Research Article

Received: November 16, 2018; Accepted: December 3, 2018

การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกระเทียมน้ำ (*Isoetes coromandelina* L.f.) : ไลโคไฟต์หายากของประเทศไทย

In vitro Propagation of *Isoetes coromandelina* L.f.: Rare Lycophyte Species of Thailand

ศรัณย์พร ล่องชูผล, อารยา อาจเจริญ เทียนหอม

และทัศไนย จารุวัฒนพันธ์*

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Sarunporn Longchuphon, Araya Arjcharoen Theanhom

and Tassanai Jaruwattanaphan*

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University,

Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์กระเทียมน้ำซึ่งเป็นพืชที่ถูกคุกคามเนื่องจากการทำลายถิ่นที่อยู่อาศัยในประเทศไทย โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการนำส่วนคล้ายคอร์ม (corm-like) มาฟอกกำจัดเชื้อด้วยคลอรอกซ์ (Clorox®) เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) และสารปฏิชีวนะเตตระไซคลิน (tetracycline) พบว่าการฟอกกำจัดเชื้อด้วยสารปฏิชีวนะเตตระไซคลิน 250 ppm นาน 20 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นาน 15 นาที และเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นาน 10 นาที ทำให้ส่วนคล้ายคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด (55.56 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำชิ้นส่วนคล้ายคอร์มที่ฟอกกำจัดเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายส่วนคล้ายคอร์มที่ปลอดเชื้อลงอาหารที่เติมสาร 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าชิ้นส่วนคล้ายคอร์มที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด (75 เปอร์เซ็นต์) และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และเมื่อนำชิ้นส่วนคล้ายคอร์มที่ปลอดเชื้อเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าส่วนคล้ายคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BA มีความยาวใบมากที่สุด ขณะที่ส่วนคล้ายคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** fagrtnj@ku.ac.th

คำสำคัญ : พืชคล้ายเฟิร์น; กระเทียมน้ำ; สภาพปลอดเชื้อ

Abstract

A micropropagation protocol was developed for *Isoetes coromandelina*, a species threatened due to habitat destruction in Thailand. Corm-like explants were surface sterilized with Clorox®, mercuric chloride ($HgCl_2$) and antibiotic drug (tetracycline). The result showed that using 250 ppm tetracycline for 20 minutes followed by 10 % (v/v) Clorox® for 15 minutes and 0.2 % (w/v) $HgCl_2$ for 10 minutes resulted in the highest survival percentage (55.56 %). The corm-like explants were cultured in ½ MS for 4 weeks and cultured on ½ MS containing with 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) to induce callus. The result showed that the treatment group using 0.5 mg/L 2,4-D had the highest survival percentage (75 %) and callus was induced. The cleaned corm-like explants were cultured on ½ MS containing 0, 0.5 and 1 mg/L BA, and 0, 0.5 and 1 mg/L NAA for 8 weeks. The result showed that the explants cultured on medium without BA had the longest leaves while the highest number of roots occurred on medium supplemented with 1.0 mg/L NAA.

Keywords: lycophyte; quillwort; micropropagation

1. บทนำ

กระเทียมน้ำ (*Isöetes* L.) หรือ quillworts เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์กระเทียมน้ำ (Isöetaceae) จัดเป็นพืชในกลุ่มพืชคล้ายเฟิร์น (fern allies) หรือไลโคไฟต์ (lycophyte) ซึ่งประกอบด้วยพืชอีก 2 วงศ์ คือ วงศ์กนกนารี (Selaginellaceae) และวงศ์สร้อยนางกรอง (Lycopodiaceae) ซึ่งพืชในกลุ่มไลโคไฟต์เป็นพืชมีท่อลำเลียงที่สืบพันธุ์โดยใช้สปอร์เช่นเดียวกับพืชกลุ่มเฟิร์นหรือโมนิโลไฟต์ (monilophyte) โดยเรียกพืชมีท่อลำเลียงที่สืบพันธุ์ด้วยสปอร์ทั้ง 2 กลุ่ม นี้ว่าเทอริโดไฟต์ (pteridophyte) พืชในวงศ์กระเทียมน้ำมีสมาชิกเพียงหนึ่งสกุล (monotypic family) คือ สกุล *Isöetes* [1] มีสมาชิกทั่วโลกประมาณ 200-350 ชนิด [1-4] กระเทียมน้ำเป็นไลโคไฟต์ขนาดเล็ก สร้างสปอร์ 2 รูปแบบ (heterosporous) ลำต้นใต้ดินคล้ายหัวแบบคอร์ม (corm-like หรือ pseudo-corm) ลักษณะเป็นพูสั้น 2-4 พู ซึ่งมีรากที่แตกแบบทวิ (dichotomously branched rootlet) จำนวนมาก ใบมีลักษณะคล้ายหญ้า (grass-like) ค่อนข้างแบน หรือคล้ายทรงกระบอก (terete) เรียงตัวเป็นกระจุกบริเวณโคนลำต้นใต้ดิน โคนใบแผ่ออกทำหน้าที่สร้างอับสปอร์ (microsporangium) ทั้ง 2 ชนิด แยกจากกัน คือ ไมโครสปอร์ (microspore) ทำหน้าที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และเมกะสปอร์ (megaspore) ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย โดยอับสปอร์ของไมโครสปอร์ (microsporangium) เรียงรอบแกนกลางลำต้น ขณะที่อับสปอร์ของเมกะสปอร์ (megasporangium) เรียงตัวอยู่รอบนอก ในประเทศไทยพบกระเทียมน้ำเพียงชนิดเดียว คือ *I. coromandelina* L.f. ซึ่งมีเขตการกระจาย

พันธุ์ตั้งแต่ประเทศอินเดีย ศรีลังกา เวียดนาม อินโดนีเซีย และกัมพูชา [5,6] และการสำรวจการกระจายพันธุ์กระเทียมน้ำในประเทศไทยพบว่ามีกระจายพันธุ์บริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำ นาข้าว และพบบนบกที่มีความชื้นใต้ดินสูง ซึ่งพื้นที่การแพร่กระจายพันธุ์ของกระเทียมน้ำน้อยกว่า 500 ตารางกิโลเมตร จำนวนสมาชิกในกลุ่มประชากรแต่ละกลุ่มมีจำนวนน้อยกว่า 2,500 ต้น และจำนวนกระเทียมน้ำตามธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจากการใช้สารเคมีในการเกษตรและการถมที่เพื่อทำการเกษตรและสิ่งก่อสร้าง เกณฑ์สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature, IUCN) จัดให้กระเทียมน้ำเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย [7] การศึกษาครั้งนี้ทดสอบสารฟอกกำจัดเชื้อและอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการขยายพันธุ์กระเทียมน้ำในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มจำนวนกระเทียมน้ำเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วิธีการฟอกกำจัดเชื้อของกระเทียมน้ำ

รวบรวมกระเทียมน้ำจากอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยเลือกพืชที่มีขนาดหัวใต้ดินประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำมาลอกใบออกจนหมด ตัดรากออก แล้วตัดแต่งส่วนคล้ายคอร์ม โดยตัดส่วนที่สัมผัสกับดินออกให้หมด ล้างด้วยน้ำสบู่และล้างผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที นำไปฟอกด้วยสารกำจัดเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Clorox®, mercuric chloride ($HgCl_2$) และสารปฏิชีวนะ tetracycline (TC-MYCIN®) ตามทรีตเมนต์ที่กำหนด ซึ่งทุกทรีตเมนต์เติมสาร Tween®20 เพื่อลดแรงตึงผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งกำจัดเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ตายออก แล้วเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคล้ายคอร์มบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige และ Skoog ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง (½ MS) [8] เติมน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2500 ลักซ์ ตรวจสอบและบันทึกผลโดยบันทึกการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ (รา และแบคทีเรีย) และจำนวนชิ้นส่วนที่พัฒนายอดได้ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 8 ทรีตเมนต์ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หัว โดยทรีตเมนต์มีดังนี้

2.1.1 ทรีตเมนต์ที่ 1 Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15 นาที) → Clorox® 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (10 นาที)

2.1.2 ทรีตเมนต์ที่ 2 Clorox® 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15 นาที) → Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (10 นาที)

2.1.3 ทรีตเมนต์ที่ 3 Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15 นาที) → $HgCl_2$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (10 นาที)

2.1.4 ทรีตเมนต์ที่ 4 Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15 นาที) → $HgCl_2$ 0.2 (w/v) (10 นาที)

2.1.5 ทรีตเมนต์ที่ 5 tetracycline 250 ppm (20 นาที) → Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15 นาที) → Clorox® 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (10 นาที)

2.1.6 ทรีตเมนต์ที่ 6 tetracycline 250 ppm (20 นาที) → Clorox® 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15 นาที) → Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (10 นาที)

2.1.7 ทรีตเมนต์ที 7 Tetracycline 250 ppm (20 นาที) → Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15 นาที) → $HgCl_2$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (10 นาที)

2.1.8 ทรีตเมนต์ที่ 8 Tetracycline 250 ppm (20 นาที) → Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (15

นาที) → $HgCl_2$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (10 นาที)

2.2 ผลของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

นำส่วนคล้ายคอร์มของกระเทียมน้ำที่ปลอดเชื้อผ่าครึ่งและเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้น บันทึกผลหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น

2.3 ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของกระเทียมน้ำในสภาพปลอดเชื้อ

เพาะเลี้ยงส่วนคล้ายคอร์มของกระเทียมน้ำโดยใช้วิธีการฟอกกำจัดเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 และ subculture เพื่อเพิ่มปริมาณต้นจนได้ต้นที่ปลอดเชื้อปริมาณเพียงพอสำหรับการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกัน 2 ชนิด คือ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร บนอาหาร ½ MS ต่อการชักนำยอดกระเทียมน้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 9 ทรีตเมนต์ โดยแต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 หัว บันทึกผลการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนใบ ความยาวใบ (โดยวัดส่วนของใบที่อยู่เหนือส่วนคล้ายคอร์มขึ้นมา 0.5 เซนติเมตร) จำนวนราก และขนาดของส่วนคล้ายคอร์ม โดย ขนาดของส่วนคล้ายคอร์ม = (ความกว้างของส่วนคล้ายคอร์ม + ความยาวของส่วนคล้ายคอร์ม) ÷ 2

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 วิธีการฟอกกำจัดเชื้อของกระเทียมน้ำ

การศึกษาวิธีการฟอกกำจัดชิ้นส่วนคล้ายคอร์มของกระเทียมน้ำด้วยวิธีการฟอกทั้งหมด 8 ทรีตเมนต์ ร่วมกับสารฟอกกำจัดเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่าการฟอกกำจัดเชื้อโดยใช้สารปฏิชีวนะ tetracycline 250 ppm นาน 20 นาทีตามด้วย Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และ $HgCl_2$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ทำให้ได้ส่วนคล้ายคอร์มปลอดเชื้อสูงที่สุด (55.56 เปอร์เซ็นต์) แต่เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น เมื่อฟอกกำจัดเชื้อกระเทียมน้ำโดยใช้ Clorox® เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับสารปฏิชีวนะ tetracycline (ทรีตเมนต์ที่ 1, 2, 5 และ 6) มีการปนเปื้อนที่เกิดจากแบคทีเรียมากที่สุด เนื่องจากการฟอกกำจัดเชื้อกระเทียมน้ำด้วย Clorox® เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเกิดราและแบคทีเรีย ส่วนคล้ายคอร์มของกระเทียมน้ำที่นำมาทดลองเป็นส่วนที่อยู่ใต้ดิน มีพื้นผิวขรุขระ ทำให้มีปริมาณราและแบคทีเรียแทรกอยู่มากกว่าส่วนที่อยู่เหนือดิน [9-12] และเมื่อฟอกกำจัดเชื้อโดยใช้ $HgCl_2$ ร่วมกับ Clorox® และสารปฏิชีวนะ tetracycline (ทรีตเมนต์ที่ 2, 3, 7 และ 8) พบว่าส่วนคล้ายคอร์มมีอัตราการเกิดแบคทีเรียน้อยลง และไม่พบการปนเปื้อนรา (ตารางที่ 1) เนื่องจาก $HgCl_2$ มีความสามารถในการฟอกกำจัดเชื้อที่รุนแรงกว่า Clorox® แต่ขณะเดียวกัน $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้นสูงสามารถทำลายเนื้อเยื่อพืช [13,14] นอกจากนี้ยังพบว่าการฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนพืชโดยใช้ Clorox® ร่วมกับ $HgCl_2$ ให้ผลดีกับพืชน้ำหลายชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวลูกผสมพันธุ์ฉลองขวัญและบัวจงกลณี (*Nymphaea* sp.) โดยนำหัวย่อยมาฟอกกำจัดเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตามด้วย $HgCl_2$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบว่าหัวย่อยปลอดเชื้อและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด [15,16] การทดสอบการฟอกกำจัดเชื้อในการเพาะ

เลี้ยงเนื้อเยื่อใบพาย (*Cryptocoryne albida*) พบว่าการฟอกกำจัดเชื้อที่มีการใช้ $HgCl_2$ ร่วมด้วยทำให้ได้จำนวนยอดที่ปลอดเชื้อและสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนดีที่สุด [17] และนอกจากนั้นการนำสารปฏิชีวนะ tetracycline มาร่วมในกระบวนการฟอกกำจัดเชื้อกระเทียมน้ำสามารถลดการปนเปื้อนลง โดยทรีตเมนต์ที่มีการใช้สารปฏิชีวนะ tetracycline มาร่วมในการฟอกกำจัดเชื้อ ทำให้การปนเปื้อนลดลง ซึ่งสารปฏิชีวนะชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ [18]

Table 1 Percentages of bacterial contamination, fungi contamination and clean explant after sterilization using various concentrations of sterilizing agents.

1st Surface sterilization	2nd Surface sterilization	3rd Surface sterilization	Bacterial contamination (%)	Fungi contamination (%)	Clean explant (%)
Clorox® 10 %	Clorox® 5 %	-	88.89[ab]	11.11	0.00
Clorox® 15 %	Clorox® 10 %	-	100.00[a]	11.11	0.00
Clorox® 10 %	$HgCl_2$ 0.1 %	-	33.33[bc]	0.00	22.22
Clorox® 10 %	$HgCl_2$ 0.2 %	-	22.23[c]	0.00	22.22
Tetracycline 250 ppm	Clorox® 10 %	Clorox® 5 %	55.57[abc]	33.33	0.00
Tetracycline 250 ppm	Clorox® 15 %	Clorox® 15 %	88.89[ab]	11.11	0.00
Tetracycline 250 ppm	Clorox® 10 %	$HgCl_2$ 0.1 %	11.11[c]	0.00	22.22
Tetracycline 250 ppm	Clorox® 10 %	$HgCl_2$ 0.2 %	22.23[c]	0.00	55.56
F-test			*	ns	ns

* = Means in the same column followed by same letter are not significant at $p \leq 0.05$ by Duncan' new multiple range test; ns = Not significant difference

3.2 ผลของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

ชิ้นส่วนคล้ายคอร์มของกระเทียมน้ำที่นำมาเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อสารสูงที่สุด (75 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งการตอบสนองลดลงตามความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เพิ่มมากขึ้น โดยกระเทียมน้ำที่เลี้ยงในอาหาร ½ MS ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส แคลลัสที่พัฒนามีสีเขียวอ่อน สีขาวปนน้ำตาล และสีเขียวเข้มปนสีเขียวอ่อน และลักษณะแคลลัสเป็นแบบก้อนแข็ง (compact callus) เซลล์เกาะตัวกันแน่น (ตารางที่ 2) มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในพืชกลุ่ม

เทอริโดไฟต์หลายชนิด เช่น อาหารสังเคราะห์ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3-5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แกมีโทไฟต์ของเฟิร์นชนิด *Ampelopteris prolifera* พัฒนาเป็นแคลลัสได้ [19] การขยายพันธุ์เฟิร์น *Nephrolepis* ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร basal medium ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส [20] และการขยายพันธุ์เฟิร์นบอสตันสามพันธุ์ปลูก ได้แก่ *N. exaltata* 'Bostoniensis', 'Scotti' และ 'Dwarf Boston' มาเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige's fern ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เฟิร์นบอสตันทั้ง 3 พันธุ์ปลูกเกิดแคลลัส โดยเฟิร์นบอสตันที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้แคลลัสที่มีลักษณะดีที่สุด [21]

Table 2 Effect of different concentrations of 2,4-D on callus response after culturing for 4 weeks.

Treatments	Response percentages	Color	Texture
½ MS + 2,4-D 0.5 mg/L	75.00[a]	Light green	compact
½ MS + 2,4-D 1.0 mg/L	50.00[b]	White and brown	compact
½ MS + 2,4-D 1.5 mg/L	25.00[c]	Light green and green	compact
½ MS + 2,4-D 2.0 mg/L	0.00[d]	-	-
F-test	**		

** Means in the same column followed by same letter are not significant at $p \leq 0.01$ by Duncan' new multiple range test.

3.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของกระเทียมน้ำในสภาพปลอดเชื้อ

การนำส่วนคล้ายคอร์มที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่วนคล้ายคอร์มที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกความเข้มข้นมีจำนวนใบที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ความยาวใบของส่วนคล้ายคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BA มีความยาวใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 12.79, 12.67 และ 11.85 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนคล้ายคอร์มบนอาหารที่ได้รับ BA ที่ความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น ความยาวใบเฉลี่ยลดลง โดยส่วนคล้ายคอร์มที่ได้รับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวใบเฉลี่ยสั้นที่สุด และพบว่าส่วนคล้ายคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตมีขนาดเล็กที่สุด และเมื่อส่วนคล้ายคอร์มได้รับ BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ส่วนคล้ายคอร์มมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.91, 1.70, 1.67 และ 1.57 เซนติเมตร จำนวนรากของส่วนคล้ายคอร์มที่เลี้ยงในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้จำนวนรากเฉลี่ยของกระเทียมน้ำมากที่สุด คือ 37.22 และ 35.78 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1) สอดคล้องกับการศึกษาการขยายพันธุ์เฟิร์น *Nephrolepis*

cordiforia ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงส่วนปลายไหลบนอาหาร ¼ MS ที่เติม BA และ NAA ทำให้การเกิดต้นอ่อนลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น และมีการพัฒนาของต้นอ่อนมากที่สุดในอาหารที่ไม่เติม BA และ NAA [22] การเพาะเลี้ยงต้น *Amorphophallus albus* บนอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *A. albus* มีการพัฒนาส่วนของคอร์มขึ้น [23]

Table 3 Effect of different concentrations of BA and NAA on leaf and root regeneration from corm-like explants of *Isoetes coromandelina.*

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Leaf numbers	Leaf length (cm)	Corm-like size (cm)	Root numbers
0	0	21.56	12.79[a1/]	1.07[d]	20.89[d]
0	0.5	24.11	12.67[a]	1.34[bcd]	22.89[cd]
0	1	22.48	11.85[a]	1.33[bcd]	37.22[a]
0.5	0	21.56	6.77[b]	1.28[cd]	29.00[b]
0.5	0.5	28.78	6.98[b]	1.70[ab]	24.00[cd]
0.5	1	24.22	7.77[b]	1.91[a]	35.78[a]
1	0	24.67	4.82[c]	1.41[bcd]	24.67[c]
1	0.5	20.00	5.05[c]	1.57[abc]	9.67[e]
1	1	21.44	4.65[c]	1.67[abc]	25.56[c]
F-test		ns	**	**	**

** Means in the same column followed by same letter are not significant at $p \leq 0.01$ by Duncan' new multiple range test.

4. ข้อเสนอแนะ

การขยายพันธุ์กระเทียมน้ำในสภาพปลอดเชื้อที่เคยศึกษามาก่อนหน้านี้ พบว่าการนำส่วนของเนื้อเยื่อลำต้น ใบอ่อน และอับสปอร์อ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS, B5, Moore's solution และ Bristol's solution ร่วมกับ NAA, 2,4-D และ BA พบว่าเนื้อเยื่ออับสปอร์และเนื้อเยื่อใบอ่อนไม่ตอบสนองต่ออาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกระดับความเข้มข้น [7] แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนคล้ายคอร์มที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ร่วมกับ BA และ NAA สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่และสามารถผ่าส่วนคล้ายคอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณ นอกจากนั้นสามารถชักนำให้ส่วนคล้ายคอร์มพัฒนาเป็นแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ร่วมกับ 2,4-D ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นยอดและรากต่อไป

Figure 1 *In vitro* responses from corm-like explants cultured on ½ MS A: without BA and NAA, B: NAA 0.5 mg/L, C: NAA 1.0 mg/L, D: BA 0.5 mg/L, E: BA 0.5 mg/L and NAA 0.5 mg/L, F: BA 0.5 mg/L and NAA 1.0 mg/L, G: BA 1.0 mg/L, H: BA 1.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L and I: BA 1.0 mg/L and NAA 1.0 mg/L

5. สรุปผลการทดลอง

การฟอกกำจัดส่วนคล้ายคอร์มด้วยสารปฏิชีวนะ tetracycline 250 ppm เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วย Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และ $HgCl_2$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ได้ส่วนคล้ายคอร์มที่ปลอดเชื้อสูงที่สุด เมื่อนำส่วนคล้ายคอร์มที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ร่วมกับ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด และเมื่อนำส่วนคล้ายคอร์มที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร ½ MS ที่เติม BA และ NAA พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสหรือเกิดยอดใหม่ แต่มีผลให้ความยาวใบลดลงและมีจำนวนรากเพิ่มมากขึ้น

6. References

[1] Ernandes, P. and Marchiori, S., 2012, A Comparative Study of Two Endemic *Isoetes* species from South Italy, Available Source: http://openaccess.sku.ac.ir/pdf/A_Comparative_Study_of_Two_Endemic_Iso__xeb_tes_Species_from_South_Italy_127250.pdf, November 30, 2018.

[2] Hoot, S.B., Napier, N.S. and Taylor, W.C., 2004, Revealing unknown or extinct lineages within *Isoetes* (Isoetaceae) using DNA sequences from hybrids, Am. J. Bot. 91: 899-904.

[3] Pereira, J.B., Mittelbach, M. and Labiak, P. H., 2015, Studies on chromosome numbers and spore size in Brazilian *Isoetes*, Am. Fern J. 105: 226-237.

[4] Shukla, S.K., Singh, S.K., Shukla, P.K., Dubey, N.K., Khanam, H. And Srivastava, G.K., 2017, A new subspecies of *Isoetes coromandelina* (Isoetaceae) from Gujarat, India, Taiwania 62: 121-128.

[5] Chandra, S., Fraser-Jenkins, C.R., Kumari, A. and Srivastava, A., 2008, A summary of the status of threatened Pteridophytes of India, Taiwania 53: 170-209.

[6] Jonhduk, J., Youngil, R., Hyosig, W. and Hong-Keun, C., 2013, Morphological and molecular characterization of a new record of *Isoetes coromandeliana* subsp. *coromandeliana* form Cambodia, Plant Syst. Evol. 300: 43-50.

[7] Chomko, S., 2003, Autecology of *Isoetes coromandeliana* L.f.: Endangered Species of Thailand, Ph.D. Dissertation, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 198 p. (in Thai)

[8] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, Physiol. Plantarum 15: 473-497.

[9] Smith, R.H., 1992, Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments, Academic Press, California, 171 p.

[10] Collin, H.A. and Edwards, S., 1998, Plant cell culture, BIOS Scientific Publishers, England, 158 p.

[11] Razdan, M.K., 2003, Introduction to plant tissue culture, 2nd Ed., Science Publishers, Inc., New Hampshire, 375 p.

[12] Kaveeta, R., 1998, Plant Tissue Culture: Principle and Techniques, 2nd Ed., Kasetsart University, Bangkok, 219 p. (in

Thai)

[13] Pierik, R. L. M. , 1987, *In vitro* Culture of Higher Plants, Martinus Nijihoff Publishers, Boston, 344 p.

[14] Kijwijan, B. , 2001, Plant Tissue Culture Technology, 2nd Ed. , Klungnana Vitthaya Press, Khon Kaen, 207 p. (in Thai)

[15] Noimai, Y. , 2012, Micropropagation of *Nymphaea* Hybrid ‘ Chalong Kwan’ , Master Thesis, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 87 p. (in Thai)

[16] Udorn, P. , 2008, *In vitro* Culture of *Nymphaea* sp. (Jongkolnee) . Master Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 61 p. (in Thai)

[17] Pechkong, S. , Sumanojitraporn, S. and Makkasap, C. , 2010, Surface Sterilization Study and Growth Regulators Effect in Tissue Culture of Aquatic Plant *Cryptocoryne albida*, Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, Department of Fisheries, Bangkok, 21 p. (in Thai)

[18] Chopra, I. and Robert, M., 2001, Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65: 232-260.

[19] Mehra, P. N. and Sulklyan, D. S. , 1969, *In vitro* studies on apogamy, apospory and controlled differentiation of rhizome segments of the fern, *Ampelopteris prolifera* (Retz.) Copel, Bot. J. Linn. Soc., 62: 431-443.

[20] Padhya, M. A. and Mehta, A. R. , 1982, Propagation of fern (*Nephrolepis*) through tissue culture, Plant Cell Rep. 1: 261-263.

[21] Byrne, T. E. and Caponetti, J. D. , 1992, Morphogenesis in three cultivars of Boston fern II, callus production from stolon tips and plantlet differentiation from callus, Am. Fern J. 82: 1-11.

[22] Higuchi, H., Amaki, W. and Suzuki, S., 1987, *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia,* Prsel, Sci. Hort. 32: 105-113.

[23] Hu, J. B. , Lui, J. , Xie, C. H. and Gao, X. X. , 2006, Corm induction and multiplication of *Amorphophallus albus in vitro*, J. Hort. Sci. Biotech. 81: 859-863.