วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.3) September – December 2021 บทความวิจัย

การขยายพันธุ์ต้นกะเพราหินปูน (*Coleus albicalyx* (Suddee) Suddee) พืชหายากของประเทศไทยในหลอดทดลอง

In vitro Propagation of *Coleus albicalyx* (Suddee) Suddee, a Rare Plant of Thailand

โรจนกร เชิงปัญญา, ทยา เจนจิตติกุล, อัจฉรา เมืองครุธ และ งามนิจ ชื่นบุญงาม*

Rodjanacorn Chuengpanya, Thaya Jenjittikul, Atchara Muangkroot and Ngarmnij Chuenboonngarm*

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University

Received : 17 February 2021

Revised : 20 March 2021

Accepted : 2 April 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เสนอวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นกะเพราหินปูน (*Coleus albicalyx* (Suddee) Suddee) ซึ่งเป็นพืชที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้นและมีสถานะเป็นพืชหายากของประเทศไทย โดยนำเมล็ดมาผ่านกรรมวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวและเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และSkoog (MS) หลังจากได้ต้นกล้าอายุ 8 สัปดาห์ ที่มีความสูง 4 เซนติเมตร จึงนำต้นกล้าดังกล่าวมาตัดเอาส่วนลำต้นที่มีข้อแรกนับจากโคนลำต้นให้มีขนาด 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีเบนซิลอะดีนิน (N^6-benzyladenine: BA) เข้มข้น 0 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชนาน 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ต้นกะเพราหินปูน เนื่องจากเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารสูตรนี้สามารถรอดชีวิตและชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ทุกชิ้นพืช ทั้งยังให้จำนวน (4.70 $\pm$ 0.15 ยอด/ชิ้นพืช) และความสูงของยอดใหม่ (3.12 $\pm$ 0.40 เซนติเมตร) ที่สูงที่สุดอีกด้วย นอกจากนี้ ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากสูตรอาหารข้างต้นยังไม่พบลักษณะฉ่ำน้ำ เมื่อนำยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมาตัดแยกเป็นยอดเดี่ยวและนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS อีก 6 สัปดาห์ พบว่ายอดพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยมีการยืดยาวของลำต้นสูงขึ้นและพบการเจริญของรากเป็นจำนวนมาก ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นวิธีการอนุรักษ์พันธุ์ต้นกะเพราหินปูนนอกถิ่นอาศัยซึ่งเป็นการช่วยรักษาความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย และอาจใช้เป็นเครื่องมือในการผลิตพืชสมุนไพรชนิดนี้ให้ได้จำนวนมากเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาด้านพฤกษเคมีต่อไป

คำสำคัญ : พืชถิ่นเดียว ; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ; เบนซิลอะดีนิน ; อาการฉ่ำน้ำ

Abstract

This research presented an *in vitro* propagation method of *Coleus albicalyx* (Suddee) Suddee, an endemic plant and also classified as a rare species of Thailand. Seeds surface was sterilized before culturing on Murashige and Skoog (MS) medium. After the 8-week-old seedlings at 4 cm in height were achieved, the nodal segments contained the first node from the base of seedlings were excised to 1.5 cm in height. Then, these explants were cultured on MS medium augmented with 0, 1, 2, 3, and 4 mg/L of N^6-benzyladenine (BA). The results at the 6th week of culture revealed that MS medium supplemented with 1 mg/L BA was the appropriate medium for multiplying new shoots *C. albicalyx*. All explants cultured on this medium could survive and produce new shoots. The best outcomes of new shoots number (4.70 $\pm$ 0.15 shoots/explant) and height (3.12 $\pm$ 0.40 cm) were also found from this treatment. Moreover, the regenerated shoots from this medium did not show hyperhydricity. These regenerated-shoots were excised into a single shoot and transferred to MS medium for further 6 weeks. Shoots developed into complete plantlets by elongated their stem and generated profuse root growth. The outcome of this study can be used as a method for *ex situ* conservation of *C. albicalyx*, which assists in the maintenance biodiversity of Thailand. Furthermore, it may be applied as a mass propagation tool of this medicinal plant to provide material for the phytochemical study.

Keywords : endemic plant ; plant tissue culture ; N^6-benzyladenine ; hyperhydricity

***Corresponding author. E-mail :** ngarmnij.chu@mahidol.edu

บทนำ

พืชสกุล *Coleus* จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae มีจำนวนชนิดพันธุ์ทั่วโลกประมาณ 294 ชนิด โดยมีการกระจายพันธุ์ในภูมิอากาศเขตร้อนชื้น (tropics) และกึ่งเขตร้อน (subtropics) ของทวีปโลกเก่า (the Old World) (Paton *et al*., 2019) พืชสกุลนี้สามารถนำมาปลูกเป็นไม้ประดับได้เนื่องจากมีลักษณะของดอกและใบที่สวยงาม ทั้งยังสามารถนำมารับประทานเป็นอาหารหรือใช้เป็นพืชสมุนไพรเพื่อบรรเทาอาการเจ็บป่วยหลายประการของมนุษย์อีกด้วย (Nagpal *et al*., 2008) การศึกษาด้านพฤกษเคมีพบว่าสมาชิกของพืชสกุลนี้ผลิตสารสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประเภท (Shivaprasad *et al*., 2014) และยังสามารถผลิตสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการทำงานของ HIV-1 protease ได้อีกด้วย (Kapewangolo & Meyer, 2018) จากเหตุผลข้างต้นจึงนับได้ว่าพืชสกุลนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ ดังนั้นจึงควรให้ความสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมอย่างยิ่ง ในประเทศไทยนั้น พบพืชสกุล *Coleus* รวม 14 ชนิด โดยมี 5 ชนิด ที่ถูกจัดเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic) หรือพืชที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (Paton *et al*., 2019) ซึ่งรวมถึงต้นกะเพราหินปูนด้วย พืชชนิดนี้ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 2004 และได้รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Plectranthus albicalyx* Suddee (Suddee *et al*., 2004) ต่อมาได้มีการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมโดยใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาร่วมด้วยและพบว่าพืชสกุล *Plectranthus* จำนวนมากมีความใกล้เคียงกับพืชสกุล *Coleus* จึงทำให้พืชสกุล *Plectranthus* เหล่านั้นถูกย้ายมาอยู่ในสกุล *Coleus* ซึ่งรวมถึงต้นกะเพราหินปูนด้วย จึงทำให้พืชชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Coleus albicalyx* (Suddee) Suddee (Paton *et al*., 2019)

สำหรับข้อมูลโดยทั่วไปของต้นกะเพราหินปูนนั้น พืชชนิดนี้กระจายพันธุ์บนภูเขาหินปูนในป่าดิบแล้งของจังหวัดกาญจนบุรี สระบุรี นครราชศรีมา ขอนแก่น และเพชรบุรี (Suddee *et al*., 2004; Chamchumroon, 2017) มีรายงานว่าส่วนใบและกิ่งของต้นกะเพราหินปูนสามารถนำมาใช้ต้มดื่มเพื่อแก้เบาหวานหรือบำรุงกำลังได้ (Medplant Mahidol, 2016) อย่างไรก็ตาม พืชชนิดนี้มีสถานะเป็นชนิดพันธุ์ที่หายาก (rare species) (Chamchumroon, 2017) และอาจมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคตเนื่องจากภาวะโลกร้อน ซึ่งอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นสามารถส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตได้ (Hansen *et al*., 2006) ประกอบกับถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของพืชชนิดนี้บางแหล่งกำลังถูกรบกวนเนื่องจากการทำอุตสาหกรรมเหมืองแร่ (Suddee *et al*., 2004) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อจำนวนต้นในธรรมชาติของต้นกะเพราหินปูนได้ในอนาคต ดังนั้นการศึกษาวิธีการอนุรักษ์พันธุ์พืชชนิดนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้การอนุรักษ์พันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องมีความรู้พื้นฐานเบื้องต้นเกี่ยวกับพืชชนิดนั้น ๆ และต้องดำเนินการอนุรักษ์ควบคู่กันไปทั้งในถิ่นอาศัย (*in situ)* และนอกถิ่นอาศัย (*ex situ*) (UNCED, 1992) ซึ่งในต้นกะเพราหินปูนนั้นได้มีการจัดตั้งเขตรักษาพันธุ์พืชเพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ในถิ่นอาศัย (Suddee *et al*., 2004) ประกอบกับมีการศึกษาชีพลักษณ์ของพืชชนิดนี้ (Saengsawang *et al*., 2015) หากแต่ยังไม่พบการศึกษาการอนุรักษ์พันธุ์นอกถิ่นอาศัยของต้นกะเพราหินปูน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการอนุรักษ์พันธุ์พืชนอกถิ่นอาศัยที่มีประสิทธิภาพอีกวิธีหนึ่ง เนื่องจากสามารถเพิ่มต้นพืชปลอดเชื้อได้ปริมาณมากในระยะเวลาที่จำกัด (George *et al*., 2008) พืชต้นใหม่ที่ได้ยังมีความสมบูรณ์แข็งแรงที่สามารถนำปลูกกลับคืนสู่ธรรมชาติได้อีกด้วย (Misic *et al*., 2005) ด้วยเหตุนี้ ในปัจจุบันจึงพบการอนุรักษ์พันธุ์พืชที่กำลังถูกคุมคามด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก (Sarasan *et al*., 2006) และยังพบว่าพืชสกุล *Coleus* หลายชนิด ได้แก่ *C. amboinicus* (Rahman *et al*., 2015; Govindaraju & Arulselvi, 2018; Arumugam *et al*., 2020) *C. barbatus* (Krishna

et al., 2010; Thangavel *et al.*, 2011; Balasubramanya *et al.*, 2012; Sreedevi *et al.*, 2013; Thangavel *et al.*, 2014) *C. bourneae* (Rajaram *et al.*, 2015; Thaniarasu *et al.*, 2015, 2016, 2018) *C. maculosus* subsp. *edulis* (Tsegaw & Feyissa, 2014; Kebede & Abera, 2015) และ *C. rotundifolius* (Asha *et al.*, 2013) ถูกนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อวัตถุประสงค์หลายประการ เช่น การอนุรักษ์พันธุ์พืช สนับสนุนการผลิตสารสำคัญ การผลิตต้นพืชให้ได้จำนวนมากเพื่อสนับสนุนอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและยา โดยผ่านการใช้ชิ้นส่วนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน หากแต่ยังไม่มีรายงานการขยายพันธุ์ต้นกะเพราหินปูนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ดำเนินการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Coleus* หลายรายงาน พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนินชนิด N^6-benzyladenine (BA) สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าไซโทไคนินชนิดอื่น หากแต่ใช้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละหลายรายงาน (Krishna *et al.*, 2010; Asha *et al.*, 2013; Sreedevi *et al.*, 2013; Kebede & Abera, 2015; Rahman *et al.*, 2015; Thaniarasu *et al.*, 2015; Arumugam *et al.*, 2020) ด้วยเหตุดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลความเข้มข้นของ BA ต่อการขยายพันธุ์ต้นกะเพราหินปูนในหลอดทดลอง ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำใช้เป็นวิธีการอนุรักษ์พันธุ์พืชชนิดนี้นอกถิ่นอาศัย หรือนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นกะเพราหินปูนให้ได้จำนวนมากเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาด้านต่าง ๆ เช่น การศึกษาด้านพฤกษเคมี ซึ่งสามารถนำไปสู่องค์ความรู้หรือการใช้ประโยชน์ในด้านใหม่ ๆ จากพืชชนิดนี้ได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

<u>การฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดของต้นกะเพราหินปูน และการชักนำให้เกิดต้นพืชปลอดเชื้อในหลอดทดลอง</u>

นำเมล็ดของต้นกะเพราหินปูนมาจุ่มลงในเอทานอลเข้มข้น 70% นาน 1 นาที ก่อนนำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ (Clorox®, USA) ที่ความเข้มข้น 20% และ 10% (คลอร็อกซ์มีสารสำคัญโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 5.25% ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 5 และ 10 นาที ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นที่ผสมสารลดแรงตึงผิว Tween®-20 เข้มข้น 50 ไมโครลิตร/100 มิลลิลิตร จากนั้นนำเมล็ดมาล้างสารเคมีออกด้วยน้ำกลั่นจำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง นาน 5 นาที/ครั้ง และนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวแล้วไปเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) บันทึกผลอัตราการปลอดเชื้อหลังเพาะเมล็ดบนอาหารสูตรดังกล่าวครบ 1 สัปดาห์

น้ำกลั่นที่ใช้ตลอดขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวนี้ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที ขณะที่อาหารสังเคราะห์สูตร MS ใช้เวลานึ่งฆ่าเชื้อนาน 15 นาที องค์ประกอบพื้นฐานของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และผงวุ้น 7.3 กรัม/ลิตร โดยมีค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารอยู่ที่ 5.7 – 5.8 อาหารสังเคราะห์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ถูกบรรจุลงในแต่ละขวดทดลอง (ขนาด 4 ออนซ์) เนื้อเยื่อถูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และได้รับแสงไฟนาน 16 ชั่วโมง/วัน จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนท์สีขาวโทนเย็น (ฟิลิปส์, ประเทศไทย) ที่ความเข้มแสง 37 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที

การศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ในหลอดทดลองของต้นกะเพราหินปูน

เลือกต้นกล้าที่มีอายุ 8 สัปดาห์ และมีความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร มาตัดแยกเอาส่วนลำต้นที่มีข้อแรกนับจากโคนลำต้นให้มีความสูง 1.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ 20 ชิ้นพืช/สูตรอาหาร ทำซ้ำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ใช้ 1 ชิ้นพืชทดลอง/ขวดเลี้ยง หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชบนสูตรอาหารดังกล่าวครบ 6 สัปดาห์ จึงเก็บข้อมูลร้อยละการรอดชีวิต ร้อยละการชักนำให้เกิดยอดใหม่ จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช ความสูงของยอดใหม่ และร้อยละการฉ่ำน้ำของยอดใหม่ จากนั้นนำยอดใหม่ที่ได้จากแต่ละสูตรอาหารมาตัดแยกให้เป็นยอดเดี่ยว และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 6 สัปดาห์ เพื่อให้ยอดใหม่พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

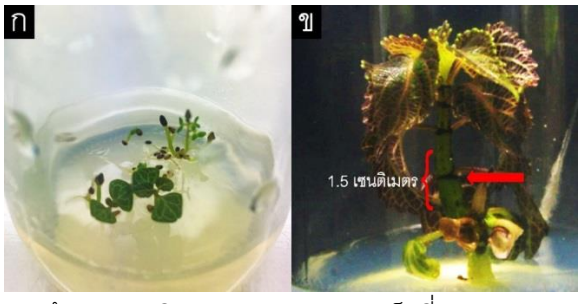
การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษานี้วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) การวิเคราะห์ทางสถิติทุกขั้นตอนวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ PASW Statistics 18.0 ข้อมูลในการศึกษานี้แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error: S.E.)

ผลการวิจัย

การฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดของต้นกะเพราหินปูน และการชักนำให้เกิดต้นพืชปลอดเชื้อในหลอดทดลอง

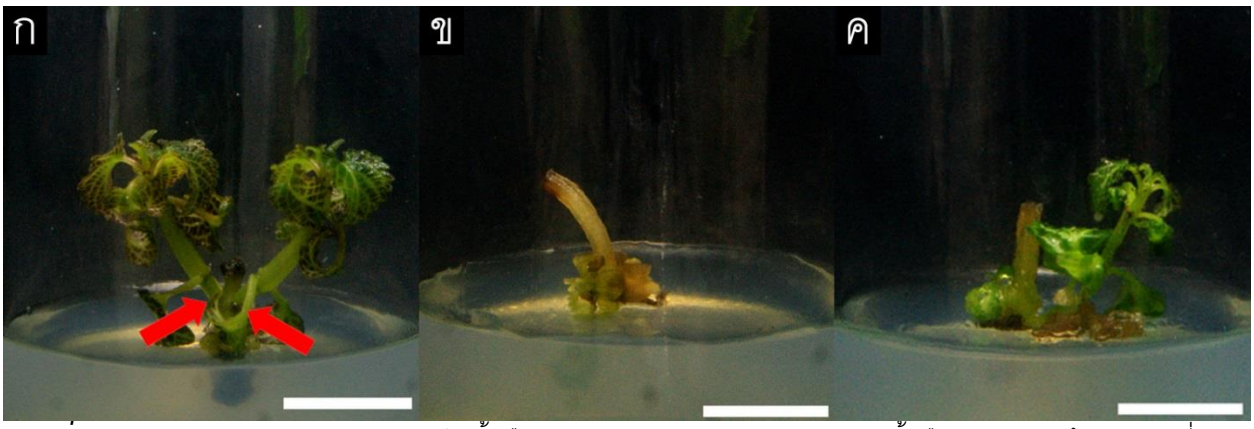
หลังจากเพาะเมล็ดต้นกะเพราหินปูนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดไม่เกิดการปนเปื้อน หลังจากเพาะเมล็ดครบ 4 สัปดาห์ เมล็ดเริ่มงอกเป็นต้นกล้าขนาดเล็ก (ภาพที่ 1ก) โดยมีการงอกร้อยละ 100 และต้นกล้าบางส่วนเจริญเติบโตพัฒนาเป็นต้นกล้าที่มีความสูง 4 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดนาน 12 สัปดาห์ ต้นกล้าที่อายุ 8 สัปดาห์นี้ สามารถมองเห็นส่วนข้อและปล้องได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 1ข) และถูกนำไปใช้เป็นพืชทดลองในขั้นถัดไป



ภาพที่ 1 ต้นอ่อนในหลอดทดลองของต้นกะเพราหินปูน หลังจากเพาะเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) และต้นกล้าอายุ 8 สัปดาห์ (12 สัปดาห์หลังเพาะเมล็ด) สามารถมองเห็นส่วนข้อได้อย่างชัดเจน (ข, ลูกศร)

ผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ในหลอดทดลองของต้นกะเพราหินปูน

เมื่อตัดเอาส่วนลำต้นที่มีข้อแรกนับจากโคนลำต้นให้มีความสูง 1.5 เซนติเมตร จากต้นกล้าอายุ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 1 ข) ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0 - 4 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าที่บริเวณข้อของชิ้นพืชทดลองมียอดใหม่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชทดลองโดยตรง (ภาพที่ 2ก) ทั้งนี้สูตรอาหารแต่ละสูตรส่งผลกระทบต่อร้อยละการรอดชีวิตของชิ้นพืชทดลองแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยชิ้นพืชทดลองที่ตายนั้นพบว่าชิ้นพืชเริ่มต้นและยอดใหม่กลายเป็นสีน้ำตาลคล้ำ และยอดใหม่ไม่มีการเจริญอีกต่อไป (ภาพที่ 2ข) ซึ่งต่างจากชิ้นพืชที่รอดชีวิต (ภาพที่ 2ค) ทั้งนี้ชิ้นพืชทดลองที่เลี้ยงบนสูตรอาหารของชุดควบคุมมีร้อยละการรอดชีวิตอยู่ที่ 98.25 $\pm$ 1.75 ขณะที่อาหารที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่พบการตายของชิ้นพืชทดลอง อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยงเกินกว่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้ร้อยละการรอดชีวิตของพืชทดลองลดลง โดยพบว่าอาหารที่มี BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร มีร้อยละการรอดชีวิตของพืชทดลองต่ำที่สุดเพียง 35.68 $\pm$ 1.28 (ตารางที่ 1)



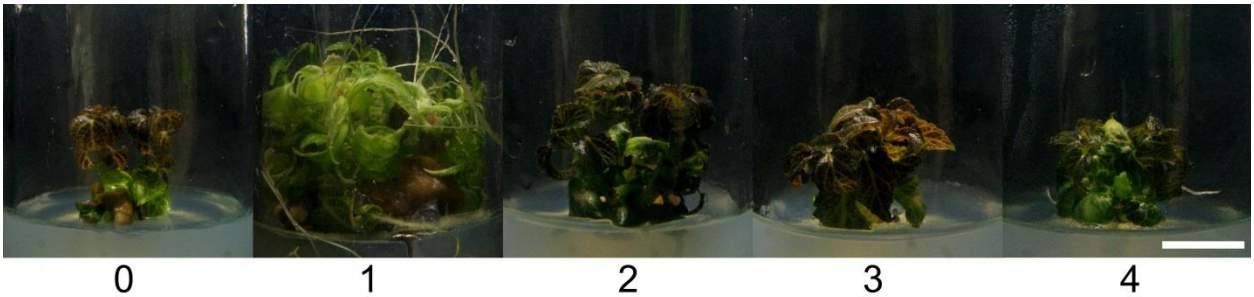
ภาพที่ 2 การเจริญของยอดใหม่จากบริเวณข้อชิ้นพืชทดลอง (ก, ลูกศร) และลักษณะของชิ้นพืชทดลองรวมถึงยอดใหม่ที่ตาย (ข) และยังมีชีวิตอยู่ (ค) หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชทดลองบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA เข้มข้นแตกต่างกัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

สำหรับร้อยละของการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นพืชทดลองนั้น แม้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ BA เกินกว่า 2 มิลลิกรัม/ลิตร มีแนวโน้มที่ทำให้การชักนำให้เกิดยอดใหม่ลดลง สำหรับจำนวนและความสูงของยอดใหม่นั้น ผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารชุดควบคุมให้จำนวนยอดใหม่ที่ 2.00 $\pm$ 0.00 ยอด/ชิ้นพืช และความสูงของยอดใหม่ที่ 1.00 $\pm$ 0.06 เซนติเมตร ขณะที่สูตรอาหารที่เติม BA สามารถชักนำให้จำนวนและความสูงของยอดใหม่ที่สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งสูตรอาหารที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ได้จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืช และความสูงของยอดใหม่ที่มากที่สุด คือ 4.70 $\pm$ 0.15 ยอด และ 3.12 $\pm$ 0.40 เซนติเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ได้จำนวนและความสูงของยอดใหม่ลดลง (ตารางที่ 1, ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลของ BA ต่อชิ้นพืชทดลองและการเจริญของยอดใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนลำต้นที่มีข้อแรกนับจากโคนลำต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0 – 4 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	**ร้อยละการรอดชีวิตของชิ้นพืช**	**ร้อยละการชักนำให้เกิดยอดใหม่**	**จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช**	**ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)**
0	98.25 ± 1.75 A	85.71 ± 8.25	2.00 ± 0.00 C	1.00 ± 0.06 C
1	100.00 ± 0.00 A	100.00 ± 0.00	4.70 ± 0.15 A	3.12 ± 0.40 A
2	55.56 ± 14.25 B	100.00 ± 0.00	3.30 ± 0.45 B	1.52 ± 0.40 BC
3	52.57 ± 6.71 B	96.30 ± 3.70	2.60 ± 0.16 C	2.09 ± 0.28 B
4	35.68 ± 1.28 B	92.90 ± 4.13	2.40 ± 0.16 C	2.07 ± 0.37 B
F-test	*	ns	*	*

หมายเหตุ : หาก F-test พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*) ข้อมูลถูกนำไปเปรียบเทียบต่อด้วยวิธี DMRT และแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง ข้อมูลวิเคราะห์ที่ $p<0.05$



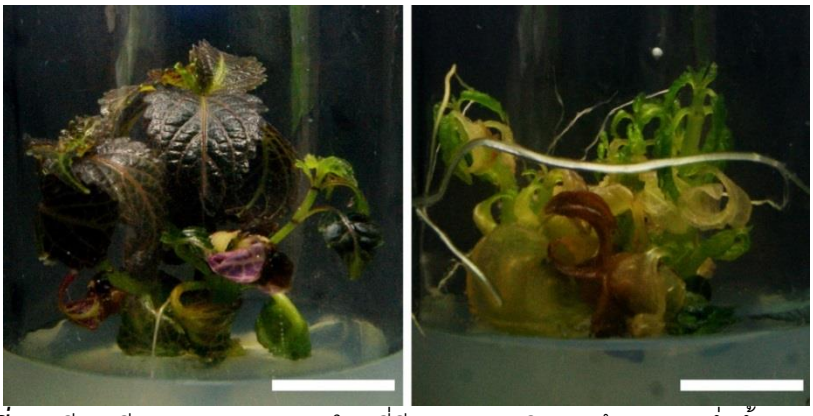
ภาพที่ 3 ยอดใหม่ของต้นกะเพราหินปูนจากชิ้นพืชทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0 - 4 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 6 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากอาหารแต่ละสูตรถูกนำมาตัดแยกออกเป็นยอดเดี่ยว และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ยอดใหม่เหล่านี้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์โดยพบการยืดยาวของยอดขึ้นและพบการพัฒนาของรากใหม่จำนวนมาก (ภาพที่ 4) ซึ่งสามารถนำไปอนุบาลออกปลูกได้ต่อไป

ภาพที่ 4 การพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ หลังจากนำยอดใหม่ที่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชทดลองที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0 - 4 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 6 สัปดาห์ ไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเติม BA นาน 6 สัปดาห์ (บาร์ = 5 เซนติเมตร)

ผลของ BA ต่อการเกิดยอดใหม่ที่มีลักษณะฉ่ำน้ำในหลอดทดลองของต้นกะเพราหินปูน

ระหว่างการเพิ่มปริมาณยอดของต้นกะเพราหินปูนในหลอดทดลองพบว่ายอดใหม่บางส่วนมีลักษณะฉ่ำน้ำ ซึ่งยอดดังกล่าวมีสีเขียวซีด ใบหงิกงอ เปราะและแตกหักได้ง่าย ลำต้นใส (ภาพที่ 5) ซึ่งผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยงส่งผลต่อการเกิดยอดฉ่ำน้ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มี BA เข้มข้น 0 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่พบยอดฉ่ำน้ำ ขณะที่ร้อยละการเกิดยอดฉ่ำน้ำเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยง ซึ่งอาหารที่มี BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร พบยอดฉ่ำน้ำสูงที่สุด คือ ร้อยละ 52.37 $\pm$ 6.42 (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ เมื่อตัดยอดฉ่ำน้ำไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 6 สัปดาห์ พบว่ายอดดังกล่าวไม่สามารถกลับมาเป็นปกติและเริ่มแสดงการตายของเนื้อเยื่อขึ้น



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะของยอดใหม่ที่มีลักษณะปกติ (ภาพซ้าย) และ ฉ่ำน้ำ (ภาพขวา)

ตารางที่ 2 ร้อยละของยอดใหม่ที่มีลักษณะฉ่ำน้ำเมื่อเลี้ยงชิ้นพืชทดลองบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0 – 4 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	**ร้อยละของยอดใหม่ที่ฉ่ำน้ำ**
0	0 B
1	0 B
2	44.61 ± 12.15 A
3	48.92 ± 6.37 A
4	52.37 ± 6.42 A
F-test	*

หมายเหตุ : หาก F-test พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*) ข้อมูลถูกนำไปเปรียบเทียบต่อด้วยวิธี DMRT และแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง ข้อมูลวิเคราะห์ที่ $p<0.05$

วิจารณ์ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Coleus* นั้น พบว่าชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อผิวเพื่อชักนำให้เกิดต้นพืชปลอดเชื้อในหลอดทดลอง ได้แก่ ใบ (Krishna *et al*., 2010; Thangavel *et al*., 2011; Balasubramanya *et al*., 2012; Thaniarasu *et al*., 2016) ปล้องหรือลำต้นที่มีตาข้าง (Asha *et al*., 2013; Sreedevi *et al*., 2013; Kebede & Abera, 2015; Rahman *et al*., 2015; Rajaram *et al*., 2015; Thaniarasu *et al*., 2015, 2016; Govindaraju & Arulselvi, 2018; Thaniarasu *et al*., 2018; Arumugam *et al*., 2020) ยอด (Sreedevi *et al*., 2013; Tsegaw & Feyissa, 2014; Kebede & Abera, 2015; Rahman *et al*., 2015) และปลายยอด (Sreedevi *et al*., 2013; Rajaram *et al*., 2015; Govindaraju & Arulselvi, 2018; Thaniarasu *et al*., 2018; Arumugam *et al*., 2020) ซึ่งการใช้ชิ้นส่วนพืชและวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวที่แตกต่างกันส่งผลให้อัตราการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ อัตราการรอดชีวิตหลังจากกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิว และความสามารถในการเจริญให้ยอดใหม่ที่แตกต่างกัน (Kebede & Abera, 2015; Arumugam *et al*., 2020) ดังนั้น ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวต้องเลือกชิ้นส่วนพืชและวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อในอัตราที่สูง โดยที่ได้รับการกัดกร่อนหรือผลกระทบจากสารฟอกฆ่าเชื้อให้น้อยที่สุด เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชยังสามารถเจริญให้เนื้อเยื่อปลอดเชื้อได้ต่อไป จากการที่ต้นกะเพราหินปูนเป็นชนิดพันธุ์หายาก (Chamchumroon, 2017) ดังนั้นเพื่อลดผลกระทบในด้านปริมาณต้นพืชที่จะถูกนำมาใช้ ประกอบกับไม่ต้องการนำต้นพืชออกจากถิ่นอาศัย การศึกษานี้จึงใช้เมล็ดเป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อผิว ซึ่งผลการศึกษาพบว่าไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพหลังจากนำเมล็ดต้นกะเพราหินปูนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 1 สัปดาห์ ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวและการใช้เมล็ดเป็นแหล่งสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อผิวในพืชสกุล *Coleus* อีกแหล่งหนึ่ง การที่เมล็ดของต้นกะเพราหินปูนไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพอาจเป็นเพราะผิวของเมล็ดพืชชนิดนี้หนาและแข็ง จึงทำให้สามารถใช้สารเคมีที่ระดับความเข้มข้นสูงร่วมกับการใช้เวลาที่นานในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวได้

โดยที่ไม่ทำอันตรายต่อคัพภะ (embryo) ที่อยู่ภายในเมล็ด ทั้งนี้ พืชสกุล *Coleus* หลายชนิดมีรายงานว่าเมล็ดมีอัตราการงอกต่ำ (Thangavel *et al*., 2011, 2014; Thaniarasu *et al*., 2015, 2016, 2018) สำหรับต้นกะเพราหินปูนนั้น พืชชนิดนี้มีการพักตัวของเมล็ดในช่วงเดือนมกราคม – กลางเดือนมิถุนายน (Saengsawang *et al*., 2015) ซึ่งการศึกษานี้พบว่าเมล็ดของต้นกะเพราหินปูนทุกเมล็ดสามารถงอกเป็นต้นกล้าได้เมื่อเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อครบ 12 สัปดาห์ โดยอาจเป็นเพราะสารเคมีที่ใช้ระหว่างขั้นการฟอกฆ่าเชื้อผิวได้กัดกร่อนผิวเมล็ด ทำให้ผิวเมล็ดอ่อนนุ่มขึ้น ธาตุอาหารและน้ำจากอาหารสังเคราะห์จึงสามารถซึมเข้าสู่เอ็มบริโอได้ง่ายขึ้น จึงเป็นการทำลายการพักตัวของเมล็ด ทำให้การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมีอัตราการงอกที่สูงกว่าในสภาพธรรมชาติ (Charoensub *et al*., 2008; Wang *et al*., 2018) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าการใช้เมล็ดเป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตพืชในเชิงอุตสาหกรรมได้อีกด้วย (Behera *et al*., 2019)

การขยายพันธุ์พืชสกุล *Coleus* สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ผ่านกลุ่มเซลล์แคลลัสได้ (indirect organogenesis) เนื่องจากวิธีการนี้สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ปริมาณมาก (Sreedevi *et al*., 2013; Thaniarasu *et al*., 2016) ควบคู่ไปกับการผลิตสารสำคัญ (Balasubramanya *et al*., 2012) อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้มีความซับซ้อนและมีองค์ประกอบที่ต้องคำนึงหลายประการ ทั้งยังใช้ระยะเวลาเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน นับตั้งแต่ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวจนถึงการออกปลูกอาจนานถึง 22 หรือ 24 สัปดาห์ (Balasubramanya *et al*., 2012; Sreedevi *et al*., 2013) ขณะที่การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนพืชโดยตรง (direct organogenesis) ใช้เวลาที่น้อยกว่า โดย Rahman *et al*. (2015) ใช้เวลาเพาะเลี้ยงเพียง 16 สัปดาห์เท่านั้น ดังนั้น การขยายพันธุ์พืชสกุล *Coleus* โดยส่วนมากจึงชักนำให้เกิดยอดใหม่ด้วยวิธี direct organogenesis จากเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น ใบ (Thangavel *et al*., 2011) ยอด (Rahman *et al*., 2015) และปลายยอด (Kebede & Abera, 2015; Thaniarasu *et al*., 2018; Arumugam *et al*., 2020) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาหลายชิ้นบ่งชี้ว่าส่วนลำต้นหรือปล้องที่มีตาข้างอยู่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ดีกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่น (Kebede & Abera, 2015; Rahman *et al*., 2015; Rajaram *et al*., 2015; Govindaraju & Arulselvi, 2018; Thaniarasu *et al*., 2018) จึงทำให้เนื้อเยื่อส่วนนี้ถูกใช้เป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับการขยายพันธุ์พืชสกุล *Coleus* จำนวนมาก (Asha *et al*., 2013; Tsegaw & Feyissa, 2014; Thangavel *et al*., 2014; Kebede & Abera, 2015; Rahman *et al*., 2015; Rajaram *et al*., 2015; Thaniarasu *et al*., 2015, 2018) ทั้งนี้ ตำแหน่งของข้อยังส่งผลต่อความสามารถในการเจริญให้ยอดใหม่ โดย Arumugam *et al*. (2020) พบว่าข้อจากตำแหน่งล่างสุดของยอดอ่อนสามารถเจริญให้ยอดใหม่ได้ดีที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะข้อตำแหน่งนี้ได้รับอิทธิพลการข่มจากตายอด (apical dominance) น้อยกว่าข้อบริเวณอื่น ประกอบกับการมีปัจจัยภายใน เช่น การสะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารชีวเคมีและธาตุอาหาร และความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ (George *et al*., 2008) ที่เอื้อต่อการเจริญให้ยอดใหม่มากกว่าข้อตำแหน่งอื่น ดังนั้น การศึกษานี้จึงเลือกใช้ส่วนลำต้นที่มีข้อแรกนับจากโคนลำต้นเป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับชักนำให้ต้นกะเพราหินปูนเกิดยอดใหม่ผ่านกระบวนการ direct organogenesis

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนินเป็นสารที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการขยายพันธุ์ต้นพืชในหลอดทดลอง เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการควบคุมและพัฒนาให้เกิดยอดใหม่ (George *et al*., 2008) ซึ่งไซโทไคนินชนิด BA เป็นสารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าไซโทไคนินชนิดอื่นดังปรากฏในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Coleus*

หลายรายงาน (Krishna *et al*., 2010; Asha *et al*., 2013; Sreedevi *et al*., 2013; Kebede & Abera, 2015; Rahman *et al*., 2015; Thaniarasu *et al*., 2015; Arumugam *et al*., 2020) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อให้ BA แก่ต้นพืช จะทำให้ต้นพืชเกิดการสะสม N^6(2-isopentenyl)adenine (iP) และ N^6(2-isopentenyl)adenosine (iPR) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ไซโทไคนินในปริมาณที่สูงขึ้น จึงมีผลให้ปริมาณไซโทไคนินภายในต้นพืชเพิ่มสูงขึ้นและส่งผลต่อการเกิดยอดใหม่ (Auer *et al*., 1999) การศึกษานี้จึงใช้ BA สำหรับชักนำให้เกิดยอดใหม่ในหลอดทดลองของต้นกะเพราหินปูน โดยผลการทดลองพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยงเกินกว่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้อัตราการรอดชีวิตของพืชทดลองลดลง ซึ่งสอดคล้องกับในต้น *Zehneria platysperma* ที่พบผลการทดลองเป็นไปในลักษณะเดียวกัน (Chuengpanya *et al*., 2020) ทั้งนี้เป็นเพราะไซโทไคนินที่ความเข้มข้นสูงเป็นพิษต่อเซลล์พืชและเป็นสัญญาณให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (apoptosis) (Carimi *et al*., 2003) การเติม BA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงต้นกะเพราหินปูนทำให้ได้อัตราการเกิดยอดใหม่และจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืชที่สูงกว่าอาหารชุดควบคุม เนื่องจากไซโทไคนินสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวกับการพัฒนาของยอดผ่านการควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้อง (Gordon *et al*., 2009) ทำลายการข่มของตายอดสู่ตาข้าง ทำลายการพักตัวของตาข้าง (George *et al*., 2008) และกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ โดยเป็นผลสืบเนื่องจากการที่ไซโทไคนินทำให้กิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดได้มากและนานขึ้น (Fuadi *et al*., 2014; Skalák *et al*., 2019) การศึกษานี้พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยงเกินกว่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้การชักนำและจำนวนยอดใหม่ลดลง ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Coleus* หลายรายงานก็ได้ระบุเช่นเดียวกันว่า การเพิ่มความเข้มข้นของไซโทไคนินหรือ BA เกินกว่าระดับที่เหมาะสมส่งผลให้การชักนำให้เกิดยอดใหม่ลดลง (Thangavel *et al*., 2011; Asha *et al*., 2013; Thangavel *et al*., 2014; Tsegaw & Feyissa, 2014; Kebede & Abera, 2015; Rajaram *et al*., 2015; Rahman *et al*., 2015; Thaniarasu *et al*., 2015; Govindaraju & Arulselvi, 2018; Thaniarasu *et al*., 2018; Arumugam *et al*., 2020) การเพิ่มความเข้มข้นของ BA เกินกว่าระดับที่เหมาะสมสามารถลดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงลงได้ (Fuadi *et al*., 2014) ดังนั้นเมื่อกระบวนการสร้างพลังงานหลักของพืชลดลง จึงทำให้กิจกรรมของเซลล์ลดลงและส่งผลให้เกิดยอดใหม่ลดลงในท้ายที่สุด นอกจากนี้ ไซโทไคนินที่ระดับสูงเกินไปยังมีผลยับยั้งการเกิดยอดใหม่และชะลอการแบ่งเซลล์อีกด้วย (George *et al*., 2008) ระดับของไซโทไคนินยังสามารถควบคุมขนาดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเจริญ (Medford *et al*., 1989; Werner *et al*., 2001) และเป็นกลไกสำคัญต่อการทำให้เกิดกระบวนการขยายขนาดของเซลล์ (Skalák *et al*., 2019) ซึ่ง BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร อาจเป็นระดับที่เหมาะสมที่เอื้อต่อการเกิดปัจจัยภายในเหล่านี้ จึงส่งผลให้ต้นกะเพราหินปูนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรนี้มีความสูงของยอดใหม่สูงที่สุด ขณะที่การเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA อาจเป็นการรบกวนปัจจัยข้างต้น จึงทำให้ยอดใหม่มีความสูงลดลง ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Coleus* หลายรายงานพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ BA หรือไซโทไคนินเกินกว่าระดับที่เหมาะสมทำให้ความสูงของยอดใหม่ลดลงเช่นเดียวกัน (Thangavel *et al*., 2011; Asha *et al*., 2013; Sreedevi *et al*., 2013; Thangavel *et al*., 2014; Tsegaw & Feyissa, 2014; Kebede & Abera, 2015; Rajaram *et al*., 2015; Rahman *et al*., 2015; Thaniarasu *et al*., 2015, 2016, 2018; Arumugam *et al*., 2020) นอกจากนี้ BA อาจเพิ่มการทำงานของ ACC synthase (Carimi *et al*., 2003) ทำให้เนื้อเยื่อในหลอดทดลองเกิดการสังเคราะห์และปลดปล่อยก๊าซเอทิลีนขึ้น (Saha *et al*., 2007) ซึ่ง

ส่งผลกระทบต่อความสูงของเนื้อเยื่อในหลอดทดลองได้ (Gaba, 2007) และกระบวนการทั้งหมดนี้อาจเกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงต้นกะเพราหินปูน

ไซโทไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ออกฤทธิ์ตรงกันข้ามกับออกซิน จึงมีผลชะลอหรือยับยั้งการเจริญของรากได้ (George *et al*., 2008) ด้วยเหตุนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Coleus* หลายรายงานจึงใช้อาหารเลี้ยงที่เติมออกซินร่วมด้วยเพื่อชักนำให้เกิดราก (Thangavel *et al*., 2011; Asha *et al*., 2013; Thangavel *et al*., 2014; Tsegaw & Feyissa, 2014; Kebede & Abera, 2015; Rajaram *et al*., 2015; Thaniarasu *et al*., 2015, 2016; Govindaraju & Arulselvi, 2018; Thaniarasu *et al*, 2018) แต่การศึกษานี้พบว่าเมื่อตัดยอดใหม่ของต้นกะเพราหินปูนแยกออกเป็นยอดเดี่ยวแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 6 สัปดาห์ ยอดสามารถพัฒนาให้รากใหม่ได้จำนวนมาก นอกจากนี้ยอดยังมีการยืดยาวเพิ่มขึ้นด้วย การเกิดรากและการยืดยาวของยอดต้นกะเพราหินปูนบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนี้คล้ายคลึงกับผลการศึกษาในพืชสกุล *Coleus* หลายรายงาน (Krishna *et al*., 2010; Sreedevi *et al*., 2013; Arumugam *et al*., 2020) ซึ่งการย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นการลดผลกระทบของไซโทไคนินที่ต้นพืชได้รับจากอาหารเลี้ยงในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอด จึงทำให้เกิดการปรับสมดุลของไซโทไคนินและออกซินภายในต้นพืชและนำไปสู่การยืดยาวของยอดและการเกิดรากของเนื้อเยื่อ (George *et al*., 2008) นอกจากนี้ การที่ยอดของต้นกะเพราหินปูนสามารถพัฒนาให้รากใหม่ได้เองหลังจากเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช อาจเป็นเพราะระดับของ BA ที่ใช้ในการศึกษานี้ ไม่เข้มข้นพอที่จะยับยั้งการเกิดราก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Asha *et al*. (2013) ที่พบว่ายอดของต้น *C. rotundifolius* สามารถเกิดรากได้เองแม้ว่าจะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ร่วมด้วยก็ตาม ถึงแม้ว่ายอดใหม่ของต้นกะเพราหินปูนจะพัฒนาให้รากจนเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์และพร้อมต่อการนำไปอนุบาลออกปลูก แต่ยอดที่เกิดจากการเลี้ยงด้วยอาหารที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร พบพัฒนาการของราก (จำนวนและความยาว) และการยืดยาวของยอดในภาพรวมที่สูงกว่าอาหารสูตรอื่น ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าความเข้มข้นของไซโทไคนินที่แตกต่างกันสามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นพืชไปอีกระยะหนึ่งภายหลังการเลิกใช้เช่นเดียวกับที่พบในต้น *Z. platysperma* (Chuengpanya *et al*., 2020)

ระหว่างขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอดของต้นกะเพราหินปูน ยอดใหม่ที่เกิดจากอาหารเลี้ยงที่มี BA เข้มข้น 2 – 4 มิลลิกรัม/ลิตร พบยอดใหม่ฉ่ำน้ำขึ้น โดยอัตรายอดฉ่ำน้ำเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยง ผลการศึกษานี้เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น *Z. platysperma* (Chuengpanya *et al*., 2020) ทั้งนี้ เมื่อย้ายยอดฉ่ำน้ำของต้นกะเพราหินปูนไปเลี้ยงต่อในอาหารที่ไม่เติม BA ต่ออีก 6 สัปดาห์ พบว่ายอดไม่สามารถกลับมามีลักษณะปกติได้ ซึ่งยอดฉ่ำน้ำสามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหลายชนิด (Hazarika & Bora, 2010) และนับว่าเป็นข้อจำกัดสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพราะยอดฉ่ำน้ำนอกจากจะทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อแล้วยังทำให้สูญเสียทรัพยากรอีกด้วย หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญต่อการทำให้เกิดยอดฉ่ำน้ำ คือ การใช้ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ไม่เหมาะสม (Hazarika & Bora, 2010) ซึ่งระดับความเข้มข้นของไซโทไคนินที่สูงเกินไปสามารถทำให้ต้นพืชเกิดการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species: ROS) สูงขึ้น และทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ซึ่ง ROS สามารถทำลายโครงสร้างต่าง ๆ ของต้นพืชได้ ทำให้เกิด lipid peroxidation (Novák *et al*., 2013)

และนำไปสู่ภาวะฉ่ำน้ำในที่สุด (Soundararajan *et al*., 2017) นอกจากนี้ จากการที่ BA สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อในหลอดทดลองสร้างก๊าซเอทิลีนได้นั้น (Saha *et al*., 2007) ก๊าซดังกล่าวนี้สามารถกระตุ้น NADPH oxidase ให้สร้าง ROS สูงขึ้น และส่งผลให้เกิดยอดฉ่ำน้ำได้เช่นเดียวกัน (Saher *et al*., 2004) การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น สามารถทำให้เกิดยอดใหม่ที่มีลักษณะผิดปกติได้ดังที่พบในต้น *C. amboinicus* (Arumugam *et al*., 2020) ดังนั้น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องใช้ในระดับที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดยอดฉ่ำน้ำหรือยอดที่มีลักษณะผิดปกติ

จากข้อมูลทั้งหมดบ่งชี้ว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นกะเพราหินปูนในหลอดทดลอง เนื่องจากสูตรอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ในปริมาณที่มากกว่าอาหารสูตรอื่นโดยไม่ทำให้เกิดยอดฉ่ำน้ำ ทั้งยังมีผลกระทบต่อการยืดยาวของยอดและการพัฒนาของรากน้อย ทั้งนี้ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ยังเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้น *C. rotundifolius* อีกด้วย (Asha *et al*., 2013)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้วิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นกะเพราหินปูนซึ่งใช้เวลาทั้งสิ้น 24 สัปดาห์ ซึ่งวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดในการศึกษานี้ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ และเมล็ดมีอัตราการงอกที่ร้อยละ 100 จากการเลือกต้นกล้าอายุ 8 สัปดาห์ และมีความสูง 4 เซนติเมตร มาตัดเอาส่วนลำต้นที่มีข้อแรกนับจากโคนลำต้นให้มีความสูง 1.5 เซนติเมตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าได้ยอดใหม่จำนวน 4.70 $\pm$ 0.15 ยอด/ชิ้นพืช และยอดใหม่มีความสูง 3.12 $\pm$ 0.40 เซนติเมตร โดยยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากอาหารสูตรนี้ไม่มีลักษณะฉ่ำน้ำ ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากสูตรอาหารข้างต้นถูกตัดแยกเป็นยอดเดี่ยวและนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 6 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้ยอดเกิดการยืดยาวและการพัฒนาของรากจนยอดพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งสามารถนำไปอนุบาลออกปลูกได้ต่อไป ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พืชถิ่นเดียวชนิดนี้ไม่ให้สูญพันธุ์ และอาจใช้เป็นเครื่องมือในการเพิ่มปริมาณพืชสมุนไพรชนิดนี้ให้ได้จำนวนมากเพื่อสนับสนุนการผลิตสารสำคัญและการศึกษาด้านพฤกษเคมี ซึ่งจะทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่จากพืชชนิดนี้ อันจะทำให้เกิดความตระหนักและเห็นความสำคัญของต้นกะเพราหินปูนมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยมหิดล และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

เอกสารอ้างอิง

Arumugam, G., Sinniah, U.R., Swamy, M.K., & Lynch, P.T. (2002). Micropropagation and essential oil characterization of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Sprengel, an aromatic medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *56*, 491–503.

Auer, A.A., Motyka, V., Brezinová, A., & Kamínek, M. (1999). Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. *Physiologia Plantarum*, *105*, 141-147.

Asha, K.I., Dwivedi, N.K., Devi, A.I., & Nair, R.A. (2013). *In vitro* propagation of Chinese Potato (*Plectranthus rotundifolius* (Poir.) J.K. Morton) through axillary shoot bud culture. *Journal of Root Crops*, *39*(2), 62-67.

Balasubramanya, S., Rajanna, L., & Anuradha, M. (2012). Effect of plant growth regulators on morphogenesis and forskolin production in *Plectranthus barbatus* Andrews. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *48*, 208-215.

Behera, S., Kar, S.K., Rout, K.K., Barik, D.P., Panda, P.C., & Naik, S.K. (2019). Assessment of genetic and biochemical fidelity of field-established *Hedychium coronarium* J. Koenig regenerated from axenic cotyledonary node on meta-topolin supplemented medium. *Industrial Crops & Products, 134,* 206-215.

Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., & Lo Schiavo, F. (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, *216*(3), 413-421.

Chamchumroon, V. (2017). *Threatened Plants in Thailand*. Bangkok: Office of the Forest Herbarium, Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation, Ministry of Natural Resources and Environment.

Charoensub, R., Thiantong, D., & Phansiri, S. (2008). Micropropagation of bat flower plant, *Tacca chantrieri* Andre. *Kasetsart Journal of Natural Science*, *42*, 7-12.

Chuengpanya, R., Pornchuti, W., Muangkroot, A., Jenjittikul, T., & Chuenboonngarm, N. (2020). *In vitro* propagation of *Zehneria platysperma* (W.J. de Wilde & Duyfjes) H. Schaef. & S.S. Renner (Cucurbitaceae), an endemic plant of Thailand. *Acta Horticulturae*, *1285*, 221–230.

Fuadi, M., Mohamed, M.T.M., Salleh, N.S., Anwar, M.P., Awang, Y., & Fauz, R.M. (2014). Effect of different concentrations of benzyladenine and frequency of watering on growth and quality of *Dracaena sanderiana* and *Codiaeum variegatum*. *Journal of Environmental Biology*, *35*, 1047-1052.

Gaba, V.P. (2005). Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In R.N. Trigiano, D.J. Gray. (Eds.), *Plant Development and Biotechnology*. (pp. 87–99). Boca Raton, FL: CRC Press.

George, E.F., Hall, M.A., & Klerk, G.J.D. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture – Volume 1: The Background (3rd Edition). Dordrecht: Springer.

Gordon, S.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C., & Meyerowitz, E.M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16529-16534.

Govindaraju, P., & Arulselvi, S. (2018). Effect of cytokinin combined elicitors (l-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on *in vitro* propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb – *Coleus aromaticus* Benth (L). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *17*(4), 435-444.

Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D.W., & Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 14288-14293.

Hazarika, B.N., & Bora, A. (2010). Hyperhydricity – a bottleneck to micropropagation of plants. *Acta Horticulturae*, *865*, 95-101.

Kapewangolo, P. & Meyer, D. (2018). *Plectranthus barbatus*; antioxidant, and other inhibitory responses against HIV/AIDS. In V.R. Preedy, R.R. Watson. (Eds.), *HIV/AIDS - Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. (pp.149-159). London: Academic Press.

Kebede, B., & Abera, B. (2015). Micropropagation of *Plectranthus edulis* (Vatke) Agnew from shoot tip and nodal explants. *African Journal of Agriculture Research*, *10*(1), 6-13.

Krishna, G., Reddy, S., Nair, N.A., Ramteke, P.W., & Bhattacharya, P.S. (2010). *In vitro* direct shoot regeneration from proximal, middle and distal segment of *Coleus forskohlii* leaf explants. *Physiology & Molecular Biology of Plants*, *16*, 195-200.

Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z., & Klee, H.J. (1989) Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentyl transferase gene. *Plant Cell*, *1*, 403-413.

Medplant Mahidol. (2016). *Plectranthus albicalyx S. Suddee LAMIACEAE*. Retrieved January 28, 2021, from https://www.matichonweekly.com/column/article_5504. (in Thai)

Mišic, D.M., Ghalawenji, N.A., Grubišic, D.V., & Konjevic, R.M. (2006). Micropropagation and reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an endemic and critically endangered Perennial of Serbia. *Phyton*, *45*, 9-20.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473-497.

Nagpal, A., Singh, B., Sharma, S., Rani, G., & Virk, G.S. (2008). *Coleus* spp.: micropropagation and *in vitro* production of secondary metabolites. *Medicinal & Aromatic Plant Science & Biotechnology*, *2*(1), 1-17.

Novák, J., Pavlu, J., Novák, O., Nozkova-Hlavackova, V., Spundova, M., Hlavinka, J., Koukalova, S., Skalak, J., Cerny, M., & Brzobohaty, B. (2013). High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of Botany*, *112*, 41-55.

Paton, A.J., Mwanyambo, M., Govaerts, R.H.A., Smitha, K., Suddee, S., Phillipson, P.B., Wilson, T.C., Forster, P.I., & Culham, A. (2019). Nomenclatural changes in *Coleus* and *Plectranthus* (Lamiaceae): a tale of more than two genera. *PhytoKeys*, *129*, 1-158.

Rahman, Z.A., Noor, E.S.M., Ali, M.S.M., Mirad, R., & Othman, A.N. (2015). *In vitro* micropropagation of a valuable medicinal plant, *Plectranthus amboinicus*. *American Journal of Plant Sciences*, *6*, 1091-1097.

Rajaram, K., Sriramji, P., & Sureshkumar, P. (2015). Micropropagation, antioxidant and antimicrobial effect of *Plectranthus bourneae* Gamble: an endangered medicinal plant. Journal of Chemical and *Pharmaceutical Sciences*, *8*(1), 142-147.

Saengsawang, P., Chintakovid, W., Putthai, T., Traiperm, P., & Pichakum, A. (2015). Phenology of *Plectranthus albicalyx* Suddee grown in Kanchanaburi province. In *Proceedings of the 9th Botanical Conference of Thailand*. (pp. 32-39). Thailand: Bangkok.

Saha, S., Mori, H., & Hattori, K. (2007). Synergistic effect of kinenin and benzyl adenine plays avital role in high frequency regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) in relation to ethylene production. *Breeding Science*, *57*, 197–202.

Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E., & Olmos, E. (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, *120*(1), 152–161.

Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J.K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *42*(3), 206-214.

Shivaprasad, H.N., Pandit, S., Bhanumathy, M., Manohar, D., Jain, V., Thandu, S.A., & Su, X. (2014). Ethnopharmacological and phytomedical knowledge of *Coleus forskohlii*: an approach towards its safety and therapeutic value. *Oriental Pharmacy & Experimental Medicine*, *14*, 301-312.

Skalák, J., Vercruyssen. L., Claeys, H., Hradilová, J., Cerný, M., Novák, O., Placková, L., Saiz-Fernández., I., Skaláková, P., Coppens, F., Dhondt, S., Koukalová, Š., Zouhar, J., Inzé, D., & Brzobohatý, B. (2019). Multifaceted activity of cytokinin in leaf development shapes its size and structure in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *97*, 805-824.

Soundararajan, P., Manivannan, A., Cho, Y.S. & Jeong, B.R. (2017). Exogenous supplementation of silicon improved the recovery of hyperhydric shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by stabilizing the physiology and protein expression. *Frontiers in plant science*, *8*, 738. (DOI 10.3389/fpls.2017.00738)

Sreedevi, E., Anuradha, M., & Pullaiah, T. (2013). Plant regeneration from leaf-derived callus in *Plectranthus barbatus* Andr. [Syn.: Coleus forskohlii (Wild.) Briq.]. *African Journal of Biotechnology*, *12*(18), 2441-2448.

Suddee, S., Paton, A.J., & Parnell, J.A.N. (2004). A taxonomic revision of tribe Ocimeae Dumort. (Lamiaceae) in continental South East Asia II. Plectranthinae. *Kew Bullentin*, 59, 379-414.

Thangavel, P., Britto, S.J., & Senthilkumar, S.R. (2011). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of the valuable medicinal herb *Plectranthus barbatus* Andrews. *African Journal of Biotechnology*, *10*(43), 8562-8569.

Thangavel, P., Prabhu, S., & Britto, S.J. (2014). High frequency shoots regeneration from nodal explants of *Plectranthus barbatus* Andrews belong to the Lamiaceae. *Journal of the Andaman Science Association*, *19*(2), 126-135.

Thaniarasu, R., Kumar, T.S., & Rao, M.V. (2015). *In vitro* propagation of *Plectranthus bourneae* Gamble - an endemic red listed plant. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, *25*(2), 273-284.

Thaniarasu, R., Kumar, T.S., & Rao, M.V. (2016). Mass propagation of *Plectranthus bourneae* Gamble through indirect organogenesis from leaf and internode explants. *Physiology & Molecular Biology of Plants*, 22, 143-151.

Thaniarasu, R., Kumar, T.S., & Rao, M.V. (2018). Rapid *in vitro* propagation by liquid culture system and genetic homogeneity assessment of *Plectranthus bourneae* Gamble, an endemic plant species to South India. *Indian Journal of Plant Physiology*, *23*, 376–384.

Tsegaw, M., & Feyissa, T. (2014). Micropropagation of *Plectranthus edulis* (Vatke) Agnew from meristem culture. African Journal of Biotechnology, 13(36), 3682-3688.

UNCED. (1992). *Convention on Biological Diversity*. Geneva: United Nations Conference on Environment and Development.

Wang, L., Du, Y., Rahman, M.M., Tang, B, Fan, L.J., & Kilaru, A. (2018). Establishment of an efficient *in vitro* propagation system for *Iris sanguinea*. *Scientific Reports*, *8*, 17100. (DOI 10.1038/s41598-018-35281-y)

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(18), 10487–10492.