การขยายพันธุ์โมกมัน [*Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb.] ในหลอดทดลอง

In Vitro Clonal Propagation of Ivory [*Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb.]

กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล* และลัดดาวัลย์ รักษ์ธรรม

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

Korn Koarapatchaikol* and Laddawan Rugtham

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University,

Khuntalea, Muang, Suratthani 84100

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์โมกมัน [*Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb.] ในหลอดทดลอง โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดจากผลแก่บนอาหารวุ้นสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BAP (6 benzyl aminopurine) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ (0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล) ผลปรากฏว่าอาหารทุกสูตรชักนำให้เมล็ดงอกและเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าได้และเกิดแคลลัสที่มีสีและขนาดแตกต่างกัน โดยอาหารที่ไม่เติม BAP หรือ 2,4-D เกิดแคลลัสขนาดเล็กที่สุด ส่วนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3.5 มก/ล แคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนของลำต้นเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหารที่ไม่เติม BAP และ 2,4-D อาหารที่เติม BAP หรือ 2,4-D สูงมีแนวโน้มทำให้เกิดยอดลดลงและกระตุ้นการเกิดแคลลัส ยอดของต้นกล้าสามารถเพิ่มจำนวนได้มากมายบนอาหารวุ้นที่เติม BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ การวางยอดแนวตั้งในอาหารที่มี BAP 5.0 มก/ล ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด (7.40 ยอด) เมื่อตัดยอดที่มีความยาว 2-7 เซนติเมตร ไปจุ่มแช่ด้านรอยตัดในสารละลาย NAA (α-napthalene acetic acid) ความเข้มข้น 1.0 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 นาที แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS พบว่าทำให้เกิดรากได้ดี ต้นที่ผ่านการอนุบาลเจริญเติบโตได้ดีและสามารถย้ายปลูกได้สำเร็จ

คำสำคัญ : โมกมัน; การขยายพันธุ์; ในหลอดทดลอง

Abstract

This research aims to study *in vitro* clonal propagation of Ivory [*Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb.]. Mature seeds were dissected from green fruits and cultured on MS (Murashige and Skoog,

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** kkoarapatchaikol@gmail.com DOI 10.14456/tstj.2015.41

1962) agar medium containing different concentrations of BAP (6 benzyl aminopurine) and 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid). It was found that various sizes and colors of calluses were observed in all the media containing BAP or 2,4-D. The control group displayed smallest callus and largest callus was fortified by the medium contains 3.5 mg/l 2,4-D. Best of shoots growth were archived on the MS medium lacking BAP and 2,4-D. High concentrations of BAP or 2,4-D tended to decrease growth of seedlings and promoted callogenesis. Shoot buds derived seedlings were successful multiplication on the MS agar medium containing BAP. Vertical orientation of explants showed superior multiplication than horizontal orientation. Maximum mean shoot number was raised on the medium fortified with 5.0 mg/l BAP (7.40 shoots). The excised shoots were rooted well after submerging the cut end portion into NAA (α-naphthalene acetic acid) aseptic solution for 1-7 min and followed by culturing in the MS agar basal medium for 4 weeks. Rooted shoots were obtained and then transplantation was successful.

Keywords: Ivory; propagation; *in vitro*

1. บทนำ

โมกมัน [*Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb.] เป็นพืชใบเลี้ยงคู่อยู่ในวงศ์ Apocynaceae ทางพฤกษศาสตร์จัดเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดใหญ่ สูง 8-20 เมตร เปลือกของลำต้นเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทาอ่อนและมียางสีขาว ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้าม (opposite) ดอกสีขาวอมเหลืองมีกลิ่นหอม ผลเป็นฝักรูปทรงกระบอก ผิวฝักขรุขระ เมล็ดเป็นรูปยาวสีเหลืองมีขนสีขาว กระจายพันธุ์โดยปลิวไปตามลม โมกมันมีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ในหลายประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ อินเดีย ศรีลังกา พม่า จีน ลาว เวียดนาม และมาเลเซีย สำหรับในประเทศไทยพบทั่วไปทุกภาค รวมทั้งภาคใต้ตอนบนในแนวชายป่าดิบแล้งและป่าเบญจพรรณ [1,2]

จุดเด่นของพืชชนิดนี้คือ เป็นพืชที่มีเนื้อไม้สีขาว นวลจึงรู้จักทางการค้าว่า Ivory wood ลักษณะเนื้อไม้มีเสี้ยนตรงละเอียดมากเหนียวและมีความแข็งพอประมาณ เลื่อยไสกบตบแต่งง่ายและขัดชักเงาได้ดี จึงนำมาทำเครื่องเรือนโดยการกลึงได้เครื่องเรือนคุณภาพดี นอกจากนี้ยังมีสมบัติทางเภสัชกรรมหลายประการ เช่น กระพี้ไม้ใช้แก้ดีพิการ รากแก้ลม เปลือกรักษาโรคไต บำรุงธาตุและแก้เชื้อคุดทะราด ใบซับน้ำเหลือง ดอกเป็นยาระบาย ผลใช้ฆ่าเชื้อรำมะนาด [3,4] จากการศึกษาวิจัยในปัจจุบันพบสารออกฤทธิ์สำคัญที่มีผลในการรักษาโรคดังกล่าว เช่น benzoic acid, 2-hydroxy-6-methyoxy, conessine, conkurchin, ferulic acid, gentisic acid, hexaconsane-3, hexacosan-3, kaempferol, ouercetin, sinapic acid, syringic acid, vanillic acid และ wrightiadione [5] นอกจากนี้โมกมันยังได้รับความนิยมปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับตามบ้านเรือนและสำนักงานหรือตกแต่งสวนเพราะเป็นไม้ที่โตเร็วทรงพุ่มสวยและให้ร่มเงาดี

ปัจจุบันพื้นที่ป่าไม้ถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว เพื่อใช้ทำประโยชน์ทางเกษตรกรรมและที่อยู่อาศัย ส่งผลให้ป่าไม้ชนิดต่างๆ ลดลงอย่างรวดเร็ว รวมทั้งโมกมันถูกทำลายจนเป็นพืชพบเห็นในป่าธรรมชาติยากขึ้น อันเนื่องมาจากมีคุณประโยชน์และปัญหาดังกล่าว การ

ขยายพันธุ์เพื่ออนุรักษ์โมกมันจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ปกติการขยายพันธุ์โมกมัน สามารถทำได้โดยใช้กิ่งปักชำ ตอนกิ่ง และเพาะเมล็ด วิธีที่สะดวกและนิยมใช้มากที่สุด คือ การเพาะเมล็ด แต่โดยทั่วไปพืชจะมีระยะเวลาที่เมล็ดแก่เก็บเมล็ดได้แตกต่างกัน บางชนิดมีระยะเวลาดังกล่าวไม่ตรงกับระยะเวลาของการเพาะกล้า แม้ว่าจะเก็บรักษาเมล็ดไว้ได้ระยะหนึ่งในภาชนะและอุณหภูมิที่เหมาะสม แต่พืชบางชนิดบางปีอาจให้เมล็ดน้อยหรือไม่มีเลย ทำให้ขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ได้ [4] การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนไม้ยืนต้นและไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิดโดยไม่ต้องรอฤดูกาลติดผลและเมล็ด เพราะสามารถเก็บรักษาต้นกล้าขนาดเล็กไว้ในหลอดทดลองได้ยาวนาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงปลายยอดจะได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในเวลาสั้น ๆ จึงมีประโยชน์ในการอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชให้คงอยู่ในธรรมชาติ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

การศึกษารายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโมกมัน แต่พบรายงานวิจัยพืชวงศ์เดียวกันหลายฉบับ เช่น ปุณณภา [6] พบว่าอาหารสูตร MS [7] ที่เติม NAA 1.0 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล ชักนำให้เนื้อเยื่อชวนชม [*Adenium obesum* (Fosk.) Roem. & Schult.] เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Oliveira [8] ที่พบว่าเนื้อเยื่อของ *Tabernaemontana fuchsiaefolia* เจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS ได้ดีกว่าสูตรอื่น ๆ คล้ายกับรายงานของ Oz [9] และ Taha และคณะ [10] ที่ทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดของ *Amsonia orientalis* Deane. ในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.2 มก/ล ทำให้เกิดการพัฒนาของต้นอย่างรวดเร็ว สำหรับผลการวิจัยพืชในสกุลเดียวกับโมกมันของ Purohit และ Kukda [11] ที่สามารถขยายพันธุ์ *Whightia tinctoria* จากตาข้าง (lateral buds) ของต้นที่มีอายุกว่า 30 ปี พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 2.0 มก/ล ส่งเสริมให้เกิดยอดใหม่ได้ดี ยอดที่เกิดขึ้นชักนำให้เกิดรากโดยจุ่มแช่ใน IBA (indole butyric acid) ความเข้มข้น 100 มก/ล เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมผงถ่าน 200 มก/ล หลังจากนั้นเมื่อนำไปอนุบาลแล้วสามารถย้ายปลูกในแปลงได้สำเร็จจำนวนมาก แต่ Penchala และคณะ [12] พบว่าอาหารสูตร MS ที่ลดเกลือแร่อนินทรีย์ลงเหลือ 1 ใน 4 ส่วนร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถชักนำให้ตายอดของ *Wrightia Tomentosa* (Roxb.) Roem. เกิดยอดใหม่ได้ทุกสูตร แต่สูตรที่เติม BAP 3.0 มก/ล เกิดยอดมากที่สุด (12 ยอด) ส่วนสุภาพร [13] ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของโมกราชินี (*Wrightia sirikitiae* Mid. & Santisuk.) บนอาหารสูตร MS และ WPM [14] พบว่าเนื้อเยื่อของโมกราชินีเจริญเติบโตบนอาหารสูตร WPM ได้ดีกว่าสูตร MS จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาสรุปโดยรวมได้ว่าอาหารสูตร MS ถูกนำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์เดียวกับโมกมันมากกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนิยมใช้ NAA และ BA การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขั้นตอนการขยายพันธุ์โมกมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ส่งเสริมการอนุรักษ์โมกมันให้คงอยู่ในธรรมชาติ เพื่อใช้ประโยชน์ในฐานะพืชเศรษฐกิจ พืชสมุนไพร และไม้ดอกไม้ประดับต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชและสถานที่ทดลอง

พืชทดลอง คือ โมกมัน [*Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb.] เก็บฝักแก่อายุประมาณ 6 เดือน จากต้นโมกมันในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์

ธานี ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาคารศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ห้องเพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิประมาณ 26 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสงโดยตั้งเวลาอัตโนมัติ 16 ชั่วโมงต่อวัน และมีความเข้มแสงประมาณ 1,500 ลักซ์

2.2 อาหารเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงใช้สูตร MS เตรียมเป็นอาหารวุ้นที่มีองค์ประกอบพื้นฐานเหมือนกัน อาหารเพาะเลี้ยงเมล็ด (seed culture medium) แบ่งเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล รวม 5 สูตร และชุดที่ 2 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล รวม 5 สูตร อาหารเพาะเลี้ยงตายอด (shoot bud culture medium) เติม BAP ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มก/ล รวม 4 สูตร และอาหารชักนำราก (root induction medium) เตรียมเป็นอาหารวุ้นสูตร MS basal medium อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส (Sucrose) 30 ก/ล ปรับค่ากรด-ด่างเป็น 5.7 อาหารวุ้นเติมวุ้น 8 ก/ล หลอมวุ้นด้วยเตาไมโครเวฟให้ละลายจนหมด แล้วตวงใส่ขวดขนาด 4 ออนซ์ ขวดละ 20 มล ปิดฝาให้สนิทก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2.3 การเพาะเลี้ยงเมล็ดโมกมัน

นำฝักโมกมันที่มีอายุ 6 เดือน มาล้างด้วยน้ำยาซักล้าง 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 % นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วผ่าฝักโมกมันในสภาพปลอดเชื้อ นำเอาเมล็ดภายในฝักมาวางเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล สูตรละ 10 ซ้ำ วางเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน เมื่อครบกำหนดบันทึกลักษณะการเจริญทางลำต้น การเกิดราก ความยาวลำต้น และสี ขนาดและลักษณะแคลลัส พร้อมทั้งถ่ายภาพประกอบการทดลอง

2.4 การชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก

ตัดยอดของต้นกล้าโมกมันในสภาพปลอดเชื้อ ยาวประมาณ 3 ซม ตัดเอาส่วนปลายยอดและใบทิ้ง นำลงวางเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มก/ล รวม 4 สูตร โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดวางยอดเพาะเลี้ยงแนวตั้ง (vertical orientation) และชุดวางยอดเพาะเลี้ยงแนวนอน (horizontal orientation) สูตรละ 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน เมื่อครบกำหนดบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นทั้งที่วางแนวตั้งและแนวนอน รวมทั้งลักษณะการเปลี่ยนแปลงของยอดที่เพาะเลี้ยงและถ่ายภาพประกอบการทดลอง

2.5 การชักนำราก

วิธีการชักนำรากโดยการตัดยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปจุ่มแช่ในสารละลาย NAA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 1, 3, 5 และ 7 นาที เมื่อครบกำหนดจึงย้ายมาปักแนวตั้งในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ชุดละ 10 ซ้ำ เพื่อศึกษาการตอบสนองต่ออาหารชักนำราก เมื่อครบกำหนด 30 วัน บันทึกผลการทดลอง ทั้งจำนวนรากและจำนวนยอดที่เกิดราก และถ่ายภาพประกอบการทดลอง

2.6 การอนุบาลและย้ายปลูก

เมื่อยอดโมกมันเกิดรากที่มีความยาวและจำนวนมากพอแล้ว จึงนำมาล้างอาหารวุ้นออกจากรากให้หมดก่อนนำไปปลูกลงกระถางดินที่มีส่วนผสมของดินและปุ๋ยอินทรีย์ 1:1 นำไปวางอนุบาลในเรือนเพาะชำหรือสถานที่มีแสงแดดไม่เกิน 50% ให้น้ำทุกวัน วันละครั้ง เพื่อรักษาความชื้น หลังจากนั้นประมาณ 30

วัน จึงย้ายลงปลูกในแปลงธรรมชาติต่อไป

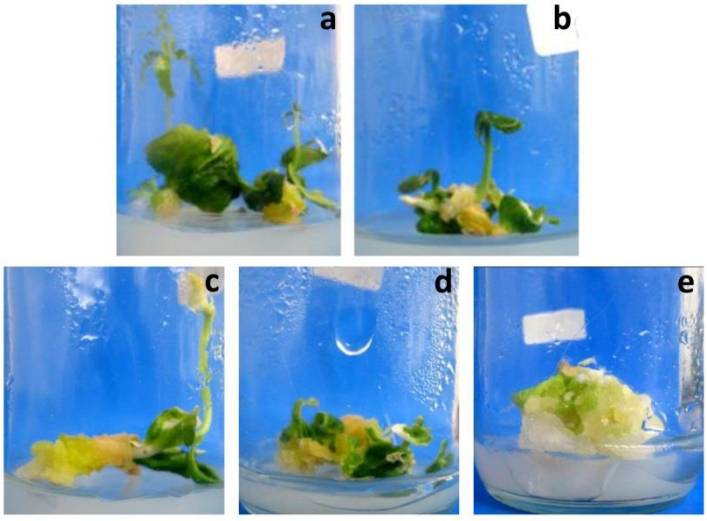
2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงจำนวน เช่น จำนวนราก จำนวนยอด นับจำนวนแล้วหาค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้เทคนิค LSD (least significance difference) ส่วนลักษณะของแคลลัส ยอดและ สี ประเมินโดยกำหนดค่าเป็น 5 ระดับคือ – (ไม่มี) + (น้อย) ++ (ปานกลาง) +++ (มาก) และ ++++ (มากที่สุด) รวมทั้งมีการพรรณนาประกอบรูป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ดโมกมันในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดโมกมันในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 3 วัน เมล็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นทุกสูตรงอกเห็นใบเลี้ยงสีขาวและเปลี่ยนเป็นสีเขียว หลังจากนั้นอีก 7 วัน จะเห็นรากงอกกระจายทั่วอาหารวุ้น และได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงผ่านไปประมาณ 15 วัน ถึงแม้ว่าการงอกของเมล็ดโมกมันในอาหารวุ้นจะเกิดขึ้นทุกสูตรแต่พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างกัน โดยสูตรที่ไม่เติม BAP และเติม BAP ความเข้มข้นต่ำ ๆ จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญทางลำต้น การเกิดรากและความยาวลำต้นมากกว่าสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้นสูง เมื่อครบกำหนด 6 สัปดาห์ จะพบว่าต้นกล้าในชุดควบคุมจะเจริญเติบโตเป็นต้นเดี่ยวและมีความยาวลำต้นเฉลี่ยมากที่สุด (6.78 ซม) ส่วนอาหารที่เติม BAP พบว่าความยาวลำต้นลดลงตามความเข้มข้นของ BAP ที่มากขึ้น และต้นกล้าอาจจะแตกกิ่ง 2-4 กิ่ง ในบางต้นของชุดทดลอง ส่วนการเกิดแคลลัสพบว่าทุกสูตรเกิดแคลลัส (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) ถ้าแคลลัสเกิดขึ้นบนอาหารที่ไม่เติม BAP หรือเติม BAP ต่ำ ๆ (0.5 มก/ล) จะเกิดแคลลัสสีขาวขนาดเล็ก (รูปที่ 1a และ 1b) แต่ถ้าแคลลัสเกิดขึ้นบนอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้นสูง (1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล) จะเกิดแคลลัสฟูขนาดใหญ่และมีสีเขียวปะปนอยู่ในเนื้อแคลลัสเป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 1c, 1d และ 1e)



รูปที่ 1 ผลของอาหารสูตร MS ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเมล็ดโมกมัน ได้แก่ 0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล (a, b, c, d และ e ตามลำดับ) หลังเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

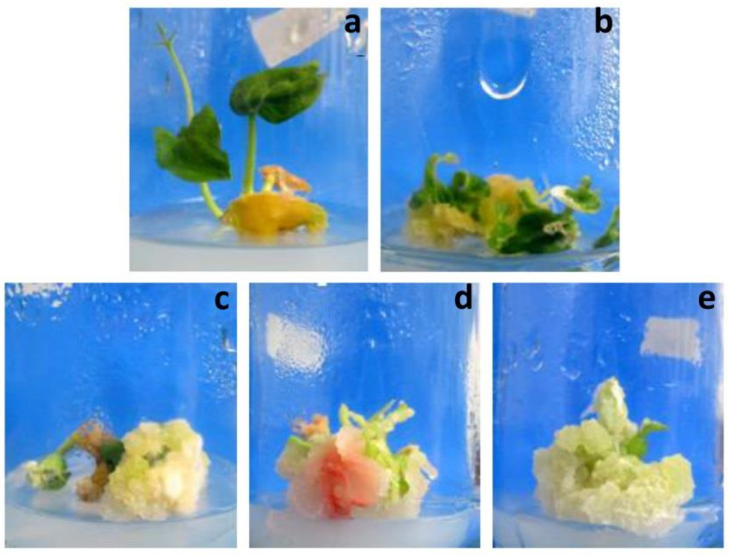
ตารางที่ 1 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเมล็ดโมกมัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

BAP (มก/ล)	การเจริญทางลำต้น	เกิดราก	ความยาวลำต้น ($\bar{x}$)	ขนาดแคลลัส
0	++	+++	5.45[a]	+
0.5	++	++	4.22[b]	++
1.5	+++	++	3.61[c]	+++
2.5	+	+	2.65[d]	++++
3.5	+	+	2.60[d]	++++

+ = น้อย; ++ = ปานกลาง; +++ = มาก; ++++ = มากที่สุด; LSD_{05} ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

3.2 การเพาะเลี้ยงเมล็ดโมกมันในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อนำเมล็ดโมกมันลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง ประมาณ 1 สัปดาห์ เปลือกหุ้มเมล็ดจะเกิดการเปิดอ้าและมีใบเลี้ยงสีขาวงอกออกมาก่อนแล้วค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียว ต่อมาไม่นานจะปรากฏแคลลัสที่ใบเลี้ยงและเยื่อหุ้มขึ้น ในสัปดาห์ที่ 2 จะเกิดแคลลัสเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะบริเวณใบเลี้ยงจะเห็นแคลลัสสีต่าง ๆ เช่น สีขาว น้ำตาล ชมพู และเขียว โดยปริมาณการเกิดแคลลัสมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ 2,4-D กล่าวคือ ความเข้มข้นของ 2,4-D ยิ่งสูงขึ้นขนาดของแคลลัสจะยิ่งโตขึ้น ดังนั้นชุดควบคุมที่ไม่เติม 2,4-D จึงมีขนาดแคลลัสเล็กที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3.5 มก/ล (รูปที่ 2 และตารางที่ 2) แต่สีของแคลลัสไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ 2,4-D เพราะเนื้อเยื่อของแคลลัสมีหลายสีปะปนกัน (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเมล็ดโมกมัน ได้แก่ 0, 0.5, 1.5, 2.5 และ 3.5 มก/ล (a, b, c, d และ e ตามลำดับ) หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

ตารางที่ 1 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเมล็ดโมกมัน หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

2,4-D (มก/ล)	สีของแคลลัส					ลักษณะแคลลัส	เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส (ซม)
	เหลือง	เขียว	น้ำตาล	ขาว	ชมพู		
0	+	+	+	+	-	ก้อนเล็กไม่ฟู	1.00[d]
0.5	+	+	+	+	+	ฟูเป็นก้อนไม่แข็ง	2.40[c]
1.5	+	+	+	+	-	ฟูเป็นก้อนไม่แข็ง	2.85[b]
2.5	+	+	+	+	+	ฟูเป็นก้อนเนื้อแข็ง	2.91[b]
3.5	+	+	+	+	+	ฟูเป็นก้อนเนื้อแข็ง	3.80[a]

+ = เกิดขึ้น; - =ไม่เกิดขึ้น; LSD_{05} ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ทั้ง BAP และ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในพืชหลายชนิด เช่น มะละกอ [15] แววมยุรา [16] โดยปกติออกซินมีคุณสมบัติในการขยายขนาดเซลล์และการแบ่งเซลล์ [17] โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 2,4-D ที่นิยมนำมาใช้ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชได้โดยง่าย รวมทั้งชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ [15,18] การที่ 2,4-D ความเข้มข้น 3.5 มก/ล ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและมีขนาดใหญ่ที่สุดแสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของโมกมันจากลำต้นมากที่สุด [19, 20] ส่วน BAP จะส่งเสริมการแบ่งเซลล์เช่นเดียวกับไซโทไคนินชนิดอื่น ๆ [17] ดังนั้นการเติม BA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดโมกมันทำให้คัภพะที่งอกมีการแบ่งเซลล์เกิดแคลลัสขึ้น รวมทั้งอาจจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างออกซินกับไซโทไคนินภายในเซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้แบ่งเซลล์เกิดแคลลัสขึ้น [21] เมื่อเปรียบเทียบขนาดของแคลลัสที่เกิดจากอาหารที่เติม 2,4-D กับ BAP โดยรวม พบว่า 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่า ทั้งนี้เพราะ 2,4-D เป็นออกซินสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในโมกมันได้ดีกว่า BAP ที่เป็นไซโทไคนิน จึงมีลักษณะสอดคล้องกับรายงานวิจัยในพืชหลายชนิด [22-24] สำหรับแคลลัสที่มีสีเขียวส่วนใหญ่เจริญมาจากส่วนลำต้นหรือใบที่มีสีเขียวเพราะในเซลล์มีคลอโรพลาสต์เกิดขึ้น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารเพาะเลี้ยงและปัจจัยแวดล้อมขณะเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสงจะกระตุ้นให้เซลล์สร้างคลอโรพลาสต์ขึ้น [20]

3.3 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในอาหารที่เติม BAP

การสังเกตการตอบสนองของยอดโมกมันที่นำลงเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ายอดที่นำลงเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP หรือชุดควบคุมสามารถเจริญเติบโตต่อไปเป็นยอดเดี่ยวได้โดยไม่มีการเกิดแคลลัส (รูปที่ 3a) แต่อัตราการเจริญเติบโตจะช้าลงหลัง 4 สัปดาห์ ผ่านไป ส่วนยอดที่นำลงเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP ทุกสูตร สิ่งแรกที่ปรากฏคือเกิดแคลลัสสีขาวฟูบริเวณรอยตัดและตายอดจะเจริญเติบโตแข็งแรงดีและมีสีเขียวเข้ม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างยอดที่นำลงวางเลี้ยงในแนวตั้งกับ

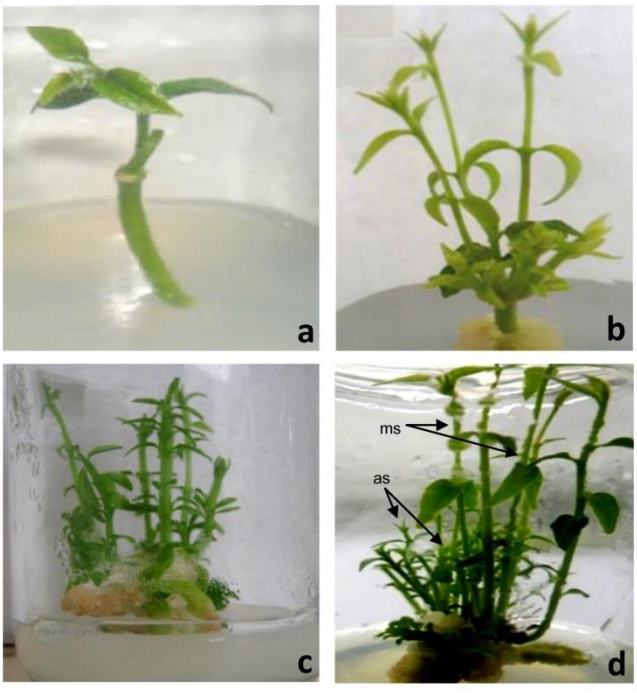
แนวนอน พบว่าการวางแบบแนวตั้งเกิดยอดเป็นกระจุกบริเวณตาข้าง รูปที่ 3b) และทำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด (7.40 ยอด) ส่วนการวางในแนวนอนพบว่าปริมาณยอดสูงสุดเกิดขึ้นในอาหารที่เติม BAP 3.0 มก/ล (3.82 ยอด) ทั้งนี้ไม่ว่าจะวางเพาะเลี้ยงในแนวตั้งหรือแนวนอนอัตราการเกิดยอดมีแนวโน้มลดลงถ้าความเข้มข้นของ BAP ต่ำหรือสูงเกินไป (ตารางที่ 3) เมื่อทดลองย้ายเลี้ยงไปยังอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มยอดใหม่ได้จำนวนมาก

อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BAP กระตุ้นให้แคลลัสเจริญเติบโตขึ้นบริเวณรอยตัดอย่างรวดเร็ว ทำให้บริเวณลำต้นบวมพอง หลังจาก 4 สัปดาห์ ไปแล้ว แคลลัสเหล่านี้มีความสามารถพัฒนายอดขึ้นมาได้โดยไม่ต้องย้ายเลี้ยงไปบนอาหารใหม่ โดยสังเกตได้จากยอดที่เกิดจากแคลลัสจะมีขนาดเล็กเป็นกระจุกจำนวนมาก แตกต่างจากยอดที่เกิดขึ้นจากตายอดเดิมจะมีขนาดใหญ่กว่าอย่างชัดเจน (รูปที่ 3c และ 3d) เมื่อนำยอดแยกออกมาจากก้อนแคลลัสจะพบว่ายอดเหล่านี้สามารถแยกออกมาได้โดยง่าย โดยไม่มีรากเกิดขึ้นเลยและไม่มีส่วนใดติดอยู่กับชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเดิม แสดงให้เห็นว่ายอดเล็ก ๆ เหล่านี้พัฒนาขึ้นมากจากแคลลัสดังกล่าว

ตารางที่ 3 ผลของ BAP ต่อการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงยอดของต้นกล้าโมกมันบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

BAP (มก/ล)	จำนวนยอด ($\bar{x}$)	
	วางแนวนอน	วางแนวตั้ง
0	2.00^{c}	1.20^{d}
1.0	3.21^{b}	2.61^{c}
3.0	3.82^{a}	4.22^{b}
5.0	3.40^{ab}	7.40^{a}

LSD_{05} ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

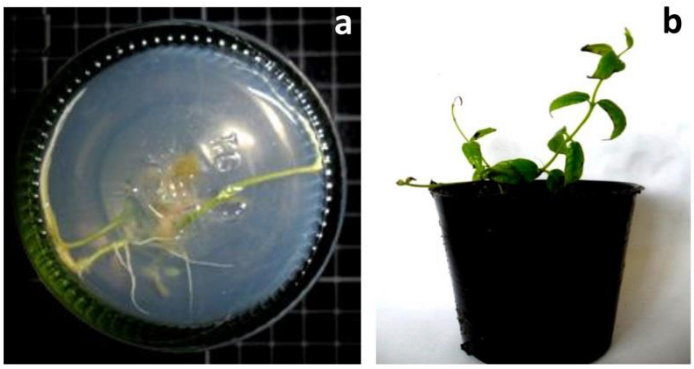


รูปที่ 3 การพัฒนาของยอดโมกมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0 และ 5.0 มก/ล หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ (a และ b) และเติม BAP 5.0 มก/ล หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 และ 8 สัปดาห์ (c และ d) (โดย as = adventitious shoots developed from callus; ms = multiple shoots developed from shoot bud)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนิน ตัวอย่าง เช่น BA, TDZ และไคเนติน มีความสามารถในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของใบและยอดของพืช [25,26] ซึ่งโดยปกติความเข้มข้นของไซโทไคนินระดับหนึ่งที่เหมาะสมกับชิ้นเนื้อเยื่อพืชจะชักนำให้เกิดการพัฒนาของยอดใหม่ได้ดี ถ้าความเข้มข้นน้อยเกินไปจะส่งเสริมให้เกิดยอดน้อย แต่ถ้าความเข้มข้นมากเกินไปจะไปยับยั้งการเกิดยอดทำให้เกิดยอดน้อยลงเช่นกัน [26] การที่ BAP ความเข้มข้น 5.0 มก/ล ทำให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงที่วางในแนวตั้งเกิดยอดได้มากที่สุด แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เมื่อวางในแนวนอนกลับพบว่า BAP ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/ล ทำให้เกิดยอดสูงสุด แสดงให้เห็นว่าแนวการวางชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณการเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงของโมกมัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาแนวการวางชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงของพืชหลายชนิด เช่น *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss [27] *Vigna subterranea* (L.) Verdc. [28] และ Gisela 5 [29] ในพืชบางชนิดการวางชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงในแนวตั้งทำให้เกิดยอดมากกว่าในแนวนอน [30,31] แต่ในพืชบางชนิดการวางในแนวนอนจะทำให้เกิดยอดมากกว่า ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าการวางแนวนอนอาจจะมีผลให้สามารถเคลื่อนย้ายสารอาหารและ BA ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ดียิ่งขึ้นทำให้เกิดยอดมากขึ้น [29] แต่ในพืชหลายชนิดรวมทั้งโมกมันกลับพบว่าการวางแนวตั้งให้ปริมาณยอดที่มากกว่า ซึ่งเป็นผลจากการตัดใบและปลายยอดออกจากชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงทำให้ลดปรากฏการณ์ข่มโดยยอด (apical dominance) ส่งผลให้อัตราส่วนความเข้มข้นของออกซินกับไซโทไคนินบริเวณตาข้างเหมาะสมต่อการแตกตาใหม่จากตาข้างจำนวนมาก [27]

3.4 การชักนำราก

จากการทดลองเบื้องต้นโดยทดลองย้ายยอดโมกมันลงชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ IBA พบว่าบริเวณรอยตัดเกิดแคลลัสจำนวนมาก ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ จึงทำการตัดตกแต่งยอดโมกมันที่ได้จากการทดลองในตู้ปลอดเชื้อให้มีความยาวประมาณ 3 ซม จุ่มด้านรอยตัดในสารละลาย NAA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ในระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 นาที แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนโดยปักด้านรอยตัดลงในอาหารวุ้น หลังจากเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่าการจุ่มแช่ใน NAA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยที่การแช่ในระยะเวลานาน 7 นาที (รูปที่ 4a) จะชักนำให้มีจำนวน (3.91 ราก) และความยาว (1.14 ซม.) รากมากที่สุด ส่วนชุดควบคุมไม่มีรากเกิดขึ้น (ตารางที่ 4)



รูปที่ 4 การชักนำรากและย้ายปลูกต้นกล้าโมกมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยเกิดรากหลังจากแช่ใน NAA 1.0 มก/ล แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (a) และต้นกล้าโมกมันที่ผ่านการอนุบาลและย้ายปลูกในกระถางดินผสมปุ๋ยอินทรีย์ (b)

การชักนำรากโดยการแช่ในออกซินความเข้มข้นสูงใช้ได้ผลดีกับ *W. tomentosa* [32] และ *W. tinctoria* [11] แตกต่างจากโมกมันที่พบว่าการจุ่มแช่ในออกซินความเข้มข้นต่ำทำให้เกิดรากที่มีคุณภาพดีและย้ายไปอนุบาลได้ จากการทดสอบเบื้องต้น (preliminary study) พบว่าการใช้ออกซินความเข้มข้นสูงหรือแช่เป็นเวลานานหรือการเติมออกซินในอาหารชักนำรากจะทำให้เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดขนาดใหญ่และขัดขวางการเกิดราก กรณีนี้มีลักษณะเหมือนรายงานวิจัยในพืชสกุลโมกหลายชนิด [11,32] ซึ่ง Purohit และ Kukda [11] ได้แก้ปัญหาโดยการลดปริมาณสารอนินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงให้น้อยลงทำให้ลดการเกิดแคลลัสได้ ส่วน Penchala และคณะ [12] ใช้วิธีลดปริมาณสารอนินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงลงเหลือเพียง 1 ใน 4 ส่วนและเติม IAA หรือ IBA ลงในอาหารปริมาณต่ำ ๆ สามารถชักนำรากของ *W. tomentosa* ได้ผลดี แต่ผลการศึกษาในโมกมันพบว่าการจุ่มแช่ใน NAA ความเข้มข้นต่ำและระยะเวลาสั้น ๆ สามารถชักนำรากและแก้ปัญหาการเกิดแคลลัสได้ผลดีเช่นเดียวกัน

3.5 การอนุบาลและย้ายปลูก

หลังจากต้นโมกมันเกิดรากมากพอและมีความแข็งแรงดีแล้ว ทำการล้างเอาอาหารวุ้นที่ติดรากออกให้หมดแล้วทดลองย้ายปลูกในกระถางดินโดยไม่ได้อนุบาลพบว่าไม่ประสบความสำเร็จ จึงนำไปอนุบาลโดยเริ่มจากตัดใบออกบางส่วนแล้วจุ่มแช่รากในน้ำไว้ประมาณ 5-7 วัน [33] หลังจากนั้นย้ายไปปลูกลงกระถางดินที่มีดินร่วนผสมปุ๋ยหมักในสัดส่วน 1:1 แล้วนำไปวางอนุบาลในที่ร่มที่มีแสงแดดประมาณ 50 % พบว่าต้นโมกมันมีใบเหี่ยวปรากฏให้เห็นบางส่วน อย่างไรก็ตาม หลังจากย้ายอนุบาลไปแล้ว 4 สัปดาห์ ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดประมาณร้อยละ 80 มีการเจริญเติบโตดี (รูปที่ 4b) และสามารถย้ายปลูกในแปลงได้สำเร็จ

4. สรุป

เมล็ดของโมกมันสามารถงอกได้ในอาหารวุ้นสูตร MS ทั้งเติมและไม่เติม BAP โดยอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตทางลำต้นและรากลดลง ส่วน 2,4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดและคัพภะที่งอกได้ดี แคลลัสมีหลายสี ถ้าความเข้มข้นมากยิ่งชักนำให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนการเพาะเลี้ยงปลายยอดของต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากและยอดเกิดรากได้ดีจากการจุ่มด้านรอยตัดในสารละลาย NAA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล นาน 1-7 นาที แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ต้นที่ผ่านการอนุบาลสามารถย้ายปลูกลงดินได้สำเร็จ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บุคลากร ศูนย์วิทยาศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่ได้อนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกทั้งสถานที่และอุปกรณ์ทดลอง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามแผนงานที่กำหนด

6. รายการอ้างอิง

[1] จำลอง เพ็งคล้าย, จรัล ฉ. เจริญผล, ลีนา ผู้พัฒนพงศ์ และธวัชชัย สันติสุข, 2518, ไม้มีค่าทางเศรษฐกิจไทย ตอนที่ 1, ทำเนียบนายกรัฐมนตรี, กรุงเทพฯ, 245 น.

[2] เต็ม สมิตินันท์, 2523, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ, 379 น.

[3] นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญ

พร, 2539, สมุนไพรไม้พื้นบ้าน, สำนักพิมพ์ประชาชนจำกัด, กรุงเทพฯ, 895 น.

[4] วิเชียร สุมันตกุล, 2542, หลักการปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าเบื้องต้น, เอกสารส่งเสริมและเผยแพร่ทางวนวัฒนวิทยา ปีที่ 1 เล่มที่ 2, ส่วนวนวัฒนวิจัย สำนักวิชาการป่าไม้กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ, 95 น.

[5] รัตนา อิทรานุปกรณ์, 2547, การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 215 น.

[6] ปุณณภา ยาวีระ, 2552, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชวนชมในสภาพปลอดเชื้อ, วิทยานิพนธ์วิทยาปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 125 น.

[7] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant 15: 473-497.

[8] Oliveira, A.J.B., Carvalho, V.M., Ferreira, A., Sato, F.Y. and Machado, M.F.S., 2003, *In vitro* multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae), Rev. Árv. 27: 421-425.

[9] Oz, G.C., 2008, *In vitro* propagation of *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae), Afr. J. Biotechnol. 7: 3638-3641.

[10] Taha, H.S., Farag, S. and Shams, K., 2011, *In vivo* and *in vitro* studies on *Thevetia* species growing in Egypt, establishment of *in vitro* tissue culture system and production of cardiac glycosides, J. Am. Sci. 7: 1-12.

[11] Purohit, S.D. and Kukda, G., 2004, Micropropagation of an adult tree – *Wrightia tinctoria*, Indian J. Biotechnol. 3: 216-220.

[12] Penchala, S., Talari, S., Rudroju, S.C., Marka, R. and Nanna, R.S., 2015, *In vitro* rapid multiplication of *Wrightia Tomentosa* (ROXB.) Roem. and Schultz, an endangered medicinal tree species, Int. Res. J. Biol. Sci. 4: 10-14.

[13] สุภาพร เจริญจิตต์, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโมกราชินี, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 159 น.

[14] Lloyd, G. and McCown, B.H., 1980, Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture, Int. Plant Prop. Soc. Comb. Proc. 30: 421-427.

[15] จำเนียร สร้างสาม, 2533, การเกิดต้นและเอ็มบริออยด์จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะละกอ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา, 175 น.

[16] Kanchanapoom, K., Buntin, N. and Kanchanapoom, K., 2009, Micropropagation through adventitious shoot regeneration from leaf culture of *Torenia fournieri* Lind. Songklanakarin J. Sci. Technol. 31: 587-590.

[17] Moore, T.C., 1979, Biochemistry and Physiology of Plant Hormones, Springer-Verlag, New York, 274 p.

[18] Koarapatchaikol, K. and Kanchanapoom, K., 2010, Plant regeneration from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) 'Kluai Sa' and

'Kluai Leb Mu Nang' and analysis of ploidy stability using flow cytometry, Tree Forest. Sci. Biotechnol. 4: 59-63.

[19] Sofiari, E., Racmakers, C.J.J.M., Kanju, E., Denso, K., Lammeren, A.M.V., Jacobsen, E. and Visser, R.G.F., 1997, Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50: 45-56.

[20] Ferriere, M.F., Novais, J.M. and Pais, M.S., 1989, Calli and suspension cultures for biomass production of *Euphorbia characias* L. subsp. Characias, Biotech. Lett. 11: 259-264.

[21] Trewavas, A.J. and Cleland, R.E., 1983, Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances?, Trends Biochem. Sci. 8: 354-357.

[22] อุษา พันฤทธิ์ดำ, 2547, การเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการแยกโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโ ท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา, 98 น.

[23] Kawiak, A., Krolicka, A. and Lojkowska, E., 2003, Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 75: 175-178.

[24] Souissi, T., Kremer, R.J. and White, J.A., 1997, Interaction of rhizobacteria with leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) callus tissue cells, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 47: 279-287.

[25] Srangsam, A. and Kanchanapoom, K., 2003, Thidiazuron induced plant regeneration in callus culture of triploid banana (*Musa* sp.) 'Gros Michel', AAA group, Songklanakarin J. Sci. Technol. 25: 689-696.

[26] Mok, D.W.S. and Mok, M.C., 1994, Cytokinins: Chemistry, Activity and Function, CRC Press, Inc., Florida, 423 p.

[27] Kozak, D., Pogrozewska, E. and Szmagara, M., 2013, The influence of type and orientation of explants on *in vitro* growth and development of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss, Acta. Sci. Pol. Hort. Cult. 12: 41-53.

[28] Kone, M., Kouakou, T.H., Kone, D., Zouzou, M., Kouadio, Y.J. and Ochatt, S.J., 2009, *In vitro* plantlets regeneration in bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc. (Fabaceae)) through direct shoot bud differentiation on hypocotyls and epicotyl cuttings, Afr. J. Biotechnol. 8: 1466-1473.

[29] Bosnjak, A.M., Keresa, S., Jercic, I.H. and Baric, M., 2012, The effect of cytokinin type and explant orientation on axillary shoot proliferation and *in vitro* rooting of Gisela 5 cherry rootstock, J. Food Agric. Environ. 10: 616-620.

[30] Shen, X., Castle, W.S. and Gmitter, F.G., 2010, *In vitro* shoot proliferation and root induction of shoot tip explant from mature male plants of *Casuarina*

cunninghamiana Miq., Plant Cell Tiss. Org. Cult. 101: 111-117.

[31] Kone, M., Kone, T., Koukou, H.T., Konate, S. and Ochatt, J.S., 2013, Plant regeneration *via* direct shoot organogenesis from cotyledon explants of Bambara groundnut, *Vigna subterranea* (L.) Verdc., Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 17: 584-592.

[32] Purohit, S.D., Kukda, G., Sharma, P. and Tak, K., 1994, *In vitro* propagation of adult tree *Wrightia tomentosa* through enchanced auxillary branching, Plant Sci. (Limeric). 103: 67-72.

[33] กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล, 2558, การขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ด้วยตายอดจากเหง้าอ่อน, ว.วิทยาศาสตร์ มศว. 31: 173-186.