ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของปลายยอดต้นเฉาก๊วยในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Plant Growth Regulators on Morphological Change of *In Vitro* Shoot Culture of *Mesona chinensis* Bentham

อธิรดา บุญเดช*
Atirada Boondech
ธนากร วงษศา*
Thanakorn Wongsasa

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดเฉาก๊วย ผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนด้วย 15% Clorox® เป็นเวลา 10 นาที และเมื่อย้ายชิ้นส่วนปลายยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด (BA, Kinetin, TDZ, IAA, IBA และ NAA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีจำนวนสูงสุดของยอดที่เจริญขึ้นมาใหม่ (12.5 ยอด) เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่จำนวนสูงสุดของรากที่เจริญขึ้นมาใหม่ (20.4 ราก) เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำสาคัญ : เฉาก๊วย / สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช / สภาพปลอดเชื้อ

ABSTRACT

Effect of types and volume of disinfectant on sterilizing shoot tip explant of *Mesona chinensis* Bentham were studied. The results found that the highest survival percentage of explants could be observed when %15 Clorox® was sterilized for 10 minutes. Shoot tip explants were then transferred to culture on semi-solid Murashige and Skoog medium (1962) supplemented with different plant growth regulators (BA, Kinetin, TDZ, IBA, IAA and NAA) at different concentrations (0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 milligram/liter) for 12 weeks. The results showed that the highest number of regenerated shoots (12.5 shoots) could obtain on MS medium augmented with 0.5 milligram/liter of BA while the highest root number (20.4 roots) could be observed on the MS medium augmented with 2.0 milligram/liter NAA.

Keywords : *Mesona Chinensis* / Plant Growth Regulators / In *Vitro*

*อาจารย์ประจำโปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

บทนำ

เฉาก๊วย (*Mesona chinensis* Bentham) จัดอยู่ในวงศ์กะเพรา (Lamiaceae) เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปีที่มีเขตการกระจายพันธุ์ในแถบพื้นที่หนาวเย็น เช่น ประเทศจีน อินเดีย เวียดนาม และมาเลเซีย เป็นพืชสมุนไพรที่มีรสหวาน มีผลสรรพคุณบรรเทาอาหารไข้ ช่วยสมานผิว ขับปัสสาวะ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชะลอริ้วรอยแห่งวัย (Lang, 2012) ด้วยคุณสมบัติที่หลากหลายนี้ เฉาก๊วยจึงถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายอย่าง ในปัจจุบันต้นเฉาก๊วยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจของจังหวัดกำแพงเพชรอย่างหนึ่ง แต่เนื่องจากเฉาก๊วยไม่ใช่พืชตามท้องถิ่นที่หาได้ง่าย เนื่องจากมีปัจจัยจำกัดเรื่องการเจริญเติบโตได้ในเขตพื้นที่อันมีลักษณะจำเพาะทำให้ต้องนำเข้าต้นเฉาก๊วยแห้งจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น จีน ไต้หวัน เวียดนาม และอินโดนีเซีย ในการนำเข้านั้นมีราคาต้นทุนการผลิตสูงประมาณหนึ่งแสนบาทต่อตัน และใช้ระยะเวลาในการขนส่ง ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะขยายพันธุ์ต้นเฉาก๊วยด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเทคโนโลยีชีวภาพของการผลิตพืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนต้นเฉาก๊วยในระยะเวลาที่สั้นและได้ปริมาณมาก เป็นการเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในขวดทดลอง ซึ่งสามารถควบคุมการเพิ่มธาตุอาหาร อุณหภูมิ แสงในการเพาะเลี้ยง ว่าพืชต้องการมากน้อยเพียงใดจึงจะเหมาะสม เพื่อผลิตต้นเฉาก๊วยให้เพียงพอกับความต้องการและหากเพิ่มการผลิตได้ในประเทศจะเป็นการช่วยเกษตรกรเพิ่มรายได้ต่อไป ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีนี้ประสบความสำเร็จในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงพืชวงศ์กะเพราหลายชนิด เช่น Ocimum basilicum (Monfort, et al., 2018) Lavandula pedunculata (Zuzarte, et al., 2010; Gonçalves & Romano, 2013) L. latifolia, L. stoechas, Lavandula viridis and L. vera (Gonçalves & Romano, 2013) Salvia fruticosa (Arikat, et al., 2004) ในการทวีจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อนั้นมักชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน (Benzylaminopurine (BA), Kinetin (Kn), Thidiazuron (TDZ)) และชักนำรากด้วยกลุ่มออกซิน (Indolebutyric acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Naphthaleneacetic acid (NAA)) สารทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตได้ในพืชเองแต่ผลิตในปริมาณน้อยคล้ายกับฮอร์โมนหรือปุ๋ยที่ใช้ในการเร่งต้นไม้ ซึ่งการตอบสนองของพืชกับสารควบคุมการเจริญชนิดต่างๆ มีการตอบสนองแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฉาก๊วยจำเป็นจึงต้องศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดการทวีจำนวนยอดของเฉาก๊วยเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยเฉพาะศึกษาปัจจัยของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อต้นเฉาก๊วย

เลือกต้นแม่พันธุ์เฉาก๊วยที่มีต้นและใบสมบูรณ์ เพาะเลี้ยงไว้ภายในโรงเรือนเพาะชำ ฉีดพ่นยาฆ่าเชื้อราด้วยสารคาแบนดาซิม (carbendazim®) สัปดาห์ละครั้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นตัดชิ้นส่วนกิ่งของต้นเฉาก๊วยที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและเชื้อโรคเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น และนำชิ้นส่วนข้อมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ Clorox® (5.25% NaOCl) Mercuric chloride ($HgCl_2$) และ plant preservative mixture (PPM™) ตามวิธีของวรรณดา และคนอื่นๆ (2555) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) รวม 8 สูตร (treatment) สูตรละ 10 ซ้ำ (replication) นำชิ้นส่วนปลายยอดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วนั้น วางเลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) ที่มีการเติม 0.2 % PPM™ โดยใส่ชิ้นส่วนปลายยอด ขวดละ 1 ชิ้น สูตรละ 10 ขวด จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ควบคุมเวลาให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 20,150 ลักซ์

การทดลองที่ 2. การศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนปลายยอดเฉาก๊วยในภาพปลอดเชื้อ

ตัดชิ้นส่วนปลายยอดของต้นเฉาก๊วยเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อความยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Benzylaminopurine (BA), Kinetin (Kn), Thidiazuron (TDZ), Indolebutyric acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20,150 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตของพืช ในด้านของการเกิดยอด ความสูงของลำต้น ความยาวของลำต้น ใบ และราก นำผลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Tukey

ตารางที่ 1 สูตรการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของต้นเฉาก๊วย

สูตรที่ (n=10)	การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ความเข้มข้นและชนิดของสารฟอกฆ่าเชื้อ	การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ความเข้มข้นและชนิดของสารฟอกฆ่าเชื้อ
1	2% Clorox® (5.25% NaOCl) 15 นาที	2% Clorox® (5.25% NaOCl) 10 นาที
2	4% Clorox® (5.25% NaOCl) 15 นาที	2% Clorox® (5.25% NaOCl) 10 นาที
3	2% Clorox® (5.25% NaOCl) 15 นาที	1% $HgCl_2$ 10 นาที
4	4% Clorox® (5.25% NaOCl) 15 นาที	2% $HgCl_2$ 10 นาที
5	0.5 มิลลิตรต่อลิตร PPM™ 10 นาที	-
6	1.0 มิลลิตรต่อลิตร PPM™ 10 นาที	-
7	2.0 มิลลิตรต่อลิตร PPM™ 10 นาที	-
8	15% Clorox® (5.25% NaOCl) 10 นาที	-

ผลการวิจัย

ผลการทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อต้นเฉาก๊วย

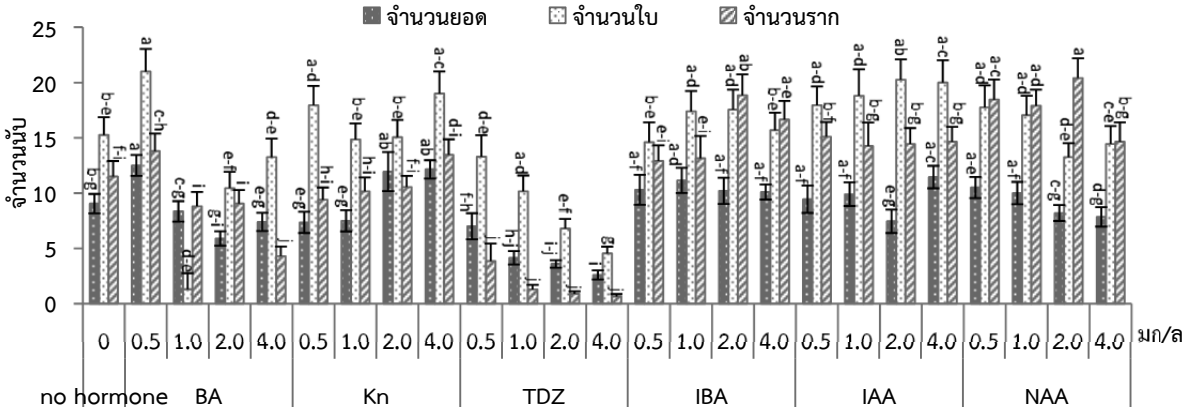
การนำชิ้นส่วนข้อของต้นเฉาก๊วยมาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อตามสูตรต่างๆ นั้น หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติม 0.2% PPM™ เป็นเวลา 30 วัน พบว่าชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อในสูตรต่างๆ มีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน โดยพิจารณาจากชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วยังมีสีเขียว มีการเจริญของตายอดหรือตาข้าง และปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 3 วัน ชิ้นส่วนข้อมีอัตราการรอดชีวิต 60-80% และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 5 7 15 และ 30 วัน พบว่าชิ้นส่วนข้อมีอัตราการรอดชีวิตลดลงและตายทั้งหมดหลังเพาะเลี้ยง 30 วัน ยกเว้นในสูตรที่ 8 ที่ใช้ชิ้นส่วนข้อที่ฟอกฆ่าเชื้อโดย 15% Clorox® ระยะเวลา 15 นาที ส่งผลให้ชิ้นส่วนข้อมีอัตราการรอดชีวิต 50% หลังเพาะเลี้ยง 30 วัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตรารอดชีวิตของข้อต้นเฉาก๊วยที่ใช้สารฟอกฆ่าเชื้อต่างกันบนอาหาร MS+0.2% PPM™ เป็นระยะเวลา 30 วัน

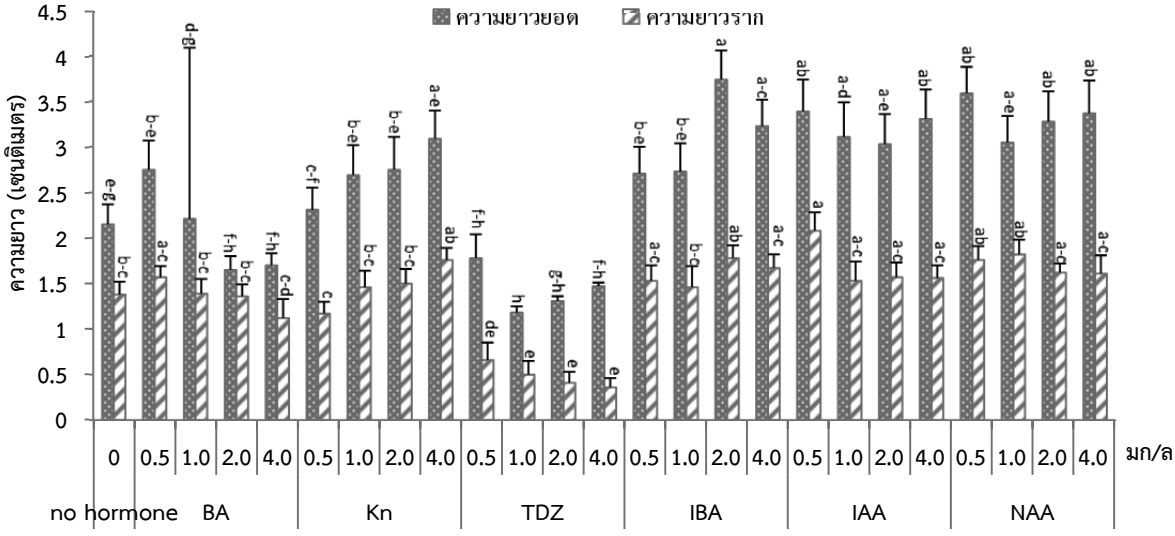
สูตร (n=10)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของข้อต้นเฉาก๊วย					
	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	15 วัน	30วัน
1	100	70	50	20	10	0
2	100	80	50	10	0	0
3	100	60	40	10	0	0
4	100	70	40	20	10	0
5	100	80	40	30	20	0
6	100	60	40	20	10	0
7	100	70	50	20	10	0
8	100	80	80	80	60	50

ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนปลายยอดเฉาก๊วยในภาพปลอดเชื้อ

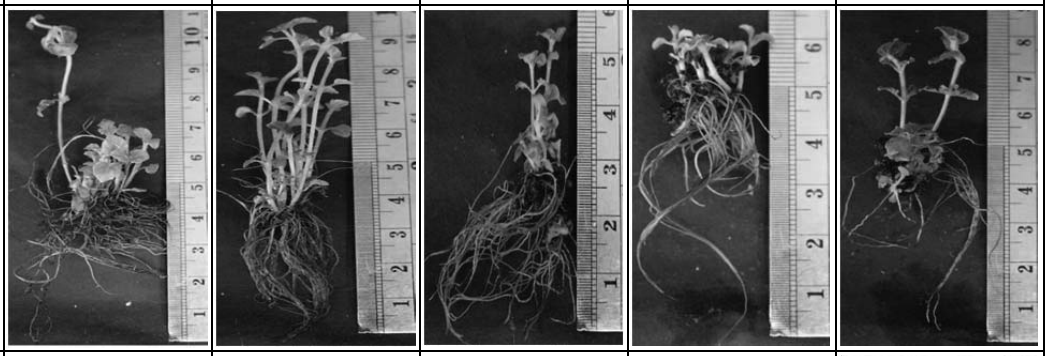
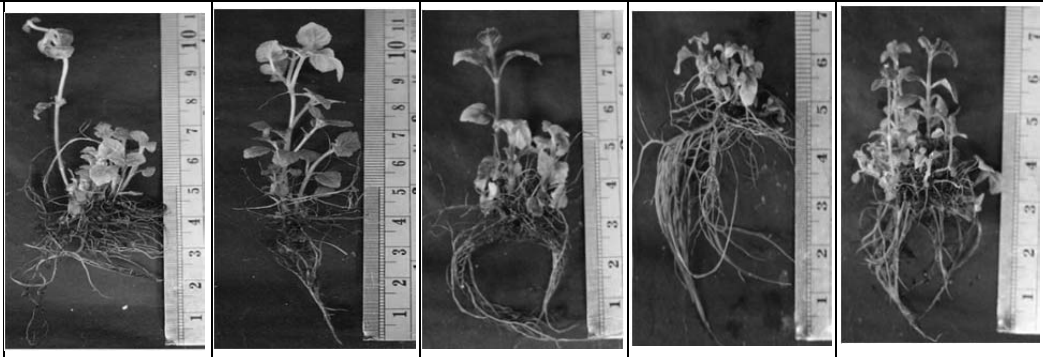
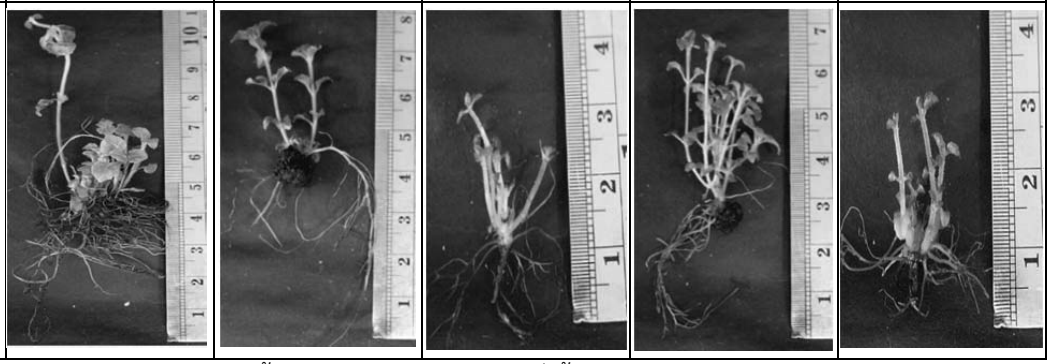
เมื่อเพาะเลี้ยงต้นยอดเฉาก๊วยเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ยอดเฉาก๊วยมีการเจริญของจำนวนใบมากที่สุดในสูตรอาหารที่เติม BA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบเฉลี่ย 21.00 ± 2.03 ใบ รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม IAA ที่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เติม IAA ที่ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนใบเฉลี่ย 20.25 ± 1.84 และ 20.00 ± 2.02 ใบตามลำดับ (ภาพที่ 1) ในการเจริญของจำนวนยอด มีการเจริญมากที่สุดในสูตรอาหารที่เติม BA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 12.50 ± 0.94 ยอด รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม Kn ที่ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เติม Kn ที่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 12.15 ± 0.83 และ 11.95 ± 1.79 ยอดตามลำดับ (ภาพที่ 1) และในการเจริญของความยาวยอด มีการเจริญมากที่สุดในสูตรอาหารที่เติม IBA ที่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ย 3.74 ± 0.32 เซนติเมตร รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม NAA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เติม IAA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความยาวยอดเฉลี่ย 3.59 ± 0.29 และ 3.39 ± 0.35 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) และการเจริญของจำนวนรากมีการเจริญมากที่สุดในสูตรอาหารที่เติม NAA ที่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 20.40 ± 1.79 รากต่อยอด รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม IBA ที่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เติม NAA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนราก 18.85 ± 1.88 และ 18.45 ± 1.82 รากต่อยอด ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่ารากมีการเจริญยืดยาวมากที่สุดในสูตรอาหารที่เติม IAA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้รากมีความยาวรากเฉลี่ย 2.08 ± 0.20 เซนติเมตร รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม NAA ที่ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เติม IBA ที่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 1.82 ± 0.16 และ 1.78 ± 0.17 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2) โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนราก ความยาวยอด และความยาวรากมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



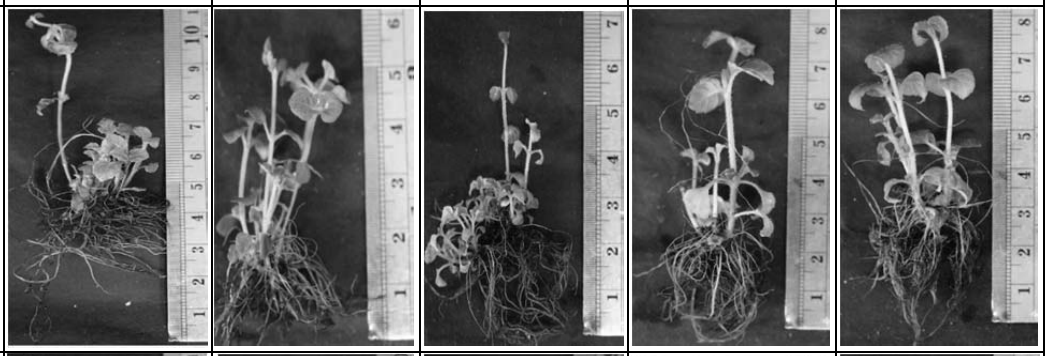
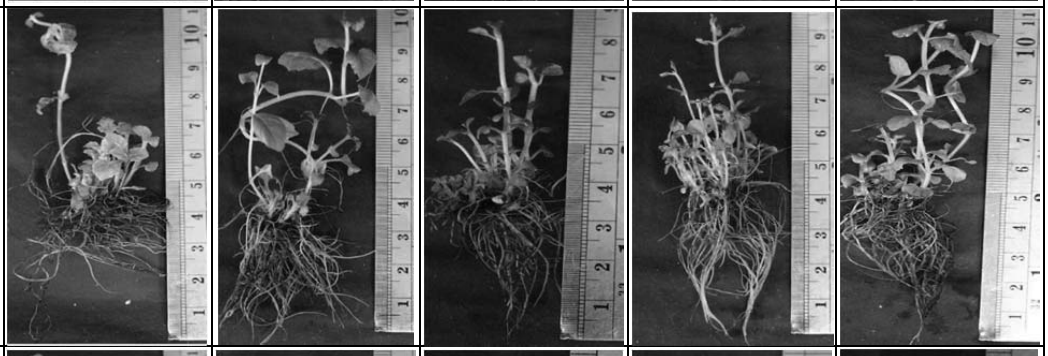
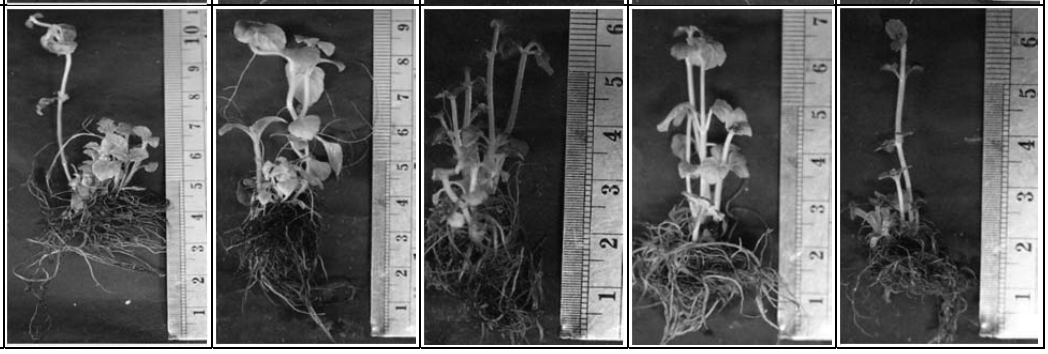
ภาพที่ 1 ค่าเฉลี่ยของจำนวนยอด จำนวนใบ และจำนวนรากของชิ้นส่วนปลายยอดต้นเฉาก๊วยที่เลี้ยงบนอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (PGRs) ชนิดต่างๆ ได้แก่ Benzylaminopurine (BA), Kinetin (Kn), Thidiazuron (TDZ), Indolebutyric acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก/ล) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยความยาวของยอด และความยาวรากของชิ้นส่วนปลายยอดต้นเฉาก๊วยที่เลี้ยงบนอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (PGRs) ชนิดต่างๆ ได้แก่ Benzylaminopurine (BA), Kinetin (Kn), Thidiazuron (TDZ), Indolebutyric acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก/ล) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

PGRs	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	0	0.5	1.0	2.0	4.0
BA					
Kn					
TDZ					

ภาพที่ 3 การเจริญและการพัฒนาชิ้นส่วนปลายยอดต้นเฉาก๊วยที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (PGRs) ได้แก่ Benzylaminopurine (BA), Kinetin (Kn) และ Thidiazuron (TDZ) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

PGRs	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	0	0.5	1.0	2.0	4.0
IBA					
IAA					
NAA					

ภาพที่ 4 การเจริญและการพัฒนาชิ้นส่วนปลายยอดต้นเฉาก๊วยที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (PGRs) ได้แก่ Indolebutyric acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) และ aphthaleneacetic acid (NAA) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

อภิปรายผล

ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อต้นเฉาก๊วย

จากการทดลองพบว่า ชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม สำหรับการฟอกชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อต้นเฉาก๊วยโดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน พบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุดคือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 15% Clorox® เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติม 0.2% PPM™ เป็นเวลา 30 วัน มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุด เนื่องจากสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวภายนอกของชิ้นเนื้อเยื่อ

ได้ดี โดยมีอัตรารอดชีวิตสูงถึง 50% ซึ่ง Clorox® มีสารออกฤทธิ์คือ NaOCl เป็นสารฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ แต่มีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อของพืชสูงด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของ *Dioscorea birmanica* เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอรอุมา และคนอื่นๆ (2555) โดยฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 15% Clorox® นาน 20 นาที และ 10% Clorox® นาน 15 นาที ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 95.24% จากการทดลองนี้ให้ผลตรงกันข้ามกับรายงานของกาญจนรี และคนอื่นๆ (2554) ได้ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตายอด *Cryptocoryne affinis* ด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือ Clorox® และ $HgCl_2$ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จำนวน 7 วิธี พบว่าสูตรที่เหมาะสม คือการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วย 2% Clorox® เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วย 1% $HgCl_2$ เป็นเวลา 20 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 15% และชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการเจริญพัฒนาเกิดต้นใหม่ 85% อีกทั้งยังให้ผลตรงกันข้ามกับรายงานการวิจัยของนัยนา และเอกรัตน์ (2553) การฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Ammannia senegalensis* ฟอกฆ่าเชื้อครั้งแรกด้วยสารละลาย 5% Clorox® เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วย 0.1% $HgCl_2$ นาน 10 นาที ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และมีอัตรารอดชีวิต 100%

ในขั้นตอนของการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายนอกโดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อนั้นต้องเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนของพืช สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อ เพราะจะมีผลถึงการเจริญของเนื้อเยื่อ โดยสารฟอกฆ่าเชื้อที่นิยมและหาได้ง่าย ได้แก่ น้ำยาฟอกผ้าขาว เช่น Clorox® ซึ่งมีสาร NaOCl เป็นสารออกฤทธิ์ ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพราะเมื่อได้ผลแล้วก็สามารถเพิ่มปริมาณและชักนำให้เกิดต้นพืชตามต้องการต่อไปได้ (ปิยะดา และอารีย์, 2551) ดังนั้นความสำเร็จในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาของการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งแตกต่างกันไปในตามแต่ละชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้รวมถึงชนิดของพืชอีกด้วย

การศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนปลายยอดเฉาก๊วยในภาพปลอดเชื้อ

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดเฉาก๊วยเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่เติม BA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบ และจำนวนยอดได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ รวมทั้งสูตรอาหารควบคุม ต้นเฉาก๊วยมีการเจริญของใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ มีสีเขียวสด ยอดอวบมีสีเขียวอ่อน โดย BA สามารถชักนำให้เกิดการเจริญของยอดใหม่ได้ดี ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของ Mentha arvensis (Nahida, et al., 2006) และ M. piperita (Sarwar, et al., 2009; Mehta, et al., 2012) เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน ซึ่งมีผลทำให้พืชมีการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตทางลำต้น และเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง พร้อมชักนำการเพิ่มจำนวนยอดและใบของพืชได้ดี (Gaspar, et al., 1996) BA จึงจัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Huettemann & Preece, 1993) โดย BA ที่ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนใบและกระตุ้นให้เกิดการแตกยอดใหม่ได้ดีไม่ใช่เฉพาะพืชในวงศ์กะเพรา (Lamiaceae) แต่พบพืชในวงศ์อื่นๆ ด้วย เช่น BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการแตกตายอดใหม่ จากการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของ *Clerodendrum wallichii* (เยาวพา และขวัญจิตต์, 2552) สำหรับ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนใบและยอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบและปล้องของ *Bacopa monniera* ได้ดีที่สุด (Rao, et al., 2012) และยังเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดจำนวนใบและยอดจากชิ้นส่วนของ *Centella asiatica* (Karthikeyan, et al., 2009) อีกด้วย

สำหรับการทดลองเพื่อชักนำให้ต้นเฉาก๊วยเกิดราก โดยเปรียบเทียบอัตราการเกิดราก และความยาวรากของต้นเฉาก๊วยที่สร้างขึ้นและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของต้นเฉาก๊วยในสูตรต่างๆ ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่ม cytokinin และ auxin พบว่า ต้นเฉาก๊วยสามารถสร้างรากขึ้นมาใหม่ตรงบริเวณโคนชิ้นส่วนได้ในทุกสูตรอาหาร โดยพบว่า สูตรอาหารที่เติม NAA ที่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดรากได้มากกว่าสูตรอาหารอื่นๆ รวมทั้งสูตรอาหารควบคุมซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยรากมีลักษณะเป็นรากฝอย ขนาดเล็ก แตกแขนงออกเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพืชวงศ์กะเพราของ Chishti, et al. (2006) และพืชวงศ์อื่นๆ ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดการสร้างรากในหลอดทดลองของ *Curcuma parviflora* (อนุพันธ์ และพันธิตรา, 2549) แต่ให้ผลทางตรงกันข้ามกับ Ghanti, et al. (2004) รายงานไว้ว่าชิ้นส่วนปลายยอดของ *Phyllanthus amarus* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มยับยั้งการเกิดรากและรากที่เกิดขึ้นใหม่มีความยาวของรากลดลงด้วย

จากการทดลองนี้พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช แต่ละชนิดในระดับความเข้มข้นต่างๆ นั้นมีคุณสมบัติในการชักนำให้ชิ้นส่วนของต้นเฉาก๊วยมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไป โดย BA สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบและจำนวนยอดได้ดีที่สุดในขณะที่ NAA สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากดีที่สุด ส่วน IAA และ IBA สามารถชักนำให้เกิดความยาวยอดและความยาวรากได้ดีที่สุด ซึ่งการทดลองนี้แสดงถึงผลที่มีทั้งสอดคล้องและแตกต่างจากการทดลองของท่านอื่นๆ เนื่องจากชนิดและชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ในการทดลองนั้น มีผลต่อการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไป (ธนากร และคนอื่นๆ, 2555) ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นพืชต่างชนิดกันหรือพืชชนิดเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงจากส่วนที่ต่างกันก็ตาม ดังตัวอย่างใน Sorghum (Arulselvi & Krishnaveni, 2009) *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* และ *D. moschatum* (Nayak, et al., 1997)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และสารเคมีในการทดลองจนสำเร็จลุล่วง ตลอดจนมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2557

เอกสารอ้างอิง

กาญจนรี พงษ์ฉวี และคนอื่นๆ. (2554). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne affinis* Hook.** กรุงเทพฯ : กรมประมง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด.

ธนากร วงษศา และคนอื่นๆ. (2555). ผลขององค์ประกอบอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้พญาฉันทันต์ (*Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz.) ในสภาพปลอดเชื้อ. **สักทอง : วารสารมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์, 18**(2), 11-21.

นัยนา เสนาศรี และเอกรัตน์ วสุเพ็ญ. (2553). **การฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอมมาเนียแดง *(Ammannia senegalensis)***. สกลนคร : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัมก์. (2551). **บทปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ : เอเจนเทค.

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์. (2555). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออเมซอน *Echinodorus horemanii* Rataj**. กรุงเทพฯ : กรมประมง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด.

เยาวพา จิระเกียรติกุล และขวัญจิตต์ บุญหา (2552). การเพิ่มจำนวนต้นและชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อของต้นสร้อยสายเพชร (*Clerodendrum wallichii*). **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 17**(3), 61-67.

อนุพันธ์ กงบังเกิด และพันธิตรา กมล. (2549). ผลของไซโตไคนินและออกซินต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว. **NU Science Journal, 2**(2), 183-201

อรอุมา สองศรี และคนอื่นๆ. (2555). การฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนข้อของ *Dioscorea birmanica* เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 2**(ฉบับพิเศษ), 637-640.

Arikat, N.A., et al. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae, 100**(1-4), 193-202.

Arulselvi P.I. & Krishnaveni, S. (2009). Effect of hormones, explants and genotypes in *in vitro* culturing of sorghum. **Journal of Biochemical Technology, 1**(4), 96-103.

Chishti, N., et al. (2006). Clonal propagation of *Mentha arvensis* L. through nodal explant. **Pakistan Journal of Biological Sciences, 9**, 1416-1419.

Gaspar, T., et al. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 32**(4), 272-289.

Ghanti, K.S., et al. (2004). High frequency shoot regeneration from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn**. Indian Journal of Biotechnology, 3,** 103-107.

Gonçalves, S. & Romano, A. (2013). *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances, 31**(2), 166-174.

Huetteman, C.A. & Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 33,** 105-119.

Karthikeyan, K., Chandran, C. & Kulothungan, S. (2009). Rapid clonal multiplication through in vitro axillary shoot proliferation of *Centeella asiatica* L. **Indian Journal of Biotechnology, 8**, 232-235.

Lang, G. (2012). **Studies on rapid propagation and polyploid induction of *Mesona chinensis***. Master's thesis, Guangxi Normal University.

Mehta, J., et al. (2012). An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (Pipperment). **Asian Journal of Plant Science and Research, 2**(4), 518-523.

Monfort, L.E.F., et al. (2018). Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. **Industrial Crops and Products, 116,** 231-239.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum, 15,** 473-497.

Nahida C., et al. (2006). Clonal propagation of *Menthe arvensis* L. Through explant. **Biological Sciences**, 1416-1419.

Nayak, N.R., Patnaik, S. & Rath, S.P. (1997). *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae, 71**(3-4), 243-250.

Rao, S., et al. (2012). Efficient plant regeneration from leaf explants of *Bacopa monniera* (L.) Wettst. : A threatened medicinal herb. **Annals of Phytomedicine, 1**(1), 110-117.

Sarwar, S., et al. (2009). *In vitro* direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium. **African Journal of Biotechnology, 8**(18), 4667-4671.

Zuzarte, M.R., et al. (2010). Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products, 32**(3), 580-587.