บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย *Croton sublyratus* Kurz เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์เปล้าน้อยให้ได้ต้นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และเพื่อเป็นวัตถุดิบป้อนโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตยา โดยใช้เปล้าน้อยพันธุ์ IBGE 2 ที่ปลูกในแปลงทดลองของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีการวิจัยพบว่ามีปริมาณสารเปลาโนทอลสูง และมีสิ่งเจือปนน้อย (ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และวีระเดช สุขเอียด, 2539) โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS และ MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพวกไซโตไคนินคือ Kn หรือ BA ที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0.5, 1, 5, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ PG 1.62 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (Nemeth, 1986) รวม 10 สูตร พบว่าทุกสูตรสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างเกิดยอดได้ 1 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วน แต่มีบางชิ้นส่วนที่สามารถแตกกิ่งได้ในอาหารที่มีไคเนทิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเพราะไคเนตินมีผลกระตุ้นตาข้างให้เจริญออกมาเป็นกิ่งได้ (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2536)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปล้องในอาหารสูตร MS ที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีของชลิดา เล็กสมบูรณ์ และวีระเดช สุขเอียด (2539) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ โดยเกิดยอด 1-20 ยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 6 ยอดต่อชิ้น ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจาก BA ที่เติมลงไปมีผลในการกระตุ้นการเกิดยอดและการแบ่งเซลล์ และพบว่าในการเพาะเลี้ยงช่วงเริ่มต้น เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นแคลลัสซึ่งสามารถจำแนกแคลลัสที่เกิดขึ้นได้ 2 ชนิดคือ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น (compact callus) เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นตุ่มเล็กสีขาวหรือเหลืองอ่อนจำนวนมากประกอบกันเป็นก้อนแน่น มีการเจริญเติบโตช้า และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์อวบน้ำ เป็นก้อนนิ่มสีเหลืองอ่อนมีน้ำหนักเบา แยกออกจากกันได้ง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งจากการทดลองพบว่าอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปล้องของเปล้าน้อยพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสจนกระทั่งพัฒนาเป็นยอดเป็นการพัฒนาแบบ organogenic

callus โดยอิทธิพลของ BA มีผลทำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสชนิดดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ishioka และ Tanimoto (1990) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Bulgarian rose และในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อยจะพบปัญหา การเกิดสีน้ำตาล (browning) ซึ่งมักพบกับพืชในกลุ่มไม้เนื้อแข็งที่เป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ของสารพวก phenolic compound ซึ่งจะสร้างตรงบริเวณรอยตัดของพืชทำให้อาหารมีสีน้ำตาลและเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืช (Shojwani และ Razdan, 1983)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปล้องในสภาพที่ไม่ให้แสง พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ภายในระยะเวลา 2 เดือน และมีแคลลัสสีขาวหรือเหลืองอ่อนลักษณะเกาะกันแน่น มีความสูงของแต่ละยอดไม่เท่ากัน จึงทำการทดลองเพื่อหาความสูงของยอดที่เหมาะสมในการนำออกสู่สภาพแสงเพื่อให้ได้ยอดที่สมบูรณ์ โดยแปรผันความสูงของยอดแรกก่อนนำออกสู่สภาพแสงเป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เซนติเมตร พบว่าที่ความสูงของยอดในช่วง 1.0-3.0 เซนติเมตร สามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ แต่ถ้ายอดมีความยาวน้อยกว่า 1 หรือมากกว่า 3 เซนติเมตร ยอดจะไม่มีการเจริญเติบโต และไม่พัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ แต่ถ้าเป็นกลุ่มยอดภายใน 1 ชิ้นส่วน และมีความสูงใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 0.5-3.0 เซนติเมตร มาย้ายสู่สภาวะที่มีแสงจะได้ยอดที่สมบูรณ์ ส่วนยอดที่มีความสูงมากเกินไปคือ 4.0-5.0 เซนติเมตร จะได้ยอดที่ไม่สมบูรณ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลานาน ทำให้ลำต้นมีลักษณะยาวเป็นผลให้การเจริญเติบโตลดลง (Murashige, 1977 อ้างถึงใน Shojwani และ Razdan, 1983)

จากการทดลองใช้ชิ้นส่วนปล้องเปล้าน้อยที่มีตำแหน่งต่างกัน คือ ปล้องที่ 1-3 ปล้องที่ 4-7 และปล้องที่ 8-11 พบว่าชิ้นส่วนของปล้องที่ 4-7 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุดเท่ากับ 88.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปล้องที่ 8-11 และปล้องที่ 1-3 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์ และ 26.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปล้องที่ 4-7 เกิดแคลลัสชนิด compact callus มีสีขาวถึงเหลืองอ่อน มีการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากตำแหน่งของชิ้นส่วนปล้องเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Litz, 1993; ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า ชิ้นส่วนปล้องที่ 4-7 จะเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปล้องของเปล้าน้อย

จากการศึกษาฤดูกาลเก็บชิ้นส่วนพืช โดยทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปล้องเปล้าน้อยในแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง เดือนธันวาคม เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนภายในพืช ในแต่ละช่วงการเจริญ พบว่าเปล้าน้อยที่ทำการเพาะเลี้ยงในเดือนพฤษภาคมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากชิ้นส่วนปล้องสูงสุดคือ 85.23 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.8 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลง

มาคือในช่วงเดือนเมษายน มิถุนายน และ กรกฎาคม โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากชิ้นส่วนปล้องเท่ากับ 83.33 เปอร์เซ็นต์, 82.35 เปอร์เซ็นต์ และ 82.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 5.6, 5.5 และ 5.2 ต่อชิ้นส่วนตามลำดับ เนื่องจากในช่วงเดือนพฤษภาคมของทุกปี ภายหลังจากที่เปล้าน้อยออกดอกและเก็บผลในเดือนพฤศจิกายน-มีนาคม จึงเป็นไปได้ว่าต้นเปล้าน้อยจะเริ่มมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น หรือ Vegetative part มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูง และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2536) โดยจะมีการแตกกิ่งและใบใหม่ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บชิ้นส่วนมาเพาะเลี้ยงควรจะอยู่ในช่วงเดือนเมษายน-กรกฎาคม เนื่องจากหลังจากเดือนกรกฎาคมจะเป็นช่วงที่มีฝนตกทำให้เกิดการปนเปื้อน ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการฟอกฆ่าเชื้อและการนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ได้ทำการทดลองเพาเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องของต้นเปล้าน้อยที่ได้จากแหล่งต่างๆ เพื่อดูความจำเพาะของสูตรอาหารโดยใช้เปล้าน้อยที่เก็บรวบรวมไว้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าพันธุ์ IBGE 2 เป็นพันธุ์เดียวที่มีการพัฒนาเป็นยอดได้คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มยอดดังกล่าวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงสามารถพัฒนาเป็นต้นที่มีใบสมบูรณ์ได้ ส่วน TA 1 สามารถเกิดยอดได้ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ยอดมีจำนวนน้อยและไม่แข็งแรง ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ ส่วนต้นเปล้าน้อยที่ได้จากแหล่งอื่นๆ ไม่มีการเกิดยอดโดยชิ้นส่วนของพืชจะเป็นสีน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน แสดงว่าสูตรอาหารนี้เหมาะสมสำหรับพันธุ์ IBGE 2 ซึ่งหากต้องการขยายพันธุ์สายพันธุ์อื่นๆ ควรทำการศึกษาและปรับปรุงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ pecan ของ Hansen และ Lazarte (1984)

การชักนำให้เกิดรากจากยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้อง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ในสภาพที่ไม่ให้แสงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนจึงย้ายออกสู่สภาพที่มีแสง สามารถชักนำให้เกิดรากได้ภายในเวลา 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 26.66 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะผลของการไม่ให้แสงกับชิ้นส่วนยอดมีผลในการเกิดรากของเปล้าน้อยได้ อาจเนื่องจากความมืดมีผลต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต (IAA) กล่าวคือ IAA ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย และไม่เสถียรในสภาพที่มีแสง (Zaerr and Mapes, 1982) สอดคล้องกับรายงานของ Dai *et al.*, (1987) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดของ *Rhododendron prinophyllum* ในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดรากที่มี IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ไม่ให้แสง 1 เดือนแล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่เติม NAA พบว่าจะพัฒนาเป็นแคลลัสปริมาณมากตรง

บริเวณรอยตัดที่สัมผัสกับอาหาร แต่ไม่มีการพัฒนาเป็นราก และในอาหารที่เติม IBA พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง และมีแคลลัสบริเวณรอยตัดเล็กน้อย แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นรากได้

ต้นทุนในการผลิตเปล้าน้อยในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ 28.50 บาท/ขวด/ต้น เมื่อเทียบกับการเพาะเมล็ดซึ่งต้นทุนประมาณ 4 บาท/ต้น อาจจะเสียค่าใช้จ่ายมากกว่า แต่เนื่องจากสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อยรวมทั้งสูตรอาหารยังไม่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณยอดจากยอดที่เพาะเลี้ยงในขวดได้ ซึ่งการเพิ่มปริมาณยอดเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการขยายพันธุ์ในเชิงอุตสาหกรรม จึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงกว่า ดังนั้นถ้าสามารถขยายยอดให้ได้ปริมาณมากได้จะทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง