

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก

The Effects of Plant Growth Regulators and Type of MS Media on Plant Growth and Development of *Stemona collinsae* Craib.

นิตยา สุขวรรณ และสุภาพร ภัสสร*

คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแมกกา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

Nittaya Sookwanna and Supaporn Pussorn*

School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Maeka, Muang, Phayao, 56000

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำขึ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยากที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และการเกิดยอดจำนวนมาก เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อโดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น Murashige and Shooog (MS) และในอาหารเหลว 1/2 MS ที่เติมฮอร์โมน 6- benzyl adenine (BA) ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-dicholophenoxy acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณฮอร์โมนที่ BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสทั้งในอาหารเหลว 1/2 MS และอาหารวุ้นสูตร MS คือ มีอัตราการเกิดแคลลัส 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการเกิดยอดจำนวนมากพบในอาหารเหลว 1/2 MS และอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA 5 มก./ล. โดยมีค่าเฉลี่ยของการเกิดยอดสูงสุด คือ 7.8 และ 6.0 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ แสดงให้เห็นว่าผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารทั้งสองแบบมีความคล้ายคลึงกัน แต่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1/2 MS สามารถชักนำการเกิดแคลลัสและยอดจำนวนมากของต้นหนอนตายหยากได้สูงกว่าเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นผลมาจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารในสภาพอาหารแข็งมีน้อยกว่า

คำสำคัญ : หนอนตายหยาก; สารควบคุมการเจริญเติบโต; แคลลัส

Abstract

Influence of plant growth regulators (PGR) on callus formation and shoot multiplication from node of *Stemona collinsae* was investigated using *in vitro* culture technique. Each node

segment was cultured on solid Murashige and Shooog (MS) and liquid $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 0, 1, 3 and 5 mg/l of 6-benzyl adenine (BA) and combined with or without 0, 0.1, 0.5, and 1 mg/l of 2, 4-dicholophenoxy acetic acid (2,4-D). The growth of *S. collinsae* node in these different concentrations of PGR and two different states of culture medium was evaluated after a period of four weeks. The results showed that the at 5 mg/l BA with 0.1 mg/l 2,4-D promoted maximum percentage of callus formation in both liquid and solid medium about 80 and 60 percent, respectively. Moreover, highest number of shoot was found in solid MS and liquid $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented 5 mg/l BA having 7.8 and 6.0 shoots per plantlet respectively. The plant growth regulators had influence on callus production and shoot multiplication in both types of medium showing similar results. Therefore, liquid medium was more suitable for inducing shoot multiplication and callus formation than solid medium due to increased contact surface of plant samples to medium.

Keywords: ; *Stemona collinsae*; plant growth regulator; callus

1. บทนำ

ประเทศไทยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของศัตรูพืช ซึ่งทำความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจของประเทศ สารเคมีสังเคราะห์จึงเข้ามามีบทบาทในการแก้ปัญหาให้กับเกษตรกร แต่การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงที่ก่อให้เกิดปัญหาตามมา เช่น ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากสารเคมีดังกล่าวต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ขาดดุลการค้า ส่งผลให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของผู้ใช้และผู้บริโภค รวมไปถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้สมดุลธรรมชาติของระบบนิเวศน์สูญเสียในระยะยาว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันอาหารปลอดภัย (food safety) กำลังมีบทบาทสำคัญในการค้าโลก และชีวิตประจำวัน เพื่อเสริมสร้างคุณภาพชีวิตของผู้ผลิต และผู้บริโภค การป้องกันกำจัดศัตรูพืช จึงให้ความสนใจและมุ่งเน้นที่จะใช้สารที่มีพิษต่ำต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม วิธีการใช้สารจากพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลง ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทดแทนสารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

และมีสมบัติสลายตัวเร็วในสภาพแวดล้อม ออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจง เนื่องจากพืชมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลากหลาย

ปัจจุบันได้มีการศึกษาด้านหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีรากใต้ดิน มีสารออกฤทธิ์ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่เรียกว่า stemona alkaloids ซึ่งมีมากกว่า 80 ชนิด ตัวอย่างสารที่สำคัญ ได้แก่ stemonine, stemocurtisine, oxyprotostemonine และ stemocurtisinol เป็นต้น โดยสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชและจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด [1] ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับให้เกษตรกรใช้ในการกำจัดศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ มีการรายงานพบสาร 1',2'-didehydrostemofoline [2] ซึ่งเป็นสารที่น่าสนใจและมีความสำคัญทางการแพทย์ในรากของต้นหนอนตายหยากที่ยังไม่ได้ระบุชนิดจากจังหวัดลำปาง และสาร stemofoline ในรากของต้นหนอนตายหยาก ชนิด *S. aphylla* ที่เก็บจากจังหวัดลำปาง [3] ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์

ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยมีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์ได้ [4] ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาการขยายพันธุ์หนอนตายหยากชนิด *Stemona collinsae* และศึกษาความสามารถที่จะชักนำขึ้นส่วนบริเวณข้อจากต้นหนอนตายหยากให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดจำนวนมาก เพื่อเพิ่มปริมาณการขยายพันธุ์ให้มากขึ้น การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ต้นหนอนตายหยากโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS จะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายสำหรับส่งถ่ายยีนในงานด้านพันธุวิศวกรรมพืช สำหรับการผลิตและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากต้นหนอนตายหยากในเชิงธุรกิจ โดยไม่ทำลายระบบนิเวศน์ที่ต้นหนอนตายหยากอาศัยอยู่ อีกทั้งเพื่อเป็นแนวทางการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรนี้ต่อไปในอนาคต ดังนั้นเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชและการผลิตสารทุติยภูมิเนื่องจากสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของสารทุติยภูมิให้มีมาตรฐานแน่นอน อีกทั้งการผลิตยังสามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี โดยไม่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม [5]



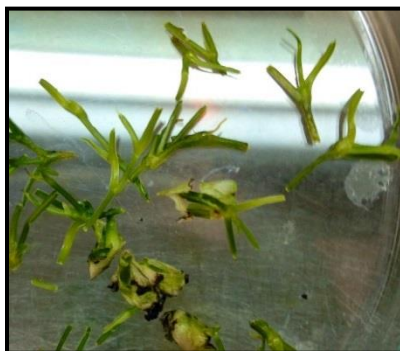
รูปที่ 1 ลักษณะต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ อายุการเพาะเลี้ยง 6 เดือน

2. อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

นำต้นหนอนตายหยากที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุการเพาะเลี้ยง 6 เดือน (รูปที่ 1) มาตัดใบและรากออกให้ได้ชิ้นส่วนของข้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แปรผันระดับความเข้มข้นต่างกัน

2.1 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของฮอร์โมน BA และ 2,4-D ในการชักนำขึ้นส่วนของข้อให้เกิดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

นำต้นหนอนตายหยากที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาตัดบริเวณขึ้นส่วนของข้อ (รูปที่ 2) ที่มีความยาวประมาณ 2.0 ซม. ย้ายขึ้นส่วนของข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างกัน ดังนี้ ฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. โดยแต่ละสูตรอาหารจะทำ 15 ข้ว โดยใช้เนื้อเยื่อ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด รวมทั้งหมด 16 สูตรอาหารเพาะเลี้ยง เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืดเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกภาพ และข้อมูลจำนวนการเกิดแคลลัสที่เกิดขึ้น



รูปที่ 2 ลักษณะชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก

2.2 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ
ฮอร์โมน BA และ 2,4-D ในการชักนำขึ้นส่วนของข้อ
ให้เกิดแคลลัสและยอดจำนวนมากที่เพาะเลี้ยงบน
อาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS เป็น
ระยะเวลา 4 สัปดาห์

นำชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก
ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ที่มีความยาวประมาณ 2.0
ซม. (รูปที่ 2) ย้ายชิ้นส่วนของข้อมาเพาะเลี้ยงบน
อาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS ที่มี
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างกัน
ดังนี้ ฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล.
ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ
1 มก./ล. โดยแต่ละสูตรอาหารจะทำ 15 ซ้ำ โดยใช้
เนื้อเยื่อ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด รวมทั้งหมด 16 สูตรอาหาร
เพาะเลี้ยง จากนั้นนำชิ้นส่วนของข้อที่เลี้ยงบนอาหาร
วุ้นสูตร MS ในขวดเพาะเลี้ยง มาเพาะเลี้ยงภายใต้
อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็น
ระยะเวลา 4 สัปดาห์ และนำขวดเพาะเลี้ยงที่มีขึ้นส่วนของ
ข้อในอาหารเหลว ½ MS ไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า
ความเร็ว 120 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศา
เซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4
สัปดาห์ บันทึกภาพและข้อมูลจำนวนการเกิดแคลลัส
จำนวนยอด และความยาวยอดที่เกิดขึ้น

2.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ จำนวนขึ้น
เนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส การสร้างยอดใหม่ ความยาวของ
ยอดที่เกิดขึ้น โดยข้อมูลในการทดลองมีจำนวน 15 ซ้ำ
ต่อหน่วยการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD
(completely randomized design) วิเคราะห์ค่า
ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ
SPSS (statistics package for the social
sciences)

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อ
การชักนำขึ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยากให้
เกิดเป็นแคลลัส ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็น
ระยะเวลา 8 สัปดาห์

ผลการศึกษาการชักนำขึ้นส่วนของข้อให้
เกิดแคลลัสโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี
ฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล.
ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ
1 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศา
เซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อ
ตรวจนับจำนวนขึ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส พบว่าใน
อาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับ
ฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์ของเกิด
แคลลัสสูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่มีฮอร์โมน
BA 3 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล.
เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 57 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3 และ
ตารางที่ 1)



รูปที่ 3 ลักษณะการเจริญเติบโตของการเกิดแคลลัสที่
เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน
BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. ที่
เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศา
เซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8
สัปดาห์

ตารางที่ 1 เพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหายากบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS		8 สัปดาห์	
2,4-D (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	จำนวนที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
0	0	0	0
	1	3	20
	3	7	47
	5	6	40
0.1	0	4	26
	1	6	38
	3	9	57
	5	12	81
0.5	0	5	32
	1	5	32
	3	6	38
	5	6	38
1	0	4	26
	1	4	26
	3	6	38
	5	6	38

หมายเหตุ : เพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสคิดจากจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสต่อจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด

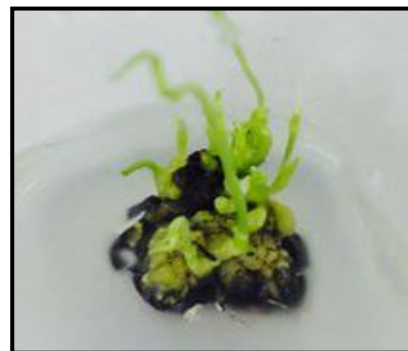
3.2 ผลของฮอร์โมน BA และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำชิ้นส่วนของข้อให้เกิดแคลลัสและการเกิดยอดใหม่จำนวนมากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร

MS และในอาหารเหลว ½ MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาการชักนำชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหายากให้สร้างแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS ที่มีฮอร์โมน BA และฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยง



(A)

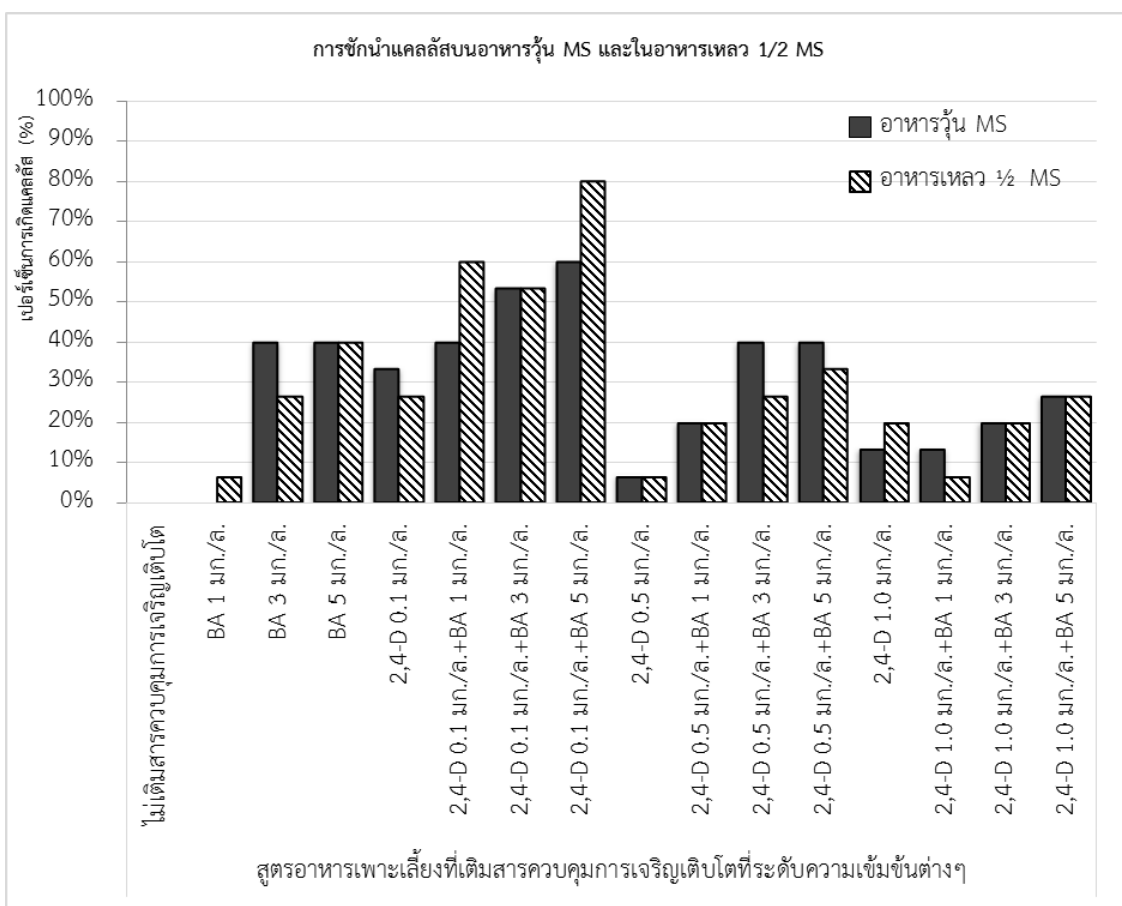


(B)

รูปที่ 4 (A) ลักษณะการเกิดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ (B) ลักษณะการเกิดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนของข้อที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1/2 MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่มีฮอร์โมน BA 1 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ (รูป

ที่ 4A) ส่วนการทดลองการชักนำชิ้นส่วนของข้อให้เกิดเป็นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่าที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4B) รองลงมาคือที่มีฮอร์โมน BA 3 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 53 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5 เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว 1/2 MS โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะ 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของฮอร์โมน BA และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาบให้เกิดยอดใหม่จำนวนมาก หลังจากนำชิ้นส่วนของข้อที่มีความยาวประมาณ 2 ซม. ย้ายมาเพาะเลี้ยงโดย

เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในระหว่างบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว 1/2 MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./

ล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และเปรียบเทียบจำนวนยอดที่เกิดขึ้นทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นของแต่ละสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่าชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $\frac{1}{2}$ MS ที่มีฮอร์โมน BA 5

มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่ได้สูงสุดโดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 7.8 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (รูปที่ 6D) ส่วนผลการทดลองการชักนำชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่ามีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 6.0 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (รูปที่ 6B)



(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 6 (A) ลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหายากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS, (B) ลักษณะการเจริญเติบโตของการเกิดยอดใหม่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์, (C) ลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหายากที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $\frac{1}{2}$ MS และ (D) ลักษณะการเจริญเติบโตของการเกิดยอดใหม่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $\frac{1}{2}$ MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ที่เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การวัดความยาวของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นพบว่าชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $\frac{1}{2}$ MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. มีความยาวของต้นประมาณ

8 ซม. (รูปที่ 7A) และชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. มีความยาวของต้นประมาณ 4 ซม. (รูปที่ 7B)



(A)



(B)

รูปที่ 7 (A) ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นเมื่อย้ายชิ้นส่วนของข้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ (B) ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นของชิ้นส่วนของข้อจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวันสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและค่าเฉลี่ยของการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงระหว่างบนอาหารวันสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	อาหารวันสูตร MS		อาหารเหลว ½ MS	
	เปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัส	ค่าเฉลี่ยของ การเกิดยอด	เปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัส	ค่าเฉลี่ยของ การเกิดยอด
ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต	0	3.07±0.59 ^j	0	3.87±1.06 ^j
BA 1 มก./ล.	0	4.27±0.88 ^{jk}	7	6.87±1.19 ^m
BA 3 มก./ล.	40	4.53±0.74 ^k	27	6.47±0.99 ^{lm}
BA 5 มก./ล.	40	6.00±0.93 ^l	40	7.80±0.94 ⁿ
2,4-D 0.1 มก./ล.	33	2.13±0.74 ^{def}	27	2.00±0.76 ^{cdef}
2,4-D 0.1 มก./ล.+BA 1 มก./ล.	40	2.13±0.74 ^{def}	60	2.87±0.83 ^{ghi}
2,4-D 0.1 มก./ล.+BA 3 มก./ล.	53	2.33±0.62 ^{efgh}	53	3.07±0.80 ⁱ
2,4-D 0.1 มก./ล.+BA 5 มก./ล.	60	2.40±0.51 ^{fgh}	80	2.93±0.70 ^{hi}
2,4-D 0.5 มก./ล.	7	1.87±0.52 ^{bcdef}	7	1.60±0.83 ^{abcd}
2,4-D 0.5 มก./ล.+BA 1 มก./ล.	20	2.40±0.63 ^{fgh}	20	2.13±0.99 ^{def}
2,4-D 0.5 มก./ล.+BA 3 มก./ล.	40	2.00±0.38 ^{cdef}	27	1.67±0.72 ^{abcde}
2,4-D 0.5 มก./ล.+BA 5 มก./ล.	40	2.20±0.68 ^{def}	33	2.07±1.03 ^{def}
2,4-D 1.0 มก./ล.	13	2.00±0.65 ^{cdef}	20	1.27±0.80 ^{ab}
2,4-D 1.0 มก./ล.+BA 1 มก./ล.	13	1.93±0.59 ^{cdef}	7	1.40±0.91 ^{abc}
2,4-D 1.0 มก./ล.+BA 3 มก./ล.	20	2.40±0.51 ^{fgh}	20	1.13±0.74 ^a
2,4-D 1.0 มก./ล.+BA 5 มก./ล.	27	2.27±0.46 ^{defg}	27	1.67±0.72 ^{abcde}

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. วิจารณ์

การทดลองการชักนำขึ้นส่วนของข้อให้เกิดแคลลัสในอาหารเหลว ½ MS พบว่าในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมฮอร์โมน BA ร่วมกับ 2,4-D มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS แม้ว่าเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS เป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของวุ้น เนื้อเยื่อของพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS มีการเจริญที่ดีและค่อนข้างเร็ว แต่ต้องระวังเรื่องการถ่ายเทอากาศของเนื้อเยื่อ ถ้าเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวจำเป็นต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมไปด้วยเสมอ เพราะการเขย่าจะช่วยให้ออกซิเจนละลายลงในอาหารส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้ช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ขึ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ [6] อย่างไรก็ตาม ในรายงานผลการศึกษาศักยภาพแคลลัสส่วนใหญ่พบในอาหารวุ้นสูตร MS ตัวอย่าง เช่น กัลยา ได้ศึกษาศักยภาพการชักนำให้เกิดแคลลัสในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่าที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.05 มก./ล. สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของโคนต้นของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่มากที่สุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียวสูงสุด คือ 33.33 เปอร์เซ็นต์ [7]

ลักษณะของการเจริญเติบโตแคลลัสหนอนตายหยากที่เกิดขึ้นมีลักษณะเหมือนกับการทดลองของ Veisseire และ Montoro จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) แคลลัสจะ

มีลักษณะเป็นแบบคอมแพค เป็นก้อนแข็ง เซลล์เกาะตัวกันแน่น [8,9] ซึ่งให้ผลในการทำงานวิจัยที่ได้ศึกษาศักยภาพการชักนำขึ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยากให้เกิดเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในช่วงที่ 1-2 สัปดาห์แรกเริ่มมีเนื้อเยื่อเจริญขึ้นมาจากบริเวณชิ้นส่วนของข้อที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ต่อมาสัปดาห์ที่ 3-4 พบจำนวนของการเกิดแคลลัสเป็นกลุ่มก้อนเล็ก ๆ เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อขยายระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเจริญเติบโตรูปร่างค่อนข้างขนาดใหญ่กว่าการชักนำแคลลัสที่อายุการเพาะเลี้ยงที่ 4 สัปดาห์ เนื่องจากมีอายุการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นทำให้เกิดแคลลัสเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferreira และคณะ ได้รายงานเช่นกันว่า แคลลัสที่ได้เจริญมาจากปลายยอด ลำต้นของ *Euphorbia characias* จะมีลักษณะแบบคอมแพค สีเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น แคลลัสที่มีสีเขียวเกิดขึ้นนี้ เพราะมีคลอโรฟิลล์ และปริมาณของคลอโรฟิลล์จะขึ้นกับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะปัจจัยแสง [10]

ส่วนการเพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนของข้อเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดสูงกว่าเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ในการทดลองเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อส่งเสริมการเพิ่มจำนวนยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS มีรายงานจากพืชในวงศ์เดียวกับดาหลา โดยเพาะเลี้ยงส่วนยอดของ *Zingiber zerumbet* Smith บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. เพียงชนิดเดียวสามารถชักนำจำนวนยอดได้สูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยของการเกิดยอด คือ 3.60

ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ [11] จากผลการศึกษาถึงแม้ว่าการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดนั้นต้องการฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสม แต่ในทางปฏิบัตินั้นพบว่ารายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของข้อเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากนั้นส่วนใหญ่มีการเติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว โดยไม่ต้องเติมออกซินก็สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดได้ดี เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชสามารถสร้างออกซินได้เองในปริมาณที่เพียงพอจึงไม่ต้องการออกซินเพิ่มจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาวบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 3.61 ยอดต่อชิ้นส่วน [12] จากการศึกษางานวิจัยของ เทิดศักดิ์ ได้รายงานผลทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างของเสี้ยวดอกขาว ที่เติมฮอร์โมน BAP ระดับความเข้มข้นต่างกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่าที่เติม BAP ความเข้มข้น 5.0 มก./ล. ทำให้มีการเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด แต่ยอดที่ได้ส่วนมากมีขนาดยาวน้อยกว่า 0.5 ซม. [13] ซึ่งแตกต่างจากการชักนำยอดจากชิ้นส่วนของข้อต้นหนอนตายหยากที่สามารถชักนำการสร้างยอดใหม่ได้จำนวนมาก และยังส่งเสริมการยึดตัวของลำต้นให้มีความยาวเพิ่มมากขึ้น

การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว นิยมใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เนื้อเยื่อโปรโทคอร์ม เนื้อเยื่อเจริญและปลายยอด เนื้อเยื่อทอลาล์ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะไม่ได้รับอิทธิพลจากแรงโน้มถ่วง การแบ่งเซลล์และการเจริญจะรวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และจะมีการเจริญออกไปในทุกทิศทาง [14] จากการศึกษาโดยใช้ชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยากนั้นเป็นบริเวณที่มีกิ่ง ใบ เจริญออกมา ตาม

ปกติข้อมักจะพองโตกว่าส่วนอื่น ๆ ของลำต้น และเป็นส่วนที่มีใบติดอยู่จึงสามารถชักนำการเจริญเติบโตของข้อที่สร้างจำนวนยอดแขนงได้จำนวนมากได้ ซึ่งข้อเหล่านี้สามารถมาตัดแบ่ง หรือนำไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดได้ต่อไป และลักษณะของยอดที่ได้จะสมบูรณ์กว่าจะเป็นยอดที่เหมาะสมกับการนำไปชักนำให้เกิดเป็นรากต่อไป

5. สรุป

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจำนวนมากในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก โดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว 1/2 MS หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา นาน 4 สัปดาห์ พบว่าในอาหารเหลว 1/2 MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของข้อมากที่สุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุดในอาหารที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุด คือ 7.8 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ และมีความสูงของต้น ความยาวประมาณ 8 ซม. ส่วนผลการเกิดแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่าในอาหารที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ให้ค่าเฉลี่ยของการเกิดยอดอยู่ที่ 6.0 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ และมีความสูงของต้น ความยาวประมาณ 4 ซม. และหลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อในการชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นระยะเวลา นาน 8 สัปดาห์ เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสมากที่สุดบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 5 มก./ล. ร่วมกับฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิด

แคลลัสสูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์

6. รายการอ้างอิง

- [1] Pilli, R.A., Rosso, G.B. and de Oliveira, M.C.F., 2000, Recent progress in the chemistry of the Stemona alkaloids, *Nat. Prod. Rep.* 17: 117-127.
- [2] Satraruji, K., Sastraruji, T., Pyne, S.G., Ung, A.T., Jatisatienr, A. and Lie, W., 2010, Semisynthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of stemofoline alkaloids and analogues, *J. Nat. Prod.* 73: 935-941.
- [3] Sastraruji, T., Chaiyong, S., Jatisatienr, A., Pyne, S.G., Ung, A.T. and Lie, W., 2011, Phytochemical studies on Stemona aphylla: Isolation of a new stemofoline alkaloid and six new stemofurans, *J. Nat. Prod.* 74: 60-64.
- [4] Baird, M.C., Pyne, S.G., Ung, A.T., Lie, W., Sastraruji, T., Jatisatienr, A., Jatisatienr, C., Dheeranupattana, S., Lowlam, J. and Boonchalermit, S., 2009, Semisynthesis and biological activity of stemofoline alkaloids, *J. Nat. Prod.* 72: 679-684.
- [5] Ramachandra, R. S., and G. A. Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances.* 20: 101-153.
- [6] อรดี สหวัชรินทร์, 2526, อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 33 น.
- [7] กัลยา รัตนถาวรกิติ, 2550, การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการส่งถ่ายยีนในปทุมมา, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 100 น.
- [8] Veisseire, P., Linossier, L., Coudret, A., 1994, Effect of abscisic acid and cytokynins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 39: 219-23.
- [9] Montoro, P., Etienne, H., Michaux-Ferriere, N and Carron, M.P., 1993, Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 33: 331-338.
- [10] Fernandes-Ferreira, M., Novais, J.M. and Pais, M.S.S., 1989, Calli and suspension cultures for biomass production of *Euphorbia characias* L. subsp. *characias*, *Biotechnol. Lett.* 11: 259-264.
- [11] Faridah, Q.F., Abdelmageed, A.H.A, Julia, A.A. and Nor Hafizah, R., 2011, Efficient *in vitro* regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (avaluable medicinal plant) plantlets from rhizome bud explants, *Afr. J. Biotechnol.* 46: 9303-9308.
- [12] พันธิตรา กมล, อุรัสยาน์ บุญยประมุข และอนุพันธ์ กงบังเกิด, 2012, ผลของไซโตไคนินและออกซินต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงขมิ้นขาว (*Curcuma manga* Valetton & Zijp.), *ว.พฤกษศาสตร์ไทย* 4 (ฉบับพิเศษ): 87-92.
- [13] เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์, 2556, การเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อเส้นใยดอกขาว, รายงานการวิจัย, คณะ
เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏ
เชียงใหม่, เชียงใหม่, 36 น.

[14] แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547, การเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อพืช, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่, เชียงใหม่.