อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำเพื่อการขยายพันธุ์หญ้าหวาน

Low Cost Plant Tissue Culture Media for Micropropagation of Stevia rebaudiana Bertoni

วรรธนา จะนู [1], อาจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ [2], อาจารย์ ดาราลักษณ์ เยาวภาคย์โสภณ [2],
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา [3]
[1]นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาการสอนวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ร่วมกับเครื่องดื่มชูกำลัง หรือเครื่องดื่มผสมวิตามิน 3 ชนิด โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน บนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย สารละลายธาตุอาหารปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินชื่อทางการค้า Hydro work (HW) สูตรสำหรับผักสลัด stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 ml/Lน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเติมกระทิงแดง หรือ M 150 หรือ Vitamix v 500 ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 ml/Lรวม 10 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 30 ซ้ำ เพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นสูตร HW ร่วมกับ Vitamix v 500 ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตรต่อลิตรให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ทั้งจำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนรากและ ความสูงของยอด แสดงให้เห็นว่าอาหารวุ้นสูตรดังกล่าว สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์หญ้าหวานได้ด้วยต้นทุนที่ต่ำ และวิธีการเตรียมที่ง่าย เหมาะสมที่จะส่งเสริมให้กับเกษตรกร และชุมชนต่าง ๆ เพื่อใช้ผลิตต้นพันธุ์หญ้าหวานเพื่อการค้าต่อไป

คำสำคัญ : หญ้าหวาน / การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช / อาหารต้นทุนต่ำ / สารละลายธาตุอาหารปลูกพืชไม่ใช้ดิน

Abstract

The efficiency of plant tissue culture media from hydroponics solution with the addition of energy or vitamin drinks for micropropagation of Stevia rebaudiana Bertoni was investigated. The nodal explants of stevia were cultured on the agar media, consisting of 5 ml/L of each stock A and B hydroponics solution “Hydro work (HW)” formula for lettuce, 30 g/L of sucrose supplemented with Red Bull or M 150 or Vitamix V500 at the concentrations of 0, 5, 10 and 15 ml/L. In total were 10 treatments with 30 samples in each treatment. The culture was kept under photoperiod of 16 h light per day at room temperature for 4 weeks. The HW agar medium with 5ml/L of Vitamix v 500 showed the highest growth of plantlets in terms of shoot number, leaf number, root number and shoot height. Therefore, this culture

medium could be useful for micropropagation of stevia with low-cost and simple preparation. It is suitable for promoting to farmers and communities for commercial propagation of stevia.

Keywords: Stevia rebaudiana Bertoni / plant tissue culture / low-cost medium / hydroponics solution

บทนำ

หญ้าหวาน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Stevia rebaudiana Bertoni จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceac มีสาร stevioside เป็นสารให้ความหวาน มีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครสประมาณ 300 เท่า มีแคลอรี่ต่ำมาก เมื่อเทียบกับน้ำตาลทราย ไม่ถูกย่อยให้เกิดพลังงานในร่างกาย คุณสมบัติของสารหวานดังกล่าว มีการนำมาใช้เป็นสารที่ให้ความหวานแทนน้ำตาลทราย ในอาหารและเครื่องดื่มบางประเภท เพื่อลดปริมาณแคลอรี่ เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วน หรือผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งไม่สามารถบริโภคน้ำตาลในปริมาณมากๆได้ ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อนุญาตให้นำสารสกัด stevioside มาขึ้นทะเบียนเป็นสารหวานแทนน้ำตาลได้ ประเทศไทยนำหญ้าหวานเข้ามาปลูกกันมากในเขตภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน พะเยา เนื่องจากหญ้าหวานชอบอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 20-26 องศาเซลเซียส และขึ้นได้ดีเมื่อปลูกในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600-700 เมตร โดยเกษตรกรจะทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด และการปักชำ แต่เนื่องจากพืชชนิดนี้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (Miyazaki and Wantenabe, 1974) และการปักชำเองก็ถูกจำกัดโดยจำนวนของต้นพันธุ์ อีกทั้งยังต้องใช้เวลานาน และยังมีโอกาสที่พืชจะติดเชื้อในเนื้อเยื่ออีกด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการขยายพันธุ์หญ้าหวานให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และได้ต้นพันธุ์ที่แข็งแรงปราศจากโรค Chotikadachanarong and Dheeranupattana (2013) ได้รายงานการขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 mg/Lเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุด 9.31±4.17 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ แต่เนื่องจากการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีต้นทุนในการเตรียมสูงทั้งในด้านของสารเคมี และเครื่องมือต่างๆ อีกทั้งยังมีขั้นตอนการเตรียมที่ซับซ้อน เนื่องจากอาหารสูตร MS นั้นประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดในปริมาณที่แตกต่างกันซึ่งต้องชั่งด้วยเครื่องชั่งสารเคมี อีกทั้งต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงโดยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เป็นเหตุให้เกษตรกรรายย่อย หรือผู้ที่สนใจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีงบประมาณจำกัดไม่สามารถดำเนินการได้สำเร็จ

ปัจจุบันมีการผลิตสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจำหน่ายในรูปแบบของสารละลายเข้มข้นซึ่งหาซื้อได้ทั่วไปในท้องตลาด และมีราคาถูก อีกทั้งยังประกอบด้วยธาตุอาหารจำเป็นสำหรับการปลูกพืช เช่นเดียวอาหารสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทดแทนธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และธาตุเหล็กในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) รวมถึงการใช้เครื่องดื่มชูกำลัง หรือเครื่องดื่มผสมวิตามินเป็นแหล่งของวิตามินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานร่วมกับเทคนิคการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (กิตติศักดิ์, 2556)

เพื่อพัฒนาขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ง่ายขึ้นด้วยต้นทุนที่ต่ำลง และให้เหมาะสมในการนำไปใช้กับโรงเรียนตำรวจตระเวนชายแดนเบญจมะ 1 ซึ่งได้ดำเนินกิจกรรมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อเป็นการปลูกจิตสำนึกแก่เยาวชนให้เห็นคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่นของตนเองในโครงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อมอยู่แล้ว การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน เพื่อที่จะนำไปให้ความรู้ และทดลองส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกหญ้าหวาน เนื่องจากโรงเรียนแห่งนี้มีสภาพภูมิอากาศที่หนาวเย็นตลอดทั้งปี อุณหภูมิเฉลี่ย 23 องศาและมีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,400 เมตร สภาพภูมิประเทศเป็นดอยสูงชัน ป่าสนสลับกับป่าดิบชื้น จึงเหมาะสมแก่การเพาะปลูกหญ้าหวาน อีกทั้งโรงเรียนตำรวจตระเวนชายแดน ซึ่งงานวิจัยนี้จะสามารถพัฒนาเป็นต้นแบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายให้กับโรงเรียนในสังกัดกองบัญชาการตำรวจตระเวนชายแดนและพัฒนาให้เป็นหน่วยงานที่เข้าไปถ่ายทอดความรู้ พัฒนาการศึกษาและฝึกอบรมวิชาชีพให้กับเยาวชน และเกษตรกรในชุมชนและผู้สนใจ ให้สามารถนำความรู้เรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปประยุกต์ใช้ และประกอบอาชีพหลัก และอาชีพเสริมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ร่วมกับเครื่องดื่มชูกำลัง หรือเครื่องดื่มผสมวิตามิน 3 ชนิด ได้แก่ M 150 กระทิงแดง Vita Mix v 500 (กลิ่นน้ำผึ้งมะนาว) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน

ขอบเขตของการวิจัย

1. ขอบเขตด้านเนื้อหา

ศึกษาผลของสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ร่วมกับเครื่องดื่มชูกำลังเอ็มร้อยห้าสิบ (M 150) กระทิงแดง (Redbull) และเครื่องดื่มผสมวิตามินไวต้ามิกซ์ วี 500 (Vitamix V500) ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน จำนวน 10 ชุดการทดลอง ๆ ละ 30 ซ้ำ

2. ขอบเขตด้านตัวแปร

ตัวแปรต้น สูตรอาหารที่เตรียมจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ผสมเครื่องดื่มชูกำลัง หรือเครื่องผสมวิตามิน ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จำนวน 10 ชุดการทดลอง

ตัวแปรตาม การเจริญเติบโตของต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตัวแปรควบคุม ใช้สภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกันทุกชุดการทดลอง ค่า pH ของอาหาร

3. ขอบเขตด้านเวลา

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย 12 เดือน (มกราคม – ธันวาคม 2557)

4. ขอบเขตด้านพื้นที่

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ณ โรงเรียนตำรวจตระเวนชายแดนเฉลิมพระเกียรติฯ บ้านแกน้อย ต.เมืองนะ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ณ โรงเรียนตำรวจตระเวนชายแดนเฉลิมพระเกียรติฯ บ้านแกน้อย ต. เมืองนะ อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่

การทบทวนวรรณกรรม

Ahmed et al. (2007) ชักนำให้เกิดยอดของหญ้าหวานจำนวน 8.75 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 mg/L ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/Lสำหรับการชักนำให้เกิดรากบนอาหารที่เติม IBA, NAA หรือ IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/L สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด (97.66%) จำนวน 12.10 รากต่อยอด จากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้ย้ายออกปลูกในถุงดำ โดยใช้ดินกับปุ๋ยหมักอัตราส่วน 2:1 เป็นวัสดุปลูก และเติมยาฆ่าเชื้อรา Agrason ความเข้มข้น 0.1% แล้วปลูกในที่ร่มเป็นเวลา 15 วัน มีการรอดชีวิต 70%

กิตติศักดิ์ (2556) รายงานผลการใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวเพื่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทดแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอ เพื่อลดต้นทุน โดยการเตรียมอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ร้อยละ 3 โดยมวลต่อปริมาตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.8 ก่อนเติมวุ้น 7 กรัม/ลิตร แล้วนำไปต้มจนเดือดจากนั้นรอจนอุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05 , 0.3 และ 0.5 โดยปริมาตร ลงในอาหารและคนให้เข้ากัน บรรจุในขวดขนาด 4 ออนซ์ ขวดละ 20 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา โดยชุดควบคุมคือสูตรอาหารเดียวกันแต่ใช้หม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำขวดอาหารทั้งหมดไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการใช้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในทุกชุดการทดลอง และเมื่อนำชิ้นส่วนข้อของม่วงเทพรัตน์ (Exacum affine Balf. F. ex Regel) มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาว ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 และ 0.05 โดยปริมาตร พบว่าอาหารที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวร้อยละ 0.01 โดยปริมาตร มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไม่แตกต่างจากชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

พงศ์ยุทธ และคณะ (2551) ศึกษาอาหารดัดแปลงเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราคาต่ำ โดยการใช้ปุ๋ย (สูตร 30-20-10) และเครื่องดื่มบำรุงกำลัง 3 ยี่ห้อ (กระทิงแดง เอ็ม 150 และฉลาม) ทดแทนธาตุอาหารและวิตามิน ทำการทดลองโดยใช้ปุ๋ย 2 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 ml/L และใช้ความเข้มข้นของเครื่องดื่มบำรุงกำลัง

3 ระดับคือ 10 15 และ 20 ml/L เปรียบเทียบกับ MS เสริมด้วย BA 2 mg/L จากการเพาะเลี้ยงต้นกระชายดำบนอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 60 วัน พบว่า จำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอาหารสูตรดัดแปลงที่เสริมด้วย เอ็ม150 10 ml/L ให้ความสูงต้นสูงสุด (8.05 เซนติเมตร) ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลงที่เสริมด้วย เอ็ม150 20 ml/L ให้ความยาวรากมากที่สุด (2.95 เซนติเมตร)

สุกัลยาและคณะ (2549) รายงานการเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากการชักนำโดยเชื้อ Agrobacterium rhizogenes สายพันธุ์ K599 ในอาหารเหลวอย่างง่ายสูตรต่าง ๆ ที่เตรียมจากปุ๋ยเกล็ดการค้า ปริมาณ 2 และ 4 กรัมต่อลิตร ร่วมกับวิตามินสูตร MS วิตามินสูตร B5 และ วิตามินรวมการค้าปริมาณต่าง ๆ เปรียบเทียบกับอาหารเหลวสูตร MS และสูตร MS ที่ใช้วิตามินสูตร B5 โดยทุกสูตรทดลองใช้น้ำตาลซูโครส 3% และปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25±2 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 เดือน โดยเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ทุกเดือนพบว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปุ๋ยเกล็ดการค้าร่วมกับวิตามินรวมทุกความเข้มข้น มีการเจริญเติบโตดีและผันแปรตามปริมาณวิตามินรวมที่ใช้ แต่ Growth Index โดยรวมยังมีค่าน้อยกว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และสูตร MS-B5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root พบว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในปุ๋ยเกล็ดการค้ามีปริมาณสาร plumbagin ต่อน้ำหนักกรัมของน้ำหนักแห้งมากกว่า hairy root ที่ เพาะเลี้ยงในสูตร MS และ MS-B5 เมื่อคำนวณผลผลิตรวมของสาร plumbagin ต่อการใช้อาหาร 1 ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนพบว่าอาหารสูตร MS และสูตร MS-B5 ให้ผลผลผลิตสูงที่สุดคือ 47.14 และ 43.79 มก. ตามลำดับ ส่วนสูตรปุ๋ย 2 ก./ล. ร่วมกับวิตามินสูตร MS ให้ผลผลิตเท่ากับ 43.03 มก. และสูตรปุ๋ย 2 ก./ล. ร่วมกับวิตามินรวม 2 มล.ให้ผลผลิตเท่ากับ 40.34 มก. ซึ่งใกล้เคียงกับสูตร MS และ MS-B5 แต่เมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิตอาหารต่อหน่วยปริมาณสารที่ได้แล้วพบว่า การผลิตโดยใช้ปุ๋ยเกล็ด 2 ก./ล. ร่วมกับวิตามินรวม 2 มล. มีต้นทุนการผลิตสาร plumbagin ต่ำที่สุด

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. การเตรียมขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝา ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ และน้ำยาล้างจาน พึ่งให้แห้ง แล้วนำไปนึ่งในลังถึงด้วยไอน้ำเดือด เป็นเวลานาน 45 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้จนแห้งเพื่อนำไปบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เตรียมอาหารวุ้นจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยเติมน้ำประปาในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตรประมาณ 300 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินชื่อทางการค้า Hydro work (HW) สูตรสำหรับผักสลัด stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มล/ล เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตรเติมเครื่องดื่มชูกำลัง หรือเครื่องดื่มผสมวิตามิน จำนวน 10 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 30 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารวุ้นสูตร HW (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มชูกำลัง M 150 5 ml/L

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มชูกำลัง M 150 10 ml/L
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มชูกำลัง M 150 15 ml/L
ชุดการทดลองที่ 5 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มชูกำลัง กระทิงแดง 5 ml/L
ชุดการทดลองที่ 6 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มชูกำลังกระทิงแดง 10 ml/L
ชุดการทดลองที่ 7 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มชูกำลัง กระทิงแดง15 ml/L
ชุดการทดลองที่ 8 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มผสมวิตามิน vita mix v500 5 ml/L
ชุดการทดลองที่ 9 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มผสมวิตามิน vita mix v500 10 ml/L
ชุดการทดลองที่ 10 อาหารวุ้นสูตร HW + เครื่องดื่มผสมวิตามิน vita mix v500 15 ml/L

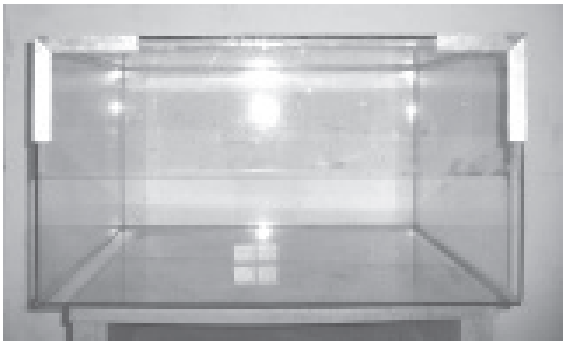
ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำประปา ปรับ pH เป็น 5.7 เติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลายแล้วฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีของ กิตติศักดิ์ (2556) คือ รอจนอุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 คนให้เข้ากัน เทใส่ขวด ปิดฝา

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน

3.1 เช็ดตู้ย้ายเนื้อเยื่อแบบดัดแปลงซึ่งมีลักษณะเป็นตู้กระจกดังภาพที่ 2 ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ให้ทั่ว นำอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ปากคีบ ด้ามมีด ตะเกียง ที่วางหลอดทดลอง (นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนเป็นเวลา 45 นาที) ตะเกียง และขวดใส่แอลกอฮอล์สำหรับจุ่มอุปกรณ์ลนไฟ เข้าจัดเรียงในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

3.2 นำขวดที่บรรจุอาหารแล้ว มาพ่นด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 แล้วเช็ดทำความสะอาดก่อนนำเข้าตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ใช้ปากคีบนำต้นอ่อนหญ้าหวานวางลงบนกระดาษรองตัดเนื้อเยื่อตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานขนาดความยาวประมาณ 1 ซม แล้วนำชิ้นส่วนข้อที่ได้ไปวางลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้

3.3 นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนชั้นวาง ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง ณ โรงเรียนตำรวจตระเวนชายแดนเฉลิมพระเกียรติฯ บ้านแกน้อย ต.เมืองนะ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอด จำนวนใบ ความยาวยอด และจำนวนรากของต้นอ่อนหญ้าหวาน



ภาพที่ 2 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อแบบดัดแปลง

4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยผล

การทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

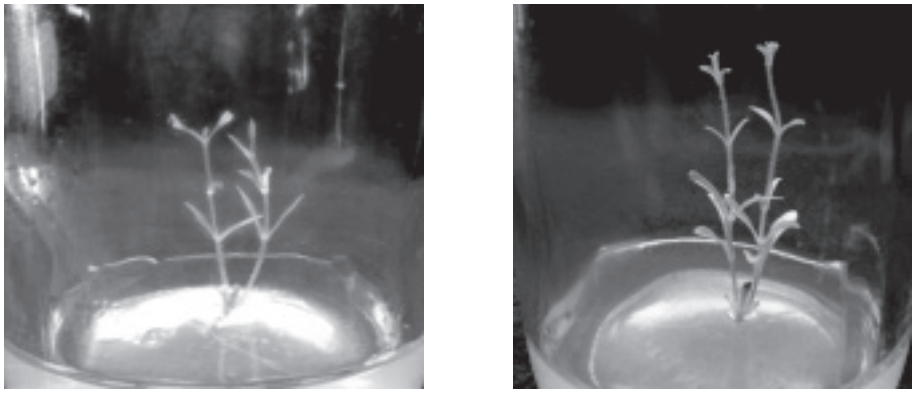
ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารวุ้นที่เตรียมจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน Hydro work (HW) สูตรสำหรับผักสลัด stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 ml/L น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ M 150 กระทิงแดง หรือ Vitamix V500 ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 ml/L รวม 10 ชุดการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าสูตรอาหาร HW, HW+ M150 5 ml/L, HW+Redbull 10 ml/L และ HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 และ 10 ml/Lสามารถชักนำให้ต้นอ่อนหญ้าหวานเกิดยอดจำนวนเฉลี่ยประมาณ 2 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ มากกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ส่วนจำนวนใบเฉลี่ยนั้นพบมากที่สุดในชุดการทดลองซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร HW และ HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 และ 15 ml/L มากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จำนวน 8.38 ± 1.51, 9.04 ± 1.63 และ 9.15 ± 1.95 ใบต่อยอด ตามลำดับ ในขณะที่ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 และ 15 ml/L ชักนำให้ยอดมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ 1.97 ± 0.71 และ 1.78 ± 0.66 ซม นอกจากนี้ยังพบว่าทุกชุดการทดลองสามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยเฉพาะอาหารสูตร HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 ml/L สามารถชักนำให้เกิดรากจำนวนมากที่สุด 2.47 ± 0.36 รากต่อต้น ซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวานโดยรวม พบว่าอาหารสูตร HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 ml/L สามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตได้มากที่สุดทั้งจำนวนยอด จำนวนใบ ความสูงของยอด และจำนวนราก อีกทั้งยังพบว่าลักษณะของต้นอ่อนหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวมีลักษณะที่แข็งแรงสมบูรณ์ ใบสีเขียวเข้ม และใบมีขนาดใหญ่ กว่าชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร HW ที่ไม่เติมวิตามิน (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย และจำนวนรากเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของหญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนยอดเฉลี่ย (ต่อชิ้นเนื้อเยื่อ)	จำนวนใบเฉลี่ย (ต่อต้น)	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนรากเฉลี่ย (ต่อต้น)
HW	1.96 ± 0.34a	8.38 ± 1.51a	1.61 ± 0.28bc	1.13 ± 1.83bc
HW+M150 5 ml/L	2.04 ± 0.55a	5.86 ± 1.98cd	1.40 ± 0.62c	1.27 ± 2.21bc
HW+M150 10 ml/L	1.50 ± 0.51b	5.03 ± 2.08def	0.95 ± 0.32e	0.67 ± 1.30bc
HW+M150 15 ml/L	1.48 ± 0.79b	5.43 ± 1.58cde	0.99 ± 0.34e	0.60 ± 1.61c
HW+Redbull 5 ml/L	1.42 ± 0.50b	6.24 ± 2.13c	0.86 ± 0.34e	0.83 ± 1.53bc
HW+Redbull 10 ml/L	2.00 ± 0.32a	4.73 ± 2.29ef	1.24 ± 0.36e	1.63 ± 0.20bc
HW+Redbull 15 ml/L	1.60 ± 0.50b	4.00 ± 2.15f	0.85 ± 0.39e	0.90 ± 1.81bc
HW+Vitamix V500 5 ml/L	2.00 ± 0.65a	9.04 ± 1.63a	1.97 ± 0.71a	2.47 ± 0.36a
HW+Vitamix V500 10 ml/L	1.96 ± 0.44a	7.80 ± 2.54b	1.69 ± 0.71b	1.77 ± 0.85b
HW+Vitamix V500 15 ml/L	1.72 ± 0.25b	9.15 ± 1.95a	1.88 ± 0.36a	1.23 ± 1.94bc

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันซึ่งอยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



(ก) (ข)

ภาพที่ 3 ต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร HW (ก) และ HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 ml/L (ข)

อภิปรายผลการวิจัย

โดยทั่วไปพืชส่วนมากที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถสร้างวิตามินได้เองแต่มีปริมาณ

ไม่เพียงพอ จึงต้องเพิ่มวิตามินลงในอาหารสังเคราะห์ เพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างปกติ ด้วยเหตุนี้ อาหารสูตร HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 ml/Lสามารถชักนำให้ต้นอ่อนหญ้าหวานมีการเจริญเติบโตได้มากที่สุด เนื่องจาก Vitamix V500 มีส่วนประกอบของวิตามิน เอ, ซี, อี, บี 1, บี 2, บี 6, บี 12, ไนอะซิน, ไบโอทิน, กรดโฟลิค และอาร์จินิน เนื่องจากวิตามินมีหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในกระบวนการต่าง ๆ คือ วิตามินบี 1 (thiamine) ซึ่งจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของอัลฟาคีโตแอซิค วิตามินบี 2 (riboflavin) เกี่ยวข้องกับการสร้าง FAD วิตามินบี 6 (pyridoxine) เกี่ยวข้องกับกระบวนการ เมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน กรดโฟลิค (folic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของวิตามินบี 10 และ บี11 เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม วิตามินซี (ascorbic acid) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ไบโอทิน (biotin) ซึ่งเคยถูกจัดเป็นวิตามิน H เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน-ดีคาร์บอกซิเลชัน (carboxylation-decarboxylation) (ศิวพงศ์, 2546)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวานที่ได้จากงานวิจัยนี้ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 ml/Lพบว่าให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.00 ± 0.65 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และความสูงของยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.97 ± 0.71 ไม่แตกต่างกับงานวิจัยของกิตติศักดิ์ (2556) ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.93±0.21 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และความสูงของยอดเฉลี่ย 2.30±0.46 ซม อย่างไรก็ตามงานวิจัยของกิตติศักดิ์ (2556) ใช้อาหารวิทยาศาสตร์มาตรฐานระดับวิจัย (สูตร MS) ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด โดยเฉพาะสารอาหารรองซึ่งใช้ปริมาณน้อยจึงต้องอาศัยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และใช้น้ำกลั่นที่ได้จากเครื่องกลั่นน้ำ อีกทั้งต้องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ เมื่อคำนวณต้นทุนในการเตรียมอาหารสูตร MS จึงมีการลงทุนที่สูงทั้งในด้านสารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือ (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตร HW+Vitamix V500 ความเข้มข้น 5 ml/L ซึ่งเตรียมโดยสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินซึ่งหาซื้อได้ง่าย และสามารถประยุกต์ใช้ช้อนตวงแทนเครื่องชั่ง สำหรับน้ำตาล (2 ช้อนโต๊ะ ประมาณ 30 กรัม) และวุ้น (2 ช้อนชา ประมาณ 7 กรัม) และใช้น้ำประปาแทนน้ำกลั่น รวมถึงการใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอ เมื่อคำนวณงบประมาณขั้นต่ำในการลงทุนเฉพาะราคาของสารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารทั้งสองสูตรซึ่งคำนวณราคาของสารเคมีที่ต้องใช้ในการเตรียมอาหารสูตร HW เปรียบเทียบกับ อาหารสูตร MS 1 ชุด ราคา ณ วันที่ 3 ตุลาคม 2557 มีต้นทุน 223 และ 22,149 บาท ตามลำดับ และเมื่อคำนวณราคาต้นทุนในการเตรียมอาหารต่อลิตรของอาหารสูตร HW เปรียบเทียบกับอาหารวุ้นสูตร MS มีราคาต้นทุนลิตรละประมาณ 19 และ 28 บาท ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อคำนวณรวมราคาขั้นต่ำของอุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็นต้องใช้ในการเตรียมอาหารแต่ละสูตร คือ เครื่องทำน้ำกลั่น เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง หม้อนึ่งความดันไอแบบใช้แก๊ส และช้อนตวง พบว่าการเตรียมอาหารสูตร MS ต้องใช้งบประมาณในการลงทุนสูงถึง 87,149 บาท ในขณะที่อาหารสูตร HW มีต้นทุนเพียง 237 บาท (ตารางที่ 2) โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานสามารถใช้ตู้ย้ายเนื้อเยื่อแบบดัดแปลงซึ่งมีราคาถูก และสามารถทำการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิห้องปกติได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้ห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศ

ตารางที่ 2 คำนวณราคาขั้นต่ำของสารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารวุ้นสูตร HW และ MS ณ วันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2557

		HW		MS	
		ราคาต่อชุด	**ราคาต่อการเตรียมอาหาร 1 ลิตร**	**ราคาต่อชุด**	**ราคาต่อการเตรียมอาหาร 1 ลิตร**
สารเคมี บาท	สารเคมี	120	1.20	22,066	10.174
	น้ำตาล 1 kg	23	0.70	23	0.70
	วุ้น 25 g	60	17.00	60	17.00
	ไฮเตอร์ 600 ml	20	0.0003	-	-
	รวม	**223**	**18.9003**	**22,149**	**27.874**
เครื่องมือ บาทต่อหน่วย	หม้อนึ่งความดันไอ	-		10,000	
	เครื่องกลั่นน้ำ	-		21,000	
	เครื่องชั่ง	-		34,000	
	ช้อนตวง	14		-	
	รวม	**14**		**65,000**	
ราคารวม (บาท)		**237**		**87,149**	

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการเผยแพร่เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานต้นทุนต่ำที่ได้จากงานวิจัยนี้ เพื่อเป็นแนวทางในการส่งเสริมกลุ่มเกษตรกรให้สามารถขยายพันธุ์หญ้าหวานเป็นอาชีพหลัก และอาชีพเสริมต่อไป

2. ควรมีการศึกษาหาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการเกษตรซึ่งมีราคาถูก และมีฤทธิ์กระตุ้นการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 โดยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2556). **ผลของน้ำยาฟอกผ้าขาวต่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อม่วงเทพรัตน์.** Rajabhat Journal of Science, Humanities & Social Science. 14(2), 34-43.

กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2556). **ผลของไทเดียซูรอนต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน.** ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 10, 2232-2239.

พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง อภิชาติ ชิดบุรีและยุทธนา เขาสุเมรุ. (2551). **ศักยภาพของสารทดแทนธาตุอาหารและวิตามินในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร.** 39(3), 528-531.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. (2546). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** อุดรธานี: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

สุกัลยา ศิริฟองนุกูล เพชรรัตน์ จันทรทิณ และเสริมศิริ จันทร์เปรม. (2549). **สูตรอาหารอย่างง่ายสำหรับเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงเพื่อผลิตสารพลัมบากิน.** วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37 (3), 249-256.

Ahmed, B. M., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A., Hannan, M.M., Sultana, R., Hossain, M. & Islam, R. (2007). **An Efficient Method for in vitro Clonal Propagation of a Newly Introduced Sweetener Plant (Stevia rebaudiana Bertoni.) in Bangladesh.** American-Eurasian Journal of Scientific Research. 2(2), 121-125.

Chotikadachanarong K. & Dheeranupattana S. (2013). **Micropropagation and acclimatization of Stevia rebaudiana Bertoni.** Pakistan Journal of Biological Sciences. 16(7), 887-890.

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.