



Research Article

Effect of cultural conditions on regeneration of *Molineria latifolia* (Drayand. Ex. W. T. Aiton) Herb ex. Kurz.

ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของเนื้อเยื่อในวุ้นสากเหล็ก (*Molineria latifolia* (Drayand. Ex. W. T. Aiton) Herb ex. Kurz.)

วาสนา แผลติตะ^{1*}, สุจิตรา เจาะจง¹, ภาวิณี ท้าวเพชร¹ และอินทร์ธวัช ศรีบุตตะ¹

Wasana Phlaetita^{1*}, Sujitar Jorjong¹, Pawinee Taopetch¹ and Indhus Sributta¹

¹สาขาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร 205 หมู่ 10 ต.แร่ อ.พังโคน จ.สกลนคร 47160

*Department of Plant Science Faculty of Natural Resources Rajamangala University of Technology ISAN Sakon Nakhon campus, 205 Moo 10, Rae, Phangkon, Sakon Nakhon 47160

Article Info

Received 3 April 2025

Revised 16 December 2025

Accepted 22 December 2025

Abstract

The objective of this experiment was to study the effect of culture conditions on regeneration system of *Molineria latifolia* (Drayand. Ex W.T.Aiton) Herb ex. Kurz by tissue culture. The experiment was designed by factorial in CRD with 3 replications of 3 experiments, 1) Determination of antibiotics for sterilization 2) Examination of medium and light conditions for plant regeneration and 3. Effect of plant growth regulators on plant regeneration. The results showed that 1) MS medium with 10 mgL⁻¹ meropenem gave the survival explant and inhibited bacteria in explant. 2) Liquid medium gave the survival explants higher than solid medium at 78 and 67%, respectively and dark condition also gave the survival explant higher than light condition at 78 and 11%, respectively. 3) In the culture on medium that added only auxin or cytokinin any regenerated. However, in the medium that added auxin and cytokinin (0.1 mgL⁻¹NAA and 1.0 mgL⁻¹BA or TDZ) with activated charcoal gave survival and induced to calli higher than others condition. In these experiments, these conditions could be used to regenerate the calli for *Molineria latifolia* (Drayand. Ex W.T.Aiton) Herb ex. Kurz and Arecacae.

Keywords: *Molineria latifolia* (Drayand. Ex W.T.Aiton) Herb ex. Kurz, Plant Growth Regulators, tissue culture

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยการเพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของวุ้นสากเหล็ก การทดลองถูกออกแบบโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในรูปแบบแฟกทอเรียล จำนวน 3 ขั้ว ประกอบด้วย 3 งานทดลอง 1) การทดสอบการใช้สารปฏิชีวนะต่อการฟอกฆ่าเชื้อ

2) ชนิดของอาหารสังเคราะห์และปัจจัยการให้แสงต่อการพัฒนาขึ้นเนื้อเยื่อ และ 3) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาขึ้นเนื้อเยื่อ ผลการทดลองพบว่า 1) อาหารสังเคราะห์ที่เติมสารปฏิชีวนะ (Meropenem) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยงได้ 2) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีอัตราการรอดมากกว่าอาหารกึ่งแข็งคิดเป็นร้อยละ 78 และ 67 ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีแสงมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการให้แสงปกติคิดเป็นร้อยละ 78 และ 11 ตามลำดับ 3) การเพาะเลี้ยงขึ้นเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่มีเพียงออกซิน หรือไซโตไคนินเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ แต่การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ 0.1 mgL^{-1} NAA และ 1.0 mgL^{-1} BA หรือ TDZ ในอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม activated charcoal ร่วมด้วยสามารถทำให้อัตราการรอด และมีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้

คำสำคัญ: วานสากเหล็ก, สารควบคุมการเจริญเติบโต, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. บทนำ

วานสากเหล็กเป็นไม้ล้มลุก มีถิ่นกำเนิดในจังหวัดสระบุรี จัดเป็นไม้ป่าล้มลุกมากในทางตอนใต้ของประเทศไทย จนถึงเกาะบอร์เนียวมาเลเซีย แต่ในขณะที่ในภาคอื่นของประเทศไทยยังพบน้อย วานสากเหล็กเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลากหลาย และช่วยในการถอนพิษไข้ กระจายโลหิต แก้ฟกช้ำ เนื่องจากมีสารแอลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบหลัก ทั้งนี้ยังเป็นแหล่งต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งด้วย [2] [8] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านทานเชื้อแบคทีเรีย [2] ในการใช้ประโยชน์ด้านผิวพรรณและความงาม ด้วยการนำมาใช้ผสมกับเหล้าขาวเพื่อลดอาการผื่นบนใบหน้าและลอกผิวทำให้หน้าขาวได้อีกด้วย [5] ทั้งนี้ในประเทศไทยมีแนวโน้มในการใช้สมุนไพรสูงเพิ่มมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นทางเภสัชวิทยาที่นำมาใช้ร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบัน และผลิตภัณฑ์ความงาม อาหารเสริมบำรุงร่างกาย วานสากเหล็กยังมีการนำมาใช้ประโยชน์จากธรรมชาติ จึงควรศึกษาแหล่งขยายพันธุ์เพื่อให้ใช้ประโยชน์ในทางธุรกิจให้หลากหลายประเภทมากขึ้น และไม่เป็นการเบียดเบียนธรรมชาติยังเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชไว้ได้อีกทางหนึ่ง

อนึ่งในภาคอีสานยังพบบานสากเหล็กมีปริมาณน้อย การเพิ่มปริมาณให้เพียงพอต่อการใช้งาน จึงเป็นสิ่งที่ควรจัดเตรียมไว้ ถึงแม้ว่าสามารถขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อและเมล็ด แต่การขยายให้ได้ปริมาณมากและปราศจากโรคนั้น เป็นสิ่งจำเป็นต่อการเพาะปลูก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ การนำชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ มีการควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่ต้องควบคุมให้มีความเหมาะสมในสภาพปลอดเชื้อ แต่การเพาะเลี้ยงพืชตระกูลปาล์มที่มีการเจริญเติบโตภายใต้สภาพความชื้นมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อกลุ่มแบคทีเรียตามลำท่อน้ำเลี้ยงจึงเป็นอุปสรรคกีดขวางการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เจริญเติบโตจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกระบวนการขึ้นต้นคือ การฟอกฆ่าเชื้อ แต่การพบจุลินทรีย์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ที่อยู่ตามราก ลำต้น หรือใบ [11] อาจจะมีผลต่อการนำเนื้อเยื่อเข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยง การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยการใช้สารยับยั้ง เช่น meropenem [14] จากนั้นจึงนำเข้าสู่ปัจจัยการเพาะเลี้ยงจากสารควบคุมการเจริญเติบโต [15] ก่อนการชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนและออกสู่กระบวนการเลี้ยงแบบธรรมชาติจึงเป็นการเพิ่มศักยภาพการเจริญเติบโตและขยายเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้แล้วยังมีการชักนำต้นของ *Tupistra albiflora* K. Larsen ที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวด้วยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตระหว่างไซโตไคนินและออกซินร่วมกันจากต้นอ่อน [9] ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชยังคงมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาขึ้นเนื้อเยื่อพืช

ในงานวิจัยนี้จึงนำวสาสนาหลักเป็นพืชตัวอย่างของกลุ่มสมุนไพรตระกูลปาล์มนำมาศึกษาปัจจัยการเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ส่งผลต่อการเจริญและพัฒนาเนื้อเยื่อของวสาสนาหลัก เพื่อนำเป็นแนวทางในการขยายต้นพันธุ์และยังนำวิธีการที่สำเร็จครั้งนี้ไปปรับปรุงใช้ในพืชชนิดอื่นในตระกูลเดียวกันต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ การใช้สารยับยั้งแบคทีเรีย และสภาวะการเพาะเลี้ยง
2. เพื่อศึกษาการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. วิธีการศึกษา

พืชศึกษา : นำส่วนยอดอ่อน (ส่วนเจริญจากไหลของต้น) นำมาฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 1-2 หยด แล้วตั้งบนเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำกาบใบที่ติดมากับชิ้นส่วนออก ให้เหลือเพียงต้นอ่อนข้างใน นำมาตัดแบ่งขนาด 0.8 ซม. จากนั้นจึงนำไปวางบนอาหารวุ้นกึ่งแข็งสำหรับงานทดลอง

อาหารเพาะเลี้ยง จัดเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 30 gL^{-1} ปรับค่า pH ที่ 5.7 เติมน้ำ 8 gL^{-1} เป็นอาหารสังเคราะห์พื้นฐานที่ใช้ในการทดลอง โดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ จากนั้นเทลงในขวดทดลองขวดละ 40 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาปล่อยให้เย็นจึงนำไปใช้สำหรับงานทดลอง

การทดลอง แบ่งออกเป็น 3 งานทดลองได้แก่

1) การทดสอบการใช้สารปฏิชีวนะต่อการฟอกฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยหลังจากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเรียบร้อยแล้วและตัดให้ได้ตามขนาดที่กำหนด นำชิ้นส่วนมาวางบนอาหารสังเคราะห์ที่เติม 10 mgL^{-1} meropenem และไม่เติมเป็นชุดเปรียบเทียบที่จัดเตรียมไว้ นำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ให้ให้แสงโดยมีความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 12 ชม. ต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ และเก็บข้อมูลอัตราการรอดชีวิตเพื่อคำนวณร้อยละอัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อที่ทดสอบ

2) ชนิดของอาหารสังเคราะห์และปัจจัยการให้แสงต่อการพัฒนาชิ้นส่วน วางแผนการทดลองแบบ 2×2 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยหลังจากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อเรียบร้อยแล้วและตัดให้ได้ตาม

ขนาดที่กำหนด นำชิ้นส่วนมาวางบนอาหารสังเคราะห์ที่จัดเตรียมไว้จำนวน 2 ชุดทดลอง ได้แก่ อาหารแข็งและเหลว แล้วนำมาเลี้ยงในสภาวะรับแสงและไม่รับแสงด้วยการห่อด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์ ทั้งชุดทดลองแล้วนำผ้าคลุมสีดำมาคลุมทับอีกครั้ง แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ให้แสงโดยมีความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 12 ชม.ต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีการย้ายอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ และเก็บข้อมูลอัตราการรอดและการเจริญของเนื้อเยื่อ

3) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาชิ้นส่วน แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนที่ 1 การทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน วางแผนการทดลองแบบ 2×5 factorial in CRD คือ Indole-3-acetic acid (IAA) และ 1-Naphthaleneacetic Acid (NAA) ที่ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0 0.1 0.5 1 และ 2 mgL^{-1} จากนั้นนำชิ้นส่วนที่เจริญจากการเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นำมาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.6×0.6 ซม. วางบนอาหารทดสอบ แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ให้แสงโดยมีความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 12 ชม.ต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยมีการย้ายอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ และเก็บข้อมูลอัตราการรอดและการเจริญของชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนที่ 2 การทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน วางแผนการทดลองแบบ 2×4 factorial in CRD คือ 6-Benzylaminopurine (BA) และ Thidiazuron (TDZ) ที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0 1 2 และ 4 mgL^{-1} จากนั้นจัดการชิ้นเนื้อเยื่อและเลี้ยงเช่นเดียวกันกับงานส่วนที่ 1 ส่วนที่ 3 ผลของการทดสอบการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกันของออกซินและไซโตไคนิน วางแผนการทดลองแบบ 4×2 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยปัจจัย 4 เป็นจำนวนสูตรอาหาร ได้แก่ 1.0 mg L^{-1} TDZ, 3.0 mgL^{-1} TDZ, 1.0 mg L^{-1} BA และ 3.0 mgL^{-1} BA โดยทุกวิธีหมั้นต์เดิมร่วมกับ 0.1 mgL^{-1} NAA ในขณะที่ปัจจัย 2 เป็นการเติมและไม่เติม 1.0 mgL^{-1} activated charcoal จากนั้นจัดการชิ้นเนื้อเยื่อและเลี้ยงเช่นเดียวกันกับงานส่วนที่ 1

การประเมินผลข้อมูล

$$\text{อัตราการรอด (\%)} = \frac{\text{ชิ้นส่วนที่มีการพัฒนา}}{\text{ชิ้นส่วนทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{การพัฒนาของชิ้นส่วน (\%)} = \frac{\text{ชิ้นส่วนที่มีการพัฒนา}}{\text{ชิ้นส่วนทั้งหมด}} \times 100$$

ลักษณะการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อ แทนด้วยสัญลักษณ์

- 3 คือ ชิ้นส่วนมีสีเขียวเข้ม
- 2 คือ ชิ้นส่วนที่ไม่มีการเกิดสี
- 1 คือ ชิ้นส่วนเกิดสีน้ำตาลหรือดำเล็กน้อย
- 0 คือ ชิ้นส่วนเกิดสีดำทั้งชิ้น

ลักษณะของการพัฒนาแคลลัส แทนด้วยสัญลักษณ์

- 3 คือ ชิ้นส่วนที่แตกเป็นแคลลัสชัดเจนและมีสีเขียว
- 2 คือ ชิ้นส่วนที่แตกเป็นแคลลัสเล็กน้อยและมีขนขาวรอบชิ้นส่วน
- 1 คือ ชิ้นส่วนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาใด ๆ
- 0 คือ ชิ้นส่วนตาย

วิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติ Statistix 10 คำนวณค่าเฉลี่ยความแปรปรวน เป็นแบบ one-sample t-test และ ANOVA โดยใช้ LSD

ผลการทดลอง

ผลของการเติมสารปฏิชีวนะในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการอัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อและปัจจัยต่อการเพาะเลี้ยงว่านสากเหล็กในกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ

จากการนำชิ้นส่วนมาฟอกฆ่าเชื้อ แต่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ตั้งแต่อาทิตย์ที่ 2 ที่เกิดจากแบคทีเรียที่มีอยู่ในท่อลำเลียงน้ำ จึงนำสารปฏิชีวนะ Meropenem ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในชิ้นส่วนเข้าเติมทำให้สามารถมีชีวิตรอดได้มากกว่าการไม่เติมสารปฏิชีวนะ โดยในสัปดาห์ที่ 2 อาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะเริ่มตายไปมากกว่าร้อยละ 50 และลดลงเรื่อย ๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยพบว่าอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ คิดเป็นร้อยละ 66.67 ± 0 และ 14.81 ± 6.42 ตามลำดับ และชี้ให้เห็นว่าการเติมยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพส่งเสริมให้เกิดอัตราการรอดชิ้นเนื้อเยื่อเพื่อนำไปทดสอบต่อไปได้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ร้อยละอัตราการรอดของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมและไม่เติม 10 mgL^{-1} meropenem เป็นเวลา 4 สัปดาห์

10 mgL^{-1} meropenem	Percentage of survival for 4 weeks (%)			
	1	2	3	4
with	100	92.59 ± 6.42	77.78 ± 6.42	66.67 ± 0
without	100	48.15 ± 6.42	40.74 ± 6.42	14.81 ± 6.42
t-test	ns	*	*	*

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ และ ns แสดงถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

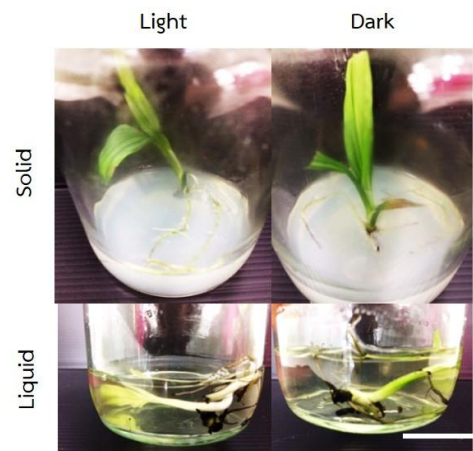
ปัจจัยการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่ออัตราการรอดและการพัฒนาของชิ้นส่วน

การทดสอบปัจจัยระหว่างชนิดอาหารและปัจจัยการให้แสงของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า อาหารแข็งมีความแตกต่างระหว่างการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการไม่มีแสงสามารถรอดชีวิตได้มากกว่าสภาวะให้แสงคิดเป็นร้อยละ 67 และ 11 ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเหลว ภายใต้สภาวะการไม่มีแสง และการให้แสงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 78 เท่ากัน (ตารางที่ 2) และต้นที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ และรอดชีวิตในอาหารชุดนี้ ภายใน 4 สัปดาห์มีความแข็งแรง (ภาพที่ 1) ซึ่งการทดสอบนี้จึงเลือกนำปัจจัยของอาหารกึ่งแข็งและภายใต้สภาวะการไม่มีแสงซึ่งจัดทำได้ง่ายและไม่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเป็นอาหารสำหรับการทดสอบในปัจจัยสารควบคุมการเจริญเติบโตในลำดับต่อไป

ตารางที่ 2 ร้อยละอัตราการรอดของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อจากการเพาะเลี้ยงภายใต้ปัจจัยการเพาะเลี้ยงของแสงและชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง

Medium	Conditions	Percentage of survived explants
Solid	Dark	67a
	Light	11b
Liquid	Dark	78a
	Light	78a
C.V (%)		32.97
F-test		*

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ (*)



ภาพที่ 1 ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะการเลี้ยงของชนิดอาหารแบบกึ่งแข็งและเหลว ภายใต้สภาวะการรับแสงแบบมีแสงและไม่มีแสงเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 10 mgL^{-1} meropenem เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (Bar=1.5 cm)

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (PGRs) ที่มีผลต่ออัตราการรอดและการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อว่านสากเหล็ก

สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน จากการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของว่านสากเหล็กมาทดสอบบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน (IAA และ NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 และ 2 mgL⁻¹ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนาการใด ๆ มีเพียงการรอดชีวิตที่สามารถบ่งบอกการตอบสนองได้บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมร่วมกับ IAA และ NAA ที่ระดับ 0.1 mgL⁻¹ ชิ้นส่วนมีสีเขียว และมีการรอดชีวิตสูงสุดที่สอดคล้องกับในระดับที่เติม 0.5 mgL⁻¹ แต่ชิ้นส่วนไม่มีสีเหลืองเช่นเดียวกับในระดับอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง IAA และ NAA พบว่าทั้ง 2 ประเภทนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้น พบว่าระดับ 0.1 และ 0.5 mgL⁻¹ มีปริมาณการรอดชีวิตมากที่สุดเมื่อเทียบกับระดับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ในการทดลองครั้งนี้จึงนำความเข้มข้นระดับ 0.1 mgL⁻¹ NAA เป็นตัวแทนสำหรับการนำไปเตรียมอาหารทดสอบร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในงานทดลองต่อไป (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การรอดชีวิตของชิ้นส่วนและพัฒนาการว่านสากเหล็กที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน

Auxin	Concentration (mgL ⁻¹)	survival explant (%)	Callus color
IAA	0	22.22 b	yellowish
	0.1	55.66 a	greenish
	0.5	55.56 a	yellowish
	1	33.33 ab	yellowish
	2	11.11 b	yellowish
C.V.%		48.42	
F-test		*	
NAA	0	33.33 ab	yellowish
	0.1	66.67 a	greenish
	0.5	55.56 ab	yellowish
	1	44.44 ab	yellowish
	2	22.22 b	yellowish

ตารางที่ 3 การรอดชีวิตของชิ้นส่วนและพัฒนาการว่านสากเหล็กที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน (ต่อ)

Auxin	Concentration (mgL ⁻¹)	survival explant (%)	Callus color
C.V.%		33.54	
F-test		*	
PGRs			
IAA		35.56	
NAA		44.44	
C.V.%		55.16	
F-test		ns	
Concentration (mgL ⁻¹)			
0		27.78 cd	
0.1		61.11 a	
0.5		55.56 ab	
1.0		38.89 bc	
2.0		16.67 d	
C.V %		38.49	
F-test		*	

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P < 0.05 (*) และ ns แสดงถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน จากการนำชิ้นส่วนของว่านสากเหล็กมาทดสอบบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน (BA และ TDZ) ในระดับ 0, 1, 2, และ 4 mgL⁻¹ พบว่าหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมีการรอดชีวิตบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA และ TDZ ที่ระดับ 1.0, 2.0 และ 4.0 mgL⁻¹ ชิ้นส่วนมีสีเขียว มีการรอดชีวิต แต่ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าทุกระดับที่มีการรอดชีวิต และพัฒนาการสามารถพัฒนาการเป็นแคลลัส หรือต้นอ่อนได้ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง BA และ TDZ ต่ออัตราการรอดของชิ้นส่วนพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระดับความเข้มข้นที่มีร้อยละอัตราการรอดสูงสุดก็คือ 1.0, 2.0, 4.0 mgL⁻¹ และ ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นร้อยละ 70.37, 55.56, 25.92 และ 18.52 ตามลำดับ

โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นอาหารสังเคราะห์ที่เติม 1.0 mgL^{-1} มีความเหมาะสมต่อการนำไปเติมร่วมกับออกซินเพื่อกระตุ้นให้เกิดการชักนำแคลลัสและต้นอ่อน ทั้งนี้เนื่องจาก 2.0 และ 4.0 mgL^{-1} ที่ยังคงรอดชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ (ตารางที่ 4)

การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่างออกซินและไซโตไคนินเพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาขึ้นส่วนเป็นแคลลัสและต้นอ่อน จากการคัดเลือกระดับความเข้มข้นและชนิดที่ใช้สำหรับทดสอบจึงได้กำหนด 4 สูตรอาหาร และยังพบว่าระหว่างการเพาะเลี้ยงขึ้นส่วนได้ปลดปล่อยส่วนน้ำยางออกจนส่งผลให้ชิ้นส่วนตายจึงได้นำ activated charcoal ที่ช่วยในการดูดซับพิษต่าง ๆ เติมลงในส่วนของการเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่จัดเตรียมขึ้น จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เติม 0.1 mgL^{-1} NAA และ 1.0 mgL^{-1} ทั้ง BA และ TDZ สามารถพัฒนาขึ้นเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสและต้นอ่อนเล็ก ๆ ได้ (ตารางที่ 5) และนอกจากนี้แล้วชิ้นส่วนที่มีความอ่อนแอต่อสูตรอาหารสังเคราะห์ที่มีเพียงกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติม activated charcoal นั้นจะไม่มีชีวิตรอดและตายเป็นสีดำภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในขณะที่อาหารที่มีการเติม activated charcoal จะคอยยับยั้งการปลดปล่อยจากชิ้นเนื้อเยื่อจนทำให้เสียหายและไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 4 อัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อและพัฒนาการเจริญเติบโตของวุ้นสาเกเหล็กที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน

Cytokinin	concentration mg/L	survival explant (%)	Callus color
BA	0	11.11 b	black
	1	59.26 a	Green
	2	51.86 a	Green
	4	29.63 b	yellowish
C.V.%		43.09	
F-test		**	
TDZ	0	18.52 c	black
	1	81.48 a	Green
	2	59.26 b	Green
	4	25.92 c	yellowish
C.V.%		34.98	
F-test		**	

ตารางที่ 5 อัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อและพัฒนาการเจริญเติบโตของวุ้นสาเกเหล็กที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน (ต่อ)

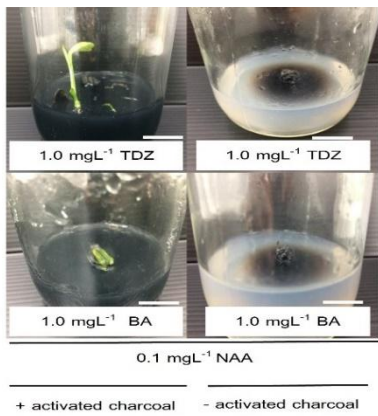
Cytokinin	concentration mg/L	survival explant (%)	Callus color
PGRs			
BA		37.04	
TDZ		46.30	
C.V.%		66.33	
F-test		ns	
Concentration (mgL^{-1})			
0		14.81 b	
1		70.37 a	
2		55.56 a	
4		25.92 b	
C.V.%		40.39	
F-test		**	

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.01$ (**) P และ ns แสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 5 อัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อและพัฒนาการเจริญเติบโตของวุ้นสาเกเหล็กที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโตไคนินร่วมกันในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน และเติมร่วมกับ activated charcoal

Plant Growth Regulators (PGRs)		Percentage of regeneration (%)	
Auxin (mgL^{-1})	Cytokinin (mgL^{-1})	+ activated charcoal	- activated charcoal
0.1 NAA	1.0 BA	80 a	46.67 a
0.1 NAA	1.0 TDZ	80 a	46.67 a
0.1 NAA	3.0 BA	20.00 b	20.00 b
0.1 NAA	3.0 TDZ	26.66 b	13.33 b
C.V (%)		46.75	57.34
F-test		*	*
Activated charcoal			
+		55.00	
-		28.33	
C.V.%		70.01	
F-test		*	

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ (*) และ ns แสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 2 ชิ้นส่วนแคลลัสและต้นอ่อนที่สามารถรอดชีวิตและเริ่มมีการพัฒนาในสูตรอาหารต่าง ๆ ได้ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ (อาหารที่เติม activated charcoal ส่วนชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่ได้เติม activated charcoal ชิ้นส่วนตายสมบูรณ์ในสัปดาห์ที่ 6 (Bar=0.5 cm)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้สารปฏิชีวนะ Meropenem ด้วยการเติมในอาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมีอัตราการรอดที่สูงกว่าการเติมไม่สารปฏิชีวนะซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ [14] ที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะ Meropenem ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากชิ้นส่วนในการถ่ายยีนให้กับกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และในขณะเดียวกันได้นำรูปแบบการฟอกฆ่าเชื้อรูปแบบเดียวกันกับ [1] ที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อของมะพร้าวกลุ่ม (*Molineria* sp.) แต่ว่านสากเหล็กมีพื้นที่การเจริญเติบโตที่ชิ้นมากกว่า จึงอาจส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์มีการปนเปื้อนในชิ้นเนื้อเยื่อที่จัดอยู่ประเภทของเอนโดไฟท์ที่อยู่รวมในพืชโดยไม่ทำลายการเจริญเติบโต [7] และพบมากในกลุ่มพืชสมุนไพรด้วย [11] แต่เมื่อเปลี่ยนสภาวะการเจริญอาจส่งผลให้มีภาวะเครียดจึงทำให้เชื้อที่อยู่ภายในท่อน้ำเลี้ยงเจริญจนทำลายชิ้นส่วนหลักได้ [3] ดังนั้นเพื่อให้ชิ้นเนื้อเยื่อปลอดเชื้อและเจริญได้ การเติมสารปฏิชีวนะในอาหารจึงมีส่วนต่อการกำจัดเชื้อร่วมด้วยและส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้

สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้เติม 1.0 mgL⁻¹ Activated Charcoal ร่วมในอาหารสังเคราะห์มีการเจริญของชิ้นเนื้อเยื่อได้ดีกว่าการไม่เติมซึ่งสอดคล้องกันกับ [4] รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน NAA ที่ระดับความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร และมีการเติมผงถ่าน 0.5 กรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นส่วนยอดและรากได้ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มได้ นอกจากนี้แล้วผงถ่านยังทำหน้าที่ดูดซับสารกลุ่ม flavonoid และส่งเสริมให้ชิ้นส่วนเกิดการพัฒนาดได้ [10] และพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ จึงมีความสอดคล้องกับ [6] ทำการศึกษามลของออกซินต่อการชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอและ

การพัฒนาพืชต้นใหม่ และมีการเติม 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพาะเลี้ยงศักยภาพของปาล์มสามารถชักนำให้เกิดได้ทั้งแคลลัสและราก แต่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกัน และมีการใช้ร่วมกับสารอื่นโดยไม่ต้องมีกลุ่มของไซโตไคนินร่วม ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าส่วนของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงอาจส่งผลให้ความต้องการต่อความจำเป็นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีส่วนเสริมให้เกิดการชักนำได้มีความแตกต่างกัน รวมถึงการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารในสูตรอาหารสังเคราะห์ก็เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดการชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน [12] แต่ในการศึกษาครั้งนี้การใช้เพียง 0.1 mgL⁻¹NAA สามารถใช้ร่วมกับ Activated Charcoal เพื่อชักนำให้เกิดรากได้ และการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อให้สามารถออกปลูกภายใต้สภาวะธรรมชาติจึงเป็นสิ่งที่ควรดำเนินการในขั้นตอนลำดับต่อไป

สรุปผลการทดลอง

อิทธิพลของปัจจัยการเพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีผลต่อการพัฒนาชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของว่านสากเหล็ก (*Molineria latifolia* (Drayand. Ex W.T.Aiton) Herb ex. Kurz) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเติมสารปฏิชีวนะ 10 mgL⁻¹ Meropenem สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในชิ้นเนื้อเยื่อ ทำให้มีอัตราการรอดได้มากกว่าการไม่เติมสารปฏิชีวนะเป็น 6 เท่า แนวโน้มการชักนำให้เกิดการพัฒนาต้นอ่อนมีสภาวะที่เหมาะสมคือการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินร่วมกับไซโตไคนินที่ระดับ 0.1 mgL⁻¹ NAA และ 1.0 mgL⁻¹ BA หรือ TDZ ร่วมกับการเติม 1.0 mgL⁻¹ activate charcoal สามารถส่งเสริมให้เกิดการชักนำของแคลลัสและต้นอ่อนสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของว่านสากเหล็กคิดเป็นร้อยละ 55 หรือคิดเป็นมากกว่าการไม่เติมถึง 5 เท่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแหล่งทุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561 (งบบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม) ที่ได้สนับสนุนต่อการดำเนินการวิจัยจนสามารถเพิ่มทักษะและวิธีการเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพรสำหรับการพัฒนาในด้านอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. กานต์ธิดา บุญลอย จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ และศุภชัย นิธิพันธ์.(2559). อิทธิพลของสารละลายโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวน โครโมโซมของมะพร้าวานกุ่ม (*Molineria* sp.). วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 9 ฉบับที่ 2 น. 81-88.
2. กองประชาสัมพันธ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. วิจัยฤทธิ์สารสกัดวานสากเหล็กต่อการ ตานอนมูลอิสระ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, เว็บไซต์ประชาสัมพันธ์ คนเมื่อ 20 มิถุนายน 2559. <https://www.rmutt.ac.th/content/32079>.
3. ฉัตรชญา กันทะเรียน. (2559). การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียได้จากระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย
4. เตือนจิตร เพ็ชรธณ อรรถรัตน์ วงศ์ศรี สุวิมล กลศึก กษิตติ ดิษฐบรรจง ภูมิรินทร์ วนิชชนานันท์ ชยานิจ ดิษฐบรรจง สุรกิตติ ศรีกุล หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และ นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. (2558). กิจกรรมงานวิจัยการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. กรมวิชาการ เกษตร หน้า 44 – 70.
5. รชพรรณ ฆารพันธ์. (2554). สมุนไพรความงาม: แนวทางการพัฒนาการใช้สมุนไพรพื้นบ้านของชาวไทยจังหวัดกาฬสินธุ์. ปริญญาศิลปศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวัฒนธรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหาสารคาม. (วิทยานิพนธ์)
6. วราภรณ์ หิตฉิม สมปอง เตชะโต และสุรรัตน์ เย็นซ้อน. (2563). ผลของออกซินต่อการชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของปาล์มน้ำมันลูกผสมพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. วารสารแก่นเกษตร, 48(1), 67–78.
7. อนันต์ วงเจริญ. (2557). บทบาทของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคพืช. วารสารแก่นเกษตร, 42(4), 623-634
8. Der J. O., K. W. Chan, N. Sarega, N. B. Alitheen, H. Ithnin, and M. Ismail. (2016). Bioprospecting the Curculigoside Cinnamic acid- rich fraction from *Molineria latifolia* rhizome as a potential antioxidant therapeutic agent. *Molecules* 26, 682; doi:10.3390/21060682
9. PALEE, J. (2018). In vitro Shoot Cultures of *Tupistra Albiflora* K. Larsen. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 17(5), 405–411.
10. Kalina D., Jasmina P. S., Inn A., Kalina A. and Marina S.,(2023). Plant Growth Regulators and Activated Charcoal Selectively Affect Phenylethanoid And Flavone Glycoside Accumulation in *Sideritis scardica* Griseb. *Tissue Culture Plants* 2023, 12(13), 2541; <https://doi.org/10.3390/plants12132541>
11. Pranha T., Pooja J., Namita M., Rupan K., and Piyush M. (2024). Bioprotecting of fendophytic fungi from medicinal plant *Anisomeles indica* L. for their diverse role in agriculture and industrial sectors. *Scientific Reports* 2024 14:588
12. Supawadee T., T. Sompong. (2010). Effect of culture medium and genotype on germination of hybrid oil palm zygotic embryos. *Science Asia* 36; 26-32.
13. Thuruthiyil D. T., (2008) The role of activated charcoal in Plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, Vol. 26, Issue 6, 2008, P 618-631.
14. Yoichi O. and Masahiro M. (2007). Meropenem and moxalactam: Novel β - lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*- mediated transformation. *Plant Science*, Volume 172, Issue 3, P. 564-572.
15. Zari H. T., N. J. Sidik, T. A. Hashim, and N. Ahmet. (2014). The effects of different concentration of NAA on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryoid cultures and phytosterols production. *Australian Journal of crop science* 8(6); 840-847.