บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาเทคนิคในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนดาจากเหง้าขมิ้นชัน

จากการนำชิ้นส่วนดาจากเหง้าขมิ้นชันขนาดประมาณ 1 ซม. โดยนำเนื้อเยื่อไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อรา คาเบนดาซิน 0.2% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที รวม 9 ชุดการทดลอง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปจุ่มใน กรดซิตริก ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 1.0% เป็นเวลา 5 นาที จะมีความเหมาะสมในการใช้ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนดาจากเหง้าของขมิ้นชันมากที่สุด เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเพียง 18 % และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 80 % เนื่องจาก $HgCl_2$ เป็นโลหะหนักที่มีกลไกการฆ่าเชื้อโดยการเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยการเข้าจับกับหมู่ซัลไฟด์ (SH-group) ของเอนไซม์ภายในเซลล์ แล้วหยุดการทำงานของเอนไซม์เหล่านั้น ทำให้กลไกต่างๆ ภายในเซลล์ไม่สามารถทำงานได้ เซลล์ก็จะตายในที่สุด (Ramayah, 2000) ดังนั้น $HgCl_2$ จึงมีฤทธิ์รุนแรงกว่า Chlorox ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ คือ sodium hyprochloride ความเข้มข้น 10-14% ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อโดยทั่วไป $HgCl_2$ จึงเหมาะที่จะใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อส่วนที่มีการติดเชื้อรุนแรง เช่นเนื้อเยื่อส่วนที่ฝังอยู่ในดิน อย่าง ราก และเหง้า เป็นต้น เช่นเดียวกับ กิตติศักดิ์ (2546) ที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อดาจากเหง้าของหนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) โดยนำเนื้อเยื่อไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อรา คาเบนดาซิน 0.2% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปจุ่มใน กรดซิตริก ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 5 นาที พบว่ามีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อได้ดี

การทำให้ชิ้นส่วนของพืชปลอดเชื้อก่อนการทำการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อนั้นต้องคำนึงถึงชนิดพืช (species) ระยะการพัฒนา (developmental phase) อายุและขนาดของชิ้นเนื้อเยื่อพืช และการขจัดสิ่งปนเปื้อน (desinfection) โดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อ (desinfectant) เช่น เมอร์คูริคคลอไรด์ ($HgCl_2$) แคลเซียมไฮโปรคลอไรด์ ($CaOCl_2$) โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (NaOCl) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และแอลกอฮอล์ เป็นต้น แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อมีความสัมพันธ์กับ

เวลา และความเข้มข้นของสาร โดยปกติประสิทธิจะสูงขึ้นถ้าใช้เวลาเป็นความเข้มข้นมากขึ้น แต่ถ้ามากเกินไปอาจจะทำอันตรายต่อความมีชีวิตของเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้การใช้สารจับใบ (surfactant) เพื่อช่วยให้สารฟอกฆ่าเชื้อเข้าไปในผิวของเนื้อเยื่อที่ไม่เรียบ หรือมีขนได้ดีขึ้น การลดปริมาณเชื้อในต้นพืช (stock plant) โดยใช้สารป้องกันกำจัดแมลง เชื้อรา สารปฏิชีวนะ หรือสารกำจัดเชื้อวิสา ก่อนการนำมาทำการฟอกฆ่าเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จของการผลิตชิ้นส่วนปลอดเชื้อ (aseptic culture) นอกจากนี้ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือการปนเปื้อนจากเชื้อที่เข้าไปเจริญเติบโตอยู่ในระบบท่อลำเลียง หรือในเซลล์พืช แม้จะทำการกำจัดเชื้อที่ผิวก็ยังมีการปนเปื้อนของเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์เจริญออกมาบนอาหารเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะกลุ่มพืชที่มีลำต้นอยู่ใต้ดิน อย่าง ขมิ้นชัน และไม้ยืนต้น ดังนั้นต้นพืชที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงควรจะปลอดโรคด้วย (รังสฤษฎ์, 2540)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเชิงเศรษฐกิจนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต้นทุน คือค่าใช้จ่ายอันอาจเกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตพืชในหลอดทดลอง เช่น ค่าอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ สารเคมี ค่าสาธารณูปโภค และแรงงาน เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญที่สุดประการหนึ่งของนักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การเริ่มต้นเนื้อเยื่อในหลอดทดลองด้วย aseptic technique โดยพยายามหาวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมากับเนื้อเยื่อให้ได้มากที่สุดโดยที่ทำอันตรายกับเนื้อเยื่อพืชน้อยที่สุด เป็นกรรมวิธีที่ไม่ควรจะยุ่งยากซับซ้อน หรือเป็นอันตรายกับผู้ใช้ หากเกิดการปนเปื้อนขึ้นทั้งจากขั้นตอนการเริ่มเลี้ยง หรือในขณะเลี้ยงพืชเพื่อขยายพันธุ์ต่อมา นับเป็นการสูญเสียทั้งเวลา ค่าใช้จ่าย แรงงาน และวัตถุดิบ จึงควรที่จะพิจารณาถึงการควบคุมปัจจัยต่างๆ และการบริหารจัดการเพื่อลดการสูญเสียจากสาเหตุนี้เพื่อลดต้นทุน (กัณฑารัตน์, 2544)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช BA (6-benzyl adenine) และ NAA (Napthaleneacetic acid) ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตาขมิ้นชัน

จากการนำชิ้นส่วนตา ขนาดประมาณ 1 ซม. ฟอกฆ่าเชื้อใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 1.0% เป็นเวลา 5 นาที (จากการทดลองที่ 1) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 3 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/l รวม 25 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 18 ซ้ำ แล้วนำไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 2,000-3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ในชุดการทดลอง ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l สามารถชักนำให้เกิดเกิดแคลลัสขึ้นบริเวณโคนของเนื้อเยื่อ จากนั้นแคลลัสจะถูกชักนำให้กลายเป็น multiple shoots 9.7 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ความสูงของยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 6.2 ซม และมีการเกิดราก 73.2% และด้วย

การที่ชิ้นส่วนต่างๆของพืชถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีมากน้อยแตกต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยที่สำคัญคือ เมื่อพิจารณาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชันพบว่า BA ที่มีความเข้มข้น 2 มก/ล เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาจากเหง้า แต่การใช้ BA ความเข้มข้นสูงหรือต่ำกว่านี้มีผลทำให้เกิดแคลลัสน้อยลง โดยเฉพาะอาหารซึ่งปราศจาก BA มีผลทำให้ตาตาจากเหง้าเจริญเติบโตช้า สร้างยอดลีบเล็กสีเหลืองอ่อนลักษณะอ่อนแอทั้งนี้เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงไม่เกิดการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตได้ ซึ่งระดับความเข้มข้นของไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เช่น Flick *et al.* (1983) ชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงปมราก *Stevia rebaudiana* บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.9 ไมโครโมล และ การเลี้ยง terminal floral apices ของ *Musa* Dwarf บนอาหาร Murashige and Turker (1969) ที่เติม glycine, nicotinic acid, thiamine-HCl, pyridoxin-HCl, 340 มก/ล NaH_2PO_4, 100 มก/ล L-tyrosine, 30 ก/ล glucose และ 5 มก/ล BA พบว่าตาดอกเจริญเป็นต้นได้โดยตรง เกิดแคลลัส 3% และสามารถชักนำให้แคลลัสเกิดต้นอ่อนได้บนอาหารเดิม โดยผ่าน somatic embryo development (Fitchet, No date) ส่วน Winnaar (1989) เพาะเลี้ยงส่วนตาจากเหง้าของขมิ้นบนอาหาร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล และน้ำตาล 2 % เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 8 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงตาจากเหง้าของขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) ที่เลี้ยงบนธาตุอาหารหลักสูตร MS ธาตุอาหารรองและไวตามินสูตร Ringe-Nitsch น้ำตาล 2% และ BA 1 ppm ทำให้เกิดยอดและรากอย่างรวดเร็วหลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม (Hosoki and Sagawa, 1977) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อระดับความ

เข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิดพบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ร่วมกับ ออกซิน มีผลต่อการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว เช่น Shervington *et al.* (1998) เพาะเลี้ยงใบชา (*Camellia sinansis*) บนอาหารวุ้น MS ที่เติม 2,4-D 4.5 ไมโครโมล ร่วมกับBA 0.45 ไมโครโมล พบว่าสามารถชักนำให้ทั้งรากและแคลลัสสร้างสาร caffein และ theobermine ซึ่งพบในใบได้ นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของกฤษณา *Aquilaria crassna* และ A. *malaccensis* บนอาหารวุ้น MS ที่เติม 2,4-D 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก/ล ร่วมกับ BA 2 และ 3 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี (พิมล, 2538) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานโดยการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารวุ้น MS ที่เติม วิตามินสูตร Nitch เสริมด้วย NAA 2.0 มก/ล และ BA 2.0 มก/ล (พัชรินทร์, 2537)

การเพาะเลี้ยงตาจากเหง้าของขมิ้นชันบนอาหารวุ้น MS พบว่าหลังจากที่เกิดยอดแล้วจะมีมีการสร้างรากได้ทุกชุดการทดลอง แม้แต่ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินแต่อย่างใด แสดงว่าไซโตไคนินไม่ได้ยับยั้งการสร้าง adventitious root เช่นเดียวกับที่พบในพืชชนิดอื่นๆ เช่น กล้วย (Wong, 1986), Gloxinia (Wuttisit and Kanchanapoom, 1996), Watermelon (Kanchanapoom *et al.*, 1998) ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเกิดจากความแตกต่างของระดับ endogenous growth substances ซึ่งน่าจะเป็นออกซินในชิ้นส่วน หรือความแตกต่างของความไวของชิ้นส่วนต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต (Trewavas and Cleland, 1983) แต่การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากได้ดีกว่า เช่นการทดลองของ Chapman (1956) ซึ่งเลี้ยงปลายรากของมันฝรั่งบนอาหาร MS ความเข้มข้น 2 เท่า เติม casein hydrolysate 500 ppm ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10 และ 0.50 มก/ล พบว่าชุดที่ไม่มีการเติม NAA ให้การเจริญของรากที่ไม่ดี แต่ NAA ความเข้มข้น 0.05-0.10 มก/ล เหมาะสมต่อชักนำให้เกิดรากได้ดี ส่วน NAA ความเข้มข้น 0.50 มก/ล ชักนำให้รากเกิดแคลลัส

การทดลองที่ 3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายต้นอ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก

โดยทั่วไปแล้ว สาเหตุหลักของการตายของพืชหลังการย้ายออกปลูกเกิดเนื่องจากพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมภายนอกทำให้พืชเกิดการสูญเสียน้ำภายในต้นอย่างรวดเร็ว แล้วพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในภาชนะปิดสนิทมีอัตราการแลกเปลี่ยนอากาศระหว่างภายใน และภายนอกภาชนะต่ำอันมีผลทำให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะต่ำ มีการสะสมของก๊าซเอทธิลีนในปริมาณที่สูง และความชื้นภายในภาชนะค่อนข้างสูง (95-100% RH) (Kozai *et al.*, 1997) ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้มีผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตผิดปกติทั้งในด้านสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา ในด้านสรีรวิทยาพบว่า พืชมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงต่ำเนื่องจากปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะต่ำซึ่งอยู่ในระดับต่ำสุดของความสามารถในการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (compensation point) กลไกการดูดน้ำของราก (water uptake) กลไกการควบคุมการปิดเปิดปากใบ และออร์กาแนลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของพืชทำงานผิดปกติ และในด้านสัณฐานวิทยา พบว่าพืชมีลักษณะอวบน้ำ (hyperhydricity) ใบมีการเจริญเติบโต และพัฒนาที่ผิดปกติ เช่น มีการสร้าง wax ที่ผิวใบน้อย มีคลอโรฟิลล์ในปริมาณต่ำ ระบบรากมีการพัฒนาน้อยโดยเฉพาะรากแขนง และรากขน (Kozai *et al.*, 1997) นอกจากปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายปัจจัยที่ทำให้พืชอ่อนแอ เช่น การใส่น้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของพืชนอกจากทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ง่ายแล้วน้ำตาลที่พืชใช้ยังมีผลยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ รูบิสโก (Rubisco) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์แสงของพืช (Desjardin, 1995) และน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ค่า water potential สูง พืชดูดน้ำ และอาหารไปใช้ได้ยากขึ้น พืชเกิดความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ การใช้ gelling agent เช่น agar หรือ gelrite ทำให้ก๊าซโดยเฉพาะออกซิเจนมีอัตราการแพร่ลงไปในอาหารได้ต่ำ (Kirdmanee *et al.*, 1995) รากขาดก๊าซที่ใช้ในการหายใจพืชจึงเจริญเติบโตช้า และมีระบบรากที่อ่อนแอ

สำหรับการทดลองนี้นำต้นอ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดลองที่ 2 อายุ 6 สัปดาห์ มาคลายฝาเกลียวทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเปิดฝาทิ้งไว้อีก 24 ชม เพื่อให้พืชได้ปรับสภาพเพื่อเตรียมใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศในการเจริญเติบโต แล้วแช่ต้นอ่อนในน้ำยาฆ่าเชื้อวาคาเบนดาซิน 0.2% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปลูกต้นอ่อนในถาดหลุม โดยใช้วัสดุปลูกคือ ทรายหยาบ: ขุยมะพร้าว: ถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 ซึ่งวัสดุปลูกดังกล่าวได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำให้ชุ่มแล้วคลุมถาดหลุมที่ปลูกต้นอ่อนขมิ้นด้วยถุงพลาสติกใส แล้วฉีดพ่นละอองน้ำก่อนปิดปากถุงพลาสติก นำไปวางในสภาพที่มีแสงปานกลางเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยภายใน 3 สัปดาห์นี้ควรมีการเปิดปากถุงเพื่อฉีดพ่นละอองน้ำบ้าง เพื่อให้พืชมีสภาพใกล้เคียงกับในหลอดทดลองซึ่งมีความชื้นสูง เมื่อครบ 3 สัปดาห์ นำถุงพลาสติกใสที่คลุมต้นอ่อนออก แล้วนำต้นอ่อนไปไว้ในเรือนเพาะชำ รดน้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง พบว่าในสัปดาห์แรกๆ หลังจากการนำต้นอ่อนขมิ้นชันออกปลูกในเรือนเพาะชำ ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ส่วนของใบและลำต้นยังไม่ค่อยแข็งแรง มีสีเขียวอ่อนปนเหลือง ใบมีลักษณะนิ่มบอบบาง ไม่มีความมัน เนื่องจากสาเหตุต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ในสัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นมา ใบจะมีลักษณะยาวเรียว ใหญ่มากขึ้นสีของใบจะเข้มขึ้น ลำต้นมีลักษณะยืดยาว และหนาขึ้น ดูค่อนข้างแข็งแรง และในสัปดาห์ที่ 8 ใบจะกลายเป็นสีเขียวเข้มมีความมันวาว ลำต้นแข็งแรง

ดังนั้นจึงควรมีการปรับสภาพพืชก่อนการย้ายปลูก (*In-vitro* acclimatization) ภายในภาชนะเพาะเลี้ยงในระหว่างการชักนำรากโดยการควบคุมสภาพสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น แสง ความชื้น การแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างภายใน และภายนอกภาชนะ รวมถึงการใช้วัสดุค้ำจุนเพื่อส่งเสริมความแข็งแรงของพืช ช่วยให้พืชมีการปรับตัวให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก การใช้วัสดุที่ยอมให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซในอัตราที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงทำให้ภายในภาชนะมีความชื้นลดลงมีผลทำให้พืชลดอาการอวบน้ำ ตลอดจนชักนำให้พืชมีการสร้างอวัยวะป้องกันการสูญเสียน้ำ เช่น wax ขนตามลำต้น และใบ อีกทั้งยังส่งเสริมให้กลไกการคายน้ำของพืชทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงมีการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์แสงมากขึ้น (Kozai *et al.*, 1997) การใช้อาหารที่ปราศจากน้ำตาลจะช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และช่วยกลไกการสังเคราะห์แสงทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ (Deajardin, 1995 ; Aitken-Christie *et al.*, 1995) การเพาะเลี้ยงพืชในวัสดุค้ำจุนที่มีช่องอากาศพรุน เช่น vermiculite หรือ florialite ทำให้ก๊าซออกซิเจนแพร่ไปยังรากพืชได้มากขึ้น พืชสามารถพัฒนาระบบราก มีการสร้างรากแขนง และขนรากเป็นจำนวนมากซึ่งมีผลทำให้พืชสามารถดูดน้ำ และแร่ธาตุไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Kirdmanee *et al.*, 1995) ดังนั้นการปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูกจึงมีบทบาทสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเนื่องจาก

ช่วยลดเวลา ค่าใช้จ่าย แรงงาน และการสูญเสียต้นพืชหลังการย้ายออกปลูก ทำให้สามารถต้นทุนของการผลิต และสามารถผลิตพืชในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การทดลองที่ 4 การสกัด และแยกสารสกัดของขมิ้นชันโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีผิวบาง

จากการนำส่วนต่างๆ ของขมิ้นชันทั้งหมด 10 ส่วน คือ ใบ ลำต้น ราก และเหง้าจากธรรมชาติ ใบ ลำต้น และรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใบ ลำต้น รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก มาสกัดสารด้วยเอทานอล 95% และแยกสารด้วยวิธี TLC โดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างให้เท่ากับ 5% ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และใช้เคอร์คูมิน ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน spot สาร ด้วยเครื่อง Automatic TLC Sample 4 แล้วแยกสารโดยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เฮกเซน: คลอโรฟอร์ม: เอทานอล อัตราส่วน 4.1:4.9:1.0 v/v พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชัน 10 ส่วน คือ ใบ ลำต้น ราก และเหง้าจากธรรมชาติ ใบ ลำต้น และรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใบ ลำต้น รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก จะมีแถบที่แตกต่างกัน โดยสารที่สกัดส่วนเดียวกันแต่มาจากแหล่งต่างกันจะมีลักษณะของแถบ และค่า R_f ใกล้เคียงกัน สารละลายมาตรฐาน (curcumin) ทั้ง 4 ความเข้มข้นจะมีจำนวนแถบน้อยที่สุด คือ 3 แถบ โดยมีค่า R_f เฉลี่ยในแต่ละแถบเท่ากับ 0.48, 0.52 และ 0.59 ซึ่งเป็นสาร บิสดีเมโทซิวเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin), ดีเมโทซิวเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และเคอร์คูมิน (curcumin) ตามลำดับ เนื่องจากสารมาตรฐาน curcumin จะเป็นสารมาตรฐานที่ยังไม่บริสุทธิ์จะยังมีอนุพันธ์อื่นๆ ของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ร่วมอยู่ด้วย สถาบันวิจัยสมุนไพร (2544) ได้ระบุไว้ว่าสารในกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ที่มีค่า R_f มากที่สุดจะเป็น curcumin ค่า R_f ถัดมาจะเป็น demethoxycurcumin และค่า R_f ต่ำสุดจะเป็น bisdemethoxycurcumin

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 10 ส่วน จะมีเพียงเนื้อเยื่อ 3 ส่วน คือ รากจากธรรมชาติ รากจากการย้ายออกปลูก และเหง้าจากธรรมชาติ มีสารมาตรฐาน curcumin เนื่องจากมีแถบที่ปรากฏสีเหมือนกับสารมาตรฐาน และยังมีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบว่าเนื้อเยื่อ 3 ส่วนดังกล่าวมีสารมาตรฐานอยู่จริง และสารที่พบในส่วนดังกล่าวเป็นสารชนิดเดียวกันจึง scan wavelength (nm) และ Absorption unit ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ความเข้มข้น และสารตัวอย่างจากรากจากธรรมชาติ รากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก และเหง้าจากธรรมชาติ มีสารเคอร์คูมินอยด์เป็นองค์ประกอบ โดยเหง้าจากธรรมชาติมี curcuminoid 5.81% รากจากธรรมชาติมี curcuminoid 3.29% รากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูกมี curcuminoid 2.11%