

ผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส การเจริญพัฒนาเป็นต้นและรากจากแคลลัสของ หม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of BA on Callus Induction, Shoot and Root Development from Callus of *Nepenthes ampullaria* through *In Vitro* Culture

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์^{1*}Jirasak Wichasawasdi^{1*}

Received date: 29 มิ.ย. 65 Revised date: 30 ส.ค. 66 Accepted date: 9 ก.ย. 66

DOI: <https://doi.org/10.55003/kmaj.2024.08.16.011>

บทคัดย่อ

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes ampullaria* Jack.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Nepenthaceae ปัจจุบัน กำลังอยู่ในสถานะเสี่ยงใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากป่าธรรมชาติลดลง อากาศแปรปรวน และมลพิษ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ BA (benzyl adenine) ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ แบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังนี้ (1) การชักนำให้เกิดแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงยอดด้วยอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 4 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงนาน 70 วัน พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (70%) (2) การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงนาน 45 วัน พบว่า แคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้มากที่สุด (19.7 ± 0.3 ยอด) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA และ (3) การชักนำให้เกิดราก โดยเพาะเลี้ยงยอดขนาด 1-2 เซนติเมตรด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0 และ 3 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 มก./ล. มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก ทำให้มีจำนวนรากมากที่สุด เฉลี่ย 7.4 ± 1.6 รากต่อยอด

คำสำคัญ: หม้อข้าวหม้อแกงลิง เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส เบนซิลอะดีนีน

ABSTRACT

Nepenthes ampullaria Jack. or pitcher plant is a carnivorous plant in the Nepenthaceae family. They are in danger of extinction because of the less forest area, volatile weather, and pollution. This study aimed to investigate the influence of BA (6-benzyl adenine) on callus induction of *Nepenthes* sp. through *In vitro* culture. The experiment was divided into three parts; (1) Callus induction; shoot of a pitcher plant were cultured on solid MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with BA (6-benzyladenine) at 0, 1, 2, and 4 mg/l for 70 days. The experiment design was completely Randomized Design (CRD) (4 treatments X 10 replicates). It was found that MS medium supplemented with 4 mg/l BA proved to be a suitable medium for callus induction (70%). (2) Shoot induction from callus; callus were cultured on MS medium supplemented with 0, 2, and 4 mg/l BA (CRD, 3 treatments X 10 replicates) for 45 days. The highest average number of regenerated shoots (19.7 ± 0.3 shoots) was observed on MS medium without BA. (3) Rooting induction; the young shoots, 1-2 cm in length, were cultured on MS medium containing 0, 1, 3, and 5 mg/l NAA combination with 0 and 3 mg/l IBA for 40 days (CRD, 8 treatments X 10 replicates). The results showed that the MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 3 mg/l IBA was suitable for root induction with the average of 7.4 ± 1.6 roots.

Keywords: *Nepenthes* sp., *in vitro*, callus, benzyladenine

¹ สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.ชุมพร 86170

¹ Division of Plant Science, Faculty of Maejo University at Chumphon, Maejo University, Chumphon 86170

* Corresponding author: Jirasak.w@gmail.com

คำนำ

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes ampullaria* Jack) เป็นพืชกินแมลง อยู่ในสกุล *Nepenthes* ซึ่งพืชสกุลนี้มี 129 ชนิด พืชเหล่านี้มักมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อมเขตรักษาพันธุ์ เต็มไปด้วยแหล่งที่มีธาตุอาหารต่ำ สภาพดินกรด พื้นที่ชุ่มน้ำ ภูเขา ป่าพรุ ป่าชายหาด และมีโครงสร้างใบเป็นกระเปาะใช้ดักจับแมลงเพื่อดูดซึมสารอาหารในการเจริญเติบโต (Sukanto et al., 2011) ส่วนใหญ่มักกระจายตัวในโซนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นอกจากนี้ มีการกระจายพันธุ์ไปถึงตะวันออกของประเทศอินเดีย ศรีลังกา มาดากัสการ์ ตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย (Charoenwattana et al., 2018) นิยมใช้ตกแต่งสวนหย่อม และใช้เป็นสมุนไพร เช่น บรรเทาอาการตาอักเสบ ผิวหนังพุพอง อาการไอ อาการไข้ แก้ปวดท้อง ช่วยระบาย นอกจากนี้ กระเปาะที่เปิดแล้วนำมาใส่อาหารและน้ำ (Sukanto et al., 2011) ในประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย มีการใช้รับประทานและทำขนมหวานในท้องถิ่น (Sapaeing et al., 2020) ปัจจุบันพืชชนิดนี้กำลังอยู่ในสถานะเสี่ยงใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากป่าธรรมชาติลดลง อากาศแปรปรวน และมลพิษ แม้ว่าพืชชนิดนี้สามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด แต่มีโอกาสติดเมล็ดน้อย เนื่องจากดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่คนละต้นกัน ส่วนการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น ปักชำกิ่ง ตอนกิ่ง ต้องใช้เวลานานและมีโอกาสสำเร็จน้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการที่สำคัญในการผลิตต้นกล้าตรงตามพันธุ์ ได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น ต้นมีความสม่ำเสมอ ปราศจากโรค และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยลดปัญหาการลักลอบนำต้นพ่อแม่พันธุ์จำนวนมากออกมาจากป่าธรรมชาติ (Sukanto et al., 2011) มีรายงานการศึกษาเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิงโดยใช้สารไซโทไคนิน ได้แก่ BA ยกตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยง *N. albomarginata* โดยใช้ปลายยอด (shoot tip) พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส คือ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงด้วย BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ทำให้เกิดแคลลัสชนิดแน่น (compact callus) (Sukanto et al., 2011) นอกจากนี้ Khompat et al., (2007) ได้เพาะเลี้ยงส่วนยอดหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* ด้วยอาหารสูตร MS ½MS และ ¼MS เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า เกิดยอดเฉลี่ย 2.4 – 4.3 ยอด โดยการเติม BA ความเข้มข้น 3 มก./ล. ทำให้ยอดสมบูรณ์ ใบมีขนาดใหญ่ มีการเพาะเลี้ยงเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. khasiana* จากนั้นตัดแยกส่วนลำต้นมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทำให้เกิดยอด 10-12 ยอด (Rathore et al., 1991 cited in Sapaeing et al., 2020) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. lowii* ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. นาน 32 สัปดาห์ ทำให้มียอดมากที่สุด 34 ยอด (Muangkroot, 2015 cited in Sapaeing et al., 2020) นอกจากนี้ Sapaeing et al. (2020) ได้เพาะเลี้ยงหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. และผงถ่าน ทำให้เกิดยอดได้ 8.48 ± 1.1 ยอด ส่วน Sukanto et al. (2011) ได้เพาะเลี้ยงปลายยอดหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. albomarginata* พบว่า สามารถเติบโตได้ดีบนอาหาร ½MS Jala (2012) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงปลายยอด *N. mirabilis* ด้วยอาหาร ½MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ทำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดได้ 4.2 ยอด Jaisue et al. (2019) ได้เพาะเลี้ยงตาข้างพืชหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* ด้วยอาหารสูตร ½MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. สามารถชักนำยอดได้ อย่างไรก็ตามยังไม่ปรากฏรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. ampullaria* จึงควรมีการศึกษาหาแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหม้อข้าวหม้อแกงลิง มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เช่น NAA และ IBA เพื่อช่วยกระตุ้นการเกิดรากได้ดี (Salisbury and Ross, 1978 cited in Sukanto et al., 2011) อาทิเช่น Khumdinpitag et al. (2004) ได้ทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง พบว่า ชิ้นส่วนยอดอ่อนจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ มีการสร้างรากได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหาร Half-MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทำให้มีรากมากที่สุดคือ 14.3 ราก และมีความยาวมากที่สุด เฉลี่ย 0.7 ซม. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ นอกจากนี้ Thanasombat et al. (2009) รายงานว่า สูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดรากของหม้อข้าวหม้อแกงลิง ได้แก่ อาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. ทำให้มีจำนวนราก เฉลี่ย 4.2 ราก การวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิงเรื่องนี้จึงได้ศึกษาแนวทางการใช้ระดับสาร BA ซึ่งเป็นสารกลุ่มไซโทไคนิน โดยทดสอบหาระดับที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี แล้วนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดยอดใหม่และต้นที่สมบูรณ์ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตต้นพันธุ์ดีของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่มีความปลอดโรค ได้ปริมาณมาก ในเวลาอันรวดเร็ว นับเป็นการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์การค้า และเป็นแนวทางการขยายพันธุ์สำหรับต่อยอดในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

ผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ

การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชหม้อข้าวหม้อแกงลิงสำหรับการทดลอง นำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหม้อข้าวหม้อแกงลิงซึ่งอยู่ในสภาพปลอดเชื้อในขวดทดลอง โดยได้รับการสนับสนุนโคลน (clone) จากบริษัทเอกชน จำนวน 1 ต้น มีอายุประมาณ 1 เดือน แล้วตัดชิ้นส่วนยอดดังกล่าวมาเพิ่มจำนวนยอดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นตัดส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. เป็นเวลา 6 เดือน เพื่อให้ได้จำนวนยอดที่มากเพียงพอสำหรับการวางแผนการทดลองนี้ หลังจากนั้น ตัดชิ้นส่วนยอดที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อแล้ว ให้มีความยาว 1.0 ซม. มีใบจริง 1-2 ใบ เพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS (pH 6.5) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design (CRD) มี 4 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ชิ้นส่วน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ภายใต้สภาพได้รับแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ นาน 14 ชั่วโมง/วัน เพาะเลี้ยงนาน 70 วัน โดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่ บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสโดยวัดตรงส่วนกว้างที่สุดของก้อนแคลลัส ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of mean, SEM) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Sirichai Statistics version 7.0

ขั้นตอนการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นยอดใหม่

ใช้ชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดลองดังกล่าว (สิ่งทดลองอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล.) ขนาดแคลลัส 0.5×0.5 ซม. เพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร MS (pH 6.5) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ชิ้นส่วน จากนั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ในสภาพอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ได้รับแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ นาน 14 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงนาน 45 วัน บันทึกข้อมูล ได้แก่ จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วน ความยาวยอดใหม่ (ซม.) เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส (ซม.) โดยวัดตรงส่วนกว้างที่สุดของก้อนแคลลัส ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of mean, SEM) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Sirichai Statistics version 7.0

ผลของ NAA และ IBA ต่อการชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาดชิ้นส่วน 1 – 2 ซม. มีใบจริงคู่แรก เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (pH 6.5) ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มก./ล. และสาร IBA ความเข้มข้น 0 และ 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน โดยมีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสิ่งทดลองควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ชิ้นส่วน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ได้รับแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงนาน 40 วัน บันทึกข้อมูล จำนวนรากต่อชิ้นส่วน ความยาวรากโดยวัดรากที่ยาวที่สุด (ซม.) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of mean, SEM) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Sirichai Statistics version 7.0

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหม้อข้าวหม้อแกงลิงภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

เมื่อตัดชิ้นส่วนปลายยอดของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ นำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. เป็นเวลานาน 70 วัน ปรากฏผลดังนี้ อาหารสูตรที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสชนิดแน่นมากที่สุด คือ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. มีการเกิดแคลลัส เฉลี่ย 70% รองลงมาคือ อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. มีการเกิดแคลลัส เฉลี่ย 50% นอกจากนี้ อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มก./ล. ชักนำให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด เฉลี่ย 1.17 ± 0.3 ซม. แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ที่แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เฉลี่ย 0.8 ± 0.3 ซม. (Table 1, Figure 1) โดยการใช้ BA ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในพืชชนิดนี้ สำหรับแคลลัสนั้นได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จัดเป็นส่วนหนึ่งของเนื้อเยื่อที่มีกลุ่มเซลล์พาเรนาไคมาหรือเซลล์เมอริ

สเต็มมีอยู่ในปริมาณมาก (high contents) ซึ่งแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ (clump of cell) ที่สามารถพัฒนา (redifferentiation) ไปเป็น meristematic cell และตายอด (shoot bud) ใหม่ได้โดยขบวนการออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) หากได้รับสัดส่วนของฮอร์โมนไซโทไคนินและออกซินที่เหมาะสม (Sharma and Alam, 2015) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับ Jala (2012) ที่ได้เพาะเลี้ยงปลายยอดของหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. Mirabilis*) ด้วยอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ Kumlay and Ercisli (2015) กล่าวว่า BA มีประโยชน์ต่อขบวนการเกิดแคลลัส (callogenesis) BA ช่วยให้เกิดขบวนการสร้างอวัยวะ (organogenesis) ของมันสำปะหลัง นอกจากนี้ BA ช่วยส่งเสริมการเพิ่มปริมาณยอด เมื่อใช้ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นอกจากนี้ Sukanto et al. (2011) ได้เพาะเลี้ยงปลายยอด หม้อข้าวหม้อแกงลิง *N.albomarginata* ด้วย BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.5 – 2.0 มก./ล. นาน 98 วัน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน Taha (2016) กล่าวว่า หากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารที่มีสมดุล (balance) ระหว่างออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสมจะทำให้แคลลัสเติบโตได้ดี และการเพิ่มความเข้มข้น BA ที่เหมาะสมช่วยเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส โดยไซโทไคนินจะเพิ่มการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ Savithramma et al. (2010) กล่าวว่า เมื่อพืชได้รับ BA และ kinetin ในความเข้มข้นที่ต่างกันจะมีผลต่อพัฒนาการของแคลลัสและการพัฒนายอด สำหรับไซโทไคนินได้ถูกค้นพบครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ. 1950 โดย Skoog และ Miller มีชื่อเรียกว่า kinetin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ adenine ทั้งนี้ ไซโทไคนินที่นิยมใช้มากที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ BA เนื่องจาก BA เป็นไซโทไคนินที่มีความคงตัวมากที่สุด ถูกออกซิไดซ์ด้วยแสงได้ยาก มีราคาถูก และใช้ง่าย นอกจากนี้ การเติมไซโทไคนินหรือ BA ในระดับที่เหมาะสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยให้เกิดการพัฒนายอด (bud formation) และ BA ช่วยส่งเสริมให้เซลล์สามารถพัฒนาจากเซลล์เดียวไปเป็นอวัยวะ (totipotent cells) ต่อไปได้ (Kanchanapoom & Boonvanno, 2000) สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วยฮอร์โมนเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีผู้รายงานไว้ว่า โครงสร้างแคลลัสมีสารสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานโดยแคลลัสชนิดแน่น (compact callus) ทำให้เกิดยอดใหม่ได้ ส่วนแคลลัสชนิดหลวม (friable callus) ทำให้เกิดเอ็มบริโอแคลลัส (embryonic callus) (Torres, 1989 cited in Sukanto et al., 2011; Kyte, 1990 cited in Sukanto et al., 2011) Kumlay and Ercisli (2015) รายงานว่า การใช้สาร BA มีผลต่อขบวนการสร้างและพัฒนาเนื้อเยื่อให้เป็นแคลลัสหรือ แคลโลเจเนซิส (callogenesis) Khatun et al., 2003 cited in Kumlay and Ercisli (2015) รายงานว่า มีการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ ช่วยชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 83.33% มีรายงาน Balachandar et al. (2004) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดและลำต้นของมะแว้งเครือ (*S. trilobatum*) พบว่า การเติม BA ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน ช่วยให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 75% เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ สำหรับการใส่ BA ความเข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ ทำให้แคลลัสที่ได้จากใบ มีการพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุด 69.8% นอกจากนี้พบว่า การใช้ NAA เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลให้เกิดแคลลัสในพืชชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม นอกจากการชักนำแคลลัสจะใช้เพียง BA เพียงอย่างเดียว ซึ่งช่วยประหยัดค่าสารเคมีอื่นๆ ควรศึกษาการใช้ BA ร่วมกับ NAA ในสัดส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสได้มากขึ้น มีรายงานการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดของหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N.albomarginata* สามารถเกิดแคลลัสได้ดี 41.67% เมื่อใช้สาร BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มก./ล. นาน 12 สัปดาห์ (Sukanto et al., 2011)

Table 1 Percentage of callus formation and diameter of callus after shoots were tips cultured on MS medium supplemented with BA at the concentrations of 0, 1, 2, and 4 mg/l for 70 days

BA (mg/l)	% of callus formation	Diameter of compact callus (cm)
0	0	0±0.0 ^c
1	50	0.8±0.3 ^{ab}
2	40	0.29±0.1 ^{bc}
4	70	1.17±0.3 ^a
F-test	-	*
CV (%)	-	120%

* = significant difference at 95% level of confidence. - = Not analysis

Mean values (mean ± SE, n=10) with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

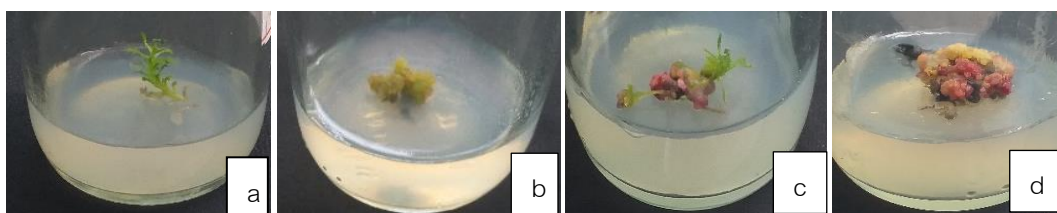


Figure 1 Callus formation after shoots were cultured on MS medium supplemented with BA at the concentrations of (a) 0 mg/L; control (b) 1 mg/L (c) 2 mg/L (d) 4 mg/L for 70 days.

ขั้นตอนการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นยอดใหม่

เมื่อได้เพาะเลี้ยงแคลลัสนาน 45 วัน พบว่า อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน มีจำนวนยอดใหม่พัฒนามากที่สุด เฉลี่ย 19.7 ± 0.3 ยอด และยอดมีความยาวเฉลี่ย 1.32 ± 0.1 ซม. สอดคล้องกับ Khompat et al. (2007) รายงานว่า หลังเพาะเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มก./ล. แล้วย้ายปลายยอดเลี้ยงต่อด้วยอาหารสูตร MS $\frac{1}{2}$ MS $\frac{1}{4}$ MS และ $\frac{1}{8}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดที่เติบโตดี จำนวน 2.4 - 4.3 ยอด Aisulaiman & Barakat (2010) รายงานว่า การใช้สารไซโทไคนินในระดับความเข้มข้นต่ำช่วยชักนำให้พัฒนาตายอดและตาข้างได้ ในงานวิจัยนี้ พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรที่เติม BA มีส่วนช่วยให้แคลลัสมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นได้ โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด 1.95 ± 0.2 ซม. แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. (Table 2, Figure 2)

Table 2 Number of regenerated shoots, shoot length and callus diameter after callus of *N. ampullaria* were cultured on MS medium supplemented with 0 1 and 2 mg/L BA for 45 days

BA (mg/L)	At 15 days after cultured		At 45 days after cultured		
	Diameter of callus (cm)	% shoot clumps	Number of regenerated shoots	Shoot length (cm)	Diameter of callus (cm)
0	1.25 ± 0.12^a	50	19.7 ± 0.3^a	1.32 ± 0.1^a	0 ± 0^b
2	1.01 ± 0.04^b	0	0 ± 0.0^b	0 ± 0.0^b	1.95 ± 0.2^a
4	0.9 ± 0.04^b	0	0 ± 0.0^{bc}	0 ± 0.0^b	1.84 ± 0.1^a
F-test	*	-	*	*	*
CV (%)	22.63 %	-	80.27	50.64	31.99

* = significant difference at 95% level of confidence. - = Not analysis

Mean values (mean $\pm$ SEM) with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$)

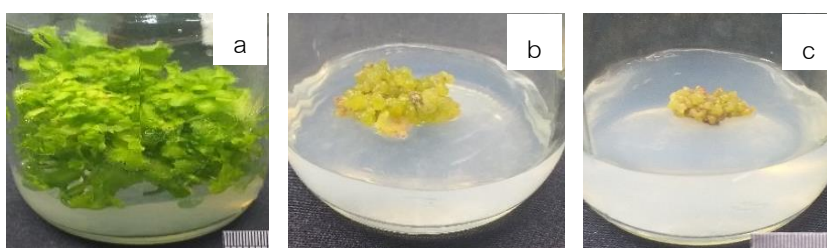


Figure 2 Effect of BA on shoot induction when calluses were cultured on MS medium supplemented with BA at the concentrations of (a) 0 or control (b) 2 mg/L (c) 4 mg/L for 45 days.

ผลของ NAA และ IBA ต่อการชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำชิ้นส่วนยอดมาชักนำให้เกิดราก โดยเฉพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่างๆ นาน 40 วัน พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำราก คือ อาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 มก./ล. ทำให้มีจำนวนรากทั้งหมด (รากที่เกิดบริเวณรอยตัด (roots) และรากเกาะ (climbing roots)) มากที่สุด 7.4 ± 1.6 ราก เมื่อวิเคราะห์แต่ละปัจจัย พบว่า การเติม IBA มีผลต่อจำนวนรากทั้งหมด ส่วนจำนวนราก (รากที่เกิดจากบริเวณรอยตัดชิ้นส่วน) ความยาวราก จำนวนรากเกาะ ความยาวรากเกาะ และความยาวรากทั้งสองชนิด พบว่า ในทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3, Figure 3) เนื่องจาก NAA และ IBA ซึ่งเป็นฮอร์โมนกลุ่มออกซินทำให้สามารถชักนำรากได้ สอดคล้องกับรายงานที่ ออกซินสามารถชักนำให้เกิดรากห้อยขาวห้อยแกงลิง *N. albomarginata* ได้ (Sukanto et al., 2011) โดยมีผู้กล่าวว่า NAA ช่วยชักนำให้เกิดราก (root differentiation) ส่วน IBA ช่วยให้มีการยืดยาวของราก (root elongation) (Mendes et al. 2011 cited in Chamandoosti, 2020) นอกจากนี้ Savithramma et al. (2010) กล่าวว่า NAA เป็นสารออกซินที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำรากและการเจริญเติบโตของรากพืช *Talinum cuneifolium* ส่วน IBA ช่วยให้เกิดรากได้ดีในพืช ทั้งนี้ Khumdinpitag et al. (2004) ได้รายงานว่า สามารถชักนำให้พืชห้อยขาวห้อยแกงลิง *N. thorelii* เกิดรากได้บนอาหารสูตร Half-MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 - 2.0 มก./ล. นอกจากนี้ มีการใช้ทั้ง NAA และ IBA ร่วมกันในการชักนำให้เกิดรากได้ Cui et al. (2019) ได้เพาะเลี้ยงยอด *Magnolia sirindhorniae* พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำรากดีที่สุด 95.7% คือ อาหารที่เติม NAA กับ IBA ชนิดละ 0.5 มก./ล.

Table 3 Root induction of *N. ampullaria* shoots cultured on MS medium supplemented with different concentration of NAA and IBA after 40 days

NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Number of roots	Root length (cm)	Number of climbing root	Climbing root length (cm)	Number of total roots
0	0	1.8 ± 0.5	2.3 ± 1.2	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.4	3.6 ± 0.4 ^c
1	0	3.1 ± 0.6	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.4	0.9 ± 0.2	4.5 ± 0.7 ^{bc}
3	0	2.3 ± 0.6	1.4 ± 0.3	2.4 ± 0.5	1.3 ± 0.2	4.7 ± 0.6 ^{bc}
5	0	1.9 ± 0.6	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.4	0.9 ± 0.2	4.0 ± 0.6 ^{bc}
0	3	2.8 ± 0.6	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.0 ± 0.3	4.1 ± 0.5 ^{bc}
1	3	4.5 ± 1.3	1.2 ± 0.2	2.9 ± 0.4	1.2 ± 0.2	7.4 ± 1.6 ^a
3	3	3.2 ± 0.6	0.9 ± 0.2	2.0 ± 0.4	0.9 ± 0.2	5.2 ± 0.7 ^{abc}
5	3	4.1 ± 0.8	1.2 ± 0.2	2.5 ± 0.5	1.1 ± 0.2	6.6 ± 0.8 ^{ab}
F-test		ns	ns	ns	ns	*
CV (%)		78.8	107.2	63.2	70.7	51.4

ns= no significant difference and, * = significant difference at 95% level of confidence, respectively.

Mean values (mean $\pm$ SEM) with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$)

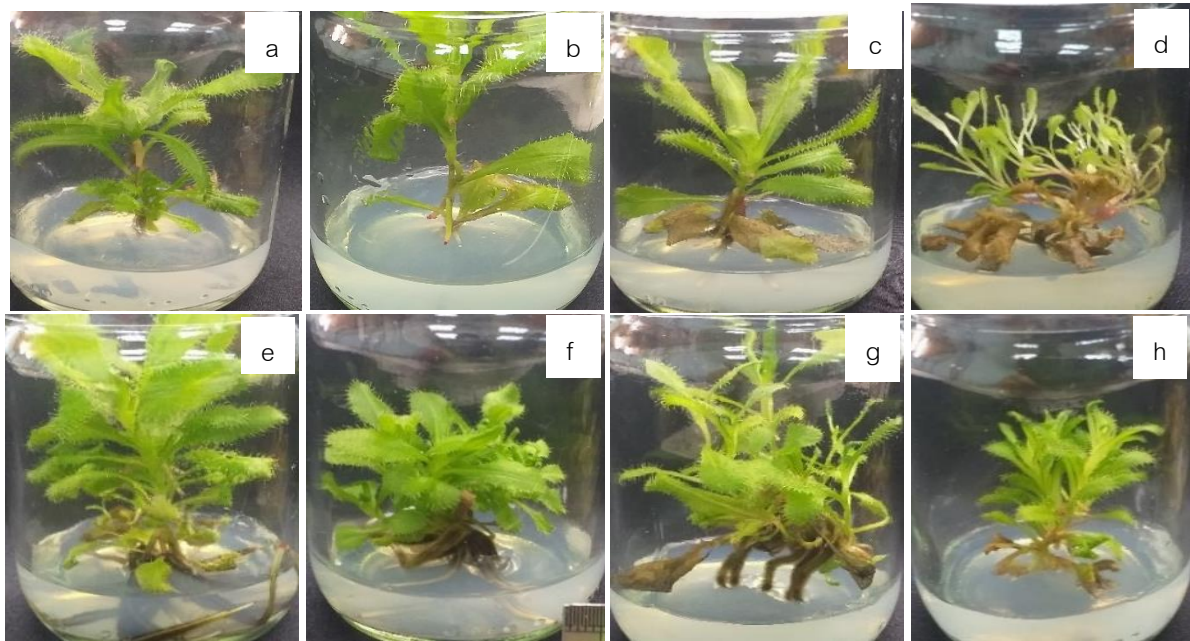


Figure 3 Root induction on MS medium supplemented with NAA and IBA individually or in combination for 40 days. (a) control (b) 1 mg/L NAA (c) 3 mg/L NAA (d) 5 mg/L NAA (e) 3 mg/L IBA (f) 1 mg/L NAA and 3 mg/L IBA (g) 3 mg/L NAA and 3 mg/L IBA (h) 5 mg/L NAA and 3 mg/L IBA

สรุปผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes ampullaria*) พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสชนิดแน่นได้มากที่สุด 70% เมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อน นาน 70 วัน คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. สำหรับขั้นตอนการชักนำให้แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ได้มากที่สุด (50%) คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ทำให้ได้จำนวนยอด 19.7 ± 0.3 ยอด เมื่อเลี้ยงนาน 45 วัน สำหรับผลของ NAA และ IBA ต่อการชักนำให้เกิดราก พบว่า สูตรที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ได้แก่ การใช้อาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 มก./ล. ทำให้เกิดรากได้มากที่สุด เฉลี่ย 7.4 ± 1.6 ราก เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน

เอกสารอ้างอิง

- Ai-sulaiman, F. A., & Barakat, M. N. (2010). *In vitro* shoot multiplication of *Ziziphus spina christi* by shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, 9(6), 850-857.
- Balachandar, R., Alagumanian, S., Perumal, V. S., Rameshkannan, K., & Rao, M. V. (2004). Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. **Current Science**, 86(11), 1478-1480.
- Chamandoosti, F. (2020). Citrus tissue culture with two different approaches. **International Journal of Biosciences and Biotechnology**, 8(1), 19-30.
- Charoenwattana, P., Srion, P., Chiablaem, K., Ploykerd, K., & Hongthong, P. (2018). Effects of Cytokinins on Shoot Induction of *Nepenthes mirabilis* *in vitro*. **Agricultural Science Journal**, 49(Suppl.3), 149-153.
- Cui, Y., Deng, Y., Zheng, K., Hu, X., Zhu, M., Deng, X., & Xi, R. (2019). An Efficient Micropropagation Protocol for an Endangered Ornamental Tree Species (*Magnolia Sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and Assessment of Genetic Uniformity through DNA Markers. **Scientific Reports**, 9(9634), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46050-w>
- Jaisue, C., Poowan, N., Kanjanasopa, D., Srirawat, T., Thitithanakul, S., Onsanit, S., & Sontikun, Y. (2019). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of somaclonal variation among *in vitro* *Nepenthes mirabilis*. **Khon Kaen Agriculture Journal**, 47(Suppl.1), 515-522.
- Jala, A. (2012). Types of media for seeds germination and effect of BA on mass propagation of *Nepenthes mirabilis* Druce. **American Transaction on Engineering and Applied Sciences**, 1(2), 163-171.
- Kanchanapoom, K., & Boonvanno, K. (2000). A protocol for micropropagation of the piscicidal plant *Maesa ramentacea* A. Dc. **Science Asia**, 26, 201-205.
- Khompat, K. Tokhao, W., & Jantasilp, A. (2007). Factors affecting *in vitro* seed germination and shoot multiplication of a pitcher plant (*Nepenthes mirabilis* Lour Druce). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 29(2), 253-260.
- Khumdinpitag, A., Krasaechai, A., & Phornsawatchai, P. (2004). *In vitro* Propagation of Pitcher Plant (*Nepenthes thorelii*). **Journal of Agriculture**, 20(1), 1-9.
- Kumlay, A. M., & Ercisli, S. (2015). Callus induction shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day condition. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 29(6), 1075-1084.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Plant Physiology**, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052>
- Sapaeing, A., Sutthion, P., Hilae, A., & Wattanapan, N. (2020). Effect of BA NAA and activated charcoal on micropropagation of *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce. **Acta Horticulturae**, 1298(38), 281-286.
- Savithramma, N., Ankanna, S., Prabha, B., & Sasilala, A. (2010). Micropropagation of *Talinum cuneifolium* Vahl. Willd. through petiole culture. **Asian Journal of Environmental Science**, 5(2), 158-163.
- Sharma, V., & Alam, A. 2015. **Plant Tissue Culture**. IK International Publishing House.
- Sukamto, L. A., Mujiono, M., Djukri, D., & Henuhili, V. (2011). Shoot tip culture of *Nepenthes albomarginata* Lobb ex Lindl. *in vitro*. **Journal Biologi Indonesia**, 7(2), 251-261.
- Taha, A. J. (2016). Callus induction and plant regeneration of *Cordia myxa* L. via tissue culture system. **International Journal of Pharmacy and Integrated Life Sciences**, 4(5), 18-29.
- Thanasombat, M., Banchong, Y., Tangpradit, P., Wongwaen, P., & Pankaeo, Y. (2009). Development and micropropagation of *Nepenthes* sp. for commercial (chapter 2) propagation by plant tissue culture. **Kasetsart Extension Journal**, 54(3), 15-25.