การขยายพันธุ์มะแหลบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

In Vitro Propagation of Heracleum siamicum Craib

พัชราวดี วัฒนวิกย์กิจ[1] และ ภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ[2*]

Patcharawadee Wattanawikkit[1], and Pattharaporn Srisamatthakarn[2*]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ 10240

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

[2]สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ. ลำปาง 52000

[2]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±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±0.42 and 7.21±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±2.06 roots per shoot and root length of 1.81±0.29 cm. *H. siamicum* Craib. shoot was induced callus formation of 100% and callus diameter of 2.43±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

Copyright @ Journal of Agricultural Research and Communications. All rights reserved.

บทคัดย่อ: มะแหลบ (*H. siamicum* Craib) เป็นพืชสมุนไพรเครื่องเทศที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญมากมาย แต่งานวิจัยด้านการขยายพันธุ์มะแหลบโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีค่อนข้างน้อย งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของเนื้อเยื่อมะแหลบ โดยการนำปลายยอดมะแหลบขนาด 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 ซ้ำ เป็นเวลานาน 45 วัน พบว่า การเติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้ 5.55 ± 0.87 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนสูตรอาหาร MS และ WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น สามารถชักนำให้มะแหลบมีความยาวยอดสูงสุด 6.80±0.42 และ 7.21 ± 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำยอดมะแหลบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (4-Indole-3-yl butyric acid), IAA (Indole-3-acetic acid) และ NAA (α-naphthaleneacetic acid) ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 20 ซ้ำ เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงเฉลี่ยร้อยละ 90 มีจำนวนรากสูง 15.65 ± 2.06 รากต่อยอด และมีความยาวราก 1.81 ± 0.29 เซนติเมตร เนื้อเยื่อมะแหลบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เฉลี่ยร้อยละ 100 และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.43 ± 0.13 เซนติเมตร เมื่อนำต้นมะแหลบที่มีทั้งรากและยอดไปย้ายปลูกในวัสดุปลูกที่ต่างกัน 4 ชนิด คือ vermiculite, perlite, peat และวัสดุผสมระหว่าง vermiculite : perlite : peat ที่อัตราส่วน 1:1:1 เป็นเวลา 30 วัน ในสภาพโรงเรือน พบว่าวัสดุผสม vermiculite : perlite : peat ส่งผลให้ต้นมะแหลบมีการรอดชีวิตร้อยละ 50 มีความสูง 3.5 เซนติเมตร

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มะแหลบ สารควบคุมการเจริญเติบโต

คำนำ

มะแหลบ เป็นพืชพื้นเมืองและเป็นพืชเศรษฐกิจท้องถิ่นที่พบมากทางภาคเหนือของไทย เช่น จังหวัดน่าน พะเยา แพร่ เชียงราย ลำปาง แม่ฮ่องสอน และเชียงใหม่ เป็นต้น ผลมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีรสขมและเผ็ดเล็กน้อย จึงใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงแต่งรสอาหารพื้นเมืองภาคเหนือ นิยมใส่ในน้ำพริกลาบหรือเครื่องลาบ เพื่อปรุงแต่งกลิ่นรสและดับกลิ่นคาวของเนื้อสัตว์ (Samphunphuang *et al*., 2014) อีกทั้งพืชสกุลมะแหลบ (*Heracleum*) มีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ (Bahadori *et al*., 2016; Iscan *et al*., 2004; Kuljanabhagavad *et al*., 2011) ปัจจุบันความต้องการมะแหลบเพิ่มขึ้นมาก ส่งผลให้ราคาเพิ่มสูงขึ้นถึง 1,000-1,200 บาทต่อกิโลกรัม แต่ปริมาณผลผลิตมะแหลบมีค่อนข้างน้อย เนื่องจากการบุกรุกเผา จึงมีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด แต่ได้ผลผลิตช้า ดังนั้นการขยายพันธุ์มะแหลบโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นวิธีการขยายพันธุ์อีกวิธีหนึ่งที่เพิ่มผลผลิตที่เร็วขึ้น 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±2.94 ยอดต่อชิ้นส่วนยอด การเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้สร้างรากเป็นจำนวนมากเฉลี่ยร้อยละ 100 มีจำนวนรากสูงสุด 5.9 ± 2.1 รากต่อยอด และเมื่อย้ายปลูกบนดิน ร่วนพบว่าต้นพืชมีลักษณะทางสัณฐาน รูปร่าง และเซลล์ เหมือนต้นแม่พันธุ์ทุกประการ Zou *et al*., (2019)

ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปลายยอดและก้านใบของ *H. scabridum* บนอาหาร MS เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม Zinc (Zn) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลายยอดเกิดจำนวนยอดได้สูงสุด 27.25 ± 4.19 ยอดต่อชิ้นส่วนปลายยอด และชักนำให้ก้านใบเกิดยอดได้ 18.23 ± 2.12 ยอดต่อใบ ปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้ร้อยละ 94.4 มีจำนวนยอด 7.12 ± 1.23 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนราก และความยาวรากได้สูงสุดเท่ากับ 20.73 ± 4.86 รากต่อยอด และ 6.1 ± 1.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อย้ายต้นอ่อนปลูกลงในวัสดุผสม peat : vermiculite ในอัตราส่วน 3:1 มีการรอดชีวิตร้อยละ 95 ต่อมา Jan *et al*. (2019) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบของ *H. candicans* Wall บนอาหาร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ยร้อยละ 100 เกิดจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด 15.2 ± 0.6 ยอดต่อชิ้นส่วน 7.6 ± 0.2 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงเฉลี่ยร้อยละ 90 และมีจำนวนรากเฉลี่ย 6.9 รากต่อยอด และมีความยาวราก 1.81 ± 0.29 เซนติเมตร มีการรายงานของ Xia *et al*. (1993) พบว่าการขยายพันธุ์พืชสกุลมะแหลบ *H. moellendorffi* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อลำต้น (stem node) บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ส่วนของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS และ N6 ที่เติมอะกาโรส ร้อยละ 0.3 ส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์จำนวนมาก เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.2 โมลาร์ ทำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการพัฒนาเป็นเอมบริโอและต้นอ่อนเกิดขึ้น

การขยายพันธุ์มะแหลบโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย แต่มีการศึกษาในพืชสมุนไพรอื่น ดังรายงานของ Wattanawikkit *et al*. (2018) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตายอดของมะแขว่นบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดมะแขว่นได้มากที่สุด และสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญให้ความยาวยอดสูงสุด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์มะแหลบได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น ช่วยอนุรักษ์พันธุกรรมพืชพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาสูง และเป็นพืชเศรษฐกิจชุมชนไม่ให้สูญหายไปจากประเทศไทย และเพียงพอกับความต้องการของตลาด

อุปกรณ์และวิธีการ

การพัฒนาเทคนิคขยายพันธุ์มะแหลบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนเพาะชำ สถาบันเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาในระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2563

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของเนื้อเยื่อมะแหลบ

นำเมล็ดมะแหลบจากแหล่งปลูกในจังหวัดลำปาง มาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้นร้อยละ 30 เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเมล็ดมะแหลบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ไปเพาะลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 45 วัน จากนั้นตัดชิ้นส่วนปลายยอดมะแหลบขนาด 1 เซนติเมตร ไปทำการเพิ่มจำนวนยอดโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร WPM ที่เติม BAP และ TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ได้รับแสงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 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 ชิ้นส่วน บันทึกจำนวนยอด และความยาวยอด

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

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากจากปลายยอดมะแหลบ

นำส่วนปลายยอดของมะแหลบขนาด 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 ชิ้นส่วน บันทึกจำนวนการเกิดราก และวัดความยาวรากเปรียบเทียบกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Duncan, 1955)

การย้ายปลูกและอนุบาลต้นอ่อนในโรงเรือนเพาะชำ

นำขวดเพาะเลี้ยงยอดมะแหลบที่ออกรากดีแล้ว คลายเกลียวฝาขวดเล็กน้อย แล้วนำไปปรับสภาพอุณหภูมิและความชื้นภายนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 สัปดาห์ แล้วนำต้นอ่อนมะแหลบจากสูตรอาหารที่มีจำนวนรากสูงสุด ขนาดความสูงเริ่มต้น 2 เซนติเมตร ออกจากขวด ล้างวุ้นให้สะอาด แช่สารป้องกันและกำจัดเชื้อรา 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 บันทึกความสูงต้น จำนวนราก ความยาวราก และร้อยละการรอดชีวิต

ผลการศึกษาและวิจารณ์

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของเนื้อเยื่อมะแหลบ

เมื่อนำเนื้อเยื่อปลายยอดมะแหลบขนาด 1 เซนติเมตรที่ปลอดเชื้อ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร WPM ที่เติม BAP และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอด พบว่าเนื้อเยื่อของมะแหลบมีลักษณะการเกิดยอดที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เติม โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้สูง 5.55 ± 0.87 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (Table 1, Figure 1C) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jan *et al*. (2019) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลมะแหลบ *H. candicans* Wall บนอาหาร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้สูงสุด อย่างไรก็ตาม การเกิดจำนวนยอดไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P > 0.05$) กับผลของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะแหลบบนอาหารสูตร 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) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะแหลบบนสูตรอาหาร MS และ WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวยอดมากกว่าต้นในกรรมวิธีอื่นๆ คือ 6.80 ± 0.42 และ 7.21 ±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 ± SE (shoots/explant)	Shoot length (cm) ± SEd
MS	1.00 ± 0.00 e	6.80 ± 0.42 a
MS + 1 mg/L BAP	2.60 ± 0.41 bcde	4.53 ± 0.43 cdef
MS + 2 mg/L BAP	5.55 ± 0.87 a	5.15 ± 0.31 bcd
MS + 4 mg/L BAP	2.85 ± 0.44 bcd	3.86 ± 0.29 ef
MS + 8 mg/L BAP	3.50 ± 0.48 bc	4.08 ± 0.39 def
MS + 1 mg/L TDZ	4.25 ± 0.86 ab	4.65 ± 0.31 cdef
MS + 2 mg/L TDZ	3.95 ± 0.73 bc	5.18 ± 0.39 bcd
MS + 4 mg/L TDZ	3.90 ± 0.78 bc	4.85 ± 0.57 cde
MS + 8 mg/L TDZ	4.20 ± 0.66 ab	3.80 ± 0.34 ef
WPM	1.00 ± 0.00 e	7.21 ± 0.35 a
WPM + 1 mg/L BAP	1.60 ± 0.15 de	6.30 ± 0.35 ab
WPM + 2 mg/L BAP	1.85 ± 0.22 de	6.18 ± 0.36 ab
WPM + 4 mg/L BAP	2.60 ± 0.30 bcde	5.62 ± 0.28 bc
WPM + 8 mg/L BAP	3.25 ± 0.43 bcd	4.34 ± 0.28 def
WPM + 1 mg/L TDZ	2.90 ± 0.60 bcd	4.64 ± 0.61 cdef
WPM + 2 mg/L TDZ	1.75 ± 0.18 de	3.53 ± 0.42 fg
WPM + 4 mg/L TDZ	2.35 ± 0.36 cde	2.68 ± 0.27 gh
WPM + 8 mg/L TDZ	1.75 ± 0.19 de	2.11 ± 0.22 h

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

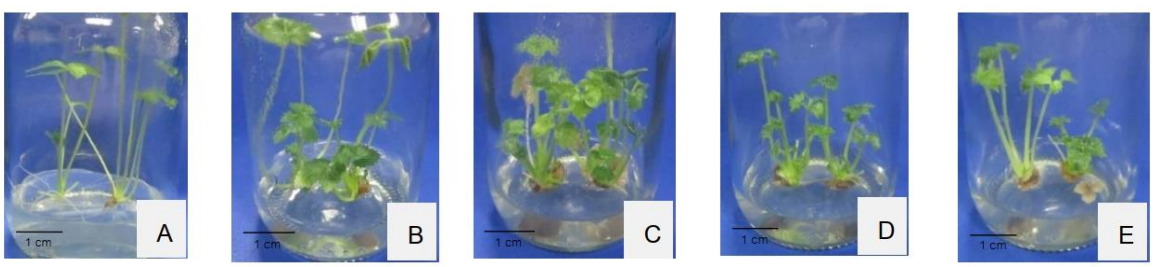


Figure 1. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L BAP for 45 days (A – E, respectively)

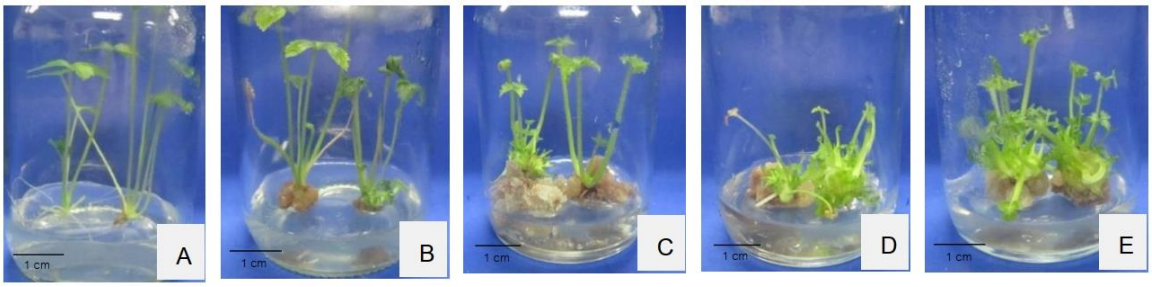


Figure 2. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L TDZ for 45 days (A – E, respectively)

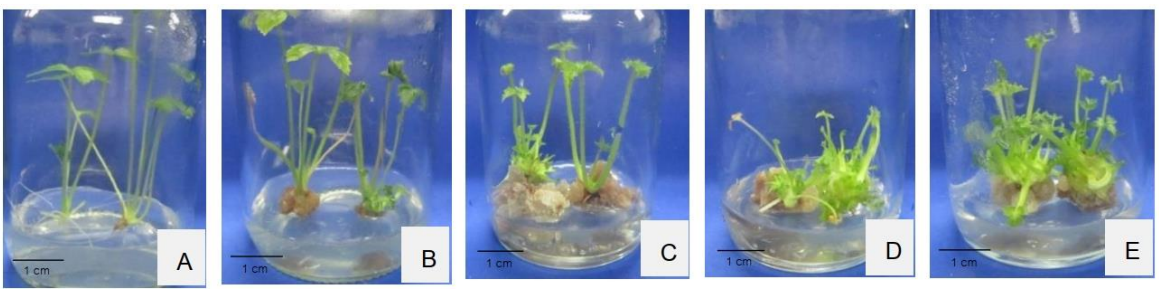


Figure 3. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L BAP for 45 days (A – E, respectively)

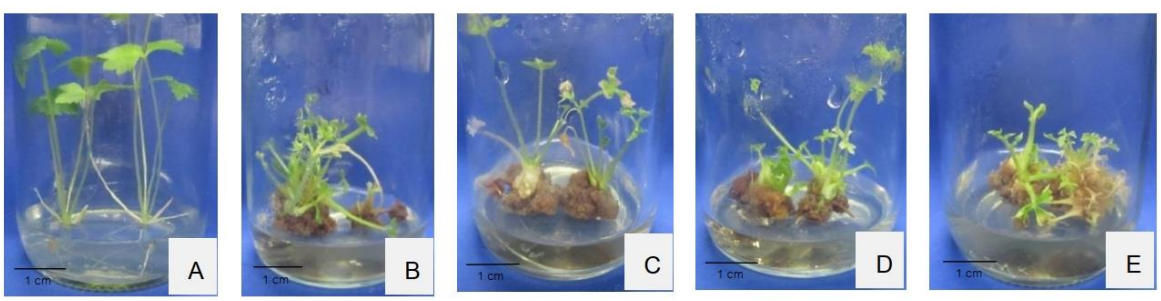


Figure 4. Multiple shoot formation from culturing shoot tip of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L TDZ for 45 days (A – E, respectively)

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากของยอดมะแหลบ

เมื่อนำส่วนยอดของมะแหลบขนาด 1 เซนติเมตรในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 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 มีผลให้ยอดมะแหลบมีจำนวนรากสูงสุด 15.65±2.06 รากต่อยอด (Figure 5B, 5C) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wakhlu and Sharma (1999) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดของ *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) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *H. candicans* Wall บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ทุกสูตรอาหารที่ศึกษาสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของยอดมะแหลบ ยกเว้นอาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส (Table 3, Figure 8A, 9A, 10A) สูตรอาหาร WPM ที่เติม NAA เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุด 2.43±0.13 เซนติเมตร (Table 3, Figure 9E) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Zaman *et al*. (2016) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์มะแหลบ (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 ± SE (callus/shoot)	Callus diameter ± SE (cm)
MS	20	0.10 ± 0.05 kl
MS + 1 mg/L IBA	100	1.14 ± 0.07 de
MS + 2 mg/L IBA	100	1.05 ± 0.07 def
MS + 4 mg/L IBA	100	0.98 ± 0.08 def
MS + 8 mg/L IBA	100	0.91 ± 0.06 efgh
MS + 1 mg/L NAA	100	0.95 ± 0.05 efg
MS + 2 mg/L NAA	100	1.05 ± 0.04 def
MS + 4 mg/L NAA	100	0.98 ± 0.07 def
MS + 8 mg/L NAA	90	0.86 ± 0.09 efgh
MS + 1 mg/L IAA	30	0.42 ± 0.16 ijk
MS + 2 mg/L IAA	30	0.25 ± 0.09 jkl
MS + 4 mg/L IAA	80	1.11 ± 0.19 def
MS + 8 mg/L IAA	100	1.08 ± 0.15 def
WPM	0	0.00 ± 0.00 l
WPM + 1 mg/L IBA	80	0.98 ± 0.15 def
WPM + 2 mg/L IBA	90	0.77 ± 0.11 efghi
WPM + 4 mg/L IBA	90	0.72 ± 0.10 fghi
WPM + 8 mg/L IBA	80	0.58 ± 0.08 ghij
WPM + 1 mg/L NAA	100	2.05 ± 0.17 b
WPM + 2 mg/L NAA	100	1.96 ± 0.19 b
WPM + 4 mg/L NAA	90	1.07 ± 0.16 def
WPM + 8 mg/L NAA	100	2.43 ± 0.13 a
WPM + 1 mg/L IAA	40	0.54 ± 0.16 hij
WPM + 2 mg/L IAA	40	0.30 ± 0.09 jkl
WPM + 4 mg/L IAA	100	1.52 ± 0.15 c
WPM + 8 mg/L IAA	100	1.37 ± 0.17 cd

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

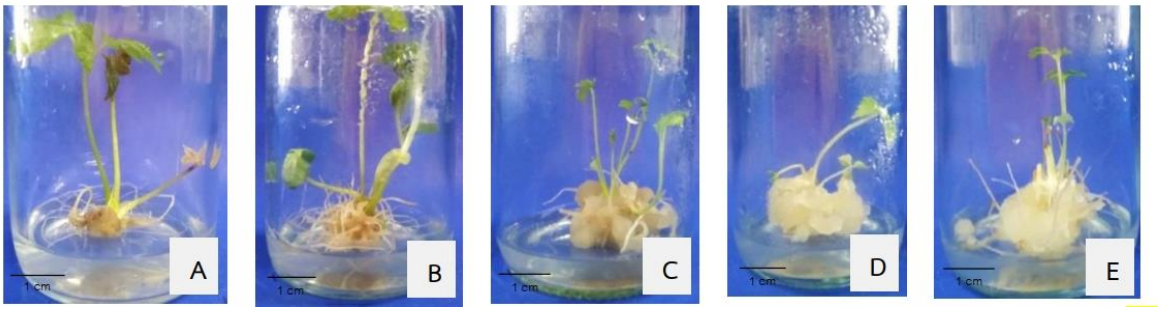


Figure 5. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L IBA for 45 days (A – E, respectively)

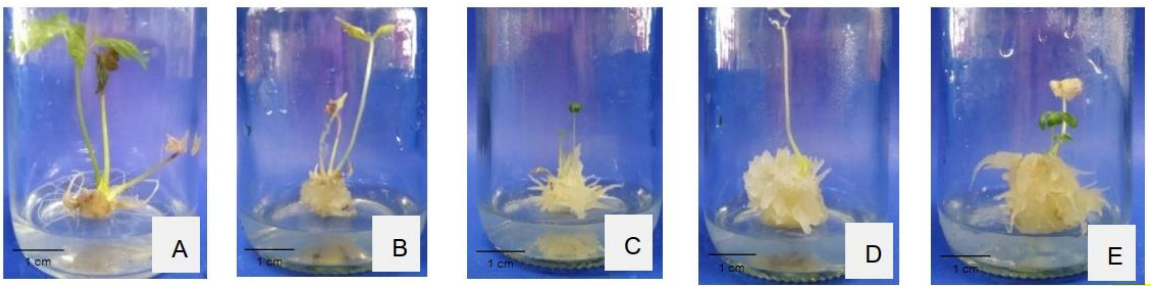


Figure 6. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L NAA for 45 days (A – E, respectively)

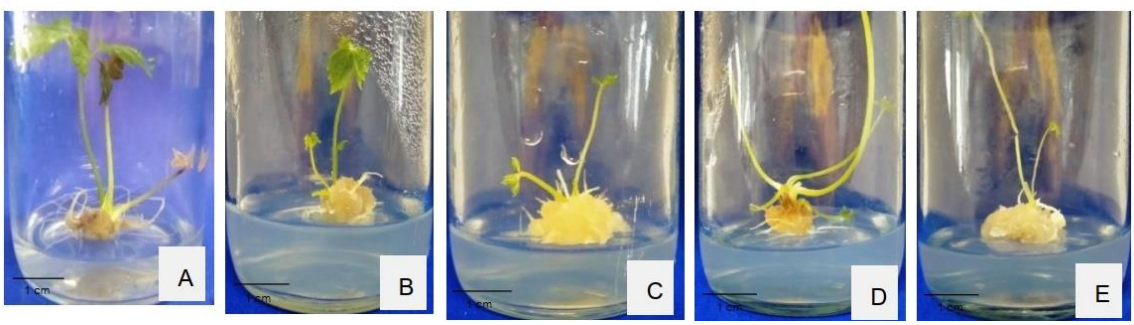


Figure 7. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on MS medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L IAA for 45 days (A – E, respectively)

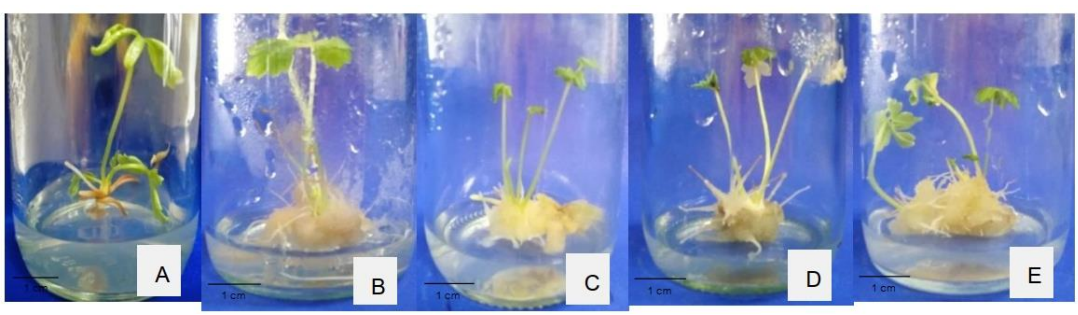


Figure 8. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0,1, 2, 4 and 8 mg/L IBA for 45 days (A – E, respectively)

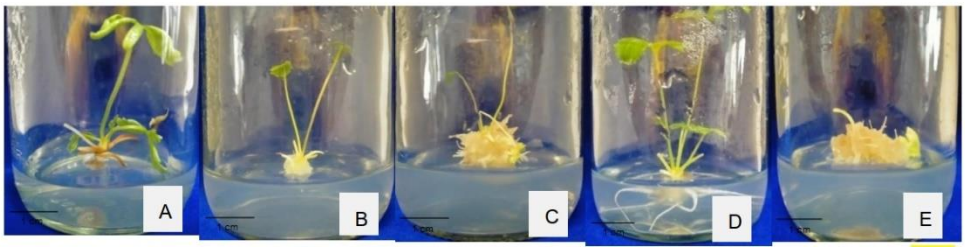


Figure 9. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L NAA for 45 days (A – E, respectively)

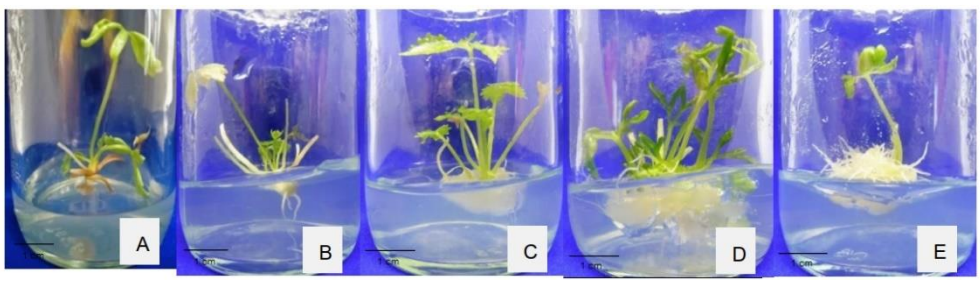


Figure 10. Root and callus development of *H. siamicum* Craib. on WPM medium added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg/L IAA for 45 days (A – E, respectively)



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

การย้ายปลูกและอนุบาลต้นอ่อนมะแหลบในโรงเรือนเพาะชำ

เมื่อนำต้นอ่อนมะแหลบที่มีทั้งรากและยอดที่ได้จากสูตรอาหาร 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 พบว่าการปลูกต้นอ่อนมะแหลบในวัสดุผสม vermiculite : perlite : peat เท่านั้นที่มีการรอดชีวิตร้อยละ 50 และหลังจากปลูกได้ 30 วัน พบว่าต้นมะแหลบมีความสูง 3.5 เซนติเมตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 5 ราก และมีความยาวรากเฉลี่ย 4.2 เซนติเมตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากวัสดุปลูกผสมนี้มีคุณสมบัติที่ดูดซับน้ำและอุ้มน้ำได้ และสามารถดูดซับธาตุอาหารแล้วค่อย ๆ ปลดปล่อยให้ในภายหลัง จึงช่วยให้ต้นอ่อนมะแหลบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 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

การเพาะเลี้ยงปลายยอดมะแหลบบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณจำนวนยอดมะแหลบได้ 5.55±0.87 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ซึ่งสูงกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ ยกเว้นอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้มะแหลบมีความยาวยอดสูงกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ คือ 6.80±0.42 และ 7.21±0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงยอดมะแหลบบนอาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ยร้อยละ 90 มีจำนวนรากสูงกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ คือ 15.65 ± 2.06 รากต่อยอด สูตรอาหาร MS เติม IBA ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำให้ยอดมะแหลบมีความยาวรากมากที่สุด คือ 2.57 ± 0.45 เซนติเมตร ทุกสูตรอาหารที่ศึกษาสามารถชักนำให้ยอดมะแหลบเกิดแคลลัสได้ ยกเว้นอาหารสูตร WPM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงยอดมะแหลบบนอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด คือ 2.43 ± 0.13 เซนติเมตร เมื่อนำต้นมะแหลบที่มีทั้งรากและยอดไปย้ายปลูกในวัสดุผสม vermiculite : perlite : peat ที่อัตราส่วน 1:1:1 ต้นมะแหลบมีการรอดชีวิตร้อยละ 50 และมีความสูง 3.5 เซนติเมตร หลังการปลูกได้ 30 วัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี 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.

Iscan, 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.

Kuljanabhagavad, T., N. Sriubolmas and N. Ruangrungsi. 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. Phisiologia 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.