

# การขยายพันธุ์มะแหลบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

## *In Vitro* Propagation of *Heracleum siamicum* Craib.

พัชราวดี วัฒนวิทย์กิจ<sup>1</sup> และ ภัทรารพณ์ ศรีสมรรถการ<sup>2\*</sup>

Patcharawadee Wattanawikkit<sup>1</sup>, and Pattharaporn Srisamatthakarn<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ 10240

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

<sup>2</sup>สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ. ลำปาง 52000

<sup>2</sup>Agricultural Technology Research Institute, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang 52000, Thailand

\*Corresponding author: Email: patr99@hotmail.com

(Received: 1 August 2024; Accepted: 30 January 2025)

**Abstract:** *Heracleum siamicum* Craib. is herbal spice plant that contains many important chemical components. However, there are a few research information on its propagation by tissue culture. This research was aimed to study the optimal media for *H. siamicum* Craib. shoot induction. The 1 cm shoot tips were cultured on the MS and WPM media which supplemented with different of BAP and TDZ at concentrations of 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L with 20 replicates for 45 days. The results showed that the BAP addition of any 2 mg/L gave significantly greater shoot number ( $5.55 \pm 0.87$  shoots/explant) than the other ( $P < 0.05$ ). While, the MS and WPM media without growth regulators exhibited the greatest shoot length of  $6.80 \pm 0.42$  and  $7.21 \pm 0.35$  cm, respectively. The *H. siamicum* Craib. root induction was afterwards conducted on the MS and WPM media supplemented with different growth regulators of IBA, IAA and NAA at 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L with 20 replicates. It was shown that the MS medium plus 1 mg/L IBA gave the highest percentage of root induction of 90%, higher root number of  $15.65 \pm 2.06$  roots per shoot and root length of  $1.81 \pm 0.29$  cm. *H. siamicum* Craib. shoot was induced callus formation of 100% and callus diameter of  $2.43 \pm 0.13$  cm on the WPM medium plus 8 mg/L NAA. The plantlets with both roots and shoots were transferred to various planting materials which were vermiculite, perlite, peat, and the mixture of vermiculite, perlite, and peat at the ratio of 1:1:1 for 30 days in the green house. It was found that *H. siamicum* Craib. planted in the mixtures of vermiculite, perlite, and peat had 50% survival percentage and average plant height 3.5 cm.

**Keywords:** Tissue culture, *H. siamicum* Craib., growth regulator

**บทคัดย่อ:** มะเหลบ (*H. siamicum* Craib) เป็นพืชสมุนไพรเครื่องเทศที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญมากมาย แต่งานวิจัยด้านการขยายพันธุ์มะเหลบโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีค่อนข้างน้อย งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของเนื้อเยื่อมะเหลบ โดยการนำปลายยอดมะเหลบขนาด 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร woody plant medium (WPM) ที่เติม BAP (6-Benzylaminopurine) และ TDZ (1-Phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)-urea) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 20 ชั่ว เป็นเวลานาน 45 วัน พบว่า การเติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้  $5.55 \pm 0.87$  ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนสูตรอาหาร MS และ WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น สามารถชักนำให้มะเหลบมีความยาวยอดสูงสุด  $6.80 \pm 0.42$  และ  $7.21 \pm 0.35$  เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำยอดมะเหลบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (4-Indole-3-yl butyric acid), IAA (Indole-3-acetic acid) และ NAA ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid) ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 20 ชั่ว เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงเฉลี่ยร้อยละ 90 มีจำนวนรากสูง  $15.65 \pm 2.06$  รากต่อยอด และมีความยาวราก  $1.81 \pm 0.29$  เซนติเมตร เนื้อเยื่อมะเหลบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เฉลี่ยร้อยละ 100 และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง  $2.43 \pm 0.13$  เซนติเมตร เมื่อนำต้นมะเหลบที่มีทั้งรากและยอดไปย้ายปลูกในวัสดุปลูกที่ต่างกัน 4 ชนิด คือ vermiculite, perlite, peat และวัสดุผสมระหว่าง vermiculite : perlite : peat ที่อัตราส่วน 1:1:1 เป็นเวลา 30 วัน ในสภาพโรงเรือน พบว่าวัสดุผสม vermiculite : perlite : peat ส่งผลให้ต้นมะเหลบมีการรอดชีวิตร้อยละ 50 มีความสูง 3.5 เซนติเมตร

**คำสำคัญ:** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มะเหลบ สารควบคุมการเจริญเติบโต

## คำนำ

มะเหลบ เป็นพืชพื้นเมืองและเป็นพืชเศรษฐกิจท้องถิ่นที่พบมากทางภาคเหนือของไทย เช่น จังหวัดน่าน พะเยาแพร่ เชียงราย ลำปาง แม่ฮ่องสอน และเชียงใหม่ เป็นต้น ผลมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีรสขมและเผ็ดเล็กน้อย จึงใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงแต่งรสอาหารพื้นเมืองภาคเหนือ นิยมใส่ในน้ำพริกปลาหรือเครื่องลาบ เพื่อปรุงแต่งกลิ่นรสและดับกลิ่นคาวของเนื้อสัตว์ (Samphunphuang *et al.*, 2014) อีกทั้งพืชสกุลมะเหลบ (*Heracleum*) มีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ และเป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ (Bahadori *et al.*, 2016; Iscan *et al.*, 2004; Kuljanabhagavad *et al.*, 2011) ปัจจุบันความต้องการมะเหลบเพิ่มขึ้นมาก ส่งผลให้ราคาเพิ่มสูงขึ้นถึง 1,000-1,200 บาทต่อ

กิโลกรัม แต่ปริมาณผลผลิตมะเหลบมีค่อนข้างน้อย เนื่องจากการบุกรุกเผา จึงมีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด แต่ได้ผลผลิตช้า ดังนั้นการขยายพันธุ์มะเหลบโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นวิธีการขยายพันธุ์อีกวิธีหนึ่งที่เพิ่มผลผลิตที่เร็วขึ้น และยังมีการศึกษากันค่อนข้างน้อยในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นรายงานจากต่างประเทศ Wakhlu and Sharma (1999) ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดด้านข้าง (axillary shoot) ของ *H. candicans* Wall. บนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้จำนวนยอดเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ  $7.5 \pm 2.94$  ยอดต่อชิ้นส่วนยอด การเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้สร้างรากเป็นจำนวนมากเฉลี่ยร้อยละ 100 มีจำนวนรากสูงสุด  $5.9 \pm 2.1$  รากต่อยอด และเมื่อย้ายปลูกบนดิน ร่วนพบว่าต้นพืชมีลักษณะทางสัณฐาน รูปร่าง และเซลล์ เหมือนต้นแม่พันธุ์ทุกประการ Zou *et al.*, (2019)

ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปลายยอดและ ก้านใบของ *H. scabridum* บนอาหาร MS เต็ม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม Zinc (Zn) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำไปปลายยอดเกิด จำนวนยอดได้สูงสุด  $27.25 \pm 4.19$  ยอดต่อชิ้นส่วนปลาย ยอด และชักนำไปก้านใบเกิดยอดได้  $18.23 \pm 2.12$  ยอดต่อใบ ปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เต็ม IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 1.5 มิลลิกรัม ต่อลิตร สามารถชักนำไปเกิดจำนวนยอดได้ร้อยละ 94.4 มีจำนวนยอด  $7.12 \pm 1.23$  ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อ ลิตร สามารถชักนำไปเกิดจำนวนราก และความยาวราก ได้สูงสุดเท่ากับ  $20.73 \pm 4.86$  รากต่อยอด และ  $6.1 \pm 1.26$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อย้ายต้นอ่อนปลูกลงใน วัสดุผสม peat : vermiculite ในอัตราส่วน 3:1 มีการ รอดชีวิตร้อยละ 95 ต่อมา Jan *et al.* (2019) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบของ *H. candidans* Wall บนอาหาร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชัก นำให้เกิดยอดได้เฉลี่ยร้อยละ 100 เกิดจำนวนยอดและ ความยาวยอดมากที่สุด  $15.2 \pm 0.6$  ยอดต่อชิ้นส่วน  $7.6 \pm 0.2$  เซนติเมตร และอาหารสูตร MS สามารถชักนำไป ให้เกิดรากได้สูงเฉลี่ยร้อยละ 90 และมีจำนวนราก เฉลี่ย 6.9 รากต่อยอด และมีความยาวราก  $1.81 \pm 0.29$  เซนติเมตร มีการรายงานของ Xia *et al.* (1993) พบว่า การขยายพันธุ์พืชสกุลมะແหลบ *H. moellendorffii* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อลำต้น (stem node) บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำไปเกิดแคลลัสได้ ส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS และ N6 ที่เติมอะกาโรส ร้อย ละ 0.3 ส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์จำนวนมาก เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.2 โมลาร์ ทำให้เกิดการพัฒนามาเป็นแคลลัส และเมื่อ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการพัฒนาเป็นเอมบริโอและ ต้นอ่อนเกิดขึ้น

การขยายพันธุ์มะແหลบโดยการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย แต่มีการศึกษาใน พืชสมุนไพรอื่น ดังรายงานของ Wattanawikkitt *et al.*

(2018) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตายอดของ มะແหลบนบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดมะແหลบได้ มากที่สุด และสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุม การเจริญให้ความยาวยอดสูงสุด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึง ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการ- ขยายพันธุ์มะແหลบได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น ช่วย อนุรักษ์พันธุกรรมพืชพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพที่มีประโยชน์ มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาสูง และ เป็นพืชเศรษฐกิจชุมชนไม่ให้สูญหายไปจากประเทศไทย และเพียงพอกับความต้องการของตลาด

## อุปกรณ์และวิธีการ

การพัฒนาเทคนิคขยายพันธุ์มะແหลบโดย วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และ ห้องปฏิบัติการและ โรงเรือนเพาะชำ สถาบันเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชภัฏชมภูล้านนาในระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2563

### การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำไป เกิดยอดของเนื้อเยื่อมะແหลบ

นำเมล็ดมะແหลบจากแหล่งปลูกในจังหวัด ลำปาง มาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปฟอกฆ่า เชื้อในสารละลายคลอริกซ์ เข้มข้นร้อยละ 30 เป็น เวลานาน 30 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการ ึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเมล็ดมะ แผลบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ไปเพาะลงบนอาหาร สังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 45 วัน จากนั้น ตัดชิ้นส่วนปลายยอดมะແหลบขนาด 1 เซนติเมตร ไปทำ การเพิ่มจำนวนยอดโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร WPM ที่เติม BAP และ TDZ ความ เข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพ ที่ได้รับแสงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 45 วัน รวมเป็น 18 กรรมวิธี วางแผนการทดลอง

แบบ completely randomized design (CRD) แต่ละความเข้มข้นของ BAP และ TDZ ที่เติมในอาหารทั้ง 2 สูตร โดยศึกษากรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชั้นส่วน บันทึกรายงานยอด และความยาวยอด

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Duncan, 1955)

### การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากจากปลายยอดมะเหลบ

นำส่วนปลายยอดของมะเหลบขนาด 1 เซนติเมตรที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร WPM ที่เติม IBA, IAA และ NAA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้แสงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 45 วัน รวมเป็น 26 กรรมวิธี โดยศึกษากรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชั้นส่วน บันทึกรายงานการเกิดราก และวัดความยาวรากเปรียบเทียบกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Duncan, 1955)

### การย้ายปลูกและอนุบาลต้นอ่อนในโรงเรือนเพาะชำ

นำขวดเพาะเลี้ยงยอดมะเหลบที่ออกรากดีแล้ว คลายเกลียวฝาขวดเล็กน้อย แล้วนำไปปรับสภาพอุณหภูมิและความชื้นภายนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 สัปดาห์ แล้วนำต้นอ่อนมะเหลบจากสูตรอาหารที่มีจำนวนรากสูงสุด ขนาดความสูงเริ่มต้น 2 เซนติเมตร ออกจากขวด ล้างรูนให้สะอาด เช็ดสารป้องกันและกำจัดเชื้อรา นำไปทดลองปลูกบนวัสดุปลูก 4 ชนิด คือ Vermiculite, Perlite, Peat และ Vermiculite ผสม Perlite และ Peat ที่อัตราส่วน 1:1:1 รดน้ำจนชุ่มแล้วคลุมด้วยถุงพลาสติก แล้วค่อย ๆ เปิดถุงพลาสติกเพื่อให้พืชปรับตัวอยู่ในสภาพธรรมชาติได้ เป็นเวลานาน 30 วัน ทดลอง 10 ซ้ำ บันทึกรายงานความสูงต้น จำนวนราก ความยาวราก และร้อยละการรอดชีวิต

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของเนื้อเยื่อมะเหลบ

เมื่อนำเนื้อเยื่อปลายยอดมะเหลบขนาด 1 เซนติเมตรที่ปลอดเชื้อ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร WPM ที่เติม BAP และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอด พบว่าเนื้อเยื่อของมะเหลบมีลักษณะการเกิดยอดที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เติม โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้สูง  $5.55 \pm 0.87$  ยอดต่อชั้นส่วนพืช (Table 1, Figure 1C) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jan *et al.* (2019) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลมะเหลบ *H. candicans* Wall บนอาหาร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้สูงสุด อย่างไรก็ตาม การเกิดจำนวนยอดไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) กับผลของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเหลบบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 1 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 1, Figure 2B, 2E) มีรายงานว่า TDZ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับของ auxin และ cytokinin ภายในเซลล์พืชให้สูงขึ้น จึงช่วยชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากในการเพาะเลี้ยง stem tip ของ *H. scabridum* บนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ (Zou *et al.*, 2019) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเหลบบนสูตรอาหาร MS และ WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวยอดมากกว่าต้นในกรรมวิธีอื่นๆ คือ  $6.80 \pm 0.42$  และ  $7.21 \pm 0.35$  เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 1, Figure 1A, 2A, 3A, 4A) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wakhlu and Sharma (1999) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอด axillary shoot ของ *H. candicans* Wall. บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP มีความยาวยอดลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BAP

Table 1. Shoot number and shoot length of *H. siamicum* Craib. induced from culturing shoot tip on MS and WPM supplemented with BAP and TDZ at different concentrations for 45 days

Medium	Number of shoots $\pm$ SE (shoots/explant)	Shoot length (cm) $\pm$ SEd
MS	1.00 $\pm$ 0.00 e	6.80 $\pm$ 0.42 a
MS + 1 mg/L BAP	2.60 $\pm$ 0.41 bcde	4.53 $\pm$ 0.43 cdef
MS + 2 mg/L BAP	5.55 $\pm$ 0.87 a	5.15 $\pm$ 0.31 bcd
MS + 4 mg/L BAP	2.85 $\pm$ 0.44 bcd	3.86 $\pm$ 0.29 ef
MS + 8 mg/L BAP	3.50 $\pm$ 0.48 bc	4.08 $\pm$ 0.39 def
MS + 1 mg/L TDZ	4.25 $\pm$ 0.86 ab	4.65 $\pm$ 0.31 cdef
MS + 2 mg/L TDZ	3.95 $\pm$ 0.73 bc	5.18 $\pm$ 0.39 bcd
MS + 4 mg/L TDZ	3.90 $\pm$ 0.78 bc	4.85 $\pm$ 0.57 cde
MS + 8 mg/L TDZ	4.20 $\pm$ 0.66 ab	3.80 $\pm$ 0.34 ef
WPM	1.00 $\pm$ 0.00 e	7.21 $\pm$ 0.35 a
WPM + 1 mg/L BAP	1.60 $\pm$ 0.15 de	6.30 $\pm$ 0.35 ab
WPM + 2 mg/L BAP	1.85 $\pm$ 0.22 de	6.18 $\pm$ 0.36 ab
WPM + 4 mg/L BAP	2.60 $\pm$ 0.30 bcde	5.62 $\pm$ 0.28 bc
WPM + 8 mg/L BAP	3.25 $\pm$ 0.43 bcd	4.34 $\pm$ 0.28 def
WPM + 1 mg/L TDZ	2.90 $\pm$ 0.60 bcd	4.64 $\pm$ 0.61 cdef
WPM + 2 mg/L TDZ	1.75 $\pm$ 0.18 de	3.53 $\pm$ 0.42 fg
WPM + 4 mg/L TDZ	2.35 $\pm$ 0.36 cde	2.68 $\pm$ 0.27 gh
WPM + 8 mg/L TDZ	1.75 $\pm$ 0.19 de	2.11 $\pm$ 0.22 h

Means within the same column followed by different letters are significantly different at  $P < 0.05$  by DMRT

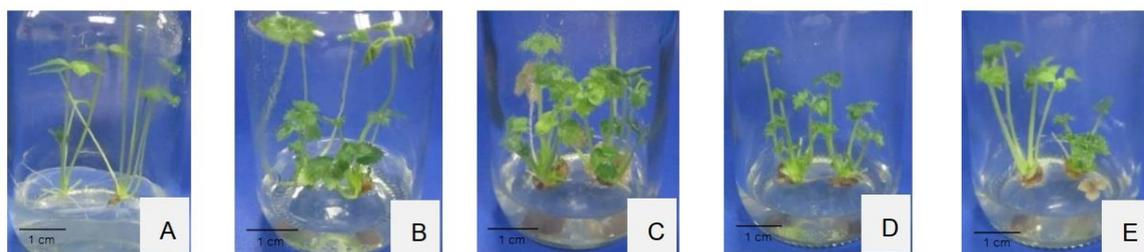


Figure 1. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L BAP for 45 days (A – E, respectively)

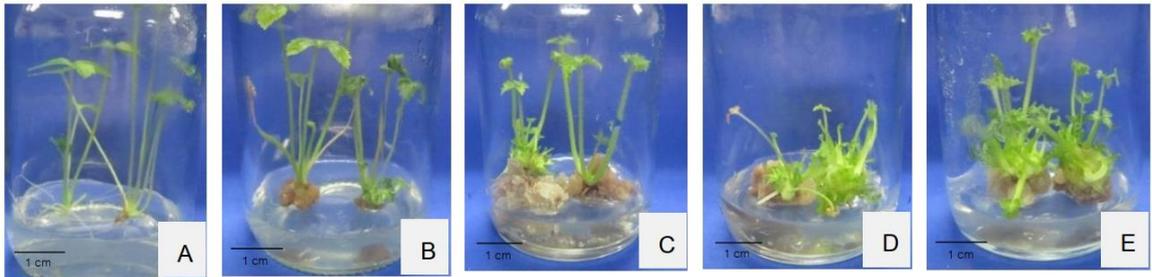


Figure 2. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L TDZ for 45 days (A – E, respectively)

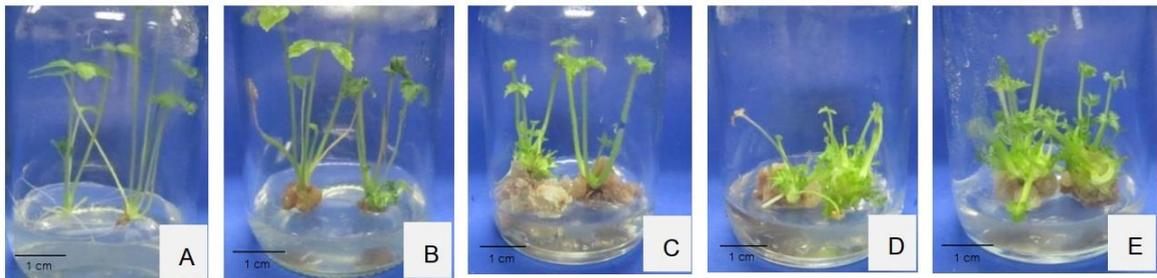


Figure 3. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L BAP for 45 days (A – E, respectively)

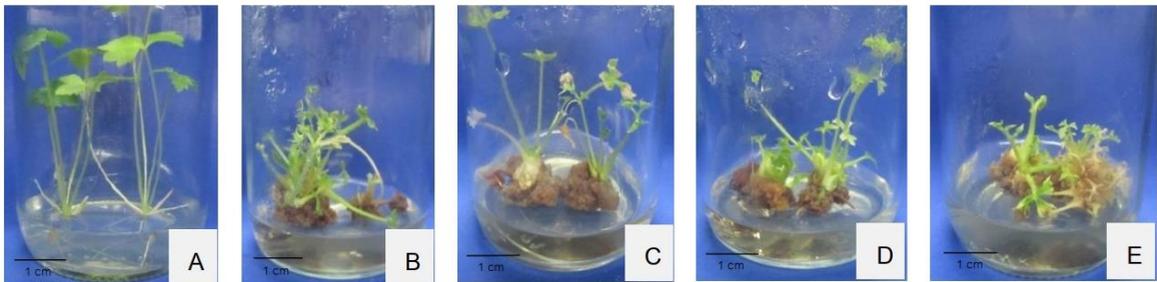


Figure 4. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L TDZ for 45 days (A – E, respectively)

### สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากของยอดมะแหลบ

เมื่อนำส่วนยอดของมะแหลบขนาด 1 เซนติเมตรในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงยอดมะแหลบบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ยร้อยละ 90 (Table 2, Figure 5B) อาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ยอดมะแหลบบีจำนวนรากสูงสุด  $15.65 \pm 2.06$  รากต่อยอด (Figure 5B, 5C) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wakhlu and Sharma (1999) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดของ *H. candicans* Wall. บนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้เกิดรากเฉลี่ยร้อยละ 100 และมี

จำนวนรากสูงสุด และอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ ทำให้ยอดมะแหลบมีความยาวรากมากที่สุด 2.57±0.45 เซนติเมตร (Table 2, Figure 5A) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jan *et al.* (2018) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *H. candicans* บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ทุกสูตรอาหารที่ศึกษาสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของยอดมะแหลบ ยกเว้นอาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส (Table 3, Figure 8A, 9A, 10A) สูตรอาหาร WPM ที่เติม NAA เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุด 2.43±0.13 เซนติเมตร (Table 3, Figure 9E) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารองของ Zaman *et al.* (2016) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์มะแหลบ (UMBELLIFERAE) บนอาหารสูตร WPM ที่มีการเติมสารออกซินจะสร้างแคลลัสได้ดีกว่าสูตรอาหาร MS

Table 2. Root number and length of *H. siamicum* Craib. induced from culturing shoot tip on MS and WPM supplemented with IBA, NAA and IAA at different concentrations for 45 days

Media	Root induction (%)	Root number ± SE (roots/shoot)	Root length ± SE (cm)
MS	90	3.90 ± 0.09 fghi	2.57 ± 0.45 a
MS + 1 mg/L IBA	90	15.65 ± 2.06 a	1.81 ± 0.29 b
MS + 2 mg/L IBA	95	13.60 ± 1.68 ab	1.11 ± 0.10 cd
MS + 4 mg/L IBA	95	11.05 ± 1.59 bcd	1.06 ± 0.07 cd
MS + 8 mg/L IBA	90	11.35 ± 1.92 bcd	0.93 ± 0.10 cd
MS + 1 mg/L NAA	90	9.95 ± 1.33 bcde	1.84 ± 0.44 b
MS + 2 mg/L NAA	90	11.70 ± 1.69 abc	0.90 ± 0.10 cd
MS + 4 mg/L NAA	65	6.25 ± 1.43 efgh	0.55 ± 0.12 cd
MS + 8 mg/L NAA	60	10.75 ± 2.32 bcde	0.46 ± 0.10 d
MS + 1 mg/L IAA	60	3.90 ± 0.96f ghi	0.95 ± 0.23 cd
MS + 2 mg/L IAA	60	3.30 ± 0.85 ghi	0.49 ± 0.15 d
MS + 4 mg/L IAA	80	5.35 ± 1.18 fghi	0.94 ± 0.15 cd
MS + 8 mg/L IAA	70	6.80 ± 1.94 defgh	0.65 ± 0.12 cd
WPM	85	3.05 ± 0.59 ghi	1.92 ± 0.24 b
WPM + 1 mg/L IBA	70	4.05 ± 0.80 fghi	1.12 ± 0.23 cd
WPM + 2 mg/L IBA	55	2.50 ± 0.94 hi	0.67 ± 0.14 cd
WPM + 4 mg/L IBA	50	3.75 ± 0.92 fghi	0.50 ± 0.13 d
WPM + 8 mg/L IBA	50	1.05 ± 0.28 i	0.69 ± 0.18 cd
WPM + 1 mg/L NAA	100	7.70 ± 1.05 cdefg	0.64 ± 0.07 cd
WPM + 2 mg/L NAA	80	8.39 ± 2.22 cdef	1.21 ± 0.18 c
WPM + 4 mg/L NAA	60	3.95 ± 0.92 fghi	1.01 ± 0.28 cd
WPM + 8 mg/L NAA	90	4.20 ± 0.70 fghi	0.71 ± 0.08 cd
WPM + 1 mg/L IAA	50	3.30 ± 0.94 ghi	0.84 ± 0.23 cd
WPM + 2 mg/L IAA	80	4.25 ± 0.93 fghi	0.67 ± 0.18 cd
WPM + 4 mg/L IAA	100	7.10 ± 1.32 defgh	1.11 ± 0.10 cd
WPM + 8 mg/L IAA	90	10.80 ± 2.19 bcde	0.78 ± 0.10 cd

Means within the same column followed by different letters are significantly different at  $P < 0.05$  by DMRT

Table 3. Percentage of callus induction and callus diameter of *H. siamicum* Craib. induced from culturing shoot tip on MS and WPM supplemented with IBA, NAA and IAA at different concentrations for 45 days

Media	Callus induction $\pm$ SE (callus/shoot)	Callus diameter $\pm$ SE (cm)
MS	20	0.10 $\pm$ 0.05 kl
MS + 1 mg/L IBA	100	1.14 $\pm$ 0.07 de
MS + 2 mg/L IBA	100	1.05 $\pm$ 0.07 def
MS + 4 mg/L IBA	100	0.98 $\pm$ 0.08 def
MS + 8 mg/L IBA	100	0.91 $\pm$ 0.06 efgh
MS + 1 mg/L NAA	100	0.95 $\pm$ 0.05 efg
MS + 2 mg/L NAA	100	1.05 $\pm$ 0.04 def
MS + 4 mg/L NAA	100	0.98 $\pm$ 0.07 def
MS + 8 mg/L NAA	90	0.86 $\pm$ 0.09 efgh
MS + 1 mg/L IAA	30	0.42 $\pm$ 0.16 ijk
MS + 2 mg/L IAA	30	0.25 $\pm$ 0.09 jkl
MS + 4 mg/L IAA	80	1.11 $\pm$ 0.19 def
MS + 8 mg/L IAA	100	1.08 $\pm$ 0.15 def
WPM	0	0.00 $\pm$ 0.00 l
WPM + 1 mg/L IBA	80	0.98 $\pm$ 0.15 def
WPM + 2 mg/L IBA	90	0.77 $\pm$ 0.11 efghi
WPM + 4 mg/L IBA	90	0.72 $\pm$ 0.10 fghi
WPM + 8 mg/L IBA	80	0.58 $\pm$ 0.08 ghij
WPM + 1 mg/L NAA	100	2.05 $\pm$ 0.17 b
WPM + 2 mg/L NAA	100	1.96 $\pm$ 0.19 b
WPM + 4 mg/L NAA	90	1.07 $\pm$ 0.16 def
WPM + 8 mg/L NAA	100	2.43 $\pm$ 0.13 a
WPM + 1 mg/L IAA	40	0.54 $\pm$ 0.16 hij
WPM + 2 mg/L IAA	40	0.30 $\pm$ 0.09 jkl
WPM + 4 mg/L IAA	100	1.52 $\pm$ 0.15 c
WPM + 8 mg/L IAA	100	1.37 $\pm$ 0.17 cd

Means within the same column followed by different letters are significantly different at  $P < 0.05$  by DMRT

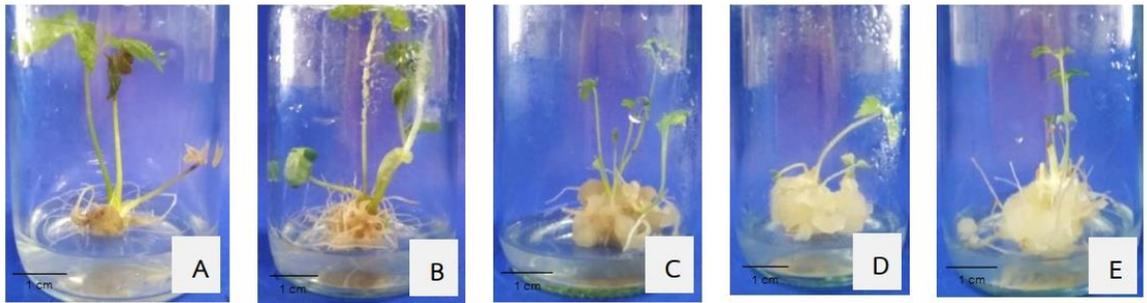


Figure 5. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L IBA for 45 days (A – E, respectively)

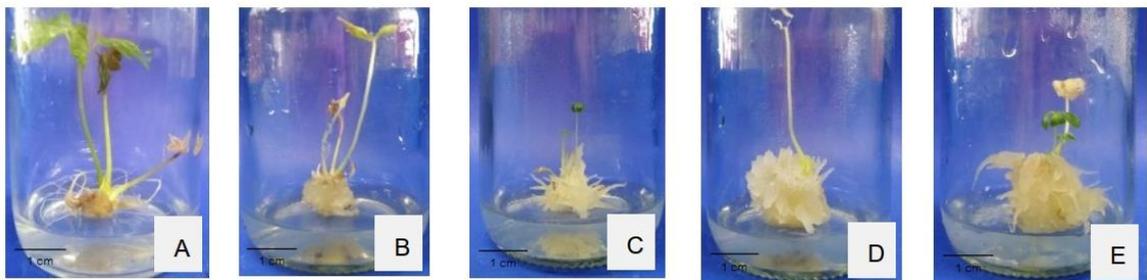


Figure 6. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L NAA for 45 days (A – E, respectively)

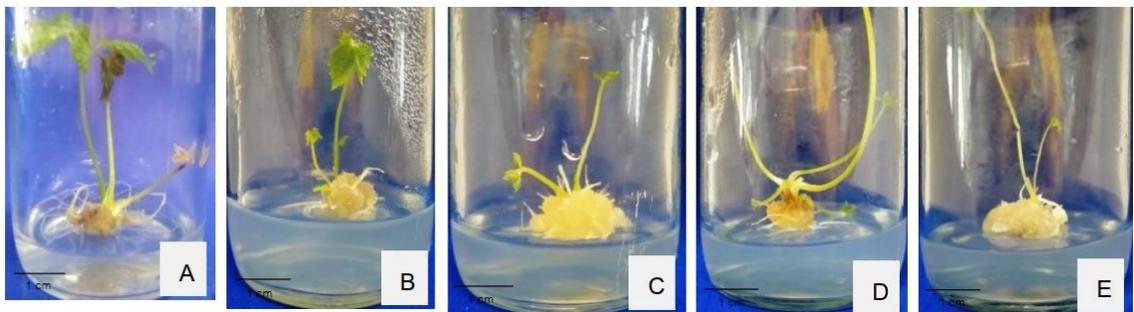


Figure 7. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L IAA for 45 days (A – E, respectively)

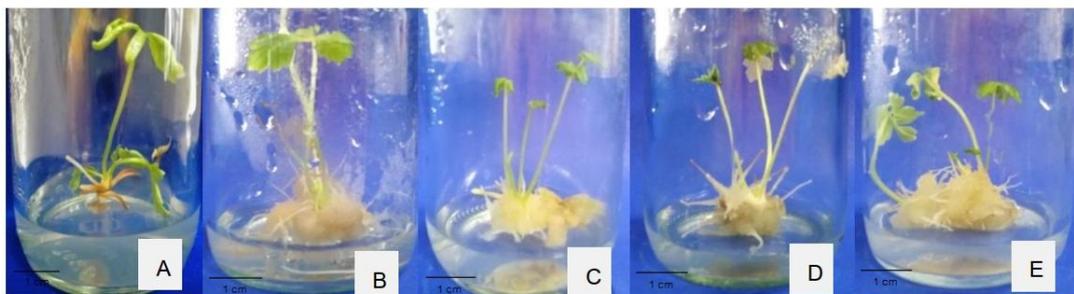


Figure 8. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L IBA for 45 days (A – E, respectively)

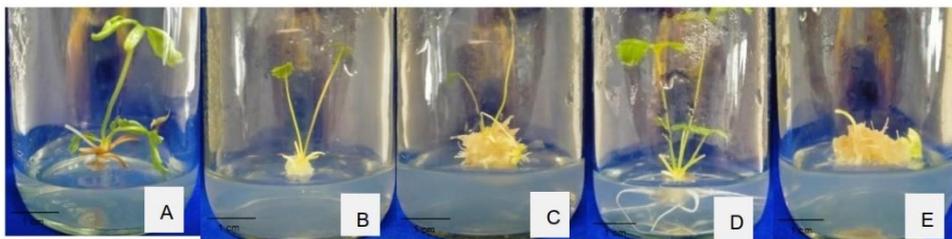


Figure 9. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L NAA for 45 days (A – E, respectively)

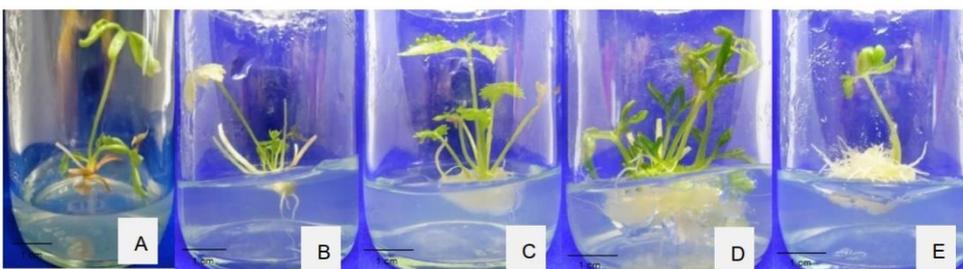


Figure 10. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L IAA for 45 days (A – E, respectively)



Figure 11. Survival of *H. siamicum* Craib. plant after 30 days of transplanting to pot containing mixture of vermiculite : perlite : peat at ratio of 1:1:1 under green house condition

Table 4. Average of survival percentage, plantlet height, root number, and root length of *H. siamicum* Craib. after transplantation under green-house condition for 30 days

Planting material	Survival percentage	Plantlet height (cm)	Number of roots (roots/plantlet)	Root length (cm)
Vermiculite	0	N/A	N/A	N/A
Perlite	0	N/A	N/A	N/A
Peat	0	N/A	N/A	N/A
Vermiculite : Perlite : Peat	50	3.5	5	4.2

N/A = No plant growth was observed

## การย้ายปลูกและอนุบาลต้นอ่อนมะແหลบในโรงเรือนเพาะชำ

เมื่อนำต้นอ่อนมะແหลบที่มีทั้งรากและยอดที่ได้จากสูตรอาหาร MS เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ขนาดความสูงเริ่มต้น 2 เซนติเมตร ย้ายออกไปปลูกในวัสดุ 4 ชนิด คือ vermiculite, perlite, peat และวัสดุผสม vermiculite : perlite : peat ที่อัตราส่วน 1:1:1 ในสภาพโรงเรือน เป็นเวลานาน 30 วัน พบว่าการปลูกต้นอ่อนมะແหลบในวัสดุผสม vermiculite : perlite : peat เท่านั้นที่มีการรอดชีวิตร้อยละ 50 และหลังจากปลูกได้ 30 วัน พบว่าต้นมะແหลบมีความสูง 3.5 เซนติเมตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 5 ราก และมีความยาวรากเฉลี่ย 4.2 เซนติเมตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากวัสดุปลูกผสมนี้มีคุณสมบัติที่ดูดซับน้ำและอุ้มน้ำได้ และสามารถดูดซับธาตุอาหารแล้วค่อย ๆ ปลดปล่อยยให้ในภายหลัง จึงช่วยให้ต้นอ่อนมะແหลบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการรอดชีวิตและมีการเจริญเติบโตดีกว่าวัสดุแบบอื่น ๆ แต่งานวิจัยของ Zou *et al.* (2019) ได้รายงานว่าการย้ายปลูกต้นอ่อนของ *H. scabridum* จากสูตรอาหาร MS เติม IBA เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวัสดุผสม peat : vermiculite ที่อัตราส่วน 3:1 มีการรอดชีวิตร้อยละ 95

## สรุป

การเพาะเลี้ยงปลายยอดมะແหลบบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณจำนวนยอดมะແหลบได้  $5.55 \pm 0.87$  ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ซึ่งสูงกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ ยกเว้นอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้มะແหลบมีความยาวยอดสูงกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ คือ  $6.80 \pm 0.42$  และ  $7.21 \pm 0.35$  เซนติเมตร ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงยอดมะແหลบบนอาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ยร้อยละ 90 มีจำนวนรากสูงกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ คือ  $15.65 \pm 2.06$  รากต่อยอด สูตรอาหาร MS

เติม IBA ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำให้ยอดมะແหลบมีความยาวรากมากที่สุด คือ  $2.57 \pm 0.45$  เซนติเมตร ทุกสูตรอาหารที่ศึกษาสามารถชักนำให้ยอดมะແหลบเกิดแคลลัสได้ ยกเว้นอาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงยอดมะແหลบบนอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด คือ  $2.43 \pm 0.13$  เซนติเมตร เมื่อนำต้นมะແหลบที่มีทั้งรากและยอดไปย้ายปลูกในวัสดุผสม vermiculite : perlite : peat ที่อัตราส่วน 1:1:1 ต้นมะແหลบมีการรอดชีวิตร้อยละ 50 และมีความสูง 3.5 เซนติเมตร หลังการปลูกได้ 30 วัน

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ที่ให้การสนับสนุนและการอนุเคราะห์ในด้านเครื่องมืออุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษาวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Bahadori, M.B., L. Dinparast and G. Zengin. 2016. The Genus *Heracleum*: A comprehensive review on its phytochemistry, pharmacology, and ethnobotanical values as a useful herb. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(6): 1018-1039.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple Range and Multiple F-Test. *Biometrics* 11: 1-5.
- Iskan, G., T. Ozek, A. Duran and K.H.C. Baser. 2004. Essential oils of tree species of *Heracleum anticandidal* activity. *Chemistry of Natural Compounds* 40(6): 544-547.

- Jan, M., S., Singh, F., Maqbool and I.A. Nawchoo. 2019. Effect of explant source and different hormonal combinations on *in vitro* regeneration of *Heracleum candicans* Wall: An important medicinal herb. African Journal of Biotechnology 18(28): 707-712.
- Kuljanabhadgavad, T., N. Sriubolmas and N. Ruangrunsi. 2011. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Heracleum siamicum* Craib. Pharmaceutical Chemistry Journal 45(3): 178-182.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.
- Samphunphuang, C., W. Somprasong and P. Sangkasa-ad. 2014. Study botanical characteristics to record characteristics for plant variety protection under the Plant Variety Protection Act B.E. 2542. Final Report. Department of Agriculture. Bangkok.39 p. (in Thai)
- Wakhlu, A.K. and R.K. Sharma. 1999. Micropropagation of *Heracleum candicans* wall: A rare medicinal herb. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 35: 79-81.
- Wattanawikkit, P., A. Meeburut and P. Srisamatthakarn. 2018. *In vitro* propagation of *Zanthoxylum limonella* Alston. The Agricultural Science Journal, 49(Suppl. 1): 152-154. (in Thai)
- Xia, G., Z. Li and H. Chen. 1993. Plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Heracleum moellendorffii*. Journal of Integrative Plant Biology 35(9): 730-732.
- Zaman, M.A.K, A.M. Azzeme, I.K. Ramle, N. Normanshah, S.N. Ramli, N.A. Shaharuddin, S. Ahmad and S.N.A. Abdullah, 2020. Induction, multiplication, and evaluation of antioxidant activity of *Polyalthia bullata* callus, a woody medicinal plant. Plants, 9(12): 1772.
- Zou, L., J. Hu, M. Luo and Q. Wu. 2019. *In vitro* propagation of the Chinese traditional and medicinal plant *Heracleum scabridum* Franch. Bangladesh Journal of Botany 48(3): 575-581.
-