วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.2) May – August 2021 บทความวิจัย

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและไคโตซานต่อการขยายพันธุ์หยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ (*Drosera adelae* F.Muell.) ในสภาพหลอดทดลอง

The Influence of Plant Growth Regulators and Chitosan on *Drosera adelae* F.Muell. *In Vitro* Condition

ศิรศาธิญากร บรรหาร* และ ช่อทิพย์ เงินเต็ม

Sirasatiyakorn Banharn* and Chorthip Ngoentem

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 9 June 2020

Revised : 8 August 2020

Accepted : 18 August 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและไคโตซานที่มีต่อการขยายพันธุ์ของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ (*Drosera adelae* F.Muell.) ในสภาพหลอดทดลอง เริ่มจากการนำชิ้นส่วนใบขนาด 0.5×0.5 ตารางเซนติเมตรของต้นกล้าหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 3 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4- D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร ½ MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 100% โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 15.60 มิลลิเมตร และน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุด 0.36 กรัม ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเกาะตัวกันแน่น (compact callus) เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 20.00 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ความยาวยอดเฉลี่ย 1.30 เซนติเมตร จำนวนใบเฉลี่ย 4.80 ใบต่อยอดและความยาวใบเฉลี่ย 1.90 เซนติเมตร สำหรับการชักนำให้เกิดรากโดยนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 15.80 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ขณะที่การชักนำให้เกิดรากโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซาน ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซาน 0.8 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดรากได้ดีที่สุด 100% และให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 13.00 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

คำสำคัญ : ไคโตซาน ; ในสภาพหลอดทดลอง ; สารควบคุมการเจริญเติบโต ; หยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์

Abstract

The objective of this research was to investigate the influence of plant growth regulators and chitosan on micro-propagation of New Zealand sundew (*Drosera adelae* F. Muell.). The 0.5 × 0.5 cm^2 leaf explants of New Zealand sundew seedlings from 3-month-old were cultured on ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) agar media with kinetin at concentrations of 0 0.1 and 0.2. mg/l together with 2, 4- D at 1, 3 and 5 mg/l concentrations for 5 weeks. From the results, it was found that leaf explants cultured on ½ MS agar media containing 0.2 mg/l kinetin with 1.0 mg/l 2, 4-D could induce compact callus induction 100% with average diameter of 15.60 mm and the maximum fresh weight of 0.36 g calluses. Then, the callus was cultured on ½ MS agar media containing with kinetin at the concentration of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mg/l for 7 weeks. It was found that ½ MS media containing 0.4 mg/l kinetin could induce shoot well with an average shoot number 20.00 shoot/explant, average shoot height 1.30 centimeters, average number of leaves 4.80 per shoot and the average leaf length 1.90 centimeters. For root induction, the shoot explant was cultured on ½ MS media containing NAA at the concentration of 0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mg/l for 7 weeks. From the result, it was found that ½ MS media containing 0.75 mg/l NAA promoted the induction of root well with the average root number 15.80 root/shoot. While the cultivation of callus on ½ MS media containing chitosan at 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 % v/v for 5 weeks, it was found that ½ MS agar media containing 0.8 % v/v chitosan could induce callus 100% and gave the average highest root number of 13.00 root/shoot.

Keywrods : chitosan ; *in vitro* ; plant growth regulator ; New Zealand Sundew ; *Drosera adelae* F.Muell

***Corresponding author. E-mail** : siripan@go.buu.ac.th

บทนำ

หยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ (*Drosera adelae* F.Muell.) เป็นพืชกินแมลงชนิดหนึ่งอยู่ในวงศ์ Droseraceae สกุลหยาดน้ำค้าง ชื่อสามัญภาษาอังกฤษคือ Sundew พืชในสกุลนี้มีหลายชนิดด้วยกันแต่ชื่อเรียกในภาษาไทยมักเรียกรวมกันในชื่อเดียวกันว่า หยาดน้ำค้าง พืชสกุลนี้มีประมาณ 194 ชนิด แบ่งออกเป็นกลุ่มตามลักษณะของพืช และถิ่นกำเนิดมีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ หยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์มีถิ่นกำหนดในรัฐควีนส์แลนด์ทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลียพบในบริเวณพื้นที่ดินทรายตามแนวลำธารหรือบนโขดหินที่อยู่ใกล้น้ำตก ซึ่งหยาดน้ำค้างจัดเป็นพืชกินแมลงที่มีสายพันธุ์หลากหลายมากที่สุด มีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลก ตั้งแต่บริเวณขั้วโลกที่หนาวเย็น จนถึงทะเลทรายร้อนระอุในออสเตรเลีย แต่สิ่งหนึ่งที่เป็นลักษณะร่วมกันคือบนผิวใบจะมีการสร้างต่อมจำนวนนับร้อย เรียกว่า trichomes ต่อมนี้ทำหน้าที่สร้างน้ำเหนียวใสคล้ายกาวเป็นหยดเล็ก ๆ จำนวนมาก เพื่อใช้ล่อแมลงให้เข้ามาดูดกิน มองเห็นเหมือนน้ำค้าง คนไทยจึงเรียกว่า “หยาดน้ำค้าง” หรือภาษาอังกฤษเรียก “Sundew” พืชชนิดนี้ชอบขึ้นบนพื้นดินที่ขาดแร่ธาตุอาหาร ดังนั้นจึงมีวิวัฒนาการเพื่อความอยู่รอด ด้วยการจับแมลงกินเป็นอาหารเพื่อทดแทนสารอาหารที่ขาดไปจากดิน (Kamarainen *et al*., 2003) จากความสวยงามของต้นหยาดน้ำค้างที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้เป็นที่รู้จัก และมีการปลูกเลี้ยงเป็นไม้ประดับกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น ส่งผลให้พืชกลุ่มนี้เริ่มมีบทบาทในการเป็นไม้ประดับในระดับเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยมากขึ้นด้วย เนื่องจากมีความสวยงาม แปลก และมีความหลากหลายของชนิดพันธุ์ โดยพืชกลุ่มนี้ได้มีการปลูกเลี้ยง และมีการผลิตเป็นการค้าในต่างประเทศมานานแล้ว รวมทั้งมีการปรับปรุงพันธุ์จนได้ลูกผสมใหม่ที่สวยงาม สำหรับในประเทศไทยได้มีการปลูกเลี้ยงเช่นกัน แต่ยังจำกัดอยู่เฉพาะในกลุ่มผู้ชื่นชอบพืชกินแมลง และนักสะสมพืชกลุ่มนี้เท่านั้น ซึ่งการปลูกเลี้ยงเพื่อการค้ายังมีไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าจากต่างประเทศ เนื่องจากพืชสกุลหยาดน้ำค้างที่พบในประเทศไทย มีเพียง 3 ชนิด คือ จอกบ่วาย (*D. burmannii* Vahl) หญ้าน้ำค้าง (*D. indica* L.) และหญ้าไฟตะกาด (*D. peltata*) (Saengdanuch and Dovanvee, 2008) อย่างไรก็ตามโดยในปัจจุบันคนไทยรู้จักพืชกลุ่มนี้มากขึ้นทำให้มีการผลิตเป็นการค้าอย่างจริงจัง โดยเฉพาะการซื้อขายผ่านทางอินเตอร์เน็ต ทำให้ผู้ผลิตบางรายสามารถผลิตและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้ด้วย นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงสารพฤกษเคมีที่พบในช่อดอกและก้านช่อดอกของหยาดน้ำค้างที่สำคัญหลายชนิด เช่น naphthoquinones, plumbagin, ramanteeon, glucoside, rossoliside, flavonoids และ hyperoside เป็นต้น (Wagner *et al*., 1984) โดยสารเหล่านี้เป็นสารที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และเภสัชกรรม ซึ่งใช้ในการรักษา การสูญเสียความทรงจำ ความผิดปกติเกี่ยวกับดวงตา โรคหอบหืด โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง (Raju and Christina, 2013) และต้านอาการชัก (Hema *et al*., 2009) เป็นต้น

การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของต้นหยาดน้ำค้างทำได้ 2 วิธี คือการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยใช้เมล็ดและการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแยกหน่อ (Samala *et al*., 2015) การขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดในธรรมชาตินั้นจะเห็นได้ว่าการติดเมล็ดมีน้อย และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำมาก ทำให้วิธีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นมีการเพิ่มจำนวนได้น้อย และใช้เวลานานประกอบกับพื้นที่ป่าที่ถูกทำลายมากขึ้น จึงทำให้ต้นหยาดน้ำค้างในธรรมชาติลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว การนำเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ต้นหยาดน้ำค้าง ทำให้สามารถทราบวิธีการขยายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อเพิ่มปริมาณหยาดน้ำค้างให้มีจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น โดยปัจจุบันมีผู้ผลิตและจำหน่ายหยาดน้ำค้างสายพันธุ์จากต่างประเทศหลายชนิดที่มีความสวยงามซื้อขายกันในราคาแพง และมีหลายรายงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกินแมลงสกุลหยาดน้ำค้าง เช่น การศึกษาการขยายพันธุ์หยาดน้ำค้าง (*D. burmannii*) ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยวิธีการนำชิ้นส่วนใบ กาบใบ และยอดอ่อนของต้น

หยาดน้ำค้างอายุ 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่มีการเติม และไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ประกอบด้วย benzyl adenine (BA) kinetin (KN) indole- acetic acid (IAA) และ ∝-naphthalene acetic acid (NAA) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ ใบ และราก ในทุกชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกชนิด และบนอาหารที่ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับ KN (Thawirojanakarn *et al*., 2018) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นในสภาพหลอดทดลองของหยาดน้ำค้าง (*D. burmannii*) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด บนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม BAP ร่วมกับ NAA พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอด และรากได้ดี (Yanthan *et al*., 2017) รวมถึงงานวิจัยที่ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นและการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในสภาพหลอดทดลองของหยาดน้ำค้าง 2 ชนิด คือ *D. spathulata* Labill. และ *D. adelae* F. Muell. บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักที่แตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วนใบของ *D. spathulata* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS สามารถชักนำให้เกิดยอดและออกดอกในสภาพหลอดทดลองได้ โดยมีจำนวนยอดและจำนวนช่อดอกมากที่สุด ขณะที่ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS สามารถถูกชักนำให้เกิดรากได้ดี โดยมีจำนวนรากและความยาวรากมากที่สุด สำหรับชิ้นส่วนใบของ *D. adelae* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS สามารถถูกชักนำให้เกิดยอดและรากได้ดีเช่นกัน โดยมีจำนวนยอดและจำนวนรากมากที่สุด และเมื่อนำชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างทั้ง 2 ชนิดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *D. spathulata* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/4MS ที่เติม IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด ส่วนชิ้นส่วนยอดของ *D. adelae* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด (Krongtam and Junkasiraporn, 2019) นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการนำไคโตซาน (Chitosan) ซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในด้านการเกษตรมากขึ้น โดยนำมาใช้เป็นอาหารเสริมให้แก่พืชเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดอีกด้วย (Prasertsongsakul, 2012)

จะเห็นได้ว่าการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์ของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ เป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษา ซึ่งผู้วิจัยต้องการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการขยายพันธุ์หยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ในสภาพหลอดทดลองให้หลากหลายมากขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้เพาะเลี้ยงหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ชนิดนี้ โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ kinetin และ 2,4-D ซึ่งถือเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดยอด รวมถึงศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินคือ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ นอกจากนี้ยังศึกษาระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากจากแคลลัสของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์อีกด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดการขยายพันธุ์ของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ ให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ผู้เพาะเลี้ยงสามารถเลือกใช้ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดนี้ได้อย่างเหมาะสม ลดการนำเข้าของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ต่อไป

ในอนาคต และเป็นการสร้างรายได้เสริมให้กับเกษตรผู้เพาะเลี้ยงหยาดน้ำค้างในประเทศไทย เป็นประโยชน์ในด้านเศรษฐกิจของตลาดพืชกินแมลง และสามารถนำวิธีการศึกษาดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับพืชกินแมลงในสกุลนี้ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเพื่อผลิตต้นกล้าปลอดเชื้อ

เลือกใบที่สมบูรณ์ของของ *D. adelae* ที่ซื้อจากร้านขายต้นไม้กินแมลงในจ.ชลบุรี มาล้างด้วยน้ำสบู่เพื่อกำจัดฝุ่น เศษซากแมลงที่อาจติดกับขอบใบ และช่วยลดแรงตึงผิวของใบ จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 5 % เป็นเวลา 10 นาที โดยวางบนเครื่องเขย่า และนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำชิ้นส่วนใบวางลงบนจานแก้ว และตัดให้มีขนาด 0.5 × 0.5 ตารางเซนติเมตร นำไปวางเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่ามีการสร้างยอด ใบและรากเกิดขึ้น (Krongtum and Junkasiraporn, 2019)

ผลของ kinetin ร่วมกับ 2,4-D ต่อการชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัส

ตัดชิ้นส่วนใบจากต้นกล้าปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน ให้มีขนาด 0.5 × 0.5 ตารางเซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่มีการเติม kinetin ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 10 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 16 ลักซ์ (เพาะเลี้ยงในที่ความเข้มแสงต่ำเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี) โดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส น้ำหนักสดของแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อเพื่อศึกษาผลของ kinetin ที่มีต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดและผลของไคโตซานต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดรากต่อไป

ผลของ kinetin ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

นำแคลลัสอายุ 5 สัปดาห์ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1±0.2 เซนติเมตร จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 6 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลการทดลอง ได้แก่ จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ และความยาวใบ จากนั้นคัดเลือกยอดที่แข็งแรงสมบูรณ์ดี ไปเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดรากต่อไป

ผลของ NAA ต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร มาตัดให้มีขนาดความยาว 1.5±0.1 เซนติเมตร จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0,0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 5 ชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลการทดลอง ได้แก่ จำนวนรากและความยาวราก

ผลของไคโตซานต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดราก

นำแคลลัสอายุ 5 สัปดาห์จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1±0.2 เซนติเมตร จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ รวม 6 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลการทดลองได้แก่ จำนวนรากและเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของรากที่เกิดขึ้นในสภาพหลอดทดลอง

นำโครงสร้างของรากที่ต้องการศึกษาออกมาจากขวดเพาะเลี้ยง ล้างวุ้นออกจากรากให้สะอาด แล้วนำชิ้นส่วนรากมาตัดตามขวางด้วยใบมีดโกนโดยใช้ใบมีดโกนเฉือนรากพืช ให้ได้ชิ้นบางๆ นำไปวางลอยในน้ำ แล้วใช้พู่กันคัดเลือกชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่บางวางลงบนแผ่นสไลด์ หยดด้วยน้ำ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำแผ่นสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยแสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของชุดการทดลอง และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Tukey's test ที่ระดับนัยสำคัญ $p \leq 0.05$ โดยการใช้โปรแกรม Minitab version 17

ผลการวิจัย

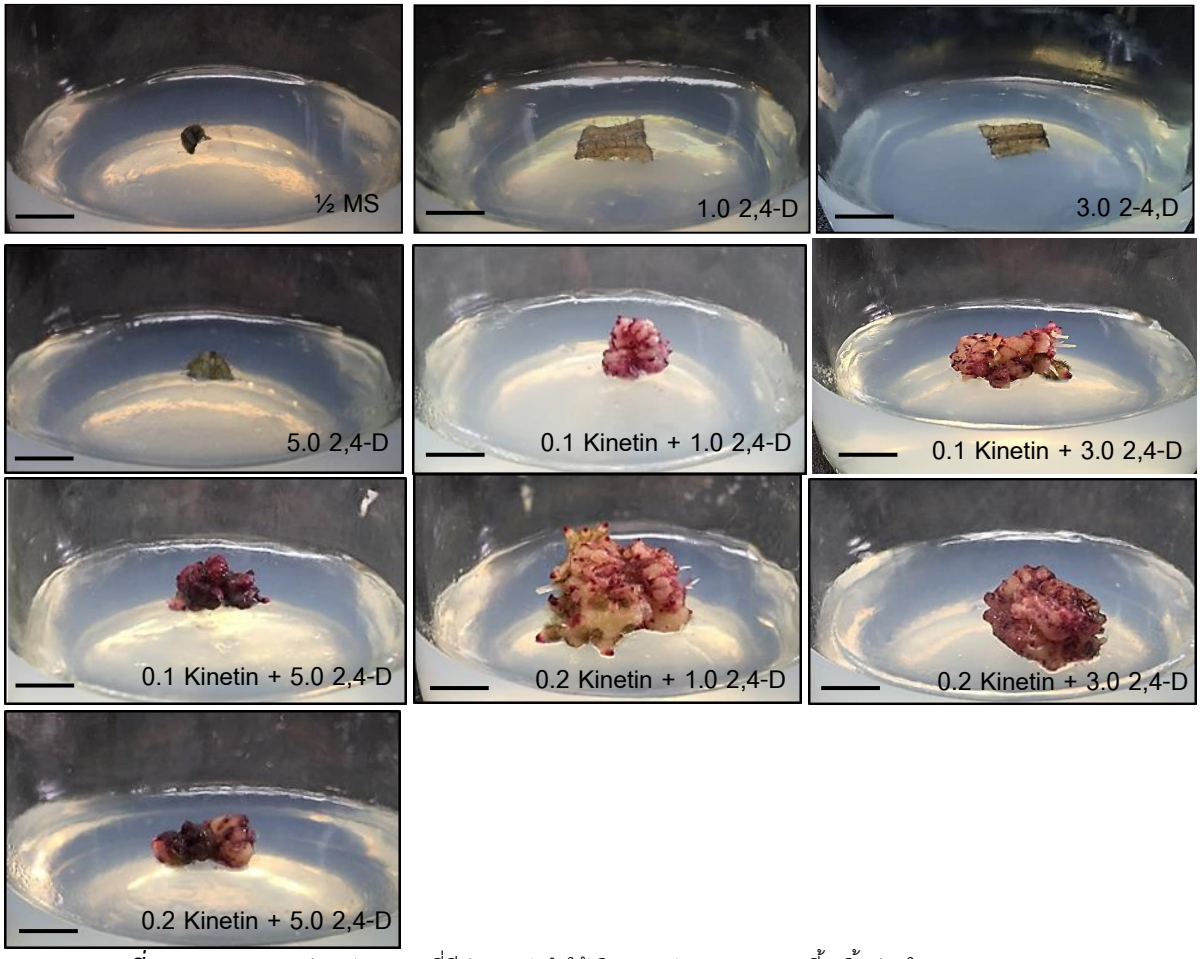
ผลของ kinetin ร่วมกับ 2, 4-D ต่อการชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ (*D. adelae*.) บนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ระดับความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 15.60±1.14 มิลลิเมตร รวมทั้งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 0.36±0.0957 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) สำหรับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะเห็นได้ว่า การเติม 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้นร่วมกับ kinetin 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100% แต่การเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

ตารางที่ 1 ผลของ kinetin ร่วมกับ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. adelae* เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

Kinetin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส (มิลลิเมตร)	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (%)
0	0	-	-	0
	1	-	-	0
	3	-	-	0
	5	-	-	0
0.1	1	8.80±0.84^{c}	0.15±0.0489^{bc}	100
	3	9.40±0.55^{bc}	0.14±0.0354^{bc}	100
	5	7.64±0.23^{d}	0.06±0.0037^{de}	100
0.2	1	15.60±1.14^{a}	0.36±0.0957^{a}	100
	3	10.60±1.82^{b}	0.18±0.0651^{b}	100
	5	8.00±0.71^{c}	0.08±0.0229^{cd}	100

* *หมายเหตุ* อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 1 ผลของ kinetin ร่วมกับ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. adelae* เป็นเวลา 5 สัปดาห์ (scale bar เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

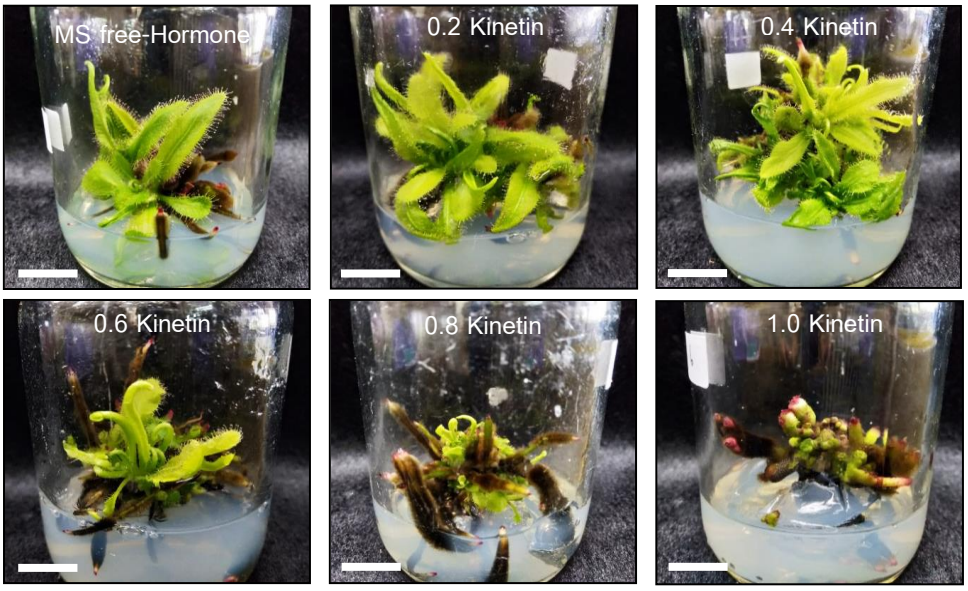
ผลของ kinetin ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* บนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตรที่เติม kinetin 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด โดยพบว่าให้จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 20.00 ±1.23 ยอด/ชิ้นส่วน และ 1.30 ± 0.27 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังสามารถชักนำให้มีการสร้างใบจำนวนมากและมีความยาวใบเฉลี่ยมากที่สุด 4.80±0.45 ใบต่อยอด และ 1.90±0.22 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม การเติม Kinetin นอกจากจะมีผลต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดแล้ว ยังพบว่าสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดรากได้อีกด้วย ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.8 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดรากได้ดี โดยมีจำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 27.60±0.89 ราก/ชิ้นส่วน และ 2.94±0.61 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ

ตารางที่ 2 ผลของ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดยอด รากและใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

kinetin (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก (ราก/ชิ้นส่วน)	ความยาวราก (เซนติเมตร)	จำนวนใบ (ใบ/ชิ้นส่วน)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)
0	8.20±0.84^{c}	0.81±0.29^{abc}	10.00±1.23^{e}	1.37±0.43^{c}	4.80±0.45^{a}	1.50±0.71^{ab}
0.2	17.40±1.34^{b}	1.10±0.42^{ab}	15.40±0.89^{c}	2.52±0.57^{ab}	4.80±0.45^{a}	1.30±0.45^{abc}
0.4	20.00±1.23^{a}	1.30±0.27^{a}	16.80±0.84^{bc}	2.41±0.42^{ab}	4.80±0.45^{a}	1.90±0.22^{a}
0.6	8.60±0.55^{c}	0.50±0.00^{c}	13.20±1.10^{d}	1.86±0.44^{bc}	2.80±1.64^{b}	0.50±0.00^{c}
0.8	6.20±1.10^{d}	0.40±0.22^{c}	27.60±0.89^{a}	2.94±0.61^{a}	3.60±1.52^{ab}	1.00±0.71^{bc}
1.0	3.40±0.55^{e}	0.50±0.35^{bc}	17.60±1.52^{b}	2.75±0.61^{ab}	2.00±0.00^{b}	0.50±0.00^{c}

**หมายเหตุ* อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 2 ผลของ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดยอด รากและใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ (scale bar เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

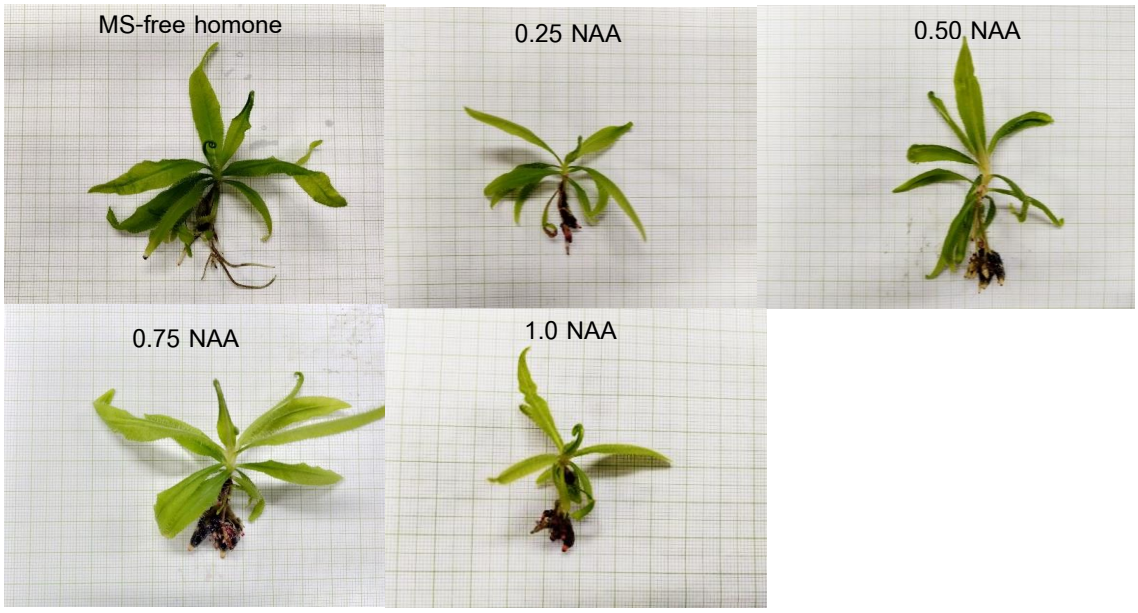
ผลของ NAA ต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *D. adelae* บนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม NAA 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 15.80±0.45 ราก/ชิ้นส่วน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3) แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า ชิ้นส่วนยอดของ *D. adelae* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (MS-free hormone) สามารถชักนำให้รากยืดยาวได้ดี โดยมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.40±1.08 เซนติเมตร และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของ NAA ต่อการชักนำให้เกิดรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *D. adelae* เป็นเวลา 7 สัปดาห์

NAA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนราก (ราก/ชิ้นส่วน)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
0	4.00±0.71^{d}	3.40±1.08^{a}
0.25	9.60±0.89^{c}	1.20±0.45^{b}
0.50	12.00±1.00^{b}	1.40±0.42^{b}
0.75	15.80±0.45^{a}	0.70±0.45^{b}
1.00	10.80±1.64^{bc}	0.64±0.49^{b}

* *หมายเหตุ :* อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 3 การชักนำให้เกิดรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *D. adelae* บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 สัปดาห์

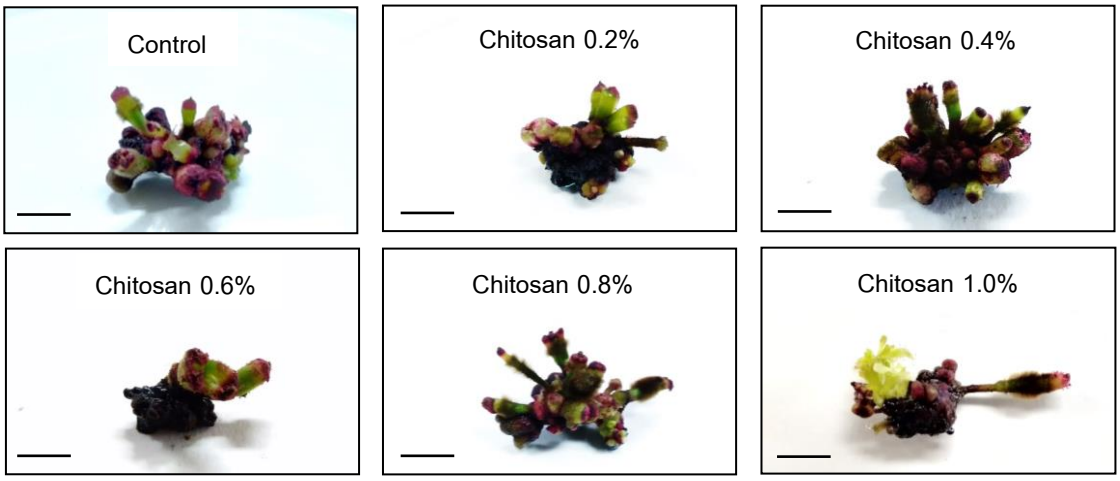
ผลของไคโตซานต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดราก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* บนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซาน ระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซาน 0.6-1.0 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 100% ซึ่งอาหารสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซาน 0.8 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 13.00±0.71 ราก/ชิ้นส่วน ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของไคโตซานต่อการชักนำให้เกิดรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

ไคโตซาน (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนราก (ราก/ชิ้นส่วน)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก
0	4.50±0.58[b]	80
0.2	3.50±0.71[bc]	40
0.4	4.75±0.50[b]	80
0.6	2.60±0.55[c]	100
0.8	13.00±0.71[a]	100
1.0	2.60±0.55[c]	100

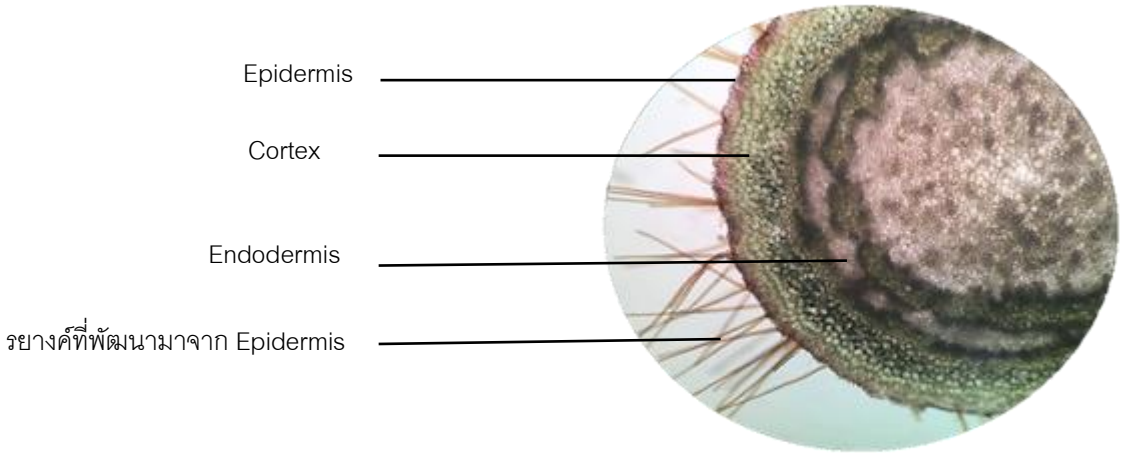
**หมายเหตุ :* อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4 ผลของไคโตซานในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการชักนำให้เกิดรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (scale bar เท่ากับ 1 เซนติเมตร)

จากการศึกษาเพิ่มเติมในด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากที่เกิดขึ้น พบว่ารากที่เกิดขึ้นมีขนสีดำเป็นจำนวนมาก เมื่อนำรากที่ได้ไปศึกษาลักษณะทางกายวิภาค พบว่าในส่วนของรากประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ ตามลำดับ คือ ชั้นของอิพิเดอร์มิส (epidermis) ที่มีลักษณะผนังเซลล์บาง ไม่มีคลอโรพลาสต์ พบประมาณ 2-3 ชั้น (Multiple epidermis) และพบรยางค์สีดำที่พัฒนามาจากชั้นอิพิเดอร์มิส ถัดเข้ามาเป็นชั้นของคอร์เทกซ์ (cortex) ที่

ประกอบด้วยเซลล์พาเรงคิมา (parenchyma) ที่มีผนังเซลล์บาง ถัดเข้ามาชั้นในสุดของชั้นคอร์เทกซ์พบชั้นเอนโดเดอร์มิส (endodermis) ที่มีลักษณะเรียงเป็นแถว และมีผนังเซลล์หนา ซึ่งจากลักษณะที่พบมีแนวโน้มว่าเป็นรากที่พัฒนามาจากแคลลัส เนื่องจากมีลักษณะคล้ายโครงสร้างของราก ซึ่งโดยปกติแล้วลำต้นของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์จะไม่มีรยางค์สีดำ และจากลักษณะทางกายวิภาคของชั้นคอร์เทกซ์ที่มีความกว้างซึ่งเป็นลักษณะของชั้นคอร์เทกซ์ที่พบในราก จึงมีแนวโน้มเป็นโครงสร้างของรากมากกว่าลำต้น (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลักษณะกายวิภาคของรากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลของ kinetin ร่วมกับ 2,4-D ต่อการชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ (*D. adelae*) บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0, 0.1, และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุด ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเกาะตัวกันแน่น (compact callus) แต่มีสีที่แตกต่างกันออกไป ตั้งแต่สีม่วงเข้มจนถึงสีชมพู ซึ่งสีที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากสารสีแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ซึ่งเป็นสารสีที่พืชสังเคราะห์ขึ้น โดยสารกลุ่มนี้เป็นสารที่ให้สีแดง ชมพู ม่วงแดง น้ำเงิน และม่วงน้ำเงิน มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ทำให้มีบทบาทต่อการป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน เป็นต้น (Chaowanikhit, 2011) และจากการทดลองยังพบอีกว่าการเติม kinetin ทุกระดับความเข้มข้นร่วมกับ 2,4-D สามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัสได้ 100% แตกต่างจากการเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin ในปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว เนื่องจากชนิดและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร เมื่อใช้ร่วมกัน

ในปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนแคลลัสอีกด้วย (Wisetsuwan, 1999) โดย 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน ช่วยทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการยืดยาวของเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการสร้างราก และยังมีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชได้อีกด้วย (Borjian and Arak, 2013) ส่วน kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่แตกต่างกันจะชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัส โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส น้ำหนักสดแคลลัส สีของแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ kinetin และ 2,4-D ที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามพืชต่างชนิดกันจะมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (Thananchai *et al*., 2013) การทดลองที่ได้ครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanfade *et al*., (2011) ที่ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ข้อ และรากของ *Boerhaavia diffusa* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า การเพาะ เลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D 5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด 96.66 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตรเดียวกันนี้ ยังสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้รองลงมาคือ 76.66 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าจากผลการทดลองครั้งนี้ แคลลัสที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง น้ำหนักสดของแคลลัสที่มากกว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. adelae* บนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมถึงแคลลัสที่ได้มีปริมาณสารแอนโทไซยานินที่มากกว่าสังเกตได้จากสีของแคลลัสที่มีความแตกต่างกันตั้งแต่สีม่วงเข้มจนถึงสีชมพู แต่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้จะมีขนาดเล็กและมีสีเขียว (Krongtum & Junkasiraporn, 2019) ซึ่งจะเห็นว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุด และแคลลัสที่ได้เกาะตัวกันแน่น มีสีม่วงเข้มจนถึงสีชมพู เหมาะต่อการนำไปศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ต่อไป

ผลของ kinetin ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสของ *D. adelae* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ยและความยาวของใบเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม kinetin 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัม/ลิตร มีการเจริญของยอดได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่เติม kinetin เนื่องจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินมีผลต่อการแบ่งเซลล์เนื่องจากไปเพิ่มการสังเคราะห์ tRNA ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน โดยเฉพาะโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ที่มีผลต่อการชักนำการเกิดยอดใหม่จำนวนมากได้ (Miyawaki *et al.,* 2004) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jayaram and Prasad (2007) ที่ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของ *D. indica* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต zeatin (Z), kinetin (KN) ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ 6-benzylaminopurine (BA) ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม Z 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนเฉลี่ยมากที่สุด อย่างไรก็ตามพัฒนาการของชิ้นพืชขึ้นกับปัจจัยหลายประการ อาทิเช่น อายุพืช ชนิดของชิ้นส่วนพืช ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโต แสง อุณหภูมิ สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งพืชแต่ละชนิด

ต้องการแตกต่างกันออกไป (Sachs, 1991) แต่หากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้ยอดไม่เจริญเติบโต (Jayaram and Prasad, 2007) ดังผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นการเติม kinetin ในระดับความเข้มข้นที่มากขึ้นจึงทำให้มีเจริญของยอดน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ

ผลของ NAA ต่อการชักนำยอดให้เกิดราก

สำหรับการชักนำให้เกิดราก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *D. adelae* บนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด แต่ในอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) มีผลทำให้รากมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งจากการชักนำให้เกิดรากจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี โดยมีจำนวนรากมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เนื่องจาก NAA เป็นสารสังเคราะห์ที่มีผลเช่นเดียวกับออกซินในธรรมชาติ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เซลล์ของพืชขยายตัว และเกิดการแบ่งเซลล์ในส่วนของลำต้น และมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้พืชเกิดราก และกระตุ้นให้ต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดรากที่สมบูรณ์พร้อมที่จะนำออกปลูกในเรือนเพาะชำได้ แต่หากมีการใช้ออกซินในปริมาณที่สูงมากเกินไปจะส่งผลยับยั้งกระบวนการพัฒนาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พืชได้ (Supinrat and Supinrat, 2014) และในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมกับเจริญเติบโต สามารถชักนำให้มีความยาวรากเฉลี่ยมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA เนื่องจากสูตรอาหาร ½ MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารน้อยจะมีการกระตุ้นให้หยาดน้ำค้างมีการพัฒนารากให้ยาวขึ้นเพื่อดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น และยังทำให้ใบมีจำนวนมากขึ้นด้วยเพื่อทำหน้าที่จับแมลงเป็นอาหารตามสภาพธรรมชาติที่พืชกินแมลงดำรงชีพอยู่ ดังนั้นการที่มีใบจำนวนมากจึงช่วยให้สามารถดักจับแมลงได้มากขึ้นเพื่อทดแทนธาตุอาหารที่ขาดไปจากดินได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เป็นการพัฒนาที่เป็นรูปแบบเฉพาะของพืชกินแมลง (Intachoti, 2010)โดยจากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มมากขึ้นมีแนวโน้มทำให้จำนวนรากเพิ่มมากขึ้น แต่จะมีความยาวรากลดลง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Chuanphung, 2004) ที่ได้ศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของต้นหยาดน้ำค้างในสภาพปลอดเชื้อและการสะสมสารพลัมบาจิน (plumbagin) โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของหยาดน้ำค้าง (*D. burmannii*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 2.53 เซนติเมตร และเมื่อระดับความเข้มข้นของ NAA เพิ่มมากขึ้นมีแนวโน้มทำให้ความยาวรากลดลง แต่มีผลทำให้น้ำหนักของรากเพิ่มขึ้นโดยสูตรอาหารที่เติม NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้น้ำหนักสดรากเฉลี่ยสูงสุด 3.56 กรัม และความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มมากขึ้นสามารถชักนำให้เกิดรากจำนวนมากแต่รากที่ได้จะสั้น

ผลของไคโตซานต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดราก

นอกจากนี้ ในการชักนำแคลลัสให้เกิดรากโดยการเติมไคโตซาน ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารวุ้นสูตร ½ MS เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS เติมไคโตซานในระดับความเข้มข้น 0.6, 0.8 และ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100% ซึ่งการเติมไคโตซาน 0.8 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 13.00 รากต่อเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการ

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสบนอาหาร ½ MS ที่เติมไคโตซานในระดับความเข้มข้นสูงสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี ซึ่งการที่แคลลัสสามารถชักนำให้เกิดรากนั้น เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบที่เติม auxin ลงไป มีผลทำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส และการที่แคลลัสสามารถพัฒนาต่อไปเป็นรากพิเศษ (adventitious root) จำนวนมากนั้น เนื่องจากปริมาณ auxin ที่ลดต่ำลงจากขั้นตอนการสร้างแคลลัสหรือการที่ไม่เติม auxin จะเกิดการสร้างรากจำนวนมาก (Yu *et.al*., 2017) และการเติมไคโตซานสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดรากได้นั้น เนื่องจากไคโตซานเป็นอาหารเสริมที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งไคโตซานมีผลต่อสมดุลของการสังเคราะห์ออกซิน โดยพบว่ามีผลไปเพิ่มการสะสมของกรดอินโดลอะซิติก (IAA) ในรากของ *Arabidopsis* ให้มากขึ้น 2-3 เท่า (Lopez-Moya *et.al*., 2017) นอกจากนี้ยังมีการนำไคโตซานไปใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดอีกด้วย รวมถึงเป็นตัวกระตุ้นให้พืชงอกราก เกิดใบใหม่ รวมถึงมีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโต และพัฒนาการของพืชได้เช่นเดียวกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยโครงสร้างของไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่ปลดปล่อยออกมาโดยที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นการใช้ไคโตซานในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงควรคำนึงถึงระดับความเข้มข้น และปริมาณที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด รวมถึงปัจจัยด้านอื่น ๆ เช่น ชิ้นส่วนพืช อายุพืช อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง (Prasertsongsakun, 2012) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Iamkheng and Nusawat, 2012) ที่ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม และต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร VW ที่เติมไคโตซานเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมไคโตซานทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม และต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องจำปา เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมไคโตซาน โดยอาหารสูตร VW ที่เติมไคโตซาน 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม และต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องจำปาได้ดีที่สุด

สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. adelae* บนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี และแคลลัสที่ได้ลักษณะเกาะตัวกันแน่น (Compact callus) และมีสีที่แตกต่างกันออกไป ตั้งแต่สีม่วงเข้มจนถึงสีชมพู และเมื่อนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม kinetin 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีผลในการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ยและความยาวใบเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งเมื่อย้ายยอดไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม NAA 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีผลทำให้มีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 15.80 รากต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติมไคโตซาน 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีผลทำให้เกิดรากมากที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดคือ 100% และให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 13.00 รากต่อชิ้นส่วน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Borjian, L. & Arak, H. (2013). A study on the effect of different concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2, 4-D and Kinetin) on callus induction in *Brassica napus*. *Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci*,*5*, 519-521.

Chaowanikhit, A. (2011). Extraction and analysis methods of anthocyanin. *Journal of Srinakharinwirot University (Science and Technology)*,*3* (6), 26-36. (in Thai)

Chuanphung, O. (2004). *Effects of NAA and BA on the growth of sundews in aseptic condition and plumbagin accumulation*. Special Problems of Bachelor Degree, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture. Kasetsart University. (in Thai)

Hema, B., Bhupendra, S., Saleem, T.S.M. & Gauthaman, K. (2009). Anticonvulsant effect of *Drosera burmannii* Vahl. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod, 2*(3), 1-4

Iamkheng, S., & Nusawat, S. (2012). Effect of chitosan on the growth of *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw. in aseptic conditions. In *the national academic conference Kasetsart University 9th Kamphaeng Saen Campus* (Page 2206–2212). Nakhon Pathom: Kasetsart University. (in Thai)

Intachoti, W. (2010). *Effect of nutrient concentration on growth of Drosera paradoxa in aseptic conditions*. Special Problems of Bachelor Degree, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture. Kasetsart University. (in Thai)

Jayaram, K. & Prasad, M.N.V. (2007). Rapid *in vitro* multiplication of *Drosera indica* L.: a vulnerable, medicinally important insectivorous plant. *Plant Biotechnol Rep, 1*(2), 79-84.

Kamarainen, T., Uusitalo, J., Jalonen, J., Laine, K. & Hohtola, K. (2003). Regional and habitat difference in 7-methyljuglone content of Finnish *Drosera rotundifolia*. *Phytochemistry,63*, 309-314.

Kanfade, H., Rudra, J., Bhowal M. & Upadhyay, A. (2011). *In-vitro* callus induction and shoot regeneration in *Boerhaavia diffusa* L. *Annals of Biological Research, 2* (1), 142-148.

Krongtam, R. & Junkasiraporn, S. (2019). *In vitro* Plant Regeneration and Callus Induction from Leaf Explants of Sundews (*Drosera spathulata* Labill. and *Drosera adelae* F. Muell.). *Burapha Science Journal*, *24*(3), 1205-1219.

Lopez-Moya, F., Escudero, N., Zavala-Gonzalez E, A., Esteve-Blázquez, A.M., Alabadí, D. & Lopez-Llorca, L.V. (2017). Induction of auxin biosynthesis and WOX5 repression mediate changes in root development in *Arabidopsis* exposed to chitosan. *Scientific Report*, *7*, 1-14.

Miyawaki, K., Matsumoto M.K. & Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal, 37*(1), 128-138.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, *15*, 473-497.

Prasetsongsakul, S. (2012). The use of chitosan in plant tissue culture. *Journal of Yala Rajabhat University*,*7*(2), 125-134. (in Thai)

Raju, A. & Christina, A.J.M. (2013). *Drosera burmannii* Vahl: antioxidant potential in Dalton's ascites lymphoma (DAL) bearing mice. *J. Med. Plants. Stud, 1*(4), 152-159.

Sachs, T. (1991). *Pattern Formation in Plant Tissue*. Cambridge University Press, Jerusalem. 234 pp.

Saengdanuch, P., & Dovanvee, W. (2008). *Carnivorous plant insectivorous plant*. Bangkok: Home and garden. (in Thai)

Samala, X., Junseedum, H., & Sae Han, O. (2015). Effect of colchicine on morphology of the sundew *in vitro*. *Journal of Plant Science*,*1*, 24-28. (in Thai)

Supinrat, S., & Supinrat, I. (2014). Effect of IBA and NAA on root induction of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. Seedling in aseptic conditions. *Journal of Science and Technology*, *22* (4), 507-514. (in Thai)

Thananchai, J., Thanapornphonphong, S., & Weianasin, S. (2013). Effect of 2,4-D and kinetin on embryogenic callus formation in white jasmine rice 105. *Agricultural Journal*, *29* (2), 177-185. (in Thai)

Thawirojanakarn, S., Kongthon, K., Thongyai, K., & Samala, X. (2018). Plant propagation of Sundew (*Drosera burmannii* Vahl.) under aseptic conditions. *Journal of Plant Science Songkhla Nakarin*, *5*(3), 18-26. (in Thai)

Wagner, H., Baldt, S. & Zgainski, E.M. (1984). *Plant drug analysis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Wisetsuwan, R. (1999). *Plant tissue culture techniques*. In The Training Documentation Basic Tissue Culture Techniques (Page 1-10). Nakhon Pathom: Center Printing House National Agricultural Promotion and Training. (in Thai)

Yanthan, J.S., Kehie, M., Kumaria, S. & Tandon, P. (2017). *In vitro* regeneration of *Drosera burmannii* Vahl. : a carnivorous plant of northeat India. *Biotech,7*, 124-133.

Yu, J., Liu, W., Liu, J., Qin, P. & Xu, L. (2017). Auxin Control of Root Organogenesis from Callus in Tissue Culture. *Front. Plant Sci*, *8*, 1-4.