในการเพาะเพื่อกระตุ้นให้ตาข้างเจริญก็ตาม จากการที่มันเจริญไปทางยอดเรื่อย ๆ ทำให้เกิดข้อเป็นจำนวนมาก เราสามารถนำต้นมาตัดขยายโดยการตัดเพียงข้อเดียว วิธีการนี้สามารถขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าพืชบางชนิดสามารถสร้างอวัยวะได้บริเวณข้อ เช่น หัว (tuber หรือ corm) เราก็สามารถผลิตหัวขนาดเล็กได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น การผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งขนาดเล็กในสภาพปลอดเชื้อโดยการกระตุ้นหัวเกิดหัวบริเวณข้อ การขยายพันธุ์ด้วยข้อเป็นวิธีการขยายพันธุ์วิธีการหนึ่งที่ทำให้ต้นพืชตรงตามพันธุ์ ไม่เกิดการกลายพันธุ์

ขั้นตอนของการขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ (Invitro plantpropagation stages)

Murashige (1974) ได้กล่าวถึงขั้นตอนการขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อว่ามีทั้งหมด 3 ขั้นตอน ซึ่งปัญหาแรกในการขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อคือ การปนเปื้อน (contamination) จากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังนั้น Debergh and Maene (1981) จึงได้เสนอว่า น่าจะเพิ่มขั้นตอนที่ 0 ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญอีกตอนหนึ่ง กล่าวคือ เป็นขั้นตอนก่อนขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนการดูแลรักษาต้นพันธุ์เพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นตอนของการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ปัจจุบันได้ให้ความสำคัญของขั้นตอนการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อถึง 5 ขั้นตอน คือ 0 – 4 ขั้นตอนต่าง ๆ ไม่เพียงแต่อธิบายขั้นตอนในการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ แต่ได้กล่าวถึงสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณต้น (Miller and Murashige, 1976) ขั้นตอนนี้นิยมทำในห้องปฏิบัติการที่ทำการค้าและวิจัย เนื่องจากสามารถวางแผนการผลิตตลอดจนค่าใช้จ่ายต่าง ๆ สามารถคำนวณต้นทุนการผลิตได้ (Kurty et al., 1991) เพื่อให้ง่ายต่อความเข้าใจในขั้นตอนต่าง ๆ จึงได้อธิบายไว้ดังนี้ คือ

ขั้นตอน 0 การคัดเลือกและการเตรียมต้นพันธุ์ (Stage 0 : Donor plant selection and preraration)

ขั้นตอนก่อนนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงนับว่ามีความสำคัญขั้นตอนหนึ่งที่จะทำให้การเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ ซึ่งเป็นขั้นตอนในการคัดเลือกต้นพันธุ์ที่จะนำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อและการดูแลรักษาให้ต้นพันธุ์มีความแข็งแรง ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งสามารถปฏิบัติได้ดังนี้ คือ

1. คัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะตรงกับวัตถุประสงค์หรือความต้องการของตลาด
2. ดูแลรักษาพืชที่คัดเลือกให้แข็งแรง โดยปฏิบัติดังนี้
 - 2.1 การให้น้ำ ควรให้น้ำบริเวณโคนต้น ไม่ควรรดน้ำทั่วทั้งต้น ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณพื้นผิวพืช และควรปลูกพืชภายใต้โรงเรือนที่ป้องกันน้ำฝนได้
 - 2.2 ควรพ่นยาป้องกันกำจัดโรคและศัตรูพืชเป็นประจำ
3. กระตุ้นให้พืชแตกตาข้าง โดยปฏิบัติดังนี้
 - 3.1 เด็ดยอดเพื่อทำลายอิทธิพลของการข่มตาข้าง
 - 3.2 ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินและจิบเบอเรลลิน

3.3 ใช้สารละลายน้ำตาล 2 เปอร์เซนต์ และ 8 – hydroxyquinoline citrate เพื่อกระตุ้นให้ตาข้างเจริญและลำเลียงสารควบคุมการเจริญเติบโตไปยังเนื้อเยื่อที่ต้องการทั้งนี้คือ ตาข้าง (Read, 1988)

4. การดูแลอื่น ๆ เช่น การให้ปุ๋ย แสง และอุณหภูมิ ซึ่งจะมีผลต่อความแข็งแรงของเนื้อเยื่อที่จะนำไปเลี้ยง

ขั้นตอนที่ 1 การทำให้เนื้อเยื่อปลอดเชื้อ (Establishment of aseptic cultures)

จุดประสงค์ของขั้นตอนที่ 1 คือการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส่วนยอดและตาข้าง ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อตั้งต้น (primary explant) ที่ได้จากต้นพันธุ์ปกติ เนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปจะมีเชื้อราและแบคทีเรียอาศัยอยู่ ดังนั้น จึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ออกจากเนื้อเยื่อ ซึ่งหมายถึงความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป หรือไม่ถ้าหากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ก็เท่ากับการเลี้ยงเนื้อเยื่อในครั้งนั้นไม่ประสบความสำเร็จ แต่ถ้าเนื้อเยื่อนั้นปลอดเชื้อก็ต้องศึกษาว่าเนื้อเยื่อยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ ถ้าเนื้อเยื่อยังมีชีวิตอยู่จะสามารถนำเนื้อเยื่อนี้ไปขยายปริมาณในระยะที่ 2

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว คือ (1) ระยะเวลาในการเจริญของเนื้อเยื่อ (explantation time) (2) ตำแหน่งของเนื้อเยื่อ (position of the explant) (3) ขนาดของเนื้อเยื่อ (explant size) และ (4) การเกิดออกซิเดชันของโพลีฟีนอล (Polyphenol oxidation) ระยะเวลาในการเจริญเติบโตของพืชหรือเนื้อเยื่อมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ เช่น ในไม้ยืนต้นถ้านำเนื้อเยื่อในฤดูใบไม้ผลิมาเลี้ยง พบว่า เนื้อเยื่อจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในฤดูใบไม้ร่วงหรือฤดูหนาว ส่วนพืชที่มีลำต้นใต้ดินเป็นหัวหรือเป็นเหง้า เช่น มันฝรั่ง มันเทศ ขิง ควรใช้เนื้อเยื่อหลังจากการพักตัวหรือมีหน่อ (sprout) ใหม่เกิดขึ้น

ความสามารถในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจากตำแหน่งที่ต่างกันในพื้นที่เดียวกันย่อมมีการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เช่น เนื้อเยื่อส่วนปลายยอดจะมีการเจริญเติบโตดีกว่าตาข้าง เนื้อเยื่อที่มีอายุน้อยกว่าเจริญเติบโตได้ดีกว่าเนื้อเยื่อที่มีอายุมากกว่า เนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ได้แก่ หน่อที่เกิดบริเวณรากที่เรียกว่า root suckero หน่อที่เกิดบริเวณโคนต้น หน่อที่เกิดจากตอไม้ และตาข้างที่เกิดจากการตัดยอดหรือตัดแต่งกิ่ง

ขนาดของเนื้อเยื่อนำมาเลี้ยง พบว่า เนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กจะมีโอกาสปลอดเชื้อหลังจากฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวได้มากกว่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ แต่โอกาสรอดและเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่

การเกิดโพลีฟีนอล ออกซิเดชัน ในเนื้อเยื่อพืชบางชนิดเมื่อนำมาเลี้ยงจะเกิดสารโพลีฟีนอล ออกซิเดชัน ตรงบริเวณรอยตัดทำให้เกิดสารน้ำตาล หรือสีดำบริเวณเนื้อเยื่อและอาหาร ซึ่งถ้าเกิดมากจะทำให้เนื้อเยื่อตายได้ วิธีการลดการเกิดโพลีฟีนอล ออกซิเดชัน หรือลดการเกิดสีน้ำตาลได้โดย (1) เลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวและเปลี่ยนอาหารบ่อย ๆ (2) เติมสารแอนติออกซิแดนท์ในอาหาร เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) หรือ polyvinylpyrrolidone (PVP) (3) ลดแสงหรือเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มืด

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรอาหารแต่ละสูตรจะเหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด ดังนั้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับสูตรอาหารที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามสูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962) สามารถใช้ได้กับพืชหลายชนิด โดยมากมักจะดัดแปลงสูตรอาหารต่าง ๆ โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ออกซินและไซโตไคนินลงในอาหาร เพื่อให้เนื้อเยื่อมีชีวิตรอดและพัฒนา (Hu and Wang, 1983) ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ลักษณะทางพันธุกรรมและขนาดของเนื้อเยื่อ

ความรู้เกี่ยวกับจุดที่พืชสังเคราะห์ฮอร์โมนทำให้เราทราบถึงความสัมพันธ์เกี่ยวกับขนาดของเนื้อเยื่อและปริมาณ สารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหาร ออกซินและไซโตไคนินในพืชถูกสังเคราะห์บริเวณปลายยอดและราก ดังนั้นเมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินจะทำให้เนื้อเยื่อส่วนยอดมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดี (Shabde and Murashige, 1977) ส่วนการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดที่มีขนาดใหญ่ไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารในขั้นตอนที่ 1 เนื้อเยื่อส่วนยอดจะเกิดรากอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องมาจากไซโตไคนินภายในเนื้อเยื่อ การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดในขั้นตอนที่ 1 มักจะใช้อาหารวุ้นและเติมไซโตไคนินเพียงเล็กน้อย (Wang and Charles, 1991) สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ใช้ ได้แก่ N6 – benzyladenin (BA), kinetin และ N6 – (2-isopentenyl) adenine (2 – iP) แต่ที่นิยมใช้คือ BA เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและราคาถูกที่สุด

ออกซินที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดมีทั้งออกซินธรรมชาติ คือ indole – 3 – acetic acid (IAA) และออกซินสังเคราะห์ คือ α – naphthalene acetic acid (NAA) และ indole – 3 – butyric acid (IBA) ออกซินจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของหน่อ แต่จำกัดการเกิดแคลลัสและตาข้าง

การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนยอดหลังจากเลี้ยงบนอาหารแล้ว พบว่า พืชบางชนิดเจริญเติบโตเร็ว บางชนิดเจริญเติบโตช้าไม่สามารถที่จะคาดคะเนการเจริญเติบโตได้ กล่าวคือ

เนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในขั้นตอนที่ 1 ประมาณ 3 – 24 เดือน และต้องเปลี่ยนอาหาร 4 – 6 ครั้ง จึงจะสามารถย้ายไปเลี้ยงในขั้นตอนที่ 2 ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ในขั้นตอนที่ 2 อาหารที่เลี้ยงจะดัดแปลงโดยเติมไซโตไคนินเพื่อให้เนื้อเยื่อเกิดยอดเป็นจำนวนมาก หรือเกิดแคลลัสและหน่อข้างในพืชบางชนิดสามารถย่นระยะเวลาของขั้นตอนที่ 1 ได้โดยการเปลี่ยนเนื้อเยื่อลงเลี้ยงในอาหารเหลว

วัตถุประสงค์หลักของขั้นตอนที่ 1 ก็คือการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวให้เนื้อเยื่อส่วนยอดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ และเร่งให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเพื่อเพิ่มปริมาณในขั้นตอนที่ 2 ดังนั้นห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งเพื่อการค้าและการวิจัยมักจะผลิตเนื้อเยื่อเก็บไว้โดยจำกัดการเจริญเติบโตหรือให้มีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ หรือเปรียบเสมือนว่ารักษาเนื้อเยื่อให้อยู่ในขั้นตอนที่ 1 ตลอดเวลา เมื่อต้องการขยายปริมาณสามารถนำเนื้อเยื่อเหล่านี้มาขยายในอาหารขั้นตอนที่ 2 ได้ทันที ทำให้ไม่เสียเวลาในการเริ่มต้นเลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่ในขั้นตอนที่ 1 การเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบนี้เรียกว่า mother block

ขั้นตอนที่ 2 การขยายจำนวนหน่อ (Proliferation of axillary shoot)

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการขยายปริมาณจากเนื้อเยื่อส่วนยอด ซึ่งมีทั้งตายอดและตาข้างอาหารวิทยาศาสตร์สำหรับขยายพันธุ์จึงต้องดัดแปลงจากสูตรเดิม โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนินไปทำลายอิทธิพลการข่มตาข้างเพื่อชักนำให้ตาข้างมีการเจริญเติบโตและสามารถตัดขยายได้ ในพืชหลายชนิดสามารถขยายจำนวนได้ 3 – 8 เท่า ต่อระยะเวลา 1 เดือน

งานประจำในขั้นตอนที่ 2 คือการตัดขยายหน่อออกเป็นข้อ ๆ เพื่อขยายปริมาณหรืออาจจะเก็บรักษาเพื่อขยายปริมาณในอนาคต หรือเพื่อการขยายปริมาณเตรียมออกปลูกหรือปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่จะออกปลูก จึงสรุปได้ว่า ในขั้นตอนที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อการขยายปริมาณเพื่อผลิตต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป

ผลกระทบต่อการขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อส่วนยอดและตาข้าง คือ แหล่งที่มาและความสามารถในการปรับตัวของเนื้อเยื่อ พบว่าเนื้อเยื่อส่วนยอดจะมีอัตราการขยายพันธุ์ได้ดีกว่าตาข้าง นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อส่วนหน่อสามารถเกิดตาข้างได้ 2 – 3 เท่า

การเปลี่ยนอาหารและตัดขยายต้นพืชที่เก็บรักษาไว้หรือ mother block เท่ากับเป็นการเริ่มต้นขั้นตอนที่ 2 ใหม่ เมื่อเปลี่ยนอาหารใหม่ต้นพืชจะสามารถขยายพันธุ์ได้ตามปกติของขั้นตอนที่ 2 ในการขยายพันธุ์ปริมาณมากต้นพืชอาจจะมีการกลายพันธุ์ได้บ้างแต่ปริมาณน้อย

มาก (Kurty et al., 1991) พืชบางชนิดสามารถตัดขยายพันธุ์ได้ทุกเดือนตลอดเวลา 8 – 48 เดือน โดยพืชจะไม่กลายพันธุ์ ตรงกันข้ามกับเฟิร์นบางชนิดที่ตัดขยายเพียง 3 ครั้ง ก็จะมีการกลายพันธุ์อย่างมากมาย

การกลายพันธุ์ของพืชขณะที่ทำการขยายพันธุ์มักจะเกิดกับหน่อที่เกิดมาจากแคลลัส ดังนั้นในการขยายพันธุ์จึงหลีกเลี่ยงหน่อที่เกิดจากแคลลัส แต่จะคัดเลือกเฉพาะหน่อที่เกิดจากตา ยอดและตาข้างเท่านั้น จะทำให้ได้ต้นที่ไม่กลายพันธุ์

การเลือกชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินในขั้นตอนที่ 2 ต้องให้เหมาะสมกับ อัตราการเกิดหน่อ ความยาวหน่อ และการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม ถ้าหากใช้ความเข้มข้น สูงเกินความเหมาะสม หน่อที่ได้จำนวนมากจะมีขนาดเล็กเกินไป ในบางครั้งพบว่าการใช้ออกซิน ร่วมกับไซโตไคนินจะทำให้เกิดยอดดีขึ้น ผลอันนี้เรียกว่า synergistic effect (Miller and Skoog, 1985) อย่างไรก็ตามพบว่า การใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนินขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ไซโตไคนินร่วมกับออกซินจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเกิดหน่อ เช่น การใช้ก้าน ช่อดอกของพืชโปกทอง (*Hosta plantaginea*) เลี้ยงในอาหารสูตร Murashig and Skoog (MS) ดัดแปลงโดยเติม NAA และ BA พบว่าเนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสได้ดี (Papachatzzi et al., 1980) ซึ่งจะทำให้ต้นพืชที่ได้จากแคลลัสมีโอกาสกลายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ออกซินร่วมกับ ไซโตไคนินจะทำให้ยอดเจริญสั้นลง ทั้งนี้เนื่องจากจะไปลดอิทธิพลของไซโตไคนินที่ทำให้ความ ยาวยอดเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ต้นพืชที่แข็งแรง ขนาด ความยาวเหมาะสมต่อการผลิตต้นพืชที่สมบูรณ์ คือมีรากในขั้นตอนที่ 3 และพร้อมย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำในขั้นตอนที่ 4

ไซโตไคนินที่ใช้ในการเร่งการเจริญเติบโตของหน่อมีด้วยกัน 3 ชนิด คือ BA ไคนิติน และ 2 – iP แต่ละชนิดล้วนแต่ส่งเสริมการเกิดตาข้าง ที่นิยมใช้กันคือ BA เนื่องจากมีราคาถูกที่สุด และใช้กับพืชได้กว้าง (หลายชนิด) กว่าไซโตไคนินตัวอื่น ๆ ในบางพืชสามารถใช้ BA ในขั้นตอนที่ 2 ได้เป็นอย่างดี แต่จะมีปัญหาในขั้นตอนที่ 4 คือขั้นตอนการออกปลูกในเรือนเพาะชำที่จะทำให้ เปอร์เซ็นต์การรอดของต้นที่ย้ายปลูกต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไคนิตินหรือ 2 – iP (Griffin et al., 1981) ซึ่งผลการใช้ BA แล้วทำให้เปอร์เซ็นต์ในขั้นตอนที่ 4 ต่ำ อาจเนื่องมาจากการทำหน้าที่ ของปากใบที่ผิดปกติ หรืออาจจะมีผลที่สืบเนื่องจากขั้นตอนที่ 2 ทำให้มีผลเสียต่อการเกิดรากใน ขั้นตอนี่ 4

ขั้นตอนที่ 3 ขั้นตอนก่อนการย้ายปลูก (Pretransplant or rooting)

ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนการเตรียมต้นหรือหน่อจากขั้นตอนที่ 2 ซึ่งอาจจะไม่มีรากให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ กล่าวคือ มีอวัยวะต่าง ๆ เช่น ลำต้น ใบ และรากที่แข็งแรงพร้อมที่จะย้ายปลูกในเรือนเพาะชำได้อย่างปลอดภัยในขั้นตอนที่ 4 ซึ่งอาจจะเตรียมได้ดังนี้คือ (1) การยึดตัวของหน่อก่อนการเกิดราก (2) ให้หน่อเดี่ยวหรือกลุ่มเกิดราก (3) ส่งเสริมให้พืชที่เก็บอาหารไว้ที่อวัยวะเกิดการพักตัวด้วยการให้อุณหภูมิต่ำ (4) ทำให้ต้นพืชแข็งแรงก่อนนำออกปลูกเพื่อให้พืชรอดตายสูง บางครั้งอาจจะผลิตต้นพืชหรือยอดในขั้นตอนที่ 2 และย้ายลงปลูกในเรือนเพาะชำเป็นขั้นตอนที่ 3 แทนเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

เนื่องจากขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายสูงคือ ประมาณ 35 – 75 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตต้นพันธุ์ทั้งหมด จึงได้พยายามหาวิธีการขยายพันธุ์ที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนที่ 3 คือเตรียมเพียงขั้นตอนที่ 2 แล้วลงปลูกในเรือนเพาะชำ ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในขั้นตอนที่ 3 ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่า รากที่เกิดในขั้นตอนที่ 3 รากส่วนใหญ่จะมีขนาดใหญ่กว่าปกติทำให้รากเหล่านั้นไม่สามารถทำหน้าที่ได้และจะตายในที่สุด จึงนิยมย้ายพืชออกปลูกก่อนที่พืชเหล่านั้นจะเกิดรากแขนงใหม่

ในพืชบางชนิดที่ไม่สามารถย้ายปลูกได้ในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าลำต้นหรือหน่อสั้น รากไม่สมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องย้ายต้นหรือหน่อเหล่านั้นลงเลี้ยงในขั้นตอนที่ 3 เพื่อให้ลำต้นยืดยาวขึ้น มีรากที่แข็งแรง พร้อมที่จะย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ (Debergh and Maene, 1981) หรืออาจจะแยกหน่อที่เกิดจำนวนมากในขั้นตอนที่ 2 ออกเป็นหน่อเดี่ยว และส่งเสริมให้หน่อยืดตัวยาวขึ้นในขั้นตอนที่ 3 แล้วจึงย้ายออกตัดชำให้เกิดรากในเรือนเพาะชำ ในการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนยอดเกิดรากในขั้นตอนที่ 3 แล้วจึงย้ายออกตัดชำให้เกิดรากในเรือนเพาะชำ ในการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนยอดเกิดรากในขั้นตอนที่ 3 ถ้าเป็นไม้เนื้ออ่อนไม่จำเป็นต้องเติมออกซินลงในอาหาร แต่ถ้าเป็นไม้เนื้อแข็งส่วนมากจะเติมออกซินลงในอาหาร ออกซินที่นิยมใช้ ได้แก่ NAA หรือ IBA การใช้ NAA สามารถเติมลงในอาหารสามารถนั่งฆ่าเชื้อได้ แต่ถ้าเป็น IBA ต้องกรองเอาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีพิเศษ (Ultra filtration) ด้วยเครื่องกรองที่เรียกว่า milipore filter เนื่องจากความร้อนที่สูงจะทำให้ IBA สลายตัว แล้วจึงนำลงไปเติมในอาหารที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วในขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิยังไม่แข็งตัวและจะไม่ทำให้ IBA สลายตัว (decompose) ความเข้มข้นของออกซินที่เติมลงไปจะต้องเหมาะสมกับการเกิดราก โดยคำนึงถึงเปอร์เซ็นต์ที่หน่อเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก กล่าวคือ จำนวนรากและความยาวรากต้องเหมาะสม ทั้งนี้เนื่องจาก ออกซินแต่ละชนิดจะมีผลต่อการเกิดรากที่ไม่เหมือนกัน ขึ้นอยู่กับชนิด

ของพืช เช่น พืชบางชนิดเมื่อได้รับ NAA เกิดรากที่ปกติสามารถย้ายปลูกในเรือนเพาะชำได้ ในขณะที่พืชบางชนิดจะเกิดรากจำนวนมาก ลักษณะของรากอวบสั้นคล้ายแคลลัส ต้นพืชที่มีรากลักษณะนี้เมื่อย้ายปลูกส่วนมากจะตาย ซึ่งถ้าพืชได้รับ NAA แล้วรากที่มีลักษณะผิดปกติควรเปลี่ยนเป็นใช้ IBA แทน (Connor and Thomas, 1981)

ขั้นตอนที่ 4 การย้ายปลูก (Transfer to natural environment)

ความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อเพื่อการขยายพันธุ์ได้จากเปอร์เซ็นต์รอดหลังย้ายปลูกตามสิ่งแวดล้อมธรรมชาติภายในเรือนเพาะชำ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการปรับตัวของต้นพืชต่อสภาพความชื้นต่ำ ความเข้มแสงสูงกว่าสภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อ แม้ว่าการปรับสภาพสิ่งแวดล้อมได้ดี ยังพบว่าอัตรารอดยังต่ำอยู่ ซึ่งกล่าวได้ว่าการนำต้นพืชออกมาปลูกในเรือนเพาะชำค่อนข้างยาก ด้วยเหตุผล 2 ประการด้วยกัน คือ (1) ข้อจำกัดในการสร้างอาหารเองหลังออกปลูกในเรือนเพาะชำ (2) การควบคุมการสูญเสียน้ำยังไม่มีประสิทธิภาพ

สภาพของการเลี้ยงเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น การเติมน้ำตาลลงในอาหาร ปริมาณหรือความเข้มของแสงต่ำ การแลกเปลี่ยนก๊าซน้อย ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงอย่างมากหรือไม่มีการสังเคราะห์แสงเลย ทั้งนี้เนื่องจากสภาพดังกล่าวมานี้เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตได้ กล่าวคือในสภาพพืชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ พืชต้องการสังเคราะห์แสงโดยมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นวัตถุดิบเพื่อให้ได้น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ในสภาพเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อเติมน้ำตาลลงในอาหาร ได้แก่ น้ำตาล sucrose ซึ่งเป็นน้ำตาลเชิงซ้อน (disaccharide) เมื่อได้รับความร้อนจากการเตรียมอาหารก็จะแตกตัวเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) เนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้ได้เลยจึงไม่จำเป็นต้องปรุงอาหาร เพราะฉะนั้นการให้แสงกับเนื้อเยื่อจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนาลักษณะรูปร่าง (morphogenesis) ตามปกติ เมื่อการสังเคราะห์แสงลดลงทำให้การทำงานของเอนไซม์ Pub Pcase ลดลงด้วย ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าในระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้รับอาหารตลอดจนสภาพแวดล้อมต่าง ๆ จึงไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์แสง เมื่อทำการย้ายต้นพืชออกปลูกทำให้สภาพที่ต้นพืชได้รับต่างจากสภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือไม่ต้องสังเคราะห์แสงมาเป็นต้องสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารเองจึงเป็นสาเหตุที่ต้นพืชตายหรือรอดตาย (Preece and Sutter, 1991) การเปลี่ยนแปลงจากการได้รับปัจจัยการเจริญเติบโตจากสภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเป็นสภาพสิ่งแวดล้อมธรรมชาติไม่ได้เปลี่ยนทันทีทันใด ตัวอย่างเช่น ในกะหล่ำปลีจะไม่รับคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จนกว่าหลังจากการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 14 วัน การทำเปลี่ยนแปลงเป็นสภาพพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ คือมีการปรุงอาหารจะเกิดขึ้นกับใบที่

เจริญเติบโตขึ้นมาใหม่หลังจากการย้ายปลูกเท่านั้น ส่วนใบที่เกิดภายใต้การเลี้ยงเนื้อเยื่อจะไม่ปรุงอาหารแต่จะเป็นแหล่งของอาหารและพลังงานต่าง ๆ เพื่อช่วยให้เกิดใบใหม่เสมือนกับว่าเป็นใบเลี้ยงที่เก็บอาหารให้กับใบพืชที่เจริญมาใหม่ การปรับตัวจากสภาพเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเป็นสภาพแวดล้อมธรรมชาติจะไม่เหมือนกันทุกพืช บางชนิดพบว่าสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมธรรมชาติหลังการย้ายปลูก

ลักษณะส่วนประกอบทางกายวิภาคและลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นพืชภายใต้สภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความสามารถในการควบคุมการสูญเสียน้ำหลังจากการย้ายออกปลูกมีจำกัด ลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นเนื่องจากในสภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสร้างไข (wax) น้อย ส่วนของเมโซฟิลล์ (mesophyll) พัฒนาไม่เต็มที่ การทำงานของปากใบ (stomata) ผิดปกติ ท่อน้ำท่ออาหารที่เชื่อมระหว่างยอดกับรากมีน้อย ด้วยข้อจำกัดคุณสมบัติของต้นพืชที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อดังที่กล่าวมาแล้ว สามารถแก้ปัญหาได้โดยการย้ายต้นพืชลงปลูกในวัสดุปลูกที่ระบายน้ำได้ดีและผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว รักษาความชื้นได้ดี ลดความเข้มของแสงและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 20 – 27 องศาเซลเซียส การควบคุมความชื้นอาจจะทำได้โดยใช้กระโจมที่ทำด้วยพลาสติกใส ภาชนะที่ใช้ปลูกอาจจะเป็นตะกร้าหรือถาดเพาะชำ ให้ความชื้นแบบพ่นหมอก วิธีการดังกล่าวทำให้ต้นพืชที่นำออกมาปลูกจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงแต่อาจจะทำให้ต้นพืชโตช้า เนื่องจากอาจจะมีน้ำขังในเครื่องปลูกและอาหารพืชบางส่วนถูกชะล้าง ระยะเวลาในการควบคุมความชื้นประมาณ 1 – 4 อาทิตย์ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช หลังจากนั้นสามารถเพิ่มความเข้มของแสงเพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติ สิ่งที่ควรคำนึงถึงอีกอย่างคือ การย้ายต้นพืชเลี้ยงในกระโจมพลาสติก ซึ่งมีความชื้นสูงต้นพืชอาจจะติดเชื้อได้ จึงควรฉีดยาป้องกันโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเน่าคอดิน (Damping off) หรืออาจจะย้ายต้นกล้าปลูกในตะกร้าแล้วคลุมด้วยถุงพลาสติกใส นอกจากสามารถรักษาความชื้นได้แล้วยังสามารถป้องกันการระบาดของเชื้อโรคได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาอัตราการขยายพันธุ์ของเนื้อเยื่อส่วนยอดไพล
2. เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์รอดตายของต้นไพลที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังการย้าย

ออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มดำเนินการ เมื่อวันที่ 1 ตุลาคม 2550
เสร็จสิ้น เมื่อวันที่ 30 มีนาคม 2552

สถานที่ อาคารปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน
คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

วิธีดำเนินงาน

การวิจัยปีงบประมาณ 2551 แบ่งออกเป็น 2 งานทดลองย่อย คือ

1. การหาอัตราการขยายพันธุ์ เพื่อหาจำนวนหน่อที่เกิดขึ้นใหม่บนเนื้อเยื่อ ส่วนยอดที่ทำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรการดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.5 ppm. (ชลิต และคณะ, 2551) โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อครบทุก 40 วัน ทำการตัดขยายและเปลี่ยนอาหารเป็นจำนวน 3 ครั้ง (120 วัน) นำจำนวนหน่อเฉลี่ยที่เลี้ยงได้ 120 วัน มาเฉลี่ยและคำนวณเพื่อหาจำนวนหน่อที่ได้เมื่อเลี้ยงประมาณ 1 ปี (360 วัน)
2. การหาเปอร์เซ็นต์การรอดตาย โดยนำเนื้อเยื่อส่วนยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 0.5 ppm. (ชลิต และคณะ, 2551) จำนวน 100 ยอด เมื่อเลี้ยงได้เป็นเวลา 30 วัน ทำการย้ายต้นที่ได้ลงเลี้ยงในตะกร้าพลาสติกที่มีวัสดุปลูกประกอบไปด้วย ปุ๋ยคอก ขุยมะพร้าว และแกลบเผา ในอัตรา 1 : 1 : 1 โดยปริมาตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้ หลังจากย้ายต้นกล้าเสร็จแล้วรดน้ำและคลุมตะกร้าด้วยพลาสติกใสเก็บไว้ในเรือนเพาะชำที่พรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน ทำการเปิดพลาสติกคอยสังเกตต้นกล้าที่ย้ายออกปลูก ในตอนบ่ายหากต้นกล้าเหี่ยวให้ปิดพลาสติกใหม่เพื่อควบคุมความชื้น ทำอย่างนี้ติดต่อกันประมาณ 2 – 3 วัน ต้นกล้าก็จะแข็งแรงและสามารถเปิดพลาสติกใสได้ตลอดไป เมื่อย้ายออกปลูกได้ 30 วัน ทำการตรวจนับเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดตายหลังย้ายต้นออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การหาอัตราขยายพันธุ์

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 1.0 ppm. NAA ร่วมกับ 1.5 ppm. BA เป็นเวลา 120 วัน พบว่า

ผลการเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งที่ 1 (40 วัน)

หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดได้ 40 วัน พบว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดเจริญเป็นหน่อเฉลี่ยได้ 2.60 หน่อ (ตารางที่ 1 ภาพที่)

ผลการเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งที่ 2 (80 วัน)

หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดได้ 40 วัน ได้ทำการตัดขยาย ครั้งที่ 1 เปลี่ยนอาหารครั้งแรก พบว่า จากจำนวนหน่อเฉลี่ย 2.6 หน่อ จากนั้นนำเนื้อเยื่อเลี้ยงต่อไปอีก 40 วัน (รวมเป็น 80 วัน) เนื้อเยื่อสามารถเกิดหน่อเฉลี่ยได้ 5.2 หน่อ (ตารางที่ 1) หรือเป็นจำนวน 2 เท่า หรือเนื้อเยื่อที่ตัดขยายแต่ละยอดสามารถเกิดหน่อเฉลี่ยได้ 2 หน่อ นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อบางซ้ำ (Replication) มีการเจริญเพิ่มจำนวนหน่อมากกว่าซ้ำอื่นเป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 1)

ผลการเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งที่ 3 (120 วัน)

หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อ 80 วัน หรือหลังจากการตัดขยายครั้งที่ 2 เปลี่ยนอาหารครั้งที่สอง พบว่า จากจำนวนหน่อเฉลี่ย 5.2 หน่อ จากนั้นนำเนื้อเยื่อเลี้ยงต่อไปอีก 40 วัน (รวมเป็น 120 วัน) เนื้อเยื่อสามารถเกิดหน่อเฉลี่ยได้ 16.2 หน่อ หรือเป็นจำนวน 3.12 เท่า หรือเนื้อเยื่อที่ตัดขยายแต่ละยอดสามารถเกิดหน่อเฉลี่ยได้ 3.12 หน่อ นอกจากนี้ยังพบว่าในการตัดขยายครั้งที่ 3 หรือเลี้ยงได้ 120 วัน เนื้อเยื่อที่เลี้ยงบางซ้ำมีการเจริญเพิ่มจำนวนหน่อมากกว่าซ้ำอื่น ๆ เป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงการเกิดหน่อของไพลบนเนื้อเยื่อส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยเติม NAA เข้มข้น 1 ppm. ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.5 ppm. เป็นเวลา 40, 80 และ 120 วัน

ตัดครั้งที่ \ ยอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	เฉลี่ย
1 (หลังจากเลี้ยง 40 วัน)	3	3	2	2	1	5	3	3	2	2	2.60
2 (หลังจากเลี้ยง 80 วัน)	5	5	11	9	3	12	5	7	2	3	5.20
3 (หลังจากเลี้ยง 120 วัน)	13	9	41	26	4	29	10	17	3	10	16.20

ภาพที่ 1 แสดงการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไพลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA
เข้มข้น 1 ppm. ร่วมกับ BAเข้มข้น 1.5 ppm. เป็นเวลา 40 วัน

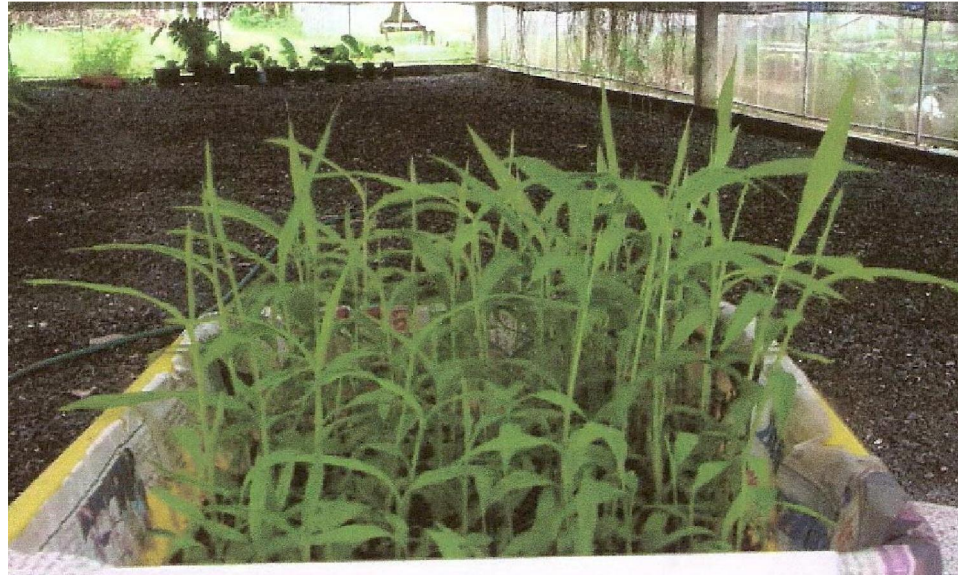


การทดลองที่ 2 เปอร์เซ็นต์การรอดหลังย้ายปลูก

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยเติม NAA เข้มข้น 0.5 ppm. เป็นเวลา 30 วัน และทำการย้ายปลูกในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 30 พบว่า ต้นโพลมี อัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่)



ภาพที่ 2 แสดงการเจริญเติบโตของต้นไพลที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังย้ายออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำเป็นเวลา 30 วัน



วิจารณ์ผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1

การหาอัตราการขยายพันธุ์

อัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไหลที่ตัดขยายและเปลี่ยนอาหารใหม่ครั้งแรก (40 วัน) ครั้งที่สอง (80 วัน) และครั้งที่สาม (120 วัน) มีดังต่อไปนี้

เมื่อตัดขยายจำนวนครั้งที่ 1 (40 วัน)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดไหลบนอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.5 เป็นเวลา 40 วัน พบว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดสามารถเกิดหน่อเฉลี่ยได้ 2.60 หน่อ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่า NAA และ BA ที่เติมลงในอาหารเมื่อรวมกับออกซินและไซโตไคนินที่เนื้อเยื่อผลิตขึ้นมาระหว่างการเจริญต่ำกว่าอัตราสมดุล จึงไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดหน่อจำนวนมาก (ชลิต, 2532) ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อส่วนยอดขึ้นอยู่กับ (1) ขนาดของเนื้อเยื่อนำมาเลี้ยง (2) ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช (3) สารควบคุมการเจริญเติบโต และ (4) ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช (Shabde – Moses and Murashige, 1979)

เมื่อตัดขยายจำนวนครั้งที่ 2 (80 วัน)

หลังจากตัดขยายจำนวนครั้งที่ 1 ได้ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ตัดขยายใหม่อีก 40 วัน รวมเป็นระยะเวลา 80 วัน พบว่า เนื้อเยื่อที่ได้จากการตัดขยายจำนวนครั้งแรกเกิดหน่อเฉลี่ย 2.60 หน่อ สามารถเจริญไปเป็นหน่อเพิ่มขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 5.20 หน่อ จะเห็นได้ว่าเนื้อเยื่อสามารถพัฒนาเป็นหน่อได้เป็นจำนวน 2 เท่า หรือเนื้อเยื่อที่ตัดขยายแต่ละยอดสามารถเกิดหน่อเฉลี่ยได้ 2 หน่อ เมื่อเลี้ยงอีก 40 วัน (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินอยู่ในอัตราที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดที่เรียกว่า synergistic effect คือผลที่ให้ออกซินและไซโตไคนินร่วมกัน (ชลิต, 2532) นอกจากนั้น (George, 1993) ได้กล่าวไว้ว่า การเพิ่มปริมาณต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อจำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อนำมาเลี้ยงบางซ้า มีการเพิ่มจำนวนหน่อมากกว่าซ้าอื่น ๆ เป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 1) ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเนื้อเยื่อเหล่านี้เกิดการกลายพันธุ์ อันเนื่องมาจากการตัดขยายหลาย ๆ ครั้ง (ชลิต, 2532)

เมื่อตัดขยายจำนวนครั้งที่ 3 (120 วัน)

หลังจากการตัดขยายจำนวนครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 80 วัน ได้นำเนื้อเยื่อที่ตัดขยายจำนวนไปเลี้ยงต่ออีก 40 วัน รวมเป็น 120 และเมื่อครบ 120 วัน ได้ทำการตัดขยายจำนวนครั้งที่ 3 พบว่า เนื้อเยื่อสามารถเจริญเป็นหน่อเฉลี่ยได้ 16.2 หน่อ หรือเท่ากับ 3.12 เท่า หรือเนื้อเยื่อที่ตัดขยายแต่ละยอดสามารถเกิดหน่อเฉลี่ยได้ 3.12 หน่อ เมื่อเลี้ยงอีก 40 วัน จะเห็นได้ว่าอัตราการขยายพันธุ์ได้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเนื้อเยื่อมีการสะสมอาหารไว้มากกว่าการตัดขยายครั้งแรก ๆ จึงทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นเนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์ ฟาเรนโดมา จะเจริญเป็นเซลล์เจริญ (meristematic cell) ขึ้นมาใหม่ กระบวนการนี้เรียกว่า redifferentiation จึงเป็นผลทำให้เนื้อเยื่อมีอัตราการเกิดหน่อได้มากขึ้น (ชลิต, 2532) นอกจากนั้นยังพบว่ายังมีบางซ้ำที่เนื้อเยื่อมีการเจริญได้เร็วกว่าเนื้อเยื่อที่เลี้ยงด้วยกัน กล่าวคือสามารถเพิ่มได้เป็นหลายเท่า (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในระหว่างการตัดขนาดจำนวน (ชลิต, 2532)

จากการตัดขยาย 3 ครั้ง ต้องใช้เวลา 120 วัน ดังนั้น หากเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณเกือบ 1 ปี หรือ 360 วัน ต้องทำการตัดขยาย 9 ครั้ง ถ้าหากใช้การตัดขยายครั้งที่ 1 เป็นอัตราการเกิดหน่อต่อ 1 ยอดเริ่มต้น คือ 2.60 หน่อ เป็นตัวคำนวณก็จะสามารถผลิตหน่อไพลได้ 5,426.59 หน่อ ต่อ 360 วัน (ตารางที่ 2) ถ้าหากใช้การตัดขยายครั้งที่ 2 เป็นอัตราการเกิดหน่อต่อยอดของไพลคือ 2 หน่อ เป็นตัวคำนวณก็จะสามารถผลิตหน่อไพลได้ 256 หน่อ ต่อ 360 วัน (ตารางที่ 3) ถ้าหากใช้การตัดขยายครั้งที่ 3 เป็นอัตราการเกิดหน่อต่อยอดของไพล คือ 3.12 หน่อ เป็นตัวคำนวณก็จะสามารถผลิตหน่อไพลได้ 14,941.52 หน่อต่อเนื้อเยื่อ เริ่มต้น 1 ยอด (ตารางที่ 4) ถ้าหากใช้ค่าเฉลี่ยของการตัดขยายทั้ง 3 ครั้งคือ 2.57 หน่อ เป็นตัวคำนวณก็จะสามารถผลิตหน่อไพลได้ 4,887.29 หน่อ ต่อ 360 วัน หรืออาจจะกล่าวได้ว่าอัตราการขยายพันธุ์ไพลมีช่วงกว้างมาก คือ ประมาณ 256 – 14,941.52 หน่อต่อเนื้อเยื่อเริ่มต้น 1 ยอด ต่อระยะเวลา 360 วัน (ตารางที่ 2, 3, 4 และ 5)

ในการตัดขยายแต่ละครั้งยังพบว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดบางซ้ำมีการเกิดหน่อมากกว่าปกติ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเนื้อเยื่อส่วนยอดที่นำมาเลี้ยงได้มาจากการตัดขยายปลอดเชื้อมาหลายครั้งซึ่งอาจจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (ชลิต, 2532)

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไหลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายครั้งแรกเป็นตัวคำนวณ

เวลา (วัน)	ตัดขยายครั้งที่	จำนวนหน่อที่ได้
วันเริ่มต้น	-	1
40	1	2.60*
80	2	$2.60 \times 2.60 = 6.76^{**}$
120	3	$2.60 \times 6.76 = 17.58^{**}$
160	4	$2.60 \times 17.58 = 45.71^{**}$
200	5	$2.60 \times 45.71 = 118.85^{**}$
240	6	$2.60 \times 118.85 = 308.75^{**}$
280	7	$2.60 \times 308.75 = 802.75^{**}$
320	8	$2.60 \times 802.75 = 2,087.15^{**}$
360	9	$2.60 \times 2,087.15 = 5,426.59^{**}$

* จำนวนหน่อเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจริง ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงที่ต่าง ๆ กัน

** จำนวนหน่อเฉลี่ยที่เกิดจากการคำนวณ โดยใช้อัตราการเกิดหน่อเฉลี่ยต่อยอดของไหล เมื่อทำการตัดขยายครั้งที่ 1 คือ 2.60 หน่อต่อยอด

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไหลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายครั้งที่ 2 เป็นตัวคำนวณ

เวลา (วัน)	ตัดขยายครั้งที่	จำนวนหน่อที่ได้
วันเริ่มต้น	-	1
40	1	2.60*
80	2	2**
120	3	$2 \times 2 = 4^{**}$
160	4	$2 \times 4 = 8^{**}$
200	5	$2 \times 8 = 16^{**}$
240	6	$2 \times 16 = 32^{**}$
280	7	$2 \times 32 = 64^{**}$
320	8	$2 \times 64 = 128^{**}$
360	9	$2 \times 128 = 256^{**}$

* จำนวนหน่อเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจริง ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงที่ต่าง ๆ กัน

** จำนวนหน่อเฉลี่ยที่เกิดจากการคำนวณ โดยใช้อัตราการเกิดหน่อเฉลี่ยต่อยอดของไหล เมื่อทำการตัดขยายครั้งที่ 2 คือ 2 หน่อต่อยอด

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไหลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายครั้งที่ 3 เป็นตัวคำนวณ

เวลา (วัน)	ตัดขยายครั้งที่	จำนวนหน่อที่ได้
วันเริ่มต้น	-	1
40	1	2.60*
80	2	5.20**
120	3	16.20**
160	4	$3.12 \times 16.20 = 50.54^{**}$
200	5	$3.12 \times 50.54 = 157.68^{**}$
240	6	$3.12 \times 157.68 = 491.96^{**}$
280	7	$3.12 \times 491.96 = 1,534.92^{**}$
320	8	$3.12 \times 1,534.92 = 4,788.95^{**}$
360	9	$3.12 \times 4,788.95 = 14,941.52^{**}$

* จำนวนหน่อเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจริง ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงที่ต่าง ๆ กัน

** จำนวนหน่อเฉลี่ยที่เกิดจากการคำนวณ โดยใช้อัตราการเกิดหน่อเฉลี่ยต่อยอดของไหล เมื่อทำการตัดขยายครั้งที่ 3 คือ 3.12 หน่อต่อยอด

ตารางที่ 5 แสดงอัตราการเกิดหน่อของเนื้อเยื่อส่วนยอดไหลในระยะเวลา 360 วัน โดยใช้อัตราการตัดขยายเฉลี่ยของการตัดขยายครั้งที่ 1 ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 เป็นตัวคำนวณ

เวลา (วัน)	ตัดขยายครั้งที่	จำนวนหน่อที่ได้
วันเริ่มต้น	-	1
40	1	2.57*
80	2	$2.57 \times 2.57 = 6.60$
120	3	$2.57 \times 6.60 = 16.96$
160	4	$2.57 \times 16.96 = 43.59$
200	5	$2.57 \times 43.59 = 112.03$
240	6	$2.57 \times 112.03 = 287.92$
280	7	$2.57 \times 287.92 = 739.95$
320	8	$2.57 \times 739.95 = 1,901.67$
360	9	$2.57 \times 1,901.67 = 4,887.29$

* จำนวนหน่อเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจริง เมื่อตัดขยายครั้งที่ 1 (2.60 หน่อ) ครั้งที่ 2 (2.00 หน่อ) และครั้งที่ 3 (3.12 หน่อ)

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2

เปอร์เซ็นต์การรอดหลังการย้ายปลูก

การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดไพลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 0.5 ppm. เป็นเวลา 30 วัน และทำการย้ายปลูกในวัสดุที่เตรียมไว้เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นไพลมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากความสมบูรณ์ของต้นไพลก่อนการย้ายปลูก กล่าวคือ ต้นไพลมีขนาดของต้นที่เหมาะสมมีจำนวนรากและความยาวรากเหมาะสม ทำให้ต้นไพลก่อนการย้ายปลูกมีความสมบูรณ์ (Debergh and Maene, 1981) นอกจากนั้นการควบคุมสภาพแวดล้อมหลังการย้ายปลูกก็เหมาะสม กล่าวคือ หลังการย้ายปลูกได้ใช้พลาสติกใสคลุมตะกร้าที่ปลูกพืชไว้เพื่อควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นไพลไม่สูญเสีย น้ำ โดยปกติต้นพืชที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสร้างไข (wax) น้อย ส่วนของเมโซฟิลล์ (mesophyll) พัฒนาไม่เต็มที่ การทำงานของปากใบยังไม่ปกติ ท่อน้ำท่ออาหารที่เชื่อมระหว่างลำต้นกับรากมีน้อย ด้วยข้อจำกัดของคุณสมบัติของต้นพืชที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อดังที่กล่าวมาแล้วสามารถแก้ปัญหาได้โดยย้ายต้นไพลปลูกในวัสดุที่ระบายน้ำได้ดี รักษาความชื้นดี ผ่านการชำเชื้อ ลดความเข้มของแสงและควบคุมอุณหภูมิ (Michael, 1996) การปฏิบัติเหล่านี้จึงมีส่วนทำให้ต้นกล้าไพลมีเปอร์เซ็นต์รอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์หลังการย้ายปลูก

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาอัตราการขยายพันธุ์ไฟลโดยใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 1.0 ppm. ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.5 ppm. พบว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดมีอัตราการขยายพันธุ์ที่กว้างมากคือประมาณ 256 – 1,4941.52 หน่อต่อเนื้อเยื่อ 1 ยอด ซึ่งใช้เวลาทำการขยายพันธุ์ 360 วัน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการคำนวณ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติจะเห็นว่าเนื้อเยื่อส่วนยอดบางซ้าจะมีการเกิดหน่อที่มากกว่าปกติ ดังนั้นจึงควรใช้เนื้อเยื่อส่วนยอดตั้งต้นในการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมาก ๆ และคัดเลือกเฉพาะซ้าที่มีอัตราการขยายพันธุ์สูงมาขยายพันธุ์ต่อไป ส่วนซ้าที่มีอัตราการขยายพันธุ์ต่ำให้คัดทิ้ง นอกจากนั้นยังพบว่าเนื้อเยื่อส่วนยอดเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA เข้มข้น 0.5 ppm. สามารถผลิตต้นไฟลที่สมบูรณ์ได้ดี เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์รอดหลังจากย้ายปลูกถึง 100 เปอร์เซ็นต์



เอกสารอ้างอิง

- ชลิต พงศ์สุภสมิทธิ. 2532. เทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. เชียงใหม่. 146 หน้า (โรเนียว).
- นิตดา เกียรติยิ่งอังสุลี, มนัส หวังหมัด, กมล สวัสดิมงคล และ มงคล โมกษะสมิต. 2522. "การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารสำคัญจากไพล." *วิทยาศาสตร์การแพทย์*. 21(1):13-23.
- รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. **พืชเครื่องเทศและสมุนไพร**. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2529. **ตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- วันดี กุญชรพันธ์. 2538. **สมุนไพรสารพัดประโยชน์**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วัลภา อนินตศานต์. 2520. "สมุนไพรหรือปุ๋ยกับงานวิจัยทางเภสัชวิทยา." *เภสัชกรรม*. 31, 4 (มีนาคม – พฤษภาคม): 31 – 38.
- พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. 2532. **รายงานการวิจัยเรื่อง การสำรวจพืชวงศ์ขิง ในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย**. ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 47 หน้า.
- สมภพ ประธานธรรักษ์. 2543. **ข้อมูลเชิงวิชาการของไพล**. (ระบบออนไลน์). 17 (กุมภาพันธ์): 1-5 แหล่งที่มา <http://www.medplant.mahidol.ac.th> (31 มีนาคม 2544).
- สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537. **ปทุมมาและกระเจียว ไม้ตัดดอกเขตร้อน กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ**. กรุงเทพฯ : กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร.
- Ball, E. (1946). Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus ablus* L. *Am. J. Bot.* 33, 301 – 18.
- Conner, A. J. and M. D. Thomas. 1981. Re-establishing plantlets from tissue culture : a reviews. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 31 : 342 – 357.
- Cutter, E. G. (1965). Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. *Bot. Reb.* 31, 7 – 113.
- Debergh, P. C. and L. J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.* 14:335 – 345.

- Debergh, P. C. and P. E. Read. 1991. **Micropropagation**. In: **Micropropagation Technology and Application**. P. C. Debergh and R. H. Zimmerman, Eds., pp. 1 – 13. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- George, E. F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., London.
- Goodwin, P. B. (1966) **An improved medium for the rapid growth of isolated potato buds**. J. Exp. Bot. 17, 590 – 5.
- Griffis, J. L., Jr., G. Hennen and R. P. Oglesby. 1981. **Establishing tissue – cultured plant in soil**. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 33:618 – 622.
- Kurtz, S., R. D. Hartmann and I.Y.E. Chu. 1991. **Current methods of commercial micropropagation**. In: **Scale-Up and Automation in Plant Propagation**. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 8. I.K. Vasil, Ed., pp. 7 – 34. Academic Press, San Dieg.
- Lloyd, G. and B. McCown. 1981. **Commercially feasible micropropagation of mountain laural, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture**. Intl. Plant Prop. Soc. Proc. 30:421 – 427.
- Loo, S. W. (1945). **Cultivation of excised stem-tips of asparagus in vitro**. Am. J. Bot. 32, 13 – 17.
- Michael, E. K. 1996. **Propagation from preexisting meristems**. Plant tissue culture concepts and laboratory excercises, pp. 61 – 71. New York CRC Press.
- Miller, L. R. and T. Murashige. 1976. **Tissue culture propagation of tropical foliage plants**. In Vitro. 12 : 797 – 813.
- Morel, G. (1960). **Producing virus-free cymbidiums**. Am. Orchid Soc. Bull. 29, 495 – 7.
- _____. (1975). **Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants**. In **Crop genetic resources for today and tomorrow**, ed. O. H. Frankel and J. G. Hawkes, pp. 327 – 32. Cambridge University Press.
- Morel, G., and Martin, G. (1955). **Guérison de pomme de terre atteintes de maladies á virus**. C. R. Acad. Sci. (Paris) 41, 472 – 5.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiol. Plant.* 15:473 – 497.
- Murashige, T. 1974. **Plant propagation through tissue culture.** *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25:135 – 166.
- Murashige, T. (1974b). **Plant cell and organ culture methods in the establishment of pathogen-free stock.** No. 2. A. W. dimock Lectures. Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, N.Y. 26 pp.
- Preece, J.E. and E. G. Sutter. 1991. **Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field.** In: *Micropropagation Technology and Application.* P. C. Debergh and R. H. Zimmerman, Eds., pp. 71 – 93. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Read, P. E. 1988. **Stock plants influence micropropagation success.** *Acta Hort.* 226: 41 – 52.
- Shabde, M. N., and Murashige, T. (1977). **Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem in vitro.** *Am. J. Bot.* 64, 443 – 8.
- Shabde-Moses, M., and Murashige, T. (1979). **Organ culture.** In *Nicotiana. Procedures for experimental use*, ed. R. D. Durbin, pp. 40 – 51. Wa
- Smith R. H., and Murashige, T. (1970). **In vitro development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms.** *Am. J. Bot.* 57, 562 – 8.
- Styer, D.J. and C.K. Chin. 1984. **Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation.** *Hort. Rev.* 5:221-227.
- Wetmore, R. H. (1953). **The use of in vitro cultures in the investigations of growth and differentiation in vascular plants.** *Brookhaven Symp. Biol.* 6, 22 – 40.
- Wetmore, R. H. and Morel, G. (1949). **Growth and development of *Adiantum pedatum* L. on nutrient agar.** *Am. J. Bot.* 36, 805 – 6.
- Wickson, M. and K. V. Thimann. 1958. **The antagonism of auxin and kinetin in apical cominance.** *Physiol. Plant.* 11:62 – 74.
- White, P. R. (1933). **Plant tissue cultures : results of preliminary experiments on the culturing of isolated stem-tips of *Stellaria media*.** *Protoplasma* 19, 97 – 116.