# ผลการทดลองและวิจารณ์

## การเพาะเลี้ยงตา (bud culture)

พันธุ์ที่นำมาทดลองส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ Golden Torch เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีการแตกกอมาก ทำให้มีต้นพืชที่จะใช้ในการทดลองมากพอ เพราะการทดลองแต่ละครั้งต้องใช้ชิ้นส่วนตาประมาณ 50-80 ชิ้น สำหรับพันธุ์อื่นๆจะนำมาใช้บางครั้งเมื่อมีต้นมากพอ แต่พันธุ์เหล่านี้มีการแตกกอช้ามาก จึงมีจำนวนต้นน้อยมาก

ปัญหาในการนำชิ้นส่วนพืชจากธรรมชาติเข้าไปเลี้ยงในหลอดทดลองอันดับแรกคือการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งนี้ก็เช่นกัน พบการปนเปื้อนของเชื้อรามาก ตายอดและตาข้างที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารจะปนเปื้อนทั้งหมดทุกครั้งที่นำมาเลี้ยง แม้ว่าจะใช้วิธีการของ Nathan และคณะ (1992) ที่รายงานว่าได้ต้นพืชที่ปลอดเชื้อ การทดลองต่อๆมาจึงพยายามปรับเปลี่ยน โดยนำเหง้าที่มีต้นหลังจากตัดแต่งและทำความสะอาดแล้วมาแช่ในยากันรา (Benlate) ก่อนนำไปเก็บในถุงพลาสติกให้ตาข้างยืดยาว นอกจากนั้นยังปรับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อหลายสูตร โดยเพิ่มยากันราในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อด้วยและปรับความเข้มข้นของ Clorox (NaOCl) และเวลาในการแช่ชิ้นส่วนพืช นอกจากกนั้นยังปรับความเข้มข้นของ $HgCl_2$ และระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อแบบต่างๆ อย่างไรก็ตามทุกครั้งที่ทดลองจะพบการปนเปื้อนของเชื้อราและไม่มีชิ้นส่วนพืชที่ปลอดจากเชื้อราเลย

ต่อมาจึงพยายามทดลองใช้วิธีใหม่ โดยใช้หน่ออ่อนที่โผล่พ้นดินยาวพอสมควร แต่ยังไม่มีแผ่นใบมาทดลอง หน่ออ่อนที่ขุดขึ้นมาจะนำมาทำความสะอาดและตัดส่วนเหง้าให้ติดมาน้อยที่สุด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาตัดแต่งพร้อมทั้งลอกกาบนอกออก 1-2 ชั้น และตัดให้มีขนาดที่จะนำมาใส่ขวดสำหรับฟอกฆ่าเชื้อได้ หลังจากฟอกฆ่าเชื้อในขั้นตอนแรกแล้วนำชิ้นส่วนยอดมาตัดแต่งลอกกาบออก ให้เหลือกาบเล็กๆ บางส่วนอยู่ แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox อีกครั้ง โดยลดความเข้มข้นและเวลาฟอกลงครึ่งหนึ่ง คือใช้ Clorox 5% ประมาณ 7 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ก่อนนำมาเลี้ยงบนอาหาร จากการใช้วิธีนี้พบว่าชิ้นส่วนพืชรอดจากการปนเปื้อนในช่วงแรกประมาณ 40% แต่ต่อมาอีก 1 เดือนพบการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น ชิ้นส่วนที่เหลือรอดมักจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่ามี 1 ชิ้น แตกตาเป็นยอดที่สมบูรณ์และมีรากเกิดขึ้นด้วย (ภาพ 5ก) แต่เมื่อนำมาตัดและย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ พบการปนเปื้อนของเชื้อราเช่นเดิม

จากการพยายามชักนำยอดจากตาได้ทดลองหลายครั้งมาก แต่ก็ยังมีปัญหาการปนเปื้อนทุกครั้ง ทำให้ไม่มียอดที่เหลือรอดมาเพิ่มจำนวนยอดได้ การที่เฮลิโคเนียมีการปนเปื้อนมาก เพราะเป็นลำต้นใต้ดิน (เหง้า) และตาก็อยู่ใต้ดิน ส่วนต้นที่เห็นนั้นเป็นส่วนของกาบใบ เฮลิโคเนียจะคล้ายกับกล้วย แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยพบการปนเปื้อนน้อยมาก เนื่องจากเหง้ากล้วยมีขนาดใหญ่ กาบใบห่อหุ้มหลายชั้นและกาบแต่ละชั้นอัดกันแน่นมาก ทำให้น้ำมีโอกาสแทรกเข้าไป

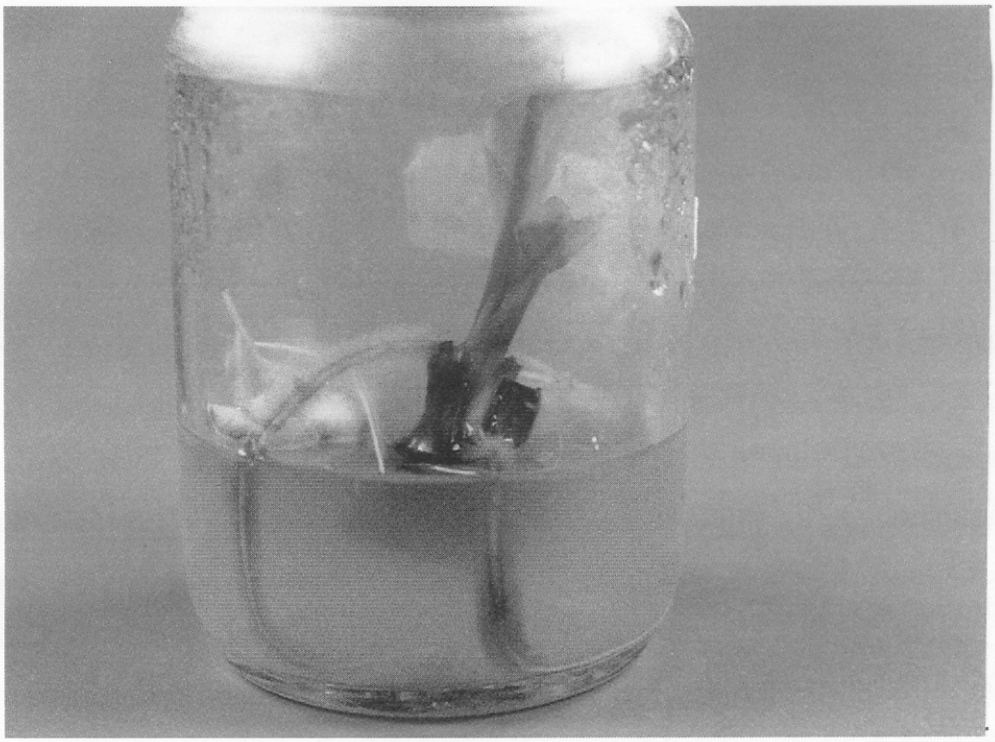
ระหว่างกาบได้น้อยมาก เมื่อนำมาฟอกฆ่าเชื้อก็สามารถใช้น้ำยาฟอกฆ่าเชื้อความเข้มข้นสูงๆได้และสามารถฟอกฆ่าเชื้อได้หลายครั้ง โดยฟอกฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วลอกกาบบางส่วนออก นำมาฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่สองและทำเช่นนี้อีกจนเหลือกาบที่หุ้มยอดส่วนในสุด แล้วค่อยเปิดออกและตัดยอดมาเพาะเลี้ยง ส่วนเฮลิโคเนียมีกาบใบหุ้มน้อยชั้นกว่าและไม่อัดกันแน่นเหมือนกล้วย ทำให้น้ำแทรกเข้าไประหว่างกาบบางส่วนได้ จึงมีโอกาสปนเปื้อนมากกว่า ส่วนวิธีการกระตุ้นให้เกิดหน่อใหม่จากต้นเดิมในถุงพลาสติกตามวิธีการของ Nathan และคณะ (1992) แล้วนำหน่อขนาดเล็กมาใช้ทดลองมีการปนเปื้อนอาจเป็นเพราะต้นที่นำมากระตุ้นหน่อมีส่วนของเหง้าติดมาด้วย ซึ่งจำเป็นต้องมีส่วนของเหง้า เพราะหน่อใหม่จะเกิดจากโคนต้นใกล้กาบใบชั้นนอก และหน่อที่เกิดมาจะมีกาบใบขนาดเล็กเพียงไม่กี่ชั้น นอกจากนั้นเมื่อตัดหน่อมาฟอกฆ่าเชื้อจะต้องตัดให้ติดส่วนเหง้ามาด้วย เพื่อไม่ให้ตัดถูกตายอด ดังนั้นจึงทำให้มีโอกาสปนเปื้อนมาก

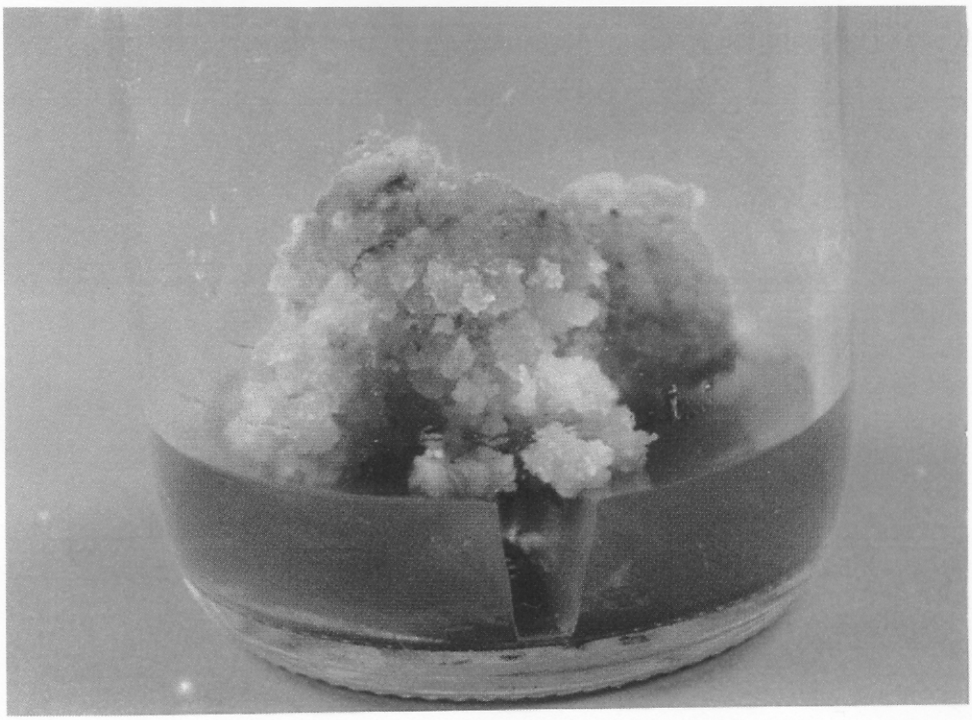
**การชักนำแคลลัส (Callus induction)**

เหตุที่เลือกส่วนของช่อดอกมาชักนำแคลลัส เนื่องจากเป็นส่วนที่ไม่สัมผัสกับดินและช่อดอกที่ใช้เป็นช่อดอกอ่อนที่ยังมีการเจริญเติบโต น่าจะมีแนวโน้มที่จะเกิดแคลลัสได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานความสำเร็จในการชักนำแคลลัสและยอดจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกในกล้วย ขิงชมพู (Chang and Criley,1993) และปักษาสวรรค์ (Ziv and Halevy, 1983)

การเลือก *H. stricta* เป็นพืชที่ใช้ทดลอง เนื่องจากกาบรองดอกมีขนาดใหญ่ห่อหุ้มส่วนที่อยู่ข้างในไว้ได้ดี และดอกอ่อนกาบรองดอกจะยังไม่เปิดออก ทำให้ส่วนที่อยู่ข้างในมีโอกาสปลอดเชื้อมากขึ้น การเพาะเลี้ยงแกนช่อดอก (rachis) พบว่าชิ้นส่วนพืชมีการปนเปื้อนของเชื้อน้อยมาก (~5%) ในช่วงแรกชิ้นส่วนยังมีสีเหมือนเดิม ต่อมาสีเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเรื่อยๆ และตายไปในที่สุด ยกเว้น 1 ชิ้นที่มีการสร้างแคลลัส (ภาพ 5ข) แต่ยังมีการปล่อยสารสีน้ำตาลดำในอาหาร และแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม บางส่วนมีลักษณะนิ่มและ เมื่อตัดย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ พบว่าไม่มีการเติบโตและตายไปในที่สุด ลักษณะแคลลัสนี้จะคล้ายกับแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนกาบใบของเฮลิโคเนีย ซึ่ง Nathan และคณะ (1992) รายงานว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดกับแคลลัสแบบนี้เช่นกัน

การเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกของเฮลิโคเนียเกิดแคลลัสขึ้นคล้ายกับการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอก (inflorescence stalk) ของปักษาสวรรค์ แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงช่อดอกขิงชมพู ซึ่งเกิดเป็นยอด เพราะช่อดอกของขิงชมพูมีตายอดที่ซอกกาบรองดอกและพืชกลุ่มขิงแดงและขิงชมพู (*Alpinia purpurata*) บางพันธุ์สามารถเกิดยอด (aerial offshoot) ในช่อดอกแก่ที่ติดอยู่กับต้นได้ ดังนั้นจึงสามารถนำส่วนช่อดอกมาชักนำยอดจำนวนมากได้ โดยหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อได้ดีกว่าการใช้เหง้าหรือต้นที่อยู่ใต้ดิน แคลลัสที่ได้มีการเติบโตช้าคล้ายกับแคลลัสที่ได้จากก้านช่อดอกของปักษาสวรรค์ นอกจากนั้น Ziv และ Halevy (1983) รายงานว่าไม่มีการเกิดยอดหรือราก (organogenesis) จากแคลลัส แม้ว่าจะย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ใส่สารควบคุมการเติบโตหลายชนิดรวมกัน (combination)





**ภาพที่ 5** ก. ต้นเฮลิโคเนียพร้อมราก หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ใส่ BA 2 mg/l
ข. แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแกนช่อดอกบนอาหารที่มี 2,4-D 5 mg/l