ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดเป็นยอดใหม่จากชิ้นส่วนปลายยอดของหรีดโทนในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of cytokinin on shoot induction from *in vitro* shoot tip explants of *Gentiana hesseliana* Hoss. var. *lakshnakarae* (Kerr) Toyokuni

อ่อนรัตน์ อิ่นมะโน[1] ธัญลักษณ์ จูอี้[1] ธนากร วงษศา[2] และ อนุพันธ์ กงบังเกิด[1]*

Onrut Inmano[1], Thanyalak Ju-Ee [1], Thanakorn Wongsa[2] and Anupan Kongbangkerd[1]*

[1] หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

[2] โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร จังหวัดกำแพงเพชร 56000

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, anupank@nu.ac.th

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดหรีดโทน (*Gentiana hesseliana* Hoss. var. *lakshnakarae* (Kerr) Toyokuni) บนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และเติมไซโตไคนิน ได้แก่ BA Kinetin TDZ 2-iP และ Zeatin ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่เติม Zeatin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยสูงที่สุด (17.4 ยอด) ในขณะที่อาหารสูตรที่เติม Zeatin 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกระตุ้นให้เกิดการแตกตาข้างเฉลี่ยมากที่สุด (4.4 ตาข้าง) อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรที่เติม 2-iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้ปลายยอดเกิดการสร้างรากมากที่สุด (9.8 ราก) แต่ 2-iP 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการกระตุ้นให้รากมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด (6.4 เซนติเมตร) อีกทั้งยังสามารถชักนำให้จำนวนใบรวม (75.4 ใบ) และจำนวนข้อรวม (39.1 ข้อ) มีค่าสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารที่เติม Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลต่อการกระตุ้นให้ต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีความสูงต้นเฉลี่ยสูงที่สุด (9.1 เซนติเมตร)

คำสำคัญ : วงศ์ดอกหรีดเขา, สารควบคุมการเจริญเติบโต, การเจริญและพัฒนา

Abstract

In vitro shoot tips of Gentiana hesseliana Hoss. Var. lakshnakarae (Kerr) Toyokuni. were cultured on semi-solid Murashige and Skoog (MS)(1962) medium added with 30 g/l sucrose and various cytokinins; BA, Kinetin, TDZ, 2-iP and Zeatin at 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg/l for 14 weeks. The results found that medium added with 0.5 mg/l Zeatin could induce the highest shoot number (17.4 shoots) while adding 4.0 mg/l of Zeatin to the medium gave the highest shoot bud number (4.4 shoot buds). The average maximum number of roots (9.8 roots) could obtain on the medium augmented with 1.0 mg/l 2-iP whereas 2-iP 4.0 mg/l adding medium could not only induce the longest root length (6.4 cm) from regenerated shoots but could

also enhance the highest total number of leaves (75.4 leaves) and nodes (39.1 nodes) from regenerated shoot clumps. Furthermore, the average highest shoot height (9.1 cm) was found on the medium added with 2.0 mg/l Kinetin.

Keywords : Gentianaceae, Plant growth regulators, Growth and development

บทนำ

หรีดโทน เป็นไม้ดอกที่ขึ้นตามป่าพื้นล่างอยู่ในวงศ์ดอกหรีดเขาหรือ Gentianaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gentiana hesseliana* Hoss. var. *lakshnakarae* (Kerr) Toyokuni (ก่องกานดา ชยามฤต, 2549) พบตามที่โล่งในป่าสนเขา ป่าละเมาะ และทุ่งหญ้า พบเฉพาะบนภูเขาหินทรายยอดตัดที่ระดับความสูงประมาณ 1200 เมตร กระจายพันธุ์ในประเทศไทยทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ภูกระดึงและภูหลวง จังหวัดเลย และดอยเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ พืชชนิดนี้เป็นไม้ล้มลุก ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามเรียงกันแน่นบริเวณปลายยอด รูปรีแกมขอบขนานกว้าง 0.3-1.0 เซนติเมตร ยาว 2-6 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ออกดอกเป็นช่อ กลีบดอกมีสีม่วงแกมฟ้าหรือสีขาว ลักษณะคล้ายรูปดาวหรือรูประฆัง ปลายแยกเป็น 5 กลีบ มีจำนวนดอกต่อช่อ 1-16 ดอก กลีบรองดอกเชื่อมเป็นหลอด ยาว 4-9 มิลลิเมตร (วีระชัย ณ นคร, 2544) จะออกดอกในช่วงพฤศจิกายนถึงเดือนพฤษภาคม (ภาพ 1) ซึ่งลักษณะดอกมีสีสันที่สดใส ทำให้ปัจจุบันถูกนำมาปลูกเป็นไม้กระถางประดับขนาดเล็กตกแต่งตามบ้านเรือน นอกจากนี้ยังพบว่ามีรายงานการนำมาเป็นพืชสมุนไพรเพื่อใช้รักษาโรคบางชนิด อาทิ นำมาใช้เป็นยาต้านการอักเสบ ยากล่อมประสาท ยาลดไข้ ยาขับเสมหะ รวมทั้งเป็นยาต้านมะเร็งได้ (Drobyk et al., 2018; Kaushal et al., 2014) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม จากสภาพการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศโลกกอปรกับการบุกรุกทำลายป่าที่เป็นแหล่งกระจายพันธุ์ของพืชชนิดต่างๆ ส่งผลให้ความหลากหลายของพืชมีแนวโน้มลดลงรวมถึงพืชในสกุล *Gentiana* ด้วย และถึงแม้ว่าพืชสกุลนี้จะมีการผลิตเมล็ดจำนวนมาก แต่การงอกและเจริญเติบโต พัฒนาเป็นต้นใหม่ในธรรมชาตินั้นยังขึ้นอยู่กับอิทธิพลทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางชีวภาพหลายปัจจัย เช่น อัตราการงอกของเมล็ดต่ำ โรคและแมลง ความต้องการของดินและสภาพภูมิอากาศ (Drobyk et al., 2015) ส่งผลหรีดโทนเขาถูกจัดอยู่ในสถานภาพเป็นพืชที่มีประชากรขนาดเล็ก และมีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์ได้ในปัจจุบัน (ก่องกานดา ชยามฤต และคณะ, 2548) เป็นเหตุให้ต้องมีการอนุรักษ์ไว้เพื่อไม่ให้แหล่งพันธุกรรมพืชชนิดนี้สูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ และหาแนวทางในการอนุรักษ์และขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณต้นให้มีมากขึ้นเพื่อรองรับการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการช่วยขยายพันธุ์ชนิดต่างๆ ให้ได้พืชต้นใหม่จำนวนมากในเวลาที่รวดเร็ว (อรดี สหวัชรินทร์, 2542 และ รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2545) ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการทวีจำนวนยอดที่สำคัญปัจจัยหนึ่ง คือ สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ที่จัดว่าเป็นปัจจัยหลักในการชักนำให้เกิดเป็นยอดใหม่จำนวนมาก และประสบความสำเร็จในการใช้กระตุ้นให้เกิดการสร้างจำนวนยอดใหม่ได้ดีในพืชหลายชนิด (van Staden

et al., 2008) อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยในเรื่องผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของหรีดโทนชนิดนี้พบว่ามีรายงานการวิจัยน้อยมากและยังไม่ประสบความสำเร็จในการทวีจำนวนต้นเท่าที่ควร การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปลายยอดของหรีดโทน (*Gentiana hesseliana* Hoss. var. *lakshnakrae* (Kerr) Toyokuni) สำหรับเป็นแนวทางเบื้องต้นในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พืชชนิดนี้ รวมถึงการประยุกต์และพัฒนาต่อยอดการศึกษางานวิจัย อันเป็นประโยชน์ในทางการค้าและการสังเคราะห์สารสำคัญในพืชชนิดนี้เพื่อเป็นประโยชน์ทางการแพทย์และในทางอุตสาหกรรมต่อไป

ภาพ 1 ลักษณะดอกของหรีดโทน

วัสดุและวิธีการ

ตัดชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในไว้ในสภาพปลอดเชื้อ ความสูงประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน ได้แก่ BA (N6-Benzylaminopurine), Kinetin (6-furfuryl-aminopurine), TDZ (Thidiazuron), 2-iP (N6- (2-Isopentenyl) Adenine) และ Trans-Zeatin ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงให้เท่ากับ 5.7 โดยใช้ NaOH และ HCl และเติมผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นบรรจุอาหารในขวด 4 ออนซ์ (25 มิลลิลิตรต่อขวด) ก่อนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดขวดละ 2 ชิ้นส่วน ซึ่งจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วน และนำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นในห้องสภาพปลอดเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2

องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20 μmol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตและบันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกจำนวนยอด จำนวนตาข้าง จำนวนใบ จำนวนข้อ จำนวนราก ความยาวราก ความสูงต้น และการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ที่สังเกตได้ในเวลา 4 8 12 และ 14 สัปดาห์

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

ทำการบันทึกผลการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) และมีการจัดสิ่งทดลองให้แต่ละทรีทเมนต์มีจำนวน 3 ซ้ำ ทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ทางสัณฐานวิทยา เมื่อเพาะเลี้ยง 14 สัปดาห์ และนำข้อมูลที่ได้จากบันทึกผลการทดลองไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดหรีดโทนบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA, Kinetin, 2-iP, Zeatin และ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดมีการเจริญเติบโตและพัฒนาแตกต่างกันออกไปตามชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับ โดยชิ้นส่วนปลายยอดจะเริ่มมีการแตกตาข้างเพื่อพัฒนาเป็นยอดใหม่ และมีการยืดยาวของลำต้นทำให้มีการเกิดข้อและจำนวนใบเพิ่มขึ้นตามลำดับ รวมถึงมีการแตกรากใหม่ (ภาพ 2) ซึ่งในสัปดาห์ที่ 1-3 ชิ้นส่วนปลายยอดยังคงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ หลังจากเพาะเลี้ยงไป 4 สัปดาห์ จะพบว่า อาหารสูตรที่เติม Zeatin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด ในขณะที่อาหารสูตรที่เติม TDZ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลกระตุ้นให้เกิดตาข้างได้ดี อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรที่เติม Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากใหม่มากที่สุด เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 8 ของการเลี้ยง พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดที่เลี้ยงบนอาหารในสูตรต่าง ๆ จะมีการเจริญเติบโตและพัฒนามากขึ้น โดยลำต้นจะมีการยืดยาวอย่างชัดเจนและมีจำนวนยอดเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งเมื่อเลี้ยงครบ 14 สัปดาห์ จะพบว่า อาหารสูตรที่เติม Zeatin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด (17.4 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่อาหารสูตรที่เติม Zeatin 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกระตุ้นให้เกิดการแตกตาข้างเฉลี่ยมากที่สุด (4.4 ตาข้างต่อชิ้นส่วน) อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรที่เติม 2-iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้ปลายยอดเกิดการสร้างรากมากที่สุด (9.8 รากต่อชิ้นส่วน) แต่ 2-iP 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการกระตุ้นให้รากมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด (6.4 เซนติเมตร) อีกทั้งยังสามารถชักนำให้จำนวนใบ (75.4 ใบ) และจำนวนข้อ (39.1 ข้อ) มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด โดยอาหารที่เติม Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลต่อการกระตุ้นให้ต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีความสูงต้นเฉลี่ยสูงที่สุด (9.1 เซนติเมตร) (ตาราง 1 และ 2 และภาพ 3)

ตาราง 1 การเจริญและพัฒนาเกิดจำนวนยอด จำนวนตายยอด และจำนวนข้อของชิ้นส่วนปลายยอดหรีดโทนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA, Kinetin, 2-iP, Zeatin และ TDZ ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 14 สัปดาห์

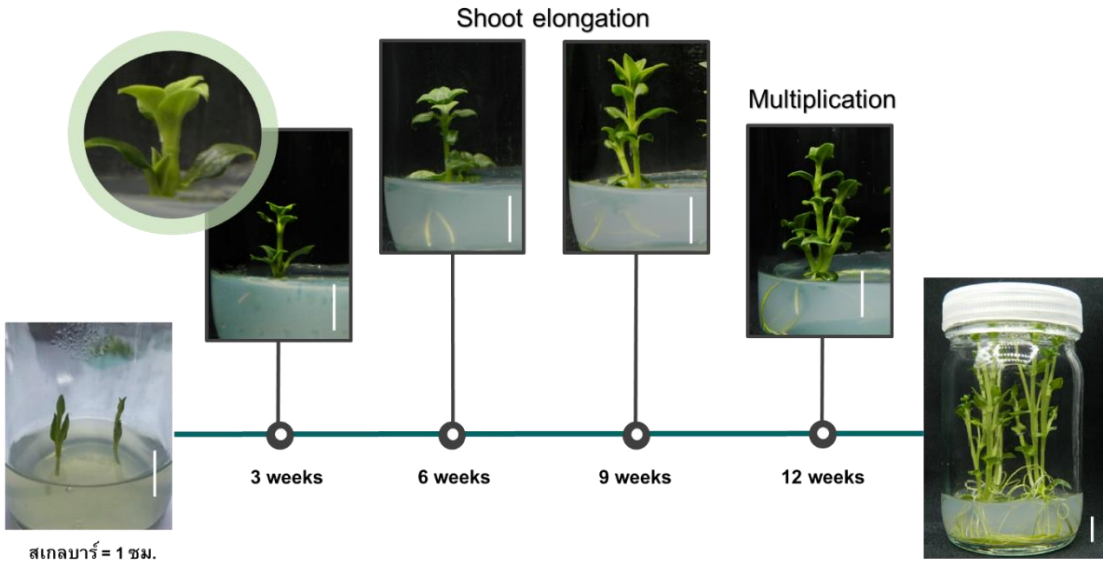
สูตรอาหาร (mg/l)		จำนวนยอด	จำนวนตายยอด	จำนวนข้อ
No hormone		6.5 ± 0.2 h*	2.0 ± 0.1 c	16.0 ± 1.6 f-h
BA	0.5	11.0 ± 0.7 b-h	2.1 ± 0.2 c	23.8 ± 1.8 c-g
	1.0	13.6 ± 1.1 a-e	2.1 ± 0.2 c	28.0 ± 2.3 b-d
	2.0	9.5 ± 1.2 d-h	1.8 ± 0.3 c	20.4 ± 2.9 c-h
	4.0	6.0 ± 1.1 e-h	1.9 ± 0.3 c	14.4 ± 2.7 gh
Kinetin	0.5	9.2 ± 0.5 d-h	2.5 ± 0.4 b	20.9 ± 0.7 c-h
	1.0	14.8 ± 2.0 a-c	1.9 ± 0.3 c	30.4 ± 0.9 a-c
	2.0	13.2 ± 0.6 a-f	2.0 ± 0.5 c	25.8 ± 2.1 c-f
	4.0	14.6 ± 1.1 a-e	1.8 ± 0.4 c	24.0 ± 0.9 c-g
TDZ	0.5	16.0 ± 0.5 ab	1.3 ± 0.2 c	35.8 ± 1.3 ab
	1.0	11.8 ± 0.5 b-g	1.0 ± 0.1 c	26.0 ± 3.2 c-e
	2.0	10.6 ± 1.5 c-h	1.7 ± 0.1 c	15.2 ± 0.7 gh
	4.0	8.4 ± 2.1 f-h	3.7 ± 0.5 ab	17.4 ± 3.8 e-h
2-iP	0.5	13.3 ± 0.8 a-f	2.0 ± 0.4 c	28.7 ± 3.3 b-d
	1.0	12.1 ± 0.3 b-g	1.8 ± 0.4 c	21.2 ± 1.1 c-h
	2.0	13.7 ± 1.7 a-e	2.0 ± 0.4 c	26.1 ± 1.5 c-e
	4.0	14.9 ± 0.8 a-c	1.2 ± 0.1 c	39.1 ± 4.1 a
Zeatin	0.5	17.4 ± 0.7 a	1.4 ± 0.2 c	35.7 ± 4.8 ab
	1.0	13.8 ± 0.7 a-e	1.7 ± 0.2 c	21.3 ± 0.8 c-h
	2.0	11.1 ± 2.2 b-h	1.8 ± 0.2 c	20.0 ± 3.1 d-h
	4.0	7.7 ± 1.0 gh	4.4 ± 0.9 a	13.4 ± 1.6 h

หมายเหตุ : *ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new Multiple Range Test (DMRT)

ตาราง 2 การเจริญและพัฒนาเกิดจำนวนใบ จำนวนราก ความยาวราก และความสูงของชิ้นส่วนปลายยอดหรีดโทนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA, Kinetin, 2-iP, Zeatin และ TDZ ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 14 สัปดาห์

สูตรอาหาร (mg/l)		จำนวนใบ	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)
No hormone		27.8 ± 3.4 gh*	5.0 ± 0.4 b-e	3.1 ± 0.2 e	5.9 ± 0.4 f-h
BA	0.5	44.7 ± 3.0 d-g	5.7 ± 0.3 bc	4.2 ± 0.4 b-e	7.2 ± 0.1 d-f
	1.0	52.5 ± 4.4 b-f	5.1 ± 0.3 b-d	3.6 ± 0.5 de	7.3 ± 0.4 c-e
	2.0	39.3 ± 5.8 d-h	4.2 ± 0.3 b-f	3.8 ± 0.5 de	5.5 ± 0.7 g-i
	4.0	27.9 ± 5.1 gh	3.1 ± 0.2 d-f	3.7 ± 0.5 de	4.1 ± 0.4 ij
Kinetin	0.5	37.6 ± 0.6 e-h	5.6 ± 0.3 bc	4.0 ± 0.2 c-e	7.6 ± 0.1 b-e
	1.0	58.4 ± 2.4 a-d	6.2 ± 0.5 b	5.6 ±0.7 a-c	8.9 ± 0.3 ab
	2.0	46.2 ± 3.8 d-g	5.7 ± 0.5 bc	5.1 ± 0.3 a-d	9.1 ± 0.1 a
	4.0	44.0 ± 1.8 d-h	5.6 ± 0.3 bc	4.7 ± 0.3 b-e	8.6 ± 0.3 a-d
TDZ	0.5	68.5 ± 2.3 a-c	5.7 ± 0.4 bc	4.8 ± 0.3 a-e	8.3 ±0.2 a-d
	1.0	51.7 ± 6.5 c-f	3.1 ± 0.3 d-f	4.8 ± 0.7 a-d	6.3 ± 0.3 e-h
	2.0	29.2 ± 2.1 gh	2.1 ± 0.3 f	4.1 ± 0.4 c-e	4.4 ± 0.5 ij
	4.0	33.5 ± 7.6 f-h	2.1 ± 0.2 f	3.8 ± 0.6 de	3.7 ± 0.5 j
2-iP	0.5	55.9 ± 6.6 b-e	8.6 ± 0.5 a	3.5 ± 0.2 de	8.8 ± 0.2 a-c
	1.0	40.5 ± 2.4 d-h	9.8 ± 1.1 a	4.5 ± 0.4 b-e	8.5 ± 0.2 a-d
	2.0	49.6 ± 2.9 d-f	6.5 ± 0.8 b	6.0 ± 0.1 ab	8.3 ± 0.3 a-d
	4.0	75.4 ± 7.3 a	8.7 ± 1.4 a	6.4 ± 0.2 a	8.8 ± 0.3 a-c
Zeatin	0.5	70.7 ± 3.7 ab	5.3 ± 0.3 b-d	4.5 ± 0.4 b-e	7.6 ± 0.0 b-e
	1.0	42.3 ± 1.6 d-h	3.7 ± 0.1 c-f	4.9 ± 0.3 a-d	6.5 ± 0.2 e-g
	2.0	39.1 ± 5.9 d-h	2.8 ± 0.2 ef	5.1 ± 0.2 a-d	5.0 ± 0.6 h-j
	4.0	24.8 ± 2.8 h	2.1 ± 0.2 f	5.6 ± 0.1 a-c	4.0 ± 0.2 ij

หมายเหตุ : *ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new Multiple Range Test (DMRT)



ภาพ 2 พัฒนาการของชิ้นส่วนยอดหรีดโทน

(*Gentiana hesseliana* Hoss. var. *lakshnakarae* (Kerr) Toyokuni)

ภาพ 3 (ก-ง) การเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน (ก) และเติมฮอร์โมน Zeatin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) และเติมฮอร์โมน 2-iP ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่เติม kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดหรีดโทน (*Gentiana hesseliana* Hoss. var. *lakshnakarae* (Kerr) Toyokuni) บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA, Kinetin, 2-iP, Zeatin และ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดมีการเจริญเติบโตและพัฒนาแตกต่างกันออกไป ตามชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับ โดยอาหารสูตรที่เติม Zeatin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด (17.4 ยอด) ซึ่งให้ผลแตกต่างกับการศึกษางานวิจัยในพืชสกุล *Gentiana* ในชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับรายงานของ Petrova et al. (2019) ที่ศึกษาผลของ BA Zeatin และ TDZ ต่อการเจริญของ *Gentiana lutea* พบว่า บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดมีการเพิ่มจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากสุด และอาหารสูตรที่เติม Zeatin จะพัฒนาความสูงของยอดได้ดีที่สุด ในขณะการรายงานการศึกษาการขยายพันธุ์ของต้นลักษณา (*Gentiana nudicaulis*) ซึ่งจัดเป็นอีกชนิดหนึ่งของพืชสกุล *Gentiana* โดยใช้ชิ้นปลายยอดเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS, ½ MS และ ¼ MS พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร ½ MS ต่อมาจึงศึกษาความเข้มข้นของ BA ในอาหารสูตร ½ MS พบว่า ยอดใหม่จะมีพัฒนาความสูงมากที่สุดในอาหารสูตร ½ MS ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้น การเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นลักษณะจะมีประสิทธิภาพลดลง (เฌอ ชาติ และคณะ, 2563) จากการทดลองในกลุ่มของอาหารสูตรที่เติม BA พบว่า หรีดโทนจะมีการตอบสนองความเข้มข้นของ BA ในปริมาณสูงกว่า (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะสามารถชักนำการเพิ่มจำนวนยอดใหม่ได้มากที่สุด แสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะใช้ชิ้นส่วนยอดเหมือนกันจากพืชสกุลเดียวกันก็จะมีการตอบสนองต่อปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตและปริมาณสารที่เพาะเลี้ยงต่างกัน ซึ่งอาจจะด้วยสายพันธุ์ของพืชที่มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา รวมถึงในระดับพันธุกรรมของพืชแต่ละชนิดด้วย (Bach and Pawlowska, 2003 ; Kaushal et al., 2014) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงจำนวนรากเฉลี่ยของหรีดโทนเขาจากการทดลอง พบว่า ในสูตรอาหารที่เติม 2-iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งจาการรายงานการศึกษาของ Butiuc-Keul et al. (2005) พบว่า ต้นอ่อน *Gentiana punctata* มีการเจริญและการเพิ่มจำนวนรากได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2-iP ร่วมกับ NAA และสารสกัดจากข้าวโพด (Me) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองในครั้งนี้ยังพบว่า อาหารที่เติม Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรส่งผลต่อการกระตุ้นให้ต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีความสูงต้นเฉลี่ยสูงที่สุด (9.1 เซนติเมตร) สอดคล้องกับรายงานในหรีดโทนชนิด *Gentiana clusii* เลี้ยงบนอาหารที่เติม Kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเจริญของยอดได้มากที่สุด (Krstić-Milošević et al., 2020) ในขณะที่ Kaushal et al. (2014) รายงานพบว่า *Gentiana kurroo* จะมีการยืดยาวของยอดใหม่ได้ดีที่สุดในอาหาร MS ที่เติมด้วย Kinetin ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ส่งผลทำให้ชิ้นส่วนของพืชสกุลหรีดแต่ละ

ชนิดเกิดการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ปริมาณมาก นอกจากนี้ จากการทดลองยังพบอาการฉ่ำน้ำ หรือเรียกว่า Vitrification หรือ Hyperhydricity โดยจะมีลักษณะโปร่งแสง หรือลักษณะเงาใสอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวการศึกษาของ เฌอ ชาติ และคณะ (2563) ที่แสดงถึงความสำคัญของธาตุอาหารที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยพบว่า เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดต้นลักษณา (*Gentiana nudicaulis*) ลงในอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่า ชิ้นส่วนเกิดการฉ่ำน้ำเกิดขึ้นบนอาหารสูตร MS และเมื่อมีการเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS พบว่า ไม่เกิดการฉ่ำน้ำเกิดขึ้นเลย ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า การขยายพันธุ์หรีดโทนด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงนอกจากต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นที่ต่ำแล้ว ธาตุอาหารก็มีความต้องการในปริมาณที่ไม่มากนักก็สามารถทำให้พืชเจริญ และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยจากการทดลองยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใด เนื่องจากสามารถเกิดจากหลายปัจจัย โดยทั่วไปมีสาเหตุมาจากสภาวะความเครียดในพืชที่ปริมาณน้ำในเซลล์สูง การได้รับฮอร์โมนหรือธาตุอาหารมากเกินไปจึงเกิดความไม่สมดุลของอาหารหรือฮอร์โมน ความชื้นสัมพัทธ์ในขวด ปริมาณแก๊สเอทธิลีน รวมถึงแสงและอุณหภูมิที่พืชได้รับ โดยสามารถเกิดได้กับทุกสูตรอาหาร รวมทั้งการเกิดคลอโรฟิลล์ลดลง และปริมาณน้ำในเซลล์สูง และสามารถเกิดกับพืชในหลายชนิดทั้งไม้ยืนต้น กระบองเพชร พืชอวบน้ำ และไม้ล้มลุกจะมีผลกระทบต่อพืชทางสรีรวิทยาของพืชอีกด้วย (รัฐภูมิ รวมอัญมณี และคณะ, 2560 ; Rojas-Martinez et al., 2010)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัยรวมทั้งผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต, ราชันย์ ภู่มา และสมราน สุดดี. (2548). *พรรณไม้ดอยเชียงดาว* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

ก่องกานดา ชยามฤต. (2549). *ลักษณะประจำวงศ์พันธุ์ไม้ 2* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ:สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.

เฌอ ชาติ โรจนกร เชิงปัญญา อัจฉรา เมืองครุธ ทยา เจนจิตติกุล และ งามนิจ ชื่นบุญงาม. (2563). การขยายพันธุ์ต้นลักษณา (*Gentiana nudicaulis* Kurz subsp. *lakshnakarae* (Kerr) Halda) ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *Thai Journal of botany, 12*(1), 67-87.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. (2545). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ:หลักการและเทคนิค* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัฐภูมิ รวมอัญมณี, สมคิด สิริพัฒนดิลก และสุธีร์ ดวงใจ. (2560). ผลของแอมโมเนียมไนเตรทและ

ความชื้นสัมพัทธ์ต่ออาการฉ่ำน้ำในการเพาะเลี้ยงยอดยูคาลิปตัสลูกผสม. *วารสารวนศาสตร์*, *36*(1), 22-32.

วีระชัย ณ นคร. (2544). *พรรณไม้สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 4*. กรุงเทพฯ:โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์.

อรดี สหวัชรินทร์. (2542). *เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. กรุงเทพฯ:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร ภาควิชาพืชสวน โครงการวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.

Bach, A. & Pawlowska, B. (2003). Somatic embryogenesis in *Gentiana pneumonanthe* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *45*(2), 79-86.

Brickell, C. (2008). *RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. United Kingdom: Dorling Kindersley, p.1136.

Butiuc-Keul, A., Suteu, A. & Deliu, C. (2005). *In vitro* organogenesis of *Gentiana punctata*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 33, 38-41.

Drobyk, N.M., Hrytsak, L.R., Mel'nyk, V.M., Kravets, N.B., Konvalyuk, I.I., Twardovska, M.O. & Kunakh, V.A. (2015). *In vitro* manipulation and propagation of *Gentiana* L. species from the Ukrainian Flora. *Biotechnology and Applications*, 2, 45-79.

Drobyk, N.M., Mel'nyk, V.M., Hrytsak, L.R., Kravets, N.B., Konvalyuk, I.I., Twardovska, M.O. & Kunakh, V.A. (2018). Establishment and analysis of tissue and fast-growing normal root cultures of four *Gentiana* L. species, rare highland medicinal plants. *Journal of Biopolymer and Cell*, *34*(6), 461-476.

Kaushal, S., Sidana, A. & Dev, K. (2014). *In vitro* plant production through apical meristem culture of *Gentiana kurroo* Royle. *Journal of Medicinal Plants*, *3*(1), 4-9.

Krstić-Milošević, D., Banjac, N., Janković, T., Eler, K., & Vinterhalter, B. (2020). *Gentiana clusii* Perr. & Song.: Enhanced production of secondary metabolites by in vitro propagation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154, 735-744.

Murashige, T & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497.

Pintov, S., Hochman, M., Livne, A., Heyman, E. & Lahat, E., (2005). Bach flower remedies Used for attention deficit hyperactivity disorder in children-a prospective double blind controlled study. European. *Journal of Paediatric Neurology*, *9*(6), 395-8.

Rojas-Martínez, L., Visser, R., & Klerk, G.D. (2010). Hydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants*, *10*(4), 169-175.

van Staden, J., Zazimalova, E. & George, E.F. (2008). *Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists*. In: E.F. George, M.A. Hall and G.-J. De Klerk, eds. Plant Propagation by Tissue Culture. Vol 1. The Background. 3rd ed. Dordrecht : Springer, pp. 205-226.