การขยายพันธุ์หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) ในสภาพปลอดเชื้อ
In vitro propagation of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.)

ทิพย์สุคนธ์ ทังสุนันท์[1,*], กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์[2]
และกัลทิมา พิชัย[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) ให้ได้จำนวนมากโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 16 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ย 2.89±2.20 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในขณะที่อาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำให้เกิดความยาวยอดเฉลี่ย 5.79±4.36 เซนติเมตร อีกทั้งยังกระตุ้นให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ย 13.59±6.59 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และให้ความยาวรากเฉลี่ยคือ 1.67±1.01 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจำนวนเฉลี่ย 2.81±1.05 แคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด 1.23±1.34 เซนติเมตร

คำสำคัญ: การเกิดราก, แคลลัส, การชักนำให้เกิดยอด, ออกซิน, ไซโตไคนิน

Abstract

The multiplication of *Stevia rebaudiana* Bertoni. by plant tissue culture technique was conducted. *In vitro* nodal segments of *S. rebaudiana* were cultured on 16 various semi-solid Murashige and Skoog (MS) (1962) media supplemented with 0, 0.1, 0.3 and 0.5 mg/l of TDZ and 0, 1, 3 and 5 mg/l of NAA for five weeks. It was found that MS medium with 0.1 mg/l TDZ induced the highest number of shoot tips, with an average of 2.89±2.20 shoots/explant, whereas hormone free MS medium (control) induced the longest shoot, the highest number of roots, and the longest root, with an average of 5.79±4.36 cm, 13.59±6.59 roots/explant, and 1.67±1.01 cm, respectively. Furthermore, the MS medium with 0.5 mg/l TDZ and 1 mg/l NAA provided the highest number of calli, with an average of 2.81±1.05 calli/explant, while the MS medium with 0.3 mg/l of TDZ produced the longest diameter of callus, with an average of 1.23±1.34 cm/explant.

Keywords: rooting, callus, shoot induction, auxin, cytokinin

[1] สาขาการสอนวิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
[*] Corresponding author, E-mail: tip7788@gmail.com

บทนำ

หญ้าหวาน หรือสตีเวีย (Stevia) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stevia rebaudiana* Bertoni. มีถิ่นกำเนิดอยู่ในบราซิล และปารากวัย เป็นพืชที่มีสารสำคัญคือ สตีวิโอไซด์ (Stevioside) สะสมในใบโดยสารดังกล่าวเป็นสารที่มีคุณสมบัติให้รสหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส 250 - 300 เท่า แต่ไม่ทำให้เกิดพลังงาน จึงเหมาะกับผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหญ้าหวานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการแพร่พันธุ์ของแบคทีเรียได้โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ทำให้ฟันผุ อีกทั้งปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ได้อนุญาตให้นำสารสกัดสตีวิโอไซด์ จากหญ้าหวานมาขึ้นทะเบียนเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลได้จึงทำให้หญ้าหวานเป็นที่ต้องการสูงของอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยเกษตรกรเริ่มมีการนำหญ้าหวานเข้ามาปลูกเมื่อปี พ.ศ. 2518 และเขตที่ปลูกกันมากได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน พะเยา แต่ปลูกได้ผลดีที่สุดที่จังหวัดน่าน ซึ่งภาคเหนือเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมในการปลูกหญ้าหวานเนื่องจากพืชชนิดนี้ชอบอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 20-26 องศาเซลเซียส และขึ้นได้ดีเมื่อปลูกในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600-700 เมตร (พิสมัย กุลกาญจนาธร, 2555)

ที่ผ่านมาเกษตรกรมักจะทำการขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยวิธีการเพาะเมล็ด แต่พืชชนิดนี้มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์อันเนื่องมาจากการผสมตัวเองไม่ติด (self-incompatibility) ซึ่งเกิดจากการที่พืชผสมตัวเองตามธรรมชาติ ภายในดอกเดียวกัน ระหว่างดอกภายในต้นเดียวกัน หรือระหว่างต้นที่มียีโนไทป์เหมือนกัน (Miyazaki and Wantenabe, 1974) เป็นเหตุให้เกษตรกรไม่สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้เพียงพอต่อความต้องการในปริมาณมาก ๆ ได้ ดังนั้นเพื่อขยายพันธุ์หญ้าหวานให้ได้ต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสองชนิด คือ Thidiazuron (TDZ) ร่วมกับ Naphthaleneacetic acid (NAA) เนื่องจาก TDZ เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยออกฤทธิ์คล้ายไซโตไคนินและมีผลต่อการเจริญและพัฒนาการต่างๆของพืชในความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับไซโตไคนินตัวอื่น ๆ และสามารถชักนำให้เกิดได้ทั้งยอดจำนวนมาก ตาดอก แคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ในพืชส่วนใหญ่ TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นทั้งในด้านปริมาณสารที่ใช้และผลลัพธ์ที่ได้ (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) และ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มออกซินเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการยืดขยายตัวของเซลล์เร่งการเติบโตของพืชทั้งในส่วนที่เป็นต้นและรากทำให้เซลล์ขยายขนาดได้ง่ายและส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (พีรเดช ทองอำไพ, 2529) ดังนั้นการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดร่วมกันจึงน่าจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าหวานได้ทั้งการกระตุ้นการเกิดยอด เกิดรากและการเกิดแคลลัสงานวิจัยนี้จึงได้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานและเพิ่มจำนวนต้นอ่อนของหญ้าหวานในเวลาอันสั้นรวมถึงใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงและประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคหนึ่งที่ปัจจุบันนิยมนำมาใช้เพื่อช่วยขยายพันธุ์พืชให้ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นและประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดรวมทั้งหญ้าหวานแต่ความสำเร็จในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งในกลุ่มของออกซิน (Auxin) และไซโตไคนิน (Cytokinin) รวมถึงการใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนินการขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นนิยมเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดข้อและใบเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสหรือยอดจำนวนมากบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin) เช่น Kinetin, 6-benzyladenine (BA), Zeatinและ Thidiazuron (TDZ) เป็นต้น จนเกิดเป็นแคลลัสหรือยอด

จำนวนมากแล้วจึงนำแคลลัสไปพัฒนาเป็นต้นอ่อนต่อไป ส่วนยอดที่ชักนำได้นำมาตัดแบ่งเป็นยอดเดี่ยวๆ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (Auxin) เช่น Naphthaleneacetic acid (NAA), Indolebutyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Indoleacetic acid (IAA) เป็นต้น เพื่อชักนำราก มีรายงานวิจัยพบว่า TDZ เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยออกฤทธิ์คล้ายไซโตไคนินและมีผลต่อการเจริญและพัฒนาการต่าง ๆ ของพืชในความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับไซโตไคนินตัวอื่น ๆ และสามารถชักนำให้เกิดได้ทั้งยอดจำนวนมาก ตาดอก แคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ขึ้นกับความเข้มข้น ชิ้นส่วนพืชและชนิดของพืช ในพืชส่วนใหญ่ TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นทั้งในด้านปริมาณสารที่ใช้และผลลัพธ์ที่ได้ (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) และมีการใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ปล้องและข้อของกล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 3 μM ทำให้เกิดยอดจำนวนมากถึง 60% ถ้าใช้ร่วมกับ BA 3 μM ชักนำให้เกิดยอดจำนวน 90% (Le *et al*., 1999) และการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนรองเท้านารี (*Paphiopedilum*sp.) บนอาหารสูตร MS ความเข้มข้นครึ่งเท่าที่เติม TDZ 0.4 μM ร่วมกับ 2,4-D 4.52 μM พบว่าเกิดยอดจำนวนมากถึง 80 % (Chen *et al*., 2002) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนกะเรกะร่อน (*Cymbidium aloifolium*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2.2 μM ทำให้เกิดยอดจำนวน 97.2% และทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ข้อของต้นอ่อนเอื้องสาย (*Dendrobium aphyllum*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 4.5 μM ชักนำให้เกิดยอดจำนวน 98.6% และเมื่อเพาะเลี้ยงข้อของต้นอ่อนเอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 4.5 μM พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวน 95% (Nayak *et al.,* 1997) เช่นเดียวกับการทดลองเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 3.8 ยอด มีความสูงเฉลี่ย 3.96 เซนติเมตร (ไตรรัตน์ ประทิศ, 2555) นอกจากนี้มีรายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในจำนวนที่มากกว่า BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ ตัวอย่างเช่น จากใบของ *Gypsophila paniculata* (Zuker *et al*., 1997) หรือจากปลายยอดของกระเทียม (Mohamed-Yasseen *et al*., 1994) นอกจากนั้นยอดที่ได้จากการชักนำด้วย TDZ จากใบของ Alstroemeria จะเกิดยอดจำนวนมากและยอดพัฒนาได้เร็ว (Lin *et al*., 1997) ในพืชบางชนิด เช่น *Cyclamen pesicum* จะเกิดยอดจำนวนมากเมื่อถูกชักนำด้วย TDZ เท่านั้น จะไม่เกิดยอดเมื่อใช้ไซโตไคนินอื่น ๆ (Karam & Al-Majathoub, 2000) ในพืชบางชนิดเช่น ช้างกระ การใช้ TDZ ร่วมกับ BA ทำให้เกิดยอดจำนวนมากมากกว่าการใช้ TDZ หรือ BA อย่างเดียว ในพืชบางชนิดเช่น *Tiliacordata* ยอดที่ได้จากการใช้ TDZ ร่วมกับ BA มีความยาวกว่ายอดที่ชักนำด้วย TDZ อย่างเดียว (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) เนื่องจาก TDZ จัดอยู่ในกลุ่มไซโตไคนินซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งและการยืดตัวของเซลล์ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของตาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (พีรเดช ทองอำไพ, 2529)

NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มออกซินเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการยืดขยายตัวของเซลล์เร่งการเติบโตของพืชทั้งในส่วนที่เป็นต้นและรากทำให้เซลล์ขยายขนาดได้ง่ายและส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (พีรเดช ทองอำไพ, 2529) มีรายงานที่เกี่ยวข้องได้แก่การเลี้ยงปลายยอด และข้อ ของหญ้าหวานโดยใช้อาหาร MS ความเข้มข้น 1 หรือครึ่งเท่า ที่เติม NAA หรือ IBA พบว่าอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากกว่าความเข้มข้นครึ่งเท่า และอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่าที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด (Miyagawa *et al*., 1986) และการเลี้ยงยอดในสภาพปลอดเชื้อของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ส่วนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ย 11 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (Dheeranupattana *et al.,* 2007)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อหญ้าหวาน

นำเมล็ดหญ้าหวานมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ผสม Tween-20 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้เกิดต้นหญ้าหวานที่ปลอดเชื้อ แล้วทำการย้ายเลี้ยงโดย ตัดส่วนชิ้นส่วนข้อของต้นหญ้าหวาน ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ยอดอ่อนจำนวนมาก จากนั้นทำการแยกยอดอ่อนของหญ้าหวานนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้ยอดหญ้าหวานปลอดเชื้อที่มีขนาดเหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ NAA ต่อการเจริญของชิ้นส่วนข้อหญ้าหวาน

นำต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อมาตัดแต่งชิ้นส่วนข้อให้มีขนาด 1.5 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ บันทึก จำนวนยอด ความสูงของยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนแคลลัส และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส โดยบันทึกผลทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

3. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองทั้งหมดใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomize design) โดยผลการทดลองถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการทดลองและวิจารณ์

การนำชิ้นส่วนข้อหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์แรกของการทดลองทุกชุดการทดลองมีการพัฒนาเกิดยอดใหม่หลังจากนั้นจำนวนยอดและความยาวยอดจะเพิ่มมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 4 ถึง 5 ความยาวของยอดส่วนใหญ่จะไม่เพิ่มขึ้น และบางส่วนจะกลายเป็นแคลลัสยกเว้นสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดทุก ๆ สัปดาห์ และพบว่า ในสัปดาห์ที่ 5 สูตรอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด (2.89±2.20 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 1ก) ในขณะที่อาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด (5.79±4.36 เซนติเมตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1ข) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียวทุกความเข้มข้น จะชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่มีลักษณะของลำต้นที่อวบ โดยความยาวของยอดจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ TDZ เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกันงานวิจัยของ ไตรรัตน์ ประทิศ (2555) ที่รายงานว่า

อาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานเกิดยอดได้เฉลี่ย 3.80 ± 0.39 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชักนำให้ยอดมีความสูงเฉลี่ยสูงสุดคือ 3.26 ± 0.46 เซนติเมตร ทั้งนี้เนื่องจาก TDZ ในระดับความเข้มข้นต่ำๆนั้นสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ ในกลุ่มไซโตไคนินแต่มีผลไปยับยั้งการยืดยาวออกของยอด (Huetteman & Preece, 1993) และมีรายงานว่าอาหารที่เติม TDZ สามารถชักนำให้กล้วยไม้สกุลช้างเกิดยอดใหม่มากที่สุด (กำแพง ศรีวิยะ, 2547) ซึ่งการเติม TDZ ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 1 μM) สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าความเข้มข้นสูง (Sankhla *et al.,* 1996) และจากการทดลองยังพบว่า อาหารสูตรที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA มีแนวโน้มทำให้การพัฒนาความยาวของยอดลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของทั้ง TDZ และ NAA เช่นเดียวกับรายงานของ วราภรณ์ ฉุยฉาย (2552) ว่ายอดที่ได้จากการชักนำของ TDZ มีปัญหาในด้านการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้น้อย ยอดไม่ยืดตัว เช่น ยอดของ *Hedychium coronarium* ที่ได้จากการชักนำโดย TDZ ร่วมกับ NAA ยอดจะสั้น ในขณะที่ยอดที่ได้จากการชักนำด้วย BA ร่วมกับ NAA จะยาวกว่า

การชักนำให้เกิดรากพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานจนถึงสัปดาห์ที่ 5 จะมีเพียง 2 ชุดการทดลองเท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ คือ ชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าจะให้จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ 13.59±6.59 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อและ 1.67±1.01 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 1) รากที่ได้มีลักษณะปกติคือรากยาวเรียวสีเขียวจากโคนปลายรากมีสีขาวรากมีการแตกแขนงและมีขนรากสีขาว (ภาพที่ 1ข) และสูตรอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 4.09±2.34 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1ค) ลักษณะของรากที่เจริญจะอวบสั้นโคนรากมีสีเขียวตรงปลายรากจะมีขนรากสีขาวซึ่งแตกต่างจาก Dheeranupattana *et al.* (2007) รายงานการเพาะเลี้ยงยอดหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ย 11 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อและมีความยาวรากเฉลี่ย 2.13 เซนติเมตร และงานวิจัยของ Chotikadachanarong และ Dheeranupattana (2013) ที่พบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารวุ้น MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด 11.18 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hossain *et al.* (2008) ทำการเพาะเลี้ยงปลายยอด และข้อ ของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองอื่น ๆ ที่พบว่า การชักนำยอดของ TDZ มีปัญหาในด้านการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้น้อยยอดไม่ยืดตัวและออกรากได้ยาก เช่น ยอดของ *Hedychium coronarium* ที่ได้จากการชักนำโดย TDZ ร่วมกับ NAA ยอดจะสั้นและเกิดรากได้ยาก ในขณะที่ยอดที่ได้จากการชักนำด้วย BA ร่วมกับ NAA ยอดยาวกว่าและเกิดรากได้ดีกว่า (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552)

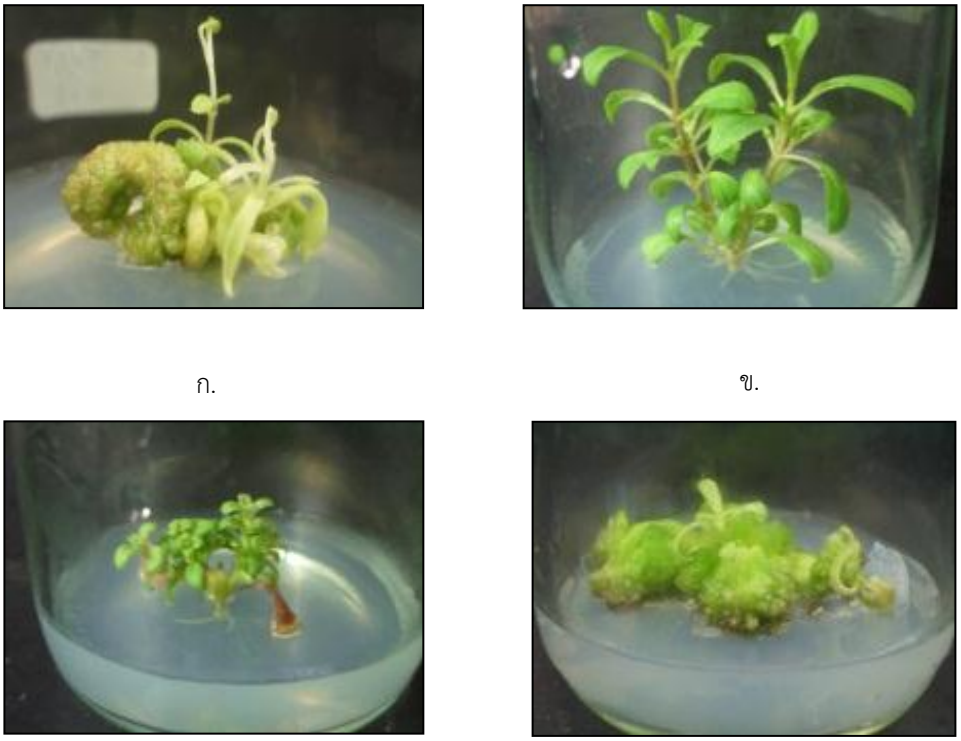
นอกจากนี้ยังพบการเกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้นรวมทั้งสูตรอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสที่แตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในสัปดาห์ที่ 1-2 มีการชักนำให้เกิดยอดและพัฒนาความยาวของยอดได้มาก แต่ในขณะเดียวกันใบที่เจริญจากตาข้างเมื่อสัมผัสกับผิวของอาหารจะเกิดการเจริญไปเป็น compact แคลลัสมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นสีเขียวเข้ม (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1ง) สำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA พบว่าเนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์และขยายขนาดเกิดเป็นแคลลัสภายใน 1-2 สัปดาห์และเจริญมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 5 ในขณะที่ จำนวนยอดและความยาวยอดมีแนวโน้มลดลง ยอดบางส่วนฝ่อและแห้งตายไป ยอดและใบหญ้าหวานบางส่วนเจริญเป็นแคลลัสซึ่งสอดคล้องกับ วราภรณ์ ฉุยฉาย (2552) ที่รายงานว่า TDZ มีผลต่อเมแทบอลิซึมของไซโตไคนินในเซลล์พืชโดยพบว่า TDZ เปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อที่ต้องการไซโตไคนินมาเป็นสภาพที่สร้างไซโตไคนินได้ด้วยตนเอง ตัวอย่างเช่น แคลลัสของ *Phaseoluslunatus* ซึ่งปกติต้องการไซโตไคนินในการเจริญเติบโต สามารถเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มีไซโตไคนินได้หลังจากได้รับ TDZ และยับยั้งการสลายตัวของไซโตไคนิน

จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เติม TDZ และ NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบแคลลัสเจริญบริเวณปลายตัดโคนชิ้นส่วนข้อในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 และ 3 จะเจริญมากขึ้นโดยพบแคลลัสทั้งชนิด friable callus และ compact callus แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็น friable callus ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ สีขาว ซึ่งจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 3 บางส่วนจะตายในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 2.81±1.05 แคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 1) อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว ทำให้เกิดความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย 1.23±1.34 เซนติเมตร (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1ง) การชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นมีปัจจัยหลายอย่าง โดยปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งคือการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ที่รุนแรง เช่น กลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ 2,4-D หรือไซโตไคนิน เช่น TDZ และ BA โดยทั่วไปถ้าใช้ TDZ ความเข้มข้นต่ำจะได้แคลลัสที่แน่น สีเขียว แคลลัสเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเป็นกลุ่มก้อนโดยไม่มีการกำหนดพัฒนา เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม แคลลัสนั้นอาจพัฒนาไปเป็นยอด หรือเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ ขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้และชนิดของพืช (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) ซึ่งแคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นจำนวนมากต่อไปได้ทั้งนี้ อัญชิสาและคณะ (2555) รายงานว่า TDZ เป็นสารประกอบประเภท phenyl urea สามารถช่วยกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ และ TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัส

ตารางที่ 1 จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนแคลลัส และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก (รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ)	ความยาวราก (เซนติเมตร)	จำนวนแคลลัส	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส (เซนติเมตร)
TDZ	NAA						
0	0	2.65±1.22^{ab}	5.79±4.36^{a}	13.59±6.59^{a}	1.67±1.01^{a}	0.00^{i}	0.00^{g}
0.1	0	2.89±2.20^{a}	0.54±0.28^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	2.22±0.67^{abc}	1.05±0.61^{bc}
0.3	0	1.75±1.05^{bcd}	0.53±0.56^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	2.67±1.37^{ab}	1.23±1.34^{b}
0.5	0	1.50±0.62^{cde}	0.66±0.56^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	2.17±1.04^{abc}	1.02±0.53^{ab}
0	1	2.09±0.83^{abc}	0.99±0.65^{b}	4.09±2.34^{b}	0.65±0.40^{b}	0.00^{i}	0.00^{g}
0.1	1	2.70±1.49^{a}	0.55±0.78^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	1.50±0.71^{efg}	0.95±0.47^{abc}
0.3	1	1.00±1.12^{def}	0.16±0.20^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	2.44±1.01^{abc}	0.60±0.29^{def}
0.5	1	0.94±1.12^{def}	0.46±0.60^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	2.81±1.05^{a}	0.74±0.50^{cde}
0	3	1.00±0.94^{def}	0.18±0.24^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	2.30±1.34^{d}	0.79±0.55^{cde}
0.1	3	0.15±0.38^{f}	0.02±0.10^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	1.08±0.49^{gh}	0.59±0.33^{def}
0.3	3	0.20±0.42^{f}	0.07±0.21^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	1.70±0.67^{defg}	0.94±0.33^{abc}
0.5	3	1.61±1.39^{cd}	0.34±0.49^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	1.54±0.88^{defg}	0.62±0.42^{def}
0	5	1.30±0.95^{cde}	0.16±0.22^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	0.60±0.52^{hi}	0.28±0.29^{fg}
0.1	5	0.76±0.97^{def}	0.21±0.27^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	1.94±0.83^{def}	0.80±0.40^{cde}
0.3	5	1.38±1.12^{cde}	0.16±0.12^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	1.23±0.73^{fgh}	0.42±0.33^{ef}
0.5	5	0.53±0.70^{ef}	0.20±0.36^{b}	0.00^{c}	0.00^{b}	1.74±0.65^{defg}	0.79±0.50^{cde}

***หมายเหตุ:** อักษรต่างกันในคอลัมน์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ก. ข.

ค. ง.

รูปภาพที่ 1 การเจริญเติบโตจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน บนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 5 สัปดาห์
ก. TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. อาหาร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
ค. NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สรุปผลการศึกษา

การขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นจากงานวิจัยนี้สามารถทำได้โดยขั้นตอนแรกคือการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงทำการย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ได้ลงบนอาหารชักนำรากคือ อาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช จะทำให้ได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์พร้อมที่จะย้ายออกปลูกได้ต่อไปสำหรับแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถนำไปใช้ในการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก หรืออาจนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 โดยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

กำแพง ศรีวิยะ. (2547). **ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลช้าง.** พิษณุโลก: การค้นคว้าอิสระมหาวิทยาลัยนเรศวร.

ไตรรัตน์ ประทิศ. (2555). **ผลของ Thidiazuron ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน.** เชียงใหม่: โครงการวิจัยปริญญาครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาคณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

พิสมัย กุลกาญจนาธร. (2555). หญ้าหวานจากธรรมชาติเพื่อสุขภาพ. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

พีรเดช ทองอำไพ. (2529). **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์: แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: ไดนามิคการพิมพ์.

วราภรณ์ ฉุยฉาย. (2552). บทบาทของไทเดียซูรอนกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. **วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.** 4 (2), 123-135.

อัญชิสา ปานแก้ว, นงลักษณ์ เทียนเสรี, และสนธิชัย จันทร์เปรม. (2555). **การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากก้านช่อดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสบู่ดำพันธุ์โคราช.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

Chen, T., Chen, J., & Chang, W. (2002). Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of Paphiopedilum orchid. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, 38, 595–597.

Chotikadachanarong, K. & Dheeranupattana, S. (2013). Micropropagation and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Pakistan J. Biol. Sci.**, 16 (17), 887-890.

Dheeranupattana, S., Wangprapa, M., & Jatisatienr, A. (2008). Effect of sodium acetate on Stevioside production of *Stevia rebaudiana*. **Acta. Horticulturae**, 786, 269-272.

Hossain, M.A., Shamimkabir, A.H.M., Jahan, T.A., & Hasan, M.N. (2008). Micropropagation of Stevia. **Int. J. Sustain. Crop Prod.**, 3 (4), 1-9.

Huetteman, C.A. & Preece, J.E. (1993). Thidiazuron a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 33, 105-119.

Karam, N.S. & Al-Majathoub, M. (2000). In vitro shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen pericum* Mill. **Sci. Hort.**, 86, 323–333.

Le, B., Phoung, N.T.H., Hong, L.T.A., & Van K.T.T. (1999). High frequencies shoot regeneration from *Rhynchostylisgigantea* (Orchidaceae) using thin cell layers. **Plant Growth Reg.**, 28, 179-185.

Lin, H.S., De Jeu, M.J., & Jacobson, E. (1997). Direct shoot regeneration from excised leaf explants of in vitro grown seedling of *Alstroemeria* L. **Plant Cell Rep.**, 16, 770–774.

Miyagawa, H., Fujioka, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Taniguchi, K., & Tanaka, R. (1986). Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and Its components; (II). Induction of shoot primordia. **Planta. Med.,** 52 (4), 321-323.

Miyazaki, Y. & Wantenabe, H. (1974). Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; on the propagation of the plant (English abstr.). **Jap. J. Trop. Agric.**, 17, 154-157.

Mohamed-Yasseen, Y., Splittstoesser, W.E., & Litz, R.E. (1997). In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, 36, 243–247.

Nayak, N.R., Rath, S.P., & Patnaik, S. (1997). In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobiumaphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobiummoschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Sci. Hort.**, 71, 243–250.

Sankhla, D., Davis, T.D., & Sankhla, N. (1996). In Vitro regeneration of Silk Tree (*Albizziajulibrissin*) from excised roots. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 44, 83-86.

Zuker, A., Ahroni, A., Shejtman, H., & Vainstein, A. (1997). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophila paniculata* L**. Plant Cell Rep**., 16, 775–778.