การชักนำให้ว่านมหาโชคเกิดหัวย่อยขนาดเล็กในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro bulblet formation of Eucharis grandiflora

เยาวพา จิระเกียรติกุล

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาชักนำให้ว่านมหาโชค (*Eucharis grandiflora*) เกิดหัวย่อยขนาดเล็กในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อส่วนของกลีบหัวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ (sodium hypochlorite) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร นาน 30 นาที และ 5% โดยปริมาตร นาน 20 นาที ทำให้ชิ้นส่วนกลีบหัวปลอดเชื้อ และรอดชีวิตมากที่สุด จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงกลีบหัวที่ปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 30 45 หรือ 60 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดหัวย่อย เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้กลีบหัวพัฒนาเป็นหัวย่อยได้ดี แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับจำนวนหัวย่อยที่พัฒนาบนอาหารสูตรอื่นๆ เมื่อนำหัวย่อยที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ IBA ความเข้มข้น 0 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลความเข้มข้น 30 45 60 75 และ 90 กรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มน้ำหนักหัวย่อย เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้หัวย่อยมีน้ำหนักหัวเพิ่มขึ้นสูงสุด และมีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นด้วย

คำสำคัญ : ว่านมหาโชค คลอร็อกซ์ สูตรอาหารเอ็มเอส

Abstract

Bulblet formation of amazon lily (*Eucharis grandiflora*) using aseptic culture technique was investigated. Bulb scale explants were sterilized in clorox® (sodium hypochlorite) at different concentrations and times. The results indicated that sterilization in 10% (v/v) clorox® for 30 minutes and 5% (v/v) clorox® for 20 minutes gave the highest sterilized bulb scales and survival percentage. The sterilized bulb scales were cultured on MS media supplemented with 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l BA and 1.0 mg/l IBA, or 1.0 mg/l BA and 0.5 mg/l IBA and 30, 45 or 60 g/l sucrose. It was found that the *in vitro* bulblets were formed well on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 30 g/l sucrose. However, the number of bulblets were not significantly different among treatments. To increase bulblet weight, the *in vitro*-formed bulblets were cultured on MS media supplemented with 0, 0.5 or 1.0 mg/l IBA and 30, 45, 60, 75 or 90 g/l sucrose for 4 weeks. The best results were obtained when MS media supplemented with 0.5 or 1.0 mg/l IBA and 30 g/l sucrose were used and the *in vitro*-formed bulblets rooted on those media.

Keywords : amazon lily, aseptic culture technique, in vitro – formed bulblets

1. บทนำ

ไม้ดอกประเภทหัวจัดเป็นกลุ่มของไม้ดอกที่นับว่ามีความ สำคัญทางเศรษฐกิจกลุ่มหนึ่ง ไม่ว่าจะนำมาใช้ในการประดับอาคารสถานที่ หรือเป็นไม้ตัดดอก ซึ่งการศึกษาวิจัยทางด้านสรีร วิทยา การปลูก และการขยายพันธุ์ของไม้ดอกประเภทหัวมักจะเน้นที่ไม้ดอกเมืองหนาว เช่น ลิลลี่ (*Lilium*) เนอรีน (*Nerine*) ไฮยาซิน (*Hyacinthus*) นาซีซัส (*Narcissus*) พืชในสกุลหัวหอม (*Allium*) อัสโตรมีเรีย (*Alstroemeria*) แกลดิโอลัส (*Gladiolus*) ไอริส (*Iris*) ทิวลิป (*Tulipa*) และคาล่า ลิลลี่ (calla lily, *Zantedeschia*) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีไม้ดอกประเภทหัวที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนอีกหลายชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและสามารถส่งเสริมให้เป็นไม้หัวส่งออกได้ เช่น เดียวกับปทุมมา (*Curcuma*) ธรรมรักษา (*Heliconia*) ว่านสี่ทิศ (*Hippeastrum*) บัวสวรรค์ (*Zephyranthes*) พลับพลึง (*Crinum*) ว่านมหาลาภ (*Eucrosia*) รวมไปถึงว่านมหาโชค (*Eucharis grandiflora*) ที่ยังไม่ได้รับความสนใจศึกษาในด้านต่างๆ ทำให้ข้อมูลของไม้หัวเหล่านี้ยังมีจำกัด โดยเฉพาะว่านมหาโชคซึ่งเป็นไม้หัวที่มีช่อดอกสวยงาม สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในแง่ของไม้ประดับอาคารสถานที่ เนื่องจากมีใบที่สวยงามเขียวตลอดปี ไม่ทิ้งใบ และเป็นไม้ตัดดอก เนื่องจากช่อดอกยาว (ประมาณ 45 - 70 เซนติเมตร) มีกลิ่นหอม และมีอายุปักแจกันนานถึง 7-10 วัน [1] นอกจากนี้ว่านมหาโชคยังจัดเป็นไม้มงคลโดยเชื่อว่า จะนำโชคลาภมาให้และค้าขายดี ในแง่ของสมุนไพรใช้ทำเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงโลหิต ทำให้ผิวพรรณผุดผ่อง อย่างไรก็ตามว่านชนิดนี้เป็นว่านที่ขยายพันธุ์ได้ช้า เมื่อเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์เดียวกัน โดยทั่วไปมักขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อ [2] ดังนั้นหากส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้า จำเป็นที่จะต้องขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนให้มาก ซึ่งการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถผลิตต้นพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น [3,4] การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านมหาโชคนั้นได้มีการศึกษามาบ้างแล้ว โดย Pierik และคณะ (1987 อ้างโดย [1]) ที่พบว่า IBA มีผลต่อการออกรากและแตกหน่อ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนที่ปราศจากเชื้อรา และแบคทีเรีย การเพิ่มจำนวนหัวขนาดเล็ก และการเพิ่มขนาดหัว ที่มีผลจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาลลงในอาหารเพาะเลี้ยง ดังนั้นการศึกษาการชักนำให้ว่านมหาโชคเกิดหัวย่อยขนาดเล็กในสภาพปลอดเชื้อ จึงเป็นงานวิจัยที่จะทำให้สามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนหัวว่านได้จำนวนมาก นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการขยายพันธุ์ไม้หัวเขตร้อนชนิดอื่นด้วยการเพาะ เลี้ยงเนื้อเยื่อ และเพิ่มศักยภาพในการส่งออกหัวพันธุ์ที่ปลอดจากโรคและแมลงได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ 1. เพื่อศึกษาหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์ที่เหมาะสมกับหัวว่านมหาโชค 2. เพื่อศึกษาผลของชนิด ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการพัฒนาหัวย่อย และการเพิ่มน้ำหนักหัวย่อยว่านมหาโชคในสภาพปลอดเชื้อ

2. วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายคลอร๊อกซ์และระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ

นำหัวว่านมาลอกส่วนเปลือกที่เป็นสีน้ำตาล และสีขาวออก 1-2 ชั้น หัวที่นำมาใช้ในการทดลองต้องเลือกหัวที่สะอาด ไม่มีช่อดอกเก่าและแห้ง หรือมีกลีบหัวที่แห้งและมีสีน้ำตาลค้างอยู่ในหัว นำหัวว่านที่เลือกแล้วมาล้างด้วยสบู่และน้ำสะอาด แช่หัวว่านในเอธิลแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง จากนั้นแช่หัวว่านในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ที่ผสมกับเตตราไซคลิน (tetracycline) 0.75 กรัม นาน 1 ชั่วโมง แล้วลอกกลีบหัวออกอีก 1-2 ชั้น แบ่งหัวว่าน

มหาโชคตามขวางออกเป็น 2 ส่วน นำส่วนที่มีฐานหัว (basal plate) มาทำการทดลอง โดยผ่าแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน นำแต่ละส่วนไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน ดังนี้

วิธีที่ 1 ฟอกด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์เข้มข้น 15% โดยปริมาตร นาน 30 นาทีและ 10% โดยปริมาตร นาน 20 นาที

วิธีที่ 2 ฟอกด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์เข้มข้น 15% โดยปริมาตร นาน 20 นาทีและ 10% โดยปริมาตร นาน 10 นาที

วิธีที่ 3 ฟอกด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์เข้มข้น 10% โดยปริมาตร นาน 30 นาทีและ 5% โดยปริมาตร นาน 20 นาที

วิธีที่ 4 ฟอกด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์เข้มข้น 10% โดยปริมาตร นาน 20 นาทีและ 5% โดยปริมาตร นาน 10 นาที

หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ตัดกลีบหัวของว่านมหาโชคออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่ากัน (กว้างประมาณ 0.6 เซนติเมตร) โดยให้ 1 ชิ้นมีกลีบหัว 2 กลีบ นำชิ้นส่วนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และปรับ pH ของอาหาร ให้ได้ 5.6 ด้วย NaOH 1 N แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ในห้อง ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยในแต่ละ treatment มี 10 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด) บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราและแบคทีเรีย จำนวนชิ้นส่วนที่ตายและเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต

การทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลต่อการเพิ่มจำนวนหัวย่อย

นำหัวย่อยปลอดเชื้อมาผ่าครึ่งตามยาว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 30 45 หรือ 60 กรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 9 สูตรอาหาร แต่ละสูตรอาหารมี 10 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด) นำชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนหัวย่อยที่พัฒนา ระยะเวลาในการพัฒนาหัวย่อยเส้นผ่าศูนย์กลางหัวย่อย และน้ำหนักหัวย่อย

การทดลองที่ 3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลต่อการเพิ่มน้ำหนักหัวย่อย

นำหัวย่อยที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อทั้งหัว ที่มีน้ำหนักประมาณ 45.7-69.1 กรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 45 60 75 และ 90 กรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 15 สูตรอาหาร แต่ละสูตรอาหารมี 10 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด) นำหัวย่อยว่านมหาโชคในสภาพปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงในห้อง ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักหัวย่อยที่เพิ่มขึ้น (มิลลิกรัม) และจำนวนรากที่พัฒนา

3. ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายคลอร๊อกซ์และระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ

จากการนำกลีบหัวว่านมหาโชค มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสาร ละลายคลอร๊อกซ์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน พบ ว่า กลีบหัวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อสารละลายคลอร๊อกซ์แต่ละความเข้มข้น และระยะเวลา ที่ใช้ ยังมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อราและแบคทีเรียค่อนข้างสูง (ตารางที่ 1) โดยการฟอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นของคลอร๊อกซ์ 10% นาน 30 นาที แล้วตามด้วย 5% นาน 20 นาที มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ

60% รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของสารละลายคลอร๊อกซ์ 15% นาน 30 นาที และ 10% นาน 20 นาที มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 50% (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีชิ้นส่วนพืชตายจากการฟอกฆ่าเชื้อ ชิ้นส่วนกลีบหัวที่ตายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล-ดำ ไม่มีการพัฒนาและไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย

การทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลต่อการเพิ่มจำนวนหัวย่อย

จากการทดลองพบว่าจำนวนหัวย่อยที่พัฒนา จำนวนวันในการสร้างหัวย่อย เส้นผ่าศูนย์กลางและน้ำหนักหัวย่อยที่พัฒนาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละสูตรอาหารที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 2) โดยชิ้นส่วนหัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนหัวย่อยที่พัฒนามากที่สุด 1.8 หัว จำนวนวันในการสร้างหัวย่อยจากชิ้นส่วนหัวที่ผ่าครึ่งในสภาพปลอดเชื้อนั้นพบว่า ชิ้นส่วนหัวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร สร้างหัวย่อยได้เร็วที่สุด คือ 16.2 วัน ส่วนชิ้นส่วนหัวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร สร้างหัวย่อยได้ช้าที่สุด คือ 21.4 วัน (ตารางที่ 2) เส้นผ่าศูนย์กลางและน้ำหนักหัวย่อยที่พัฒนา พบว่า มีเส้นผ่าศูนย์กลางหัวอยู่ในช่วง 0.27 - 0.38 เซนติเมตร และหนักประมาณ 29.26 – 58.60 มิลลิกรัม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของการฟอกฆ่าเชื้อกลีบหัวของว่านมหาโชคด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อแตกต่างกัน

ความเข้มข้น (v/v) และระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์	จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียและรา	จำนวนชิ้นส่วนที่ตาย	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต
1. 15% นาน 30 นาที และ 10% นาน 20 นาที	10	5	4	1	50
2. 15% นาน 20 นาที และ 10% นาน 10 นาที	10	2	8	0	20
3. 10% นาน 30 นาที และ 5% นาน 20 นาที	10	6	4	0	60
4. 10% นาน 20 นาที และ 5% นาน 10 นาที	10	3	7	0	30

การทดลองที่ 3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลต่อการเพิ่มน้ำหนักหัวย่อย

หัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตรมีน้ำหนักหัวย่อยเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 53.38 มิลลิกรัม (ตารางที่ 3) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำหนักหัวย่อยที่เพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงหัวย่อยบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 30 45 และ 60 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

น้ำตาลทราย 60 และ 75 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักหัวย่อยเพิ่มขึ้นเท่ากับ 45.86 37.55 36.65 33.95 และ 35.32 มิลลิกรัมตามลำดับ (ตารางที่ 3) หัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติมน้ำตาลทราย 90 กรัมต่อลิตรมีน้ำหนักหัวย่อยเพิ่มขึ้นน้อยสุดเท่ากับ 8.08 มิลลิกรัม นอกจากนี้หัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรมีการพัฒนาของราก โดยหัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุดเท่ากับ 7.6 ราก (ตารางที่ 3) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับจำนวนรากของหัวย่อยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 30 และ 45 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 45 กรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนรากเท่ากับ 7.4 5.8 และ 5.7 รากตามลำดับ จากการสังเกต (ไม่ได้บันทึกข้อมูล) การพัฒนาของใบใหม่นั้นพบว่า หัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงที่ 75 และ 90 กรัมต่อลิตรมีใบเพียง 1 ใบ หรือไม่มีการพัฒนาของใบ ในขณะที่หัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นต่ำมีใบพัฒนาเป็นปกติ 3-4 ใบ

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อกลีบหัวว่านมหาโชค พบว่า มีปัญหาของการปนเปื้อนค่อนข้างมาก เนื่องจากการปลูกพืชหัวมัก

ตารางที่ 2 จำนวนหัวย่อยที่พัฒนา จำนวนวันในการพัฒนาเป็นหัวย่อย เส้นผ่าศูนย์กลางหัวย่อย (เซนติเมตร) และน้ำหนักหัวย่อย (มิลลิกรัม) เมื่อเพาะเลี้ยงหัวย่อยครึ่งหัวในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IBA และน้ำตาลความเข้มข้นต่างกัน

BA (มก./ลิตร)	IBA (มก./ลิตร)	น้ำตาล (กรัม/ลิตร)	จำนวนหัวย่อย	จำนวนวันพัฒนาหัวย่อย	เส้นผ่าศ.ก. หัว (ซม.)	น้ำหนักหัวย่อย (มก.)
0.5	-	30	1.8	17.0	0.35	53.68
0.5	1	30	1.6	16.2	0.36	37.58
1	0.5	30	1.7	19.3	0.27	29.26
0.5	-	45	1.5	19.9	0.37	53.74
0.5	1	45	1.1	19.1	0.38	56.26
1	0.5	45	1.3	17.7	0.38	58.60
0.5	-	60	1.1	21.4	0.38	52.12
0.5	1	60	1.3	16.8	0.35	46.68
1	0.5	60	1.2	17.6	0.35	33.50
	F-test		ns	ns	ns	ns

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 น้ำหนักหัวย่อยที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงหัวย่อยทั้งหัวบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 45 60 75 และ 90 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์

IBA (มก./ลิตร)	น้ำตาล (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักหัวย่อยที่เพิ่มขึ้น (มก.)[1/]	จำนวนราก
0	30	28.72 [bcd]	1.5 [f]
0.5	30	45.86 [ab]	7.4 [ab]
1	30	53.38 [a]	7.6 [a]
0	45	18.39 [cd]	2.0 [ef]
0.5	45	37.55 [abc]	5.8 [abcd]
1	45	31.17 [bc]	5.7 [abcd]
0	60	16.16 [cd]	1.3 [f]
0.5	60	36.65 [abc]	3.7 [cdef]
1	60	33.95 [abc]	5.0 [bcd]
0	75	17.75 [cd]	2.1 [ef]
0.5	75	25.10 [bcd]	3.8 [cdef]
1	75	35.32 [abc]	5.0 [bcd]
0	90	8.08 [d]	1.7 [f]
0.5	90	15.34 [cd]	3.4 [def]
1	90	15.61 [cd]	4.2 [cde]

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ต้องปลูกหรือฝังหัวไว้ใต้ดิน จึงทำให้กลีบหัวเป็นชิ้นส่วนที่ค่อน ข้างสกปรก และเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย นอก จากนี้ว่านมหาโชคเป็นไม้หัวที่มีกลีบหัวซ้อนๆ กันเหมือนหัวหอม แต่ละกลีบที่ซ้อนกันนั้นจึงเป็นส่วนที่สะสมเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ซึ่งจากการทดลองในครั้งแรกๆ (ไม่ได้บันทึกข้อมูล) ใช้หัวว่านที่มีช่อดอกเก่าและแห้ง หรือมีกลีบหัวที่แห้งและมีสีน้ำตาลค้างอยู่ในหัว พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูงมาก หรือปนเปื้อนทั้งหมด ดังนั้นการเลือกหัวว่านที่สะอาดจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเช่นเดียวกับการทดลองขยายพันธุ์หัว *Nerine* ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เลือกใช้หัวที่ยังไม่เคยออกดอกมาก่อน [5] หรือในกระเทียมใช้หัวที่เพิ่งเก็บจากแปลงปลูกมาทำการทดลอง ซึ่งพบว่ามีอัตราการปนเปื้อนลดลง [6] นอกจากนี้ขั้นตอนการทำความสะอาดหัว และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนพืชที่สะอาด ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก็เป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ โดยขั้นตอนการทำความสะอาดหัวว่านมหาโชคในการทดลองนี้ ดัดแปลงจากการทำความสะอาดหัว *Amaryllis belladonna* [7] และว่านสี่ทิศ [8] ซึ่งพบว่าช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ในระดับหนึ่ง

ในการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการขจัดสิ่งสกปรก และเชื้อจุลินทรีย์ออกจากผิวเนื้อเยื่อ [9] สารละลายคลอร๊อกซ์หรือ Sodium hypochlorite (NaOCl) เป็นสารฟอกกำจัดเชื้อ ที่มีประสิทธิภาพดีมากและนิยมใช้มากที่ สุด ความเข้มข้นที่นิยมใช้ประมาณ 5 – 25% (v/v) [10] และระยะเวลาที่ใช้ประมาณ 5 – 30 นาที [9] จากการทดลองพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์ความเข้มข้น 10% นาน

30 นาที และ 5% นาน 20 นาที ชิ้นส่วนกลีบหัวมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุด (60%) แต่หากใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากัน แต่ระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อลดลงพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูงขึ้น หรือหากใช้ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น แต่ระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อเท่ากันพบว่า มีชิ้นส่วนพืชที่ตายจากการฟอกฆ่าเชื้อ แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารละลายคลอร๊อกซ์ที่ใช้นั้นสูงเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับที่รังสฤษดิ์ [9] ได้กล่าวไว้ว่า ประสิทธิภาพของสารฟอกกำจัดเชื้อขึ้นอยู่กับการตอบสนองต่อเวลาและปริมาณของสารที่ใช้ โดยปกติประสิทธิภาพจะมากขึ้นถ้าใช้เวลา และความเข้มข้นของสารมากขึ้น อย่างไรก็ตามหากใช้ในปริมาณที่มากเกินไป หรือระยะเวลานานเกินไปอาจทำอันตรายต่อความมีชีวิตของเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะได้ ดังนั้นในการฟอกกำจัดเชื้อของชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิด จะมีวิธีการฟอกกำจัดเชื้อแตกต่างกันทั้งชนิด และความเข้มข้นของสารฟอกกำจัดเชื้อ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้

เมื่อนำชิ้นส่วนกลีบหัวที่ปลอดเชื้อแล้ว มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดหัวย่อย พบว่า หัวย่อยขนาดเล็กพัฒนาโดยตรงระหว่างกลีบหัวทั้ง 2 กลีบบริเวณ basal plate ซึ่งการพัฒนาในลักษณะดังกล่าวนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับ *Amaryllis belladonna* [7] และ ว่านสี่ทิศ [8] เมื่อขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเป็นพืชในวงศ์ (family) เดียวกัน และมีลักษณะหัวเป็นแบบ true bulb เช่นเดียวกัน [1] BA และ IBA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน และออกซินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่างๆ [11, 12] ในพืชบางชนิดใช้ไซโทไคนินเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอ แต่ในพืชบางชนิดต้องใช้สารทั้ง 2 กลุ่มในสัดส่วนที่เหมาะสม [9, 11, 13] โดย IAA หรือ IBA นิยมนำมาใช้ร่วมกับสารในกลุ่มไซโทไคนินเพื่อชักนำหรือเพิ่มจำนวนยอด [9] ในการศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนหัวย่อยในสภาพปลอดเชื้อครั้งนี้พบ ว่า จำนวนหัวย่อย จำนวนวันในการพัฒนาเป็นหัวย่อย เส้นผ่า ศูนย์กลางหัวย่อย และน้ำหนักหัวย่อย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น มีแนวโน้มทำให้จำนวนหัวย่อยลดลง ซึ่งผลของน้ำตาลต่อการพัฒนาหัวย่อยนี้สอด คล้องกับการทดลองของ De Bruyn และคณะ [7] ที่พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้จำนวนหัวย่อยที่พัฒนาขึ้นใหม่ของ *Amaryllis belladonna* นั้นลดลง โดยความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนหัวของไม้หัวชนิดนี้ คือ ที่ความเข้มข้น 2-3% (20-30 กรัมต่อลิตร)

ในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของ IBA และน้ำตาลต่อการเพิ่มน้ำหนักหัวย่อยนั้นพบว่า น้ำหนักหัวย่อยที่เพิ่มขึ้นนั้นแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของ IBA และน้ำตาลแตกต่างกัน โดยหัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตรมีน้ำหนักหัวย่อยเพิ่มขึ้นสูงสุด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงหัวย่อยบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ส่วนหัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติมน้ำตาลทราย 90 กรัมต่อลิตรมีน้ำหนักหัวย่อยเพิ่มขึ้นน้อยสุด ซึ่งจากการทดลองยังพบว่า หัวย่อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าไม่เติม ทั้งนี้เนื่องจาก IBA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ เมื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช [11, 14] ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้หัวย่อยว่านมหาโชคมีการแบ่งเซลล์มากขึ้น มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น และมีน้ำหนักหัวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามหากไม่คำนึงถึงความเข้มข้นของ IBA หัวย่อยว่านมหาโชคมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น จำนวนใบและรากลดลงตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้น โดยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรมีผลทำให้หัวย่อยว่านมหาโชคมีน้ำหนักมากที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปมีผลต่อ osmotic potential ของอาหารจึงส่งผลต่อการดูดน้ำของชิ้นส่วนพืชได้ [12] แต่หากน้อยเกินไปก็มีพลังงานไม่เพียงพอที่จะสร้างหัวย่อย [16] น้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญในการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพืช ปกตินิยมใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 2 - 3% [9] ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ขึ้น อยู่กับชนิดและอายุของชิ้นส่วนพืช โดยทั่วไปการเจริญเติบโตและการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชนั้นจะเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงความเข้มข้นที่เหมาะสม หลังจากนั้นการเจริญเติบโต และการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชก็จะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น [12] ซึ่งผลการทดลองนี้มีความแตกต่างกับการทดลองของ ภาณุ [15] ที่พบว่า น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ทำให้หัวย่อยลิลลี่มีน้ำหนักมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 หรือ 90 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ในลิลลี่กลุ่ม oriental hybrid พันธุ์ Casablanca พบว่า น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรมีผลต่อการเจริญเติบโตของหัวย่อย ดีกว่าที่ความเข้มข้น 30, 90 และ 120 กรัมต่อลิตร [16]

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปถึงขั้นตอนการผลิตหัวย่อยว่านมหาโชคในสภาพปลอดเชื้อได้ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 หลังจากได้หัวย่อยในสภาพปลอดเชื้อแล้ว ทำการเพิ่มจำนวนหัวย่อยบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และขั้นตอนที่ 2 เพิ่มน้ำหนักหัวย่อย และชักนำให้เกิดรากไปพร้อมกันบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 ลิตร หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงหัวย่อยว่านมหาโชคบนอาหารสูตรดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดรากได้

5. สรุปผลการทดลอง

1. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อหัวว่านมหาโชค ด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์ เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ และรอดชีวิตมากที่สุด คือ ฟอกด้วยสารละลายคลอร๊อกซ์ ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตรนาน 30 นาที และ 5% โดยปริมาตรนาน 20 นาที

2. อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิ-กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้กลีบหัวว่านมหาโชคพัฒนาเป็นหัวย่อยได้ดี

3. อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิ-กรัมต่อลิตร หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้หัวย่อยว่านมหาโชคมีน้ำหนักหัวเพิ่มขึ้นสูงสุด

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2549 ผู้วิจัยขอขอบคุณทางมหาวิทยาลัยที่ให้ทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. ภาณุมาศ ฤทธิไชย อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหา- วิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้คำแนะนำ และแก้ไขงานวิจัยนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบคุณนางสาวนิสา แซ่ลิ้ม ผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยรวบรวมข้อมูล และทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

7. เอกสารอ้างอิง

[1] De Hertogh, A. A. and M. Le Nard, Botanical Aspects of Flower Bulbs, pp. 7-20, In A. A. De Hertogh and M. Le Nard (eds.), The Physiology of Flower Bulbs, Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 1993.

[2] รังว่าน ปากช่อง, ชุมนุมว่านยาและไม้มงคล, โรงพิมพ์รุ่งและการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 263 หน้า, 2524.

[3] อรดี สหวัชรินทร์, เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 48 หน้า, 2542.

[4] ประศาสตร์ เกื้อมณี, เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ, 158 หน้า, 2538.

[5] Custers, J.B.M and J.H.W. Bergervoet, Differences between Nerine hybrids in Micropropagation Potential, Scientia Horticulturae 52: 247-256, 1992.

[6] Seabrook, J.E.A., *In vitro* Propagation and Bulb Formation of Garlic, Can. J. Plant Sci. 74: 155-158, 1994.

[7] De Bruyn, M.H., D.I. Ferreira, M.M. Slabbert and J. Pretorius, *In vitro* Propagation of *Amaryllis belladonna*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 179-184, 1992.

[8] Huang, C.W., H. Okubo and S. Uemoto, Comparison of Bulblet Formation from Twin Scales and Single Scales in *Hippeastrum hybridum* Cultured in vitro, Scientia Horticulturae 42: 151-160, 1990.

[9] รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค, ภาควิชาพืชไร่นา, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า, 2540.

[10] Smith, R, H., Plant Tissue Culture; Technique and Experiment, Academic Press, New York, 231 p., 2000.

[11] Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan, Plant Tissue Culture: Theory and Practice, A Revised Edition, Elsevier, Amsterdam, 767 p., 1996.

[12] Pierik, R. L. M., *In Vitro* Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 348 p., 1997.

[13] บุญยืน กิจวิจารณ์, เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, โรงพิมพ์คลังนาวิทยา, ขอนแก่น, 207 หน้า, 2540.

[14] Razdan, M. K., Introduction to Plant Tissue Culture, 2nd edition, Science Publishers, USA, 375 p., 2003.

[15] ภาณุ เรืองจันทร์, การผลิตหัวย่อยลิลี่ในหลอดทดลอง, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ, 2533.

[16] Han, B. H., B. W. Yae, H. J. Yu and K. Y. Peak, Improvement of in vitro Micropropagation of *Lilium* Oriental Hybrid 'Casablanca' by the Formation of Shoots with Abnormally Swollen Basal Plates, Scientia Horticulturae 103: 351-359, 2005.