การขยายพันธุ์พืชสมุนไพรข้าวเย็นเหนือโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

In vitro Propagation of Medicinal Plant *Smilax corbularia* Kunth

เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์[1*] วชิระ ชุ่มมงคล[2] และ ธีระพล เสนพันธุ์[3]

Therdsak Thonnalak[1*], Vachira Choommongkol[2] and Threeraphol Senphan[3]

[1]สาขาวิชาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

[1]Medicinal Plant Science Program, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

[2]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

[2]Chemistry Program, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

[3]สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

[3]Food Engineering Program, Faculty of Engineering and Agro-industry, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

**Corresponding author: Email: th.thonnalak@gmail.com*

(Received: 8 November 2022; Accepted: 26 January 2023)

Abstract: *In vitro* propagation of the *Smilax corbularia* Kunth. From Mae Chon Luang, Chiang Mai, Thailand was studied. The nodal explants were cultured on MS medium supplemented with 0, 0.5 and 1.0 mg/l NAA in combination with 0, 1.0, 3.0 and 0.5 mg/l BA for 8 weeks. The results showed that the most effective formula for shoot induction (number of new shoots at 3.43 and shoot height at 1.98 cm) were cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA in combination with 3.0 mg/l BA. Then, the shoots of *S. corbularia* were cultured on the appropriate formula of ½ MS or MS medium supplemented with 0, 0.5 and 1.0 mg/l NAA for rooting. The results showed that both of the medium supplemented with 1.0 mg/l NAA was the most effective in root induction (10.43 and 11.25 roots). The root tended to be longer when the plant were cultured on MS medium without plant growth regulator and ½ MS or MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA. In addition, it was found that the survival rate of *S. corbularia* plantlets observed were 60 to 80 % when the plantlets were transplanted in peat moss for 4 weeks.

Keywords: *Smilax corbularia*, medicinal plant, micropropagation, *in vitro*

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: การขยายพันธุ์ข้าวเย็นเหนือจากแหล่งพื้นที่บ้านแม่จอนหลวง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด (จำนวนยอด 3.43 ยอด และความสูงยอด 1.98 เซนติเมตร) จากนั้นเมื่อนำยอดของข้าวเย็นเหนือมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ยอดข้าวเย็นเหนือเกิดรากได้จำนวนมากที่สุด (10.43 และ 11.25 ราก) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง 2 สูตร ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยรากมีแนวโน้มมีความยาวมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่า ต้นอ่อนของข้าวเย็นเหนือมีอัตราการรอดชีวิต 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายปลูกในพีทมอสเป็นเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: ข้าวเย็นเหนือ พืชสมุนไพร การขยายพันธุ์ สภาพปลอดเชื้อ

คำนำ

ข้าวเย็นเหนือเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ส่วนหัวใต้ดินซึ่งมีรสหวานเล็กน้อย เป็นส่วนประกอบในการปรุงตำรับยาแผนโบราณไทยมากกว่า 2,400 รายการ ได้รับการขึ้นทะเบียนจากกระทรวงสาธารณสุขให้เป็นหนึ่งในสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ เช่น น้ำเหลืองเสีย โรคเรื้อน กามโรค การติดเชื้อแบคทีเรีย โรคมะเร็ง และอาการอักเสบต่าง ๆ เป็นต้น (Tewtrakul *et al*., 2006) ในตำรับยาไทยใช้หัวข้าวเย็นในสกุล *Smilax* 2 ชนิด คือ หัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) และหัวข้าวเย็นใต้ (*Smilax glabra* Roxb.) (Itharat, 2010) ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากหัวข้าวเย็นเหนือได้มาจากต้นที่มีอยู่ในธรรมชาติ หากในอนาคตพืชชนิดนี้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายและมีการส่งเสริมให้ปลูกเพื่อการค้า อาจทำให้ต้นพันธุ์มีไม่เพียงพอต่อความต้องการในการใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ดอาจจะเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลผลิต ดังนั้นเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีส่วนสำคัญที่เข้ามาช่วยในการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์และรักษาลักษณะของต้นพันธุ์ที่ได้ตรงตามสายพันธุ์

การศึกษาของ Thirugnanasampandan *et al.* (2009) ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อจากยอดของ *Smilax zeylanica* บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 - 10 วัน และย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ l-glutathione ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนของยอดได้ดี และชักนำให้ยอดเกิดรากได้บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งต้นอ่อนรอดชีวิตได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายปลูกในวัสดุปลูกเวอร์มิคูไลท์ ทราย และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1

สำหรับ *S. glabra* สามารถชักนำให้ตาข้างของชิ้นส่วนข้อพัฒนาได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชักนำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้บนอาหารสูตร Hyponex (H)

ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยต้นอ่อนมีชีวิตรอดได้เมื่อย้ายปลูกในวัสดุพีทมอสและทราย-แม่น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 (Dong *et al*., 2014) ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของ *Smilax myosotiflora* พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดรากได้ดีบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Abdullah *et al*., 2021) สำหรับประเทศไทย มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเย็นใต้ (*S. glabra*) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้ยอดเกิดรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยต้นอ่อนที่เกิดรากแล้วย้ายปลูกอนุบาลในโรงเรือนพรางแสงนาน 2 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ (Jirakiattikul *et al*., 2015)

เนื่องจากยังไม่มีรายงานวิธีการขยายพันธุ์ของข้าวเย็นเหนือ จึงได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการพัฒนาให้ชิ้นส่วนพืชเกิดเป็นต้นอ่อนสมบูรณ์ และสามารถนำออกปลูกให้มีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมปกติได้ การศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ข้าวเย็นเหนือ และใช้เป็นข้อมูลสำหรับพัฒนาการผลิตวัตถุดิบพืชสมุนไพรข้าวเย็นเหนือต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การฟอกฆ่าเชื้อและชักนำให้เกิดยอด

นำชิ้นส่วนข้อของข้าวเย็นเหนือ (Figure 1A) จากแหล่งรวบรวมในพื้นที่แม่จอนหลวง ตำบลแม่นาจร อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ ขนาด 1.0 เซนติเมตร มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox®, USA) ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (คลอร็อกซ์มี active NaOCl 5.25 % v/v) ร่วมกับ Tween20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ชิ้นส่วนข้อเกิดการพัฒนาและอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนข้อที่มีการพัฒนาตาข้างขนาด 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 5 กรัมต่อลิตร และเติม naphthalene acetic acid (NAA) ร่วมกับ N6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้นแตกต่างกัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้ได้รับความเข้มแสง 35 µmol m^{-2} s^{-1} นาน 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบ 3 x 4 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของ NAA มี 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ BA มี 4 ระดับ คือ 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมจำนวน 12 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วนพืช บันทึกจำนวนยอด (ยอด) และความสูงของยอด (เซนติเมตร) จำนวนราก (ราก) และความยาวของราก (เซนติเมตร) วิเคราะห์ข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การชักนำราก

ชักนำให้ต้นอ่อนข้าวเย็นเหนือเกิดรากบนอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 35 µmol m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อต้นอ่อนเกิดราก นำออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ล้างวุ้นอาหารด้วยน้ำประปาออกให้หมด ปลูกอนุบาลต้นอ่อนข้าวเย็นเหนือในโรงเรือนพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุปลูกพีทมอส

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 4 Factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ในอาหารสูตร MS มี 2 ระดับ คือ ½ MS และ MS และความเข้มข้นของ NAA มี 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมจำนวน 6 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วนพืช บันทึกความสูงต้นอ่อน (เซนติเมตร) จำนวนราก (ราก) ความยาวของราก (เซนติเมตร) และการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก (เปอร์เซ็นต์) วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

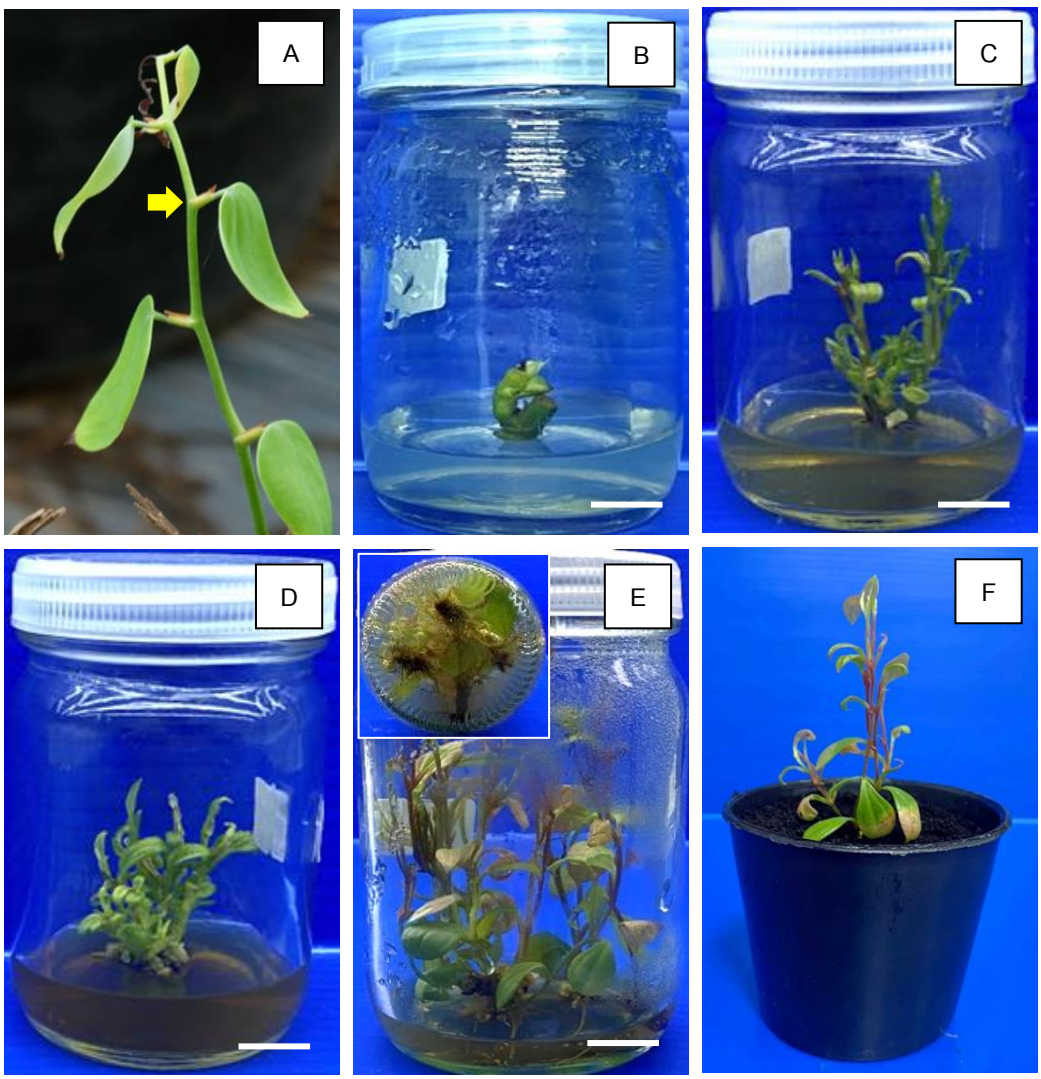

Figure 1. *In vitro* propagation of *Smilax corbularia* Kunth; (A) Nodal explant used for culture initiation (arrow), (B) Development of axillary shoots from nodal explants on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA after 4 weeks of culture, (C, D) Development of multiple shoots from nodal explants on MS medium supplemented with 0.5 or 1.0 mg/l NAA and 3.0 or 5.0 mg/l BA after 8 weeks of subculture, (E) Induction of roots from microshoots in ½ MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA after 8 weeks, (F) The plantlet planted in the peat moss. (bar = 1 cm)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การฟอกฆ่าเชื้อและชักนำให้เกิดยอด

การนำชิ้นส่วนข้อของข้าวเย็นเหนือ (Figure 1A) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ส่งผลให้ได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ซึ่งเป็นสารฟอกขาวที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ ((Daud *et al*., 2012; Hesami *et al*., 2017) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของสารฟอกฆ่าเชื้อยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารด้วย โดยทั่วไปถ้าใช้เวลานานขึ้นและความเข้มข้นของสารสูงขึ้น โอกาสปนเปื้อนของจุลินทรีย์จะลดน้อยลง แต่หากใช้เวลาและความเข้มข้นที่สูงเกินไป อาจเกิดอันตรายต่อชิ้นส่วนพืชได้ (Gu *et al*., 2022)

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตาข้างที่บริเวณชิ้นส่วนข้อเกิดการพัฒนาได้จำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1B) การที่ตาข้างบริเวณชิ้นส่วนข้อของข้าวเย็นเหนือสามารถพัฒนาได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญของตาข้างที่บริเวณส่วนข้อนั้นถูกควบคุมภายใต้อิทธิพลของเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของพืช ซึ่งเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนออกซิน (Müller and Leyser, 2011) โดยออกซินถูกสังเคราะห์ขึ้นที่บริเวณปลายยอด จากนั้นลำเลียงแบบมีทิศทางผ่านเนื้อเยื่อไซเลม (xylem) ไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อยู่ส่วนล่าง ส่งผลให้ออกซินยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของตาข้างที่บริเวณส่วนข้อ เรียกว่า ปรากฏการณ์ข่มโดยตายอด (apical dominance) (Dun *et al*., 2006) การตัดชิ้นส่วนพืชเฉพาะเพียงชิ้นส่วนข้อมาเพาะเลี้ยง จึงเป็นการกำจัดออกซินที่ปลายยอดของพืชออก ส่งผลให้เนื้อเยื่อเจริญตาข้างของข้าวเย็นเหนือเจริญเติบโตและพัฒนาขึ้นได้ นอกจากนี้การเพิ่ม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญตาข้างพัฒนาได้ดีขึ้น เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางสรีรวิทยาของพืชที่หลากหลาย เช่น การชะลอการข่มของตายอดทำให้ตาข้างเกิดการเจริญและพัฒนา การนำไซโทไคนินมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงส่งผลให้พืชสร้างยอดใหม่ นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมกระบวนการแบ่งเซลล์และการขยายตัวของเซลล์ ยับยั้งการแก่ชราของใบ ช่วยการลำเลียงอาหาร ป้องกันการเสื่อมชราของเนื้อเยื่อพืช และการตอบสนองต่อความเครียดของพืชอีกด้วย (Azizi *et al*., 2015; Kacer *et al*., 2005) ซึ่งไซโทไคนินที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น zeatin และ 2-isopentyladenine (2iP) และมีการสังเคราะห์ขึ้น เช่น 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) และ thidiazuron (TDZ) เป็นต้น (Jana *et al*., 2013) อย่างไรก็ตาม การประเมินว่าควรเลือกใช้ไซโทไคนินชนิดใดเพื่อให้พืชพัฒนายอดใหม่นั้น ขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ ตลอดจนพันธุกรรมของพืชชนิดนั้น ๆ ด้วย (Arab *et al*., 2014)

เมื่อนำชิ้นส่วนข้อที่มีการพัฒนามาเพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 หรือ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดจำนวนสูงที่สุดเฉลี่ย 3.62 4.15 3.71 และ 3.43 ยอด ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นอื่น ๆ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารสูตร MS ที่เติมเพียงเฉพาะ BA ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มจะส่งผลให้ความสูงของยอดมีค่าสูงที่สุดเฉลี่ย 2.16, 1.93, 2.08 และ 1.98 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 1) แต่อย่างไรก็ตาม

Table 1. Effects of NAA and BA combinations on shoot regeneration from nodal explants of *Smilax corbularia* in MS medium, 8 weeks after cultured

Factors	Number of new shoots	Shoot height (cm)	Number of roots	Root length (cm)
1-Naphthaleneacetic acid (NAA)				
0 mg/l	1.83 ± 0.30^{b}	2.01 ± 0.35^{a}	0.16 ± 0.02^{c}	0.24^{b}
0.5 mg/l	2.65 ± 0.45^{a}	1.67 ± 0.35^{ab}	0.81 ± 0.16^{b}	0.27^{ab}
1.0 mg/l	2.75 ± 0.57^{a}	1.24 ± 0.25^{b}	1.16 ± 0.40^{a}	0.32^{a}
F-test	*	*	*	*
N6-Benzyladenine (BA)				
0 mg/l	1.28 ± 0.17^{c}	1.71 ± 0.29^{a}	2.77 ± 0.45^{a}	0.81 ± 0.20^{a}
1.0 mg/l	1.78 ± 0.32^{b}	1.65 ± 0.34^{a}	0.06 ± 0.03^{b}	0.07 ± 0.04^{b}
3.0 mg/l	3.15 ± 0.67^{a}	1.73 ± 0.34^{a}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}
5.0 mg/l	3.41 ± 0.69^{a}	1.46 ± 0.31^{b}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}
F-test	*	*	*	*
Interaction (NAA x BA)				
0 mg/l NAA + 0 mg/l BA	1.14 ± 0.10^{c}	2.16 ± 0.34^{a}	0.63 ± 0.07^{b}	0.94 ± 0.20^{a}
0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA	1.38 ± 0.21^{c}	1.87 ± 0.38^{ab}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
0 mg/l NAA + 3.0 mg/l BA	2.13 ± 0.47^{b}	1.93 ± 0.26^{a}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
0 mg/l NAA + 5.0 mg/l BA	2.65 ± 0.50^{b}	2.08 ± 0.44^{a}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
0.5 mg/l NAA + 0 mg/l BA	1.27 ± 0.15^{c}	1.64 ± 0.27^{b}	3.22 + 0.63^{a}	1.06 ± 0.20^{a}
0.5 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA	1.56 ± 0.32^{c}	1.72 ± 0.34^{ab}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
0.5 mg/l NAA + 3.0 mg/l BA	3.62 ± 0.61^{a}	1.98 ± 0.49^{a}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
0.5 mg/l NAA + 5.0 mg/l BA	4.15 ± 0.81^{a}	1.32 ± 0.29^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
1.0 mg/l NAA + 0 mg/l BA	1.43 ± 0.25^{c}	1.32 ± 0.23^{c}	4.47 + 1.27^{a}	0.43 ± 0.17b^{c}
1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA	2.41 ± 0.46^{b}	1.37 ± 0.28^{c}	0.18 + 0.09^{b}	0.21 ± 0.12^{c}
1.0 mg/l NAA + 3.0 mg/l BA	3.71 ± 0.91^{a}	1.28 ± 0.25^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
1.0 mg/l NAA + 5.0 mg/l BA	3.43 ± 0.76^{a}	0.97 ± 0.20^{d}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{d}
F-test	*	*	*	*

*; Significant difference ($p \leq 0.05$), Mean values followed by the same letters within a column are not significantly different according to DMRT.

ความสูงของยอดมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตร MS ที่เติมเพียงเฉพาะ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.87 ยอด) หรืออาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.72 ยอด) นอกจากนี้ ชิ้นส่วนพืชยังมีการพัฒนารากเกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมเฉพาะเพียง NAA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 1) การพัฒนายอดของข้าวเย็นเหนือจำนวนมากที่เกิดขึ้นนั้น (Figure 1C, D) เกิดจากปฏิสัมพันธ์ร่วมของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (NAA) และไซโทไคนิน (BA) ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงทำให้ชิ้นส่วนพืชพัฒนายอดหรือรากผ่านกระบวนการพัฒนาอวัยวะ (organogenesis) ได้ (Su *et al*., 2011) โดยออกซินทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการยืดตัวของเซลล์ (Mayerni *et al*., 2020) ส่วนไซโทไคนินช่วยส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสร้าง tRNA ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความสำคัญกับการแบ่งเซลล์ และช่วยในการพัฒนายอดและใบ (Mayerni *et al*., 2020; Takahashi and Umeda, 2014) การทำหน้าที่ร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่ม ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์จำนวนมาก และมีการพัฒนายอดใหม่ผ่านกระบวนการที่เซลล์จำนวนหนึ่งเปลี่ยนแปลงไปมีลักษณะเฉพาะเพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (cell differentiation) (Fehér, 2019; Takahashi and Umeda, 2014) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ ยอดของข้าวเย็นเหนือมีการเจริญเติบโตและพัฒนาในด้านความสูงได้เช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยสารประกอบอนินทรีย์ น้ำตาล และวิตามิน ซึ่งช่วยให้ยอดมีการเจริญเติบโต แต่ไม่มีการเกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้น (Pérez *et al*., 2004)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Smilax* พบว่า ชิ้นส่วนพืชมีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของไซโทไคนินแตกต่างกันไป แต่อย่างไรก็ตาม การเติมไซโทไคนินไม่ว่าเป็นชนิดและระดับความเข้มข้นใด ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ช่วยส่งเสริมให้พืชพัฒนายอดใหม่ได้ (Kadota and Niimi, 2003) เช่น ใน *S. zeylanica* สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Thirugnanasampandan *et al*., 2009) ใน *S. glabra* ชักนำให้เกิดการพัฒนาตาข้างที่บริเวณส่วนข้อได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (Dong *et al*., 2014) หรือบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jirakiattikul *et al*., 2015) ส่วน *S. myosotiflora* สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Abdullah *et al*., 2021)

การชักนำราก

การชักนำต้นอ่อนข้าวเย็นเหนือเกิดราก โดยนำต้นอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ร่วมกับ NAA ความเข้ม 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ต้นอ่อนมีจำนวนรากสูงที่สุด 10.43 และ 11.25 ราก ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้นอื่น ๆ (Table 2) ในขณะที่ความยาวรากมีค่าสูง เฉลี่ย 1.45 และ 1.39 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับความยาวรากของต้นข้าวเย็นเหนือที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีความยาวเฉลี่ย 1.28 เซนติเมตร แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่น ๆ (Table 2) ส่วนความสูงต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA หรือเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0

มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าความสูงเฉลี่ย 7.73, 8.02 และ 7.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้ความสูงยอดเฉลี่ย 7.63 เซนติเมตร (Table 2) (Figure 1E)

Table 2. Effects of NAA on plantlet height and root induction from shoot of *Smilax corbularia* on ½MS or MS medium, 8 weeks after cultured

Factors	Plantlet height (cm)	Number of roots	Root length (cm)	Survival rate[1] (%)
Culture mdium (A)				
½ MS	7.55 ± 0.51	5.59 ± 0.93	1.12 ± 0.21	71.70
MS	7.90 ± 0.66	6.13 ± 1.20	1.12 ± 0.24	71.70
F-test	ns	ns	ns	-
Plant growth regulator (B)				
0 mg/l	7.59 ± 0.51	0.90 ± 0.13^{c}	1.23 ± 0.21^{a}	62.50
0.5 mg/l	7.83 ± 0.60	5.84 ± 1.18^{b}	1.42 ± 0.29^{a}	72.50
1.0 mg/l	7.77 ± 0.65	10.84 ± 2.14^{a}	0.70 ± 0.17^{b}	80.00
F-test	ns	*	*	-
Interaction A x B				
½ MS + 0 mg/l NAA	7.45 ± 0.42^{c}	0.67 ± 0.08^{c}	1.18 ± 0.19^{b}	60.00
½ MS + 0.5 mg/l NAA	7.63 ± 0.50^{ab}	5.68 ± 1.15^{b}	1.45 ± 0.27^{a}	75.00
½ MS + 1.0 mg/l NAA	7.58 ± 0.63^{b}	10.43 ± 1.89^{a}	0.72 ± 0.16^{c}	80.00
MS + 0 mg/l NAA	7.73 ± 0.60^{a}	1.13 ± 0.20^{c}	1.28 ± 0.23^{ab}	65.00
MS + 0.5 mg/l NAA	8.02 ± 0.71^{a}	6.01 ± 1.21^{b}	1.39 ± 0.30^{a}	70.00
MS + 1.0 mg/l NAA	7.96 ± 0.69^{a}	11.25 ± 2.39^{a}	0.68 ± 0.17^{c}	80.00
F-test	*	*	*	-

*; Significant difference ($p \leq 0.05$), ns; No significant difference, Mean values followed by the same letters within a column are not significantly different according to DMRT.

[1]; The survival rate of plantlets were transplanted in peat moss for 4 weeks.

จากการศึกษาการพัฒนารากของต้นอ่อนข้าวเย็นเหนือดังกล่าว พบว่า ให้ผลการศึกษาสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับ Jirakiattikul *et al*. (2015) ที่รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดรากในข้าวเย็นใต้ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาปัจจัยความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ในอาหารสูตร ½ MS และ MS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทั้งด้านความสูงต้นอ่อน จำนวนราก และความยาวราก (Table 2) ดังนั้นการที่ต้นอ่อนสามารถพัฒนาทั้งทางด้านจำนวนรากและความยาวรากได้นั้นเกิดจากอิทธิพลของ NAA เพียงปัจจัยเดียว ซึ่งการได้รับ NAA ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมช่วยกระตุ้นให้มีการพัฒนารากพิเศษ (adventitious root) โดยการพัฒนารากพิเศษนั้นประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ระยะชักนำให้เกิดเซลล์กำเนิดราก (induction) ระยะเริ่มต้นพัฒนาราก (initiation) และระยะการเติบโตและยืดขยายราก (extension) โดยออกซินมีส่วนช่วยในกระบวนการสร้างรากพิเศษดังกล่าวในทุกขั้นตอน (Guan *et al*., 2019) ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มอื่น ได้แก่ ไซโทไคนิน พบว่า มีคุณสมบัติยับยั้งไม่ให้มีการพัฒนาจุดกำเนิดราก (Azizi *et al*., 2015) และเมื่อนำต้นอ่อนข้าวเย็นเหนือที่มีรากสมบูรณ์ย้ายออกปลูกในพีทมอส และอนุบาลในโรงเรือนพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1F) พบว่า หลังย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต้นอ่อนข้าวเย็นเหนือมีการรอดชีวิต 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Table 2)

สรุป

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของข้าวเย็นเหนือบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยให้จำนวนยอด 3.43 ยอด และยอดมีความสูง 1.98 เซนติเมตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในขณะที่ชิ้นส่วนพืชมีการพัฒนารากเกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมเพียง NAA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ยอดของข้าวเย็นเหนือสามารถชักนำให้เกิดรากได้จำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 10.43 และ 11.25 ราก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยรากมีแนวโน้มมีความยาวมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ และอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อย้ายปลูกต้นอ่อนข้าวเย็นเหนือที่มีรากสมบูรณ์ในพีทมอส และอนุบาลในโรงเรือนพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต้นอ่อนการรอดชีวิต 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) เป็นอย่างยิ่งที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย (สวก.-63-012.3) และขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Abdullah, N., N.H. Hassan, M.F. Yahya, M.S.A. Wahid, R. Khalid, S. Ramuddin and R. Abdullah. 2021. *In vitro* propagation of *Smilax myosotiflora* (Ubi Jaga) for conservation and commercial purposes. International Journal of Agriculture. Forestry and Plantation 12: 110-113.

Arab, M.M., A. Yadollahi, A. Shojaeiyan, S. Shokri and S.M. Ghojah. 2014. Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of

G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative rootstock. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 12(2): 81-87.

Azizi, P., M.Y. Rafii, M. Maziah, S.N.A. Abdullah, M.M. Hanafi, M.A. Latif, A.A. Rashid and M. Sahebi. 2015. Understanding the shoot apical meristem regulation: A study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. Mechanisms of Development 135: 1-15.

Daud, N.H., S. Jayaraman and R. Mohamed. 2012. An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 20(2): 55-58.

Dong, Q., Z. Yan, L. Bai and Q. Wu. 2014. Rapid propagation system for tissue culture of *Smilax glabra*. Journal of Chinese Medicinal Materials 37(1): 5-9.

Dun, E.A., B.J. Ferguson and C.A. Beveridge. 2006. Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? Plant Physiology 142(3): 812-819.

Fehér, A. 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? Frontiers in Plant Science 10: 536, doi: 10.3389/fpls. 2019.00536.

Gu, M., Y. Li, H. Jiang, S. Zhang, Q. Que, X. Chen and W. Zhou. 2022. Efficient *in vitro* sterilization and propagation from stem segment explants of *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst, a multipurpose woody plant. Plants 11: 1937, doi: 10.3390/plants11151937.

Guan, L., R. Tayengwa, Z. Cheng, W.A. Peer, A.S. Murphy and M. Zhao. 2019. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. BMC Plant Biology 19: 435, doi: 10.1186/s12870-019-2002-9.

Hesami, M., M.H. Daneshvar and A. Lotfi-Jalalabadi. 2017. Effect of sodium hypochlorite on control of *in vitro* contamination and seed germination of *Ficus religiosa*. Iranian Journal of Plant Physiology 7(4): 2157-2162.

Itharat, A. 2010. Comparative biological activities of five Thai medicinal plants called Hua-Khao-Yen. Thai Journal of Pharmacology 32(1): 327-331.

Jana, S., I. Sivanesan and B.R. Jeong. 2013. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3(7): 549-553.

Jirakiattikul, Y., O. Songsri, P. Rithichai and A. Itharat. 2015. *In vitro* propagation of Hao-Khao-Yen (*Smilax glabra* Roxb.). Thai Science and Technology Journal 23(1): 11-21. (in Thai)

Kacer, Y.A., M. Mazmanoglu, Y.Y. Mendi, S. Serce and S. Cetiner. 2005. The effect of cytokinin type and concentration on multiplication rate of *Spathiphyllum* (Fam. *Araceae*). Asian Journal of Plant Sciences 4(4): 401-404.

Kadota, M. and Y. Niimi. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72(3): 261-265.

Mayerni, R., B. Satria, D.K. Wardhani and S.R.O.S. Chan. 2020. Effect of auxin (2,4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local

patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 583: 012003, doi:10.1088/1755-1315/583/1/012003.

Müller, D. and O. Leyser. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. Annals of Botany 107(7): 1203-1212.

Pérez, A., L. Nápoles, C. Carvajal, M. Hernandez and J.C. Lorenzo. 2004. Effect of sucrose, inorganic salts, inositol, and thiamine on protease excretion during pineapple culture in temporary immersion bioreactors. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 40: 311-316.

Su, Y.H., Y.B. Liu and X.S. Zhang. 2011. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. Molecular Plant 4(4): 616-625.

Takahashi, N. and M. Umeda. 2014. Cytokinins promote onset of endoreplication by controlling cell cycle machinery. Plant Signaling & Behavior 9: e29396, doi: 10.4161/psb.29396.

Tewtrakul, S., A. Itharat and P. Rattanasuwan. 2006. Anti-HIV-1 protease- and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua-Khao-Yen. Journal of Ethnopharmacology 105(1-2): 312-315.

Thirugnanasampandan, R., V.N. Mutharaian and V. Narmatha Bai. 2009. *In vitro* propagation and free radical studies of *Smilax zeylanica* Vent. African Journal of Biotechnology 8(3): 395-400.