วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.3) September – December 2022 บทความวิจัย

การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นจอกหินตะนาวศรี (*Dorcoceras brunneum* C.Puglisi) พืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย

In vitro Propagation of *Dorcoceras brunneum* C.Puglisi, An Endangered Plant of Thailand

โรจนกร เชิงปัญญา, นิรุตต์ จงศร, อัจฉรา เมืองครุฑ, วิทยาพร พรชุติ, ทยา เจนจิตติกุล และ งามนิจ ชื่นบุญงาม*

Rodjanacorn Chuengpanya, Nirut Jongsorn, Atchara Muangkroot, Witayaporn Pornchuti, Thaya Jenjittikul and Ngarmnij Chuenboonngarm*

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University

Received : 13 October 2021
Revised : 18 January 2022
Accepted : 3 February 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรี (*Dorcoceras brunneum* C.Puglisi) ซึ่งเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทยโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ชิ้นส่วนเริ่มต้นใช้ใบตำแหน่งที่ 2 และ 3 ซึ่งมีขนาดความยาว 3.5 – 4 เซนติเมตร และกว้าง 1.5 – 2 เซนติเมตร ถูกตัดออกจากบริเวณยอดของยอดปลอดเชื้อที่มีอายุ 16 สัปดาห์ จากนั้นตัดเฉพาะส่วนกลางและโคนใบให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่มีเบนซิลอะดีนีน (N^6-benzyladenine: BA) เข้มข้น 0 – 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดแนฟทาลีนอะซิติก (1-napthaleneacetic acid: NAA) เข้มข้น 0 – 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 16 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าการเลี้ยงส่วนกลางใบของต้นจอกหินตะนาวศรีบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่ได้สูงสุด (17.5 ยอด/ชิ้นพืช) กอของยอดใหม่ที่เกิดจากสูตรอาหารนี้ถูกนำมาตัดแยกเป็นยอดเดี่ยว ก่อนนำยอดเดี่ยวที่มีความสูง 1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารลดลงครึ่งหนึ่ง (½MS) หรือเข้มข้นตามปกติ ซึ่งมีการเติมหรือไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal: AC) ปริมาณ 2 กรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก เมื่อเลี้ยงยอดบนสูตรอาหารข้างต้นนาน 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มี AC สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ดีที่สุด (จำนวนรากใหม่ 15.6 ราก/ยอด, ความยาวรากใหม่ 2.1 เซนติเมตร) ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการขยายและอนุรักษ์พันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรี ซึ่งจะเป็นการช่วยอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุ์พืชของประเทศไทยอีกทางหนึ่ง

คำสำคัญ : ต้นจอกหินตะนาวศรี ; พืชเฉพาะถิ่น ; การขยายพันธุ์โดยจุลวิธี ; การเกิดอวัยวะจากชิ้นพืชเริ่มต้นโดยตรง

Abstract

This research presented a propagation protocol for *Dorcoceras brunneum* C.Puglisi, which is an endangered plant of Thailand, using plant tissue culture technique. The 2nd and 3rd leaves, 3.5 – 4 cm long and 1.5 – 2 cm wide, were cut from shoots of 16-week-old axenic shoots and were chosen as explant material. Then, only middle and basal parts of them were cut to 0.5 x 0.5 cm^2. The explants were cultured on Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 0 – 1 mg/L N^6-benzyladenine (BA) and 0 – 0.5 mg/L 1-napthaleneacetic acid (NAA) for 16 weeks. The results showed that culturing the middle part of leaf onto MS medium augmented with 1 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA produced the highest number of new shoots (17.5 shoots/explant). Bunches of regenerated shoots from this medium were separated into a single shoot. The single shoot at the height of 1 cm was cultured onto half-strength (½MS) or full-strength MS medium with or without supplementation of 2 g/L activated charcoal (AC) for root induction. After culturing shoots on these media for 8 weeks, ½MS medium supplemented with AC resulted in the best root regeneration (new roots number 15.6 roots/shoot, new root length 2.1 cm). The data obtaining from this study will be helpful for propagation and conservation of *D. brunneum*, which may provide as another way for maintaining diversity of plant in Thailand.

Keywords : *Dorcoceras brunneum* ; endemic plant ; micropropagation ; direct organogenesis

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

บทนำ

Dorcoceras เป็นพืชสกุลหนึ่งในวงศ์ Gesneriaceae ซึ่งทั่วโลกพบเพียง 6 ชนิด โดยกระจายพันธุ์ในประเทศอินเดีย จีน พม่า ไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย ในประเทศไทยนั้นพบพืชสกุลนี้ 4 ชนิด ซึ่ง 2 ใน 4 ชนิด ดังกล่าวถูกจัดเป็นพืชที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น คือ *Dorcoceras brunneum* C.Puglisi และ *Dorcoceras glabrum* C.Puglisi และพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ ยังจัดเป็นพืชชนิดใหม่ (new species) ที่พึ่งได้รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์เมื่อปี ค.ศ. 2017 อีกด้วย (Puglisi & Middleton, 2017) สำหรับต้นจอกหินตะนาวศรีหรือ *D. brunneum* นั้น พบการกระจายพันธุ์ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และบริเวณภูเขาหินปูนและป่าเบญจพรรณของจังหวัดกาญจนบุรี ไม้เนื้ออ่อนชนิดนี้มีความยาวและความกว้างของแผ่นใบประมาณ 0.5 – 2 และ 4 – 10 เซนติเมตร ตามลำดับ ช่อดอกเป็นแบบกระจุก (cyme) ประกอบไปด้วยดอกสีม่วงจำนวน 3 – 12 ดอก และก้านชูช่อดอกที่ยาว 9 – 15 เซนติเมตร (ภาพที่ 1ก) (Puglisi & Middleton, 2017) ด้วยขนาดที่เล็กและมีดอกสวยงามนี้ จึงทำให้พืชชนิดนี้มีศักยภาพต่อการนำมาพัฒนาให้เป็นไม้ประดับประเภทไม้กระถางเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทยได้ หากแต่ต้นจอกหินตะนาวศรีมีขอบเขตการแพร่กระจาย (extent of occurrence) เพียง 130 ตารางกิโลเมตร และพื้นที่กระจายพันธุ์บางส่วนไม่ได้อยู่ในเขตอนุรักษ์พันธุ์พืช ทำให้พืชชนิดนี้เสี่ยงต่อการถูกรบกวนจากกิจกรรมของมนุษย์ จึงส่งผลให้ต้นจอกหินตะนาวศรีควรได้รับการประเมินสถานะให้เป็นชนิดพันธุ์ใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) ของประเทศไทย (Puglisi & Middleton, 2017) ดังนั้นการศึกษาเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรี ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีที่ช่วยธำรงไว้ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง

ภาพที่ 1 ต้นจอกหินตะนาวศรีในถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ (ก) และผลของพืชชนิดนี้ที่นำมาใช้ระหว่างขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวเพื่อชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อปลอดเชื้อในหลอดทดลอง (ข, บาร์ = 2 เซนติเมตร)

จากการที่ประเทศไทยได้เข้าร่วมเป็นสมาชิกของภาคีอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity) และได้ดำเนินตามข้อตกลง “เป้าหมายความหลากหลายทางชีวภาพไอชิ (Aichi Biodiversity Targets)” ด้วยการเพิ่มพื้นที่อนุรักษ์ชนิดพันธุ์สิ่งมีชีวิตให้ครอบคลุมมากขึ้นไปแล้วนั้น (Chotthong *et al*., 2019) หากแต่การอนุรักษ์พันธุ์พืช เช่น กลุ่มพืชหายาก พืชเฉพาะถิ่น หรือพืชใกล้สูญพันธุ์อย่างยั่งยืนนั้น นอกเหนือไปจากวิธีการจัดการที่มีประสิทธิภาพจากภาครัฐแล้ว ควรมีการศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพและการหาวิธีการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ จากต้นพืชควบคู่ไปด้วย อันจะเป็นการช่วยอนุรักษ์พันธุ์พืชอย่างยั่งยืนได้ ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตอบสนองต่อการรักษาพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถขยายพันธุ์ต้นพืชปลอดเชื้อได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (Geroge *et al*., 2008) จึงทำให้มีจำนวนต้นพืชเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ของมนุษย์โดยไม่ไปรบกวนประชากรพืชในธรรมชาติ (Prameela *et al*., 2015) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังอาจเป็นเพียงวิธีเดียวที่สามารถใช้ในการอนุรักษ์หรือขยายพันธุ์พืชที่มีข้อจำกัดสูง เช่น สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ผ่านการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชที่ผสมตัวเองไม่ได้ (self-incompatible) (Mycock *et al*., 1997) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้พืชที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไม่ต่ำกว่า 170 ชนิด จาก 60 วงศ์ ได้รับการอนุรักษ์พันธุ์โดยการประยุกต์ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมด้วย (Benson, 1999) สำหรับพืชในวงศ์ Gesneriaceae นั้น ได้มีการศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองหลายชนิด เช่น *Chirita longgangensis* (Tang *et al*., 2007) *C. moonii* (Herath, 2013) *C. swinglei* (Chen *et al*., 2016) *Codonanthe devosiana* (Emer *et al*., 2018) *Dayaoshania cotinifolia* (Yang *et al*., 2014) *Henckelia incana* (Prameela *et al*., 2015) *Lysionotus pauciflorus* (Godo *et al*., 2010) *L. serratus* (Li *et al*., 2013) *Metabriggsia ovalifolia* (Ma *et al*., 2011; Ouyang *et al*., 2016) *Oreocharis mileense* (Wang *et al*., 2018) *Primulina tabacum* (Ma *et al*., 2010; Yang *et al*., 2012) *P. tamiana* (Padmanabhan *et al*., 2014) *Saintpaulia ionantha* (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Khan *et al*., 2007) *S. speciosa* (Pang *et al*., 2006; Park *et al*., 2012; Blinstrubiene *et al*., 2020) และ *Titanotrichum oldhamii* (Takagi *et al*., 2011) เป็นต้น โดยงานวิจัยเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์ต้นพืชให้ได้จำนวนมากเพื่ออนุรักษ์พันธุ์นอกถิ่นอาศัยหรือนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้า หรือนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

การได้มาซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae ที่มีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชวงศ์นี้ ได้แก่ การเลือกใช้ชิ้นส่วนพืช วิธีการชักนำให้เกิดยอดใหม่ การเลือกใช้ระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตระหว่างการเพิ่มปริมาณยอดใหม่ การใช้ความเข้มข้นของปริมาณธาตุอาหารที่ต่างกันและอิทธิพลร่วมของการเติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal : AC) ระหว่างการชักนำให้เกิดรากใหม่ ซึ่งแต่ละรายงานมีวิธีการขยายพันธุ์พืชที่ต่างกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชแต่ละชนิด จากการที่ยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นจอกหินตะนาวศรี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานแรกที่ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ในหลอดทดลอง โดยปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นได้ถูกศึกษาในงานวิจัยนี้เพื่อสร้างวิธีที่มีประสิทธิภาพต่อการขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลอง ข้อมูลที่นำเสนอในการศึกษานี้นอกจากจะสามารถใช้เป็นเครื่องมือเพื่ออนุรักษ์พันธุ์พืชชนิดนี้แล้ว ยังอาจสามารถเป็นข้อมูลเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาด้านอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต เช่น การผลิตต้นพืชให้มีปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ศักยภาพต่อการเป็นไม้ประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่

หรือศึกษาการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เป็นต้น นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้ยังอาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Dorcoceras* ชนิดอื่น ๆ ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลสำหรับการต่อยอดเพื่อศึกษาในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชหรือการวิจัยด้านชีววิทยา/อณูชีววิทยา ซึ่งจะเป็นสร้างองค์ความรู้ใหม่จากต้นจอกหินตะนาวศรี อันจะทำให้พืชชนิดนี้มีคุณค่าและความสำคัญมากยิ่งขึ้น และสามารถนำไปสู่การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุ์พืชของประเทศไทยอย่างยั่งยืนต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชเริ่มต้นของต้นจอกหินตะนาวศรี

นำใบและผลของต้นจอกหินตะนาวศรีจาก จ. กาญจนบุรี มาฟอกฆ่าเชื้อผิว (ภาพที่ 1ข) โดยนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและสบู่เหลวเพื่อขจัดฝุ่นละอองที่ติดอยู่บริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชออก จากนั้นนำส่วนใบและผลจุ่มลงในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 30 วินาที และนำไปฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยน้ำกลั่นที่ผสมด้วยคลอร็อกซ์ (Clorox®, USA) เข้มข้น 15% และ 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ร่วมกับการเติม Tween®-20 (Merck, Germany) ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/100 มิลลิลิตร ชิ้นพืชถูกนำไปล้างสารเคมีออกโดยใช้น้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

น้ำกลั่นที่ใช้ในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวและอุปกรณ์ตัดย้ายเนื้อเยื่อพืชในงานวิจัยนี้ถูกทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้แรงดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที สำหรับคลอร็อกซ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีสารออกฤทธิ์สำคัญโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) เข้มข้น 6% (ปริมาตร/ปริมาตร) ขณะที่ Tween®-20 มีสารออกฤทธิ์สำคัญคือ polyethylene glycol sorbitan monolaurate

การชักนำให้เกิดยอดปลอดเชื้อ

ใบและผลของต้นจอกหินตะนาวศรีที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวถูกนำมาใช้เป็นชิ้นพืชเริ่มต้นสำหรับชักนำให้เกิดยอดปลอดเชื้อในหลอดทดลอง โดยนำใบมาตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) ที่มีเบนซิลอะดีนิน (N^6-benzyladenine: BA) (Sigma, USA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดแนฟทาลีนอะซีติก (1-napthaleneacetic acid, NAA) (Sigma, USA) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร จากการที่ผลของพืชชนิดนี้มีขนาดเล็ก จึงไม่สามารถแยกเมล็ดออกจากผลได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำผลมาตัดตามขวางให้มีความยาว 1 เซนติเมตร แล้วจึงตัดผ่าครึ่งตามยาว ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต บันทึกผลการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพของชิ้นพืชหลังจากเลี้ยงในหลอดทดลองครบ 1 สัปดาห์

อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ใช้ตลอดการศึกษานี้ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร และผงวุ้น 7.5 กรัม/ลิตร มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.7 – 5.8 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที อาหารถูกบรรจุในขวดแก้วปริมาตร 120 มิลลิลิตร โดยแต่ละขวดทดลองบรรจุอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พืชทดลองถูกเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และได้รับความเข้ม

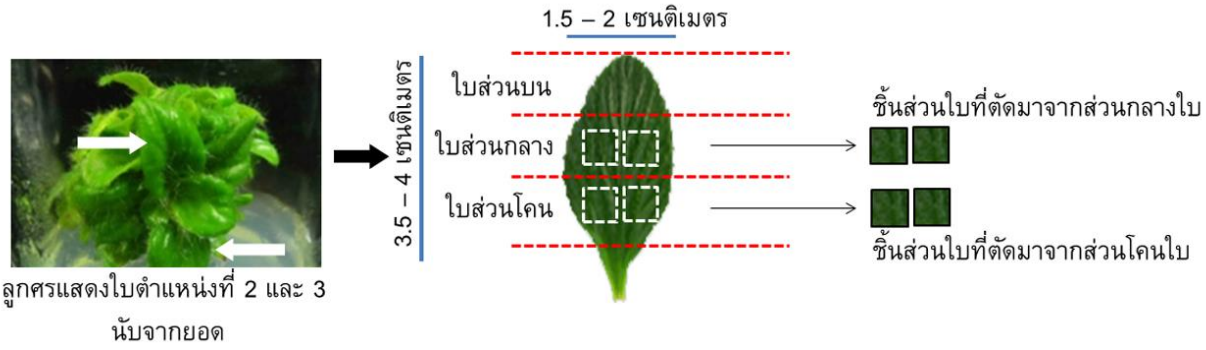
แสง 37 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที นาน 16 ชั่วโมง/วัน (ช่วงมืด 8 ชั่วโมง/วัน) จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาวโทนเย็น (ฟิลิปส์, ประเทศไทย)

การเพิ่มปริมาณพืชทดลอง

จากการที่ยอดปลอดเชื้อที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 มีปริมาณที่น้อย จึงเพิ่มปริมาณพืชทดลอง โดยนำกอของยอดปลอดเชื้อที่มีอายุ 16 สัปดาห์ จากขั้นตอนที่ 2 มาตัดแยกให้เป็นยอดเดี่ยวแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 8 สัปดาห์ แล้วย้ายชิ้นพืชไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 8 สัปดาห์ (เปลี่ยนย้ายต้นพืชสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์) ดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้ได้ปริมาณต้นพืชที่เพียงพอต่อการดำเนินงานวิจัย วิธีการข้างต้นนี้เป็นสูตรอาหารและวิธีพื้นฐานในการเพิ่มปริมาณพืชทดลองของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การศึกษาบริเวณของใบและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลอง

ยอดปลอดเชื้อของต้นจอกหินตะนาวศรีจากขั้นตอนที่ 3 ซึ่งมีใบตำแหน่งที่ 2 และ 3 (นับจากบริเวณยอดลงมา) ยาว 3.5 – 4 เซนติเมตร และกว้าง 1.5 – 2 เซนติเมตร ถูกนำมาใช้เป็นชิ้นพืชทดลอง จากนั้นตัดชิ้นส่วนใบจากบริเวณกลางใบและโคนใบให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร (ภาพที่ 2) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร รวมเป็นทั้งหมด 24 ชุดการทดลอง (ชิ้นพืช 2 ส่วน x สูตรอาหาร 12 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 1) โดยวางให้ด้านท้องใบ (abaxial surface) สัมผัสกับอาหาร บันทึกผลการเกิดยอดใหม่หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชครบ 16 สัปดาห์ (เปลี่ยนย้ายชิ้นพืชสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์)



ภาพที่ 2 วิธีการตัดชิ้นส่วนใบของต้นจอกหินตะนาวศรีเพื่อใช้ในการศึกษานี้

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นจอกหินตะนาวศรี

ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากบริเวณใบและสูตรอาหารที่ดีที่สุดถูกเลือกนำมาใช้ทดลองต่อ โดยกอของยอดใหม่ที่เจริญขึ้นจากชุดการทดลองนี้ถูกตัดแยกออกเป็นยอดเดี่ยว แล้วเลือกยอดที่มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารตามปกติหรือลดลงครึ่งหนึ่ง (½MS) โดยมีการเติมหรือไม่เติม AC (Sigma,

USA) ปริมาณ 2 กรัม/ลิตร ร่วมด้วย รวมเป็นทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 2) เมื่อเลี้ยงยอดบนสูตรอาหารดังกล่าวครบ 8 สัปดาห์ (ย้ายยอดสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์) บันทึกจำนวนรากและความยาวรากใหม่ที่เกิดขึ้น

การวางแผนการทดลอง มาตรฐานการวัดข้อมูล และการวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ชุดทดลองแต่ละชุดใช้จำนวนชิ้นพืช 20 ชิ้น ทำซ้ำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (รวมเป็น 60 ชิ้นพืช/ชุดทดลอง) ข้อมูลจำนวนยอดและรากที่เกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในขวดทดลองนับจากทุกยอดและทุกรากที่เกิดขึ้นใหม่ ขณะที่ความยาวของรากใหม่วัดจากรากที่ยาวที่สุดของแต่ละขวดทดลอง ข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม PASW Statistics 18.0 หากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance) ด้วยการทดสอบค่าเอฟ (F-test) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลถูกนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยต่อด้วยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) การทดสอบทางสถิติทุกขั้นตอนของการศึกษานี้วิเคราะห์ที่ระดับ $p<0.05$ การวิจัยนี้แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: S.D.)

ผลการวิจัย

การชักนำให้เกิดยอดปลอดเชื้อในหลอดทดลองและการเพิ่มปริมาณพืชทดลอง

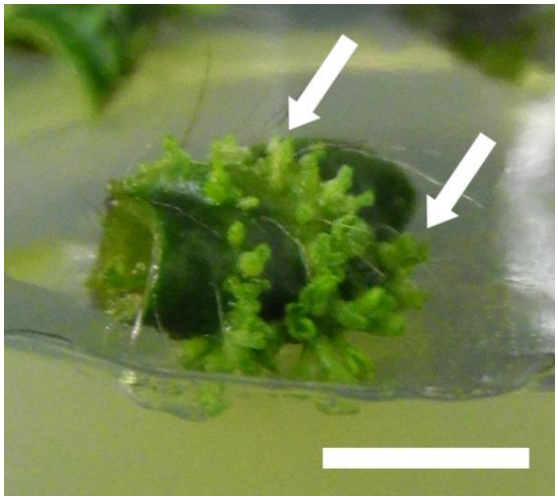
หลังจากนำใบที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวและถูกตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ครบ 1 สัปดาห์ พบว่าทุกใบพืชมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ (contaminate) ขณะที่ชิ้นพืชส่วนผลซึ่งเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพที่ร้อยละ 33 หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชครบ 1 สัปดาห์ ชิ้นพืชส่วนผลเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงและเห็นเป็นยอดอ่อนขนาดเล็กเมื่อเลี้ยงชิ้นพืชในสภาพปลอดเชื้อครบ 8 สัปดาห์ และเมื่อเลี้ยงชิ้นพืชส่วนผลครบ 24 สัปดาห์ พบว่าชิ้นพืชส่วนนี้มีการเจริญของยอดอ่อนที่แน่นติดกันเป็นกระจุก ใบมีการแผ่ขยายขนาดมากขึ้น อีกทั้งยอดยังมีความสมบูรณ์สามารถนำไปใช้ศึกษาหรือทำการทดลองต่อไป

เนื่องจากยอดปลอดเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นพืชส่วนผลมีจำนวนน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อการดำเนินการทดลองได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงได้ดำเนินการเพิ่มปริมาณพืชทดลองให้มีจำนวนเพียงพอต่อการดำเนินงานวิจัย โดยเลี้ยงยอดเดี่ยวบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 8 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายยอดไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 8 สัปดาห์ เพื่อล้างอิทธิพลของ BA ที่อาจส่งผลกระทบต่อผลการทดลองในขั้นตอนต่อไป ผลการสังเกตระหว่างการเพิ่มปริมาณพืชทดลองโดยใช้ส่วนยอดเป็นชิ้นพืชนี้ พบว่ายอดใหม่เจริญขึ้นโดยตรงจากบริเวณข้อของชิ้นพืช (direct organogenesis) โดยไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น

การศึกษาบริเวณของใบและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลอง

เมื่อนำใบตำแหน่งที่ 2 และ 3 (นับจากบริเวณยอดลงมา) ที่มีความยาว 3.5 – 4 เซนติเมตร และกว้าง 1.5 – 2 เซนติเมตร จากยอดปลอดเชื้อของต้นจอกหินตะนาวศรีที่มีอายุ 16 สัปดาห์ มาตัดเอาชิ้นส่วนใบขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร จากบริเวณกลางและโคนของใบ ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่แตกต่างกันนาน 4 สัปดาห์ ผลการสังเกตพบว่าชุดการทดลองส่วนมากมีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้เลี้ยงชิ้นพืช โดยพบว่า

ยอดใหม่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชทดลองโดยตรง (ภาพที่ 3) โดยเห็นเป็นยอดสีเขียวขนาดเล็กกระจายทั่วไปบนชิ้นส่วนใบ หากแต่ยังไม่สามารถนับจำนวนได้อย่างชัดเจน ในขณะที่บางชุดการทดลอง เช่น ชิ้นส่วนใบจากบริเวณโคนใบที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ยังไม่พบการเจริญของยอดแต่พบการเจริญของรากใหม่จำนวนมากบริเวณบนผิวใบ (ภาพที่ 4 – 5)



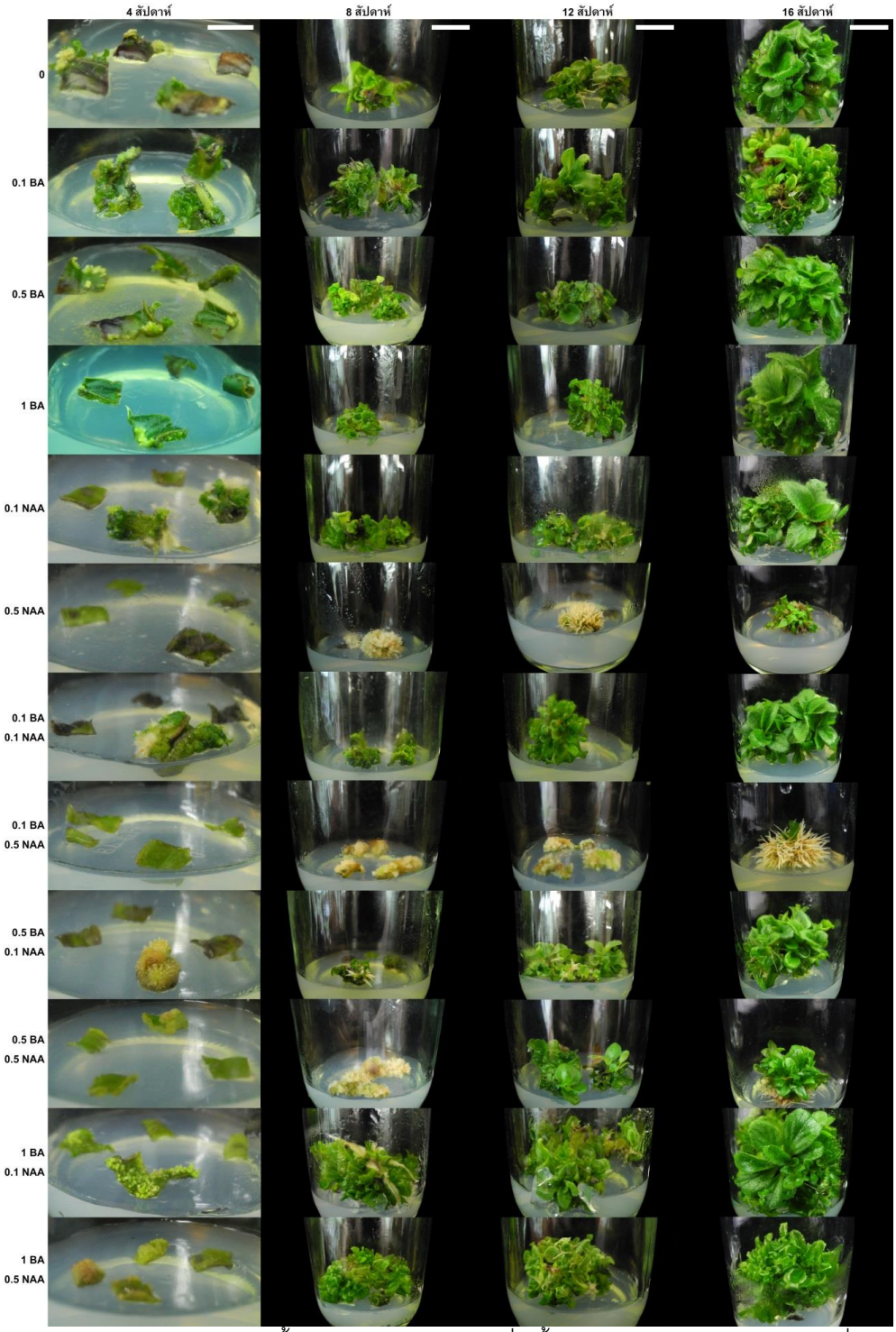
ภาพที่ 3 การเกิดยอดใหม่จากชิ้นพืชส่วนใบของต้นจอกหินตะนาวศรีซึ่งพบว่ายอดใหม่ (ลูกศร) เจริญขึ้นโดยตรงจากชิ้นพืชทดลอง (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ชิ้นพืชมีการตอบสนองต่ออาหารสังเคราะห์ ตลอดจนมีการพัฒนาและเห็นเป็นยอดชัดเจนมากขึ้นตามลำดับหลังจากเลี้ยงครบ 8 และ 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 4 – 5) โดยผลการทดลองที่ 16 สัปดาห์ พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถนับจำนวนยอดได้อย่างชัดเจน และยังพบว่าชิ้นส่วนใบทุกชิ้นสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้โดยไม่พบการเจริญของแคลลัส หากแต่ชิ้นส่วนใบจากกลางใบและโคนใบมีการชักนำให้จำนวนยอดใหม่ที่แตกต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหาร โดยผลการทดลองของชิ้นส่วนใบจากกลางใบพบว่าการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ 10.7 ยอด/ชิ้นพืช ขณะที่การเลี้ยงชิ้นพืชบนอาหารที่มี BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว พบว่า BA และ NAA ที่ระดับ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืชที่ดีกว่าความเข้มข้นระดับอื่น (11.1 ยอด/ชิ้นพืช) อีกทั้งยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ BA หรือ NAA เกินจากระดับข้างต้น ส่งผลให้จำนวนยอดใหม่ลดลง การเลี้ยงชิ้นส่วนใบจากบริเวณกลางใบบนอาหารที่มี BA และ NAA ร่วมกันนั้น พบว่าอาหารที่มี BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ได้จำนวนยอดใหม่ต่ำสุดจากทั้ง 24 ชุดการทดลอง (1.8 ยอด/ชิ้นพืช) ขณะที่อาหารที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ได้จำนวนยอดใหม่สูงถึง 17.5 ยอด/ชิ้นพืช ซึ่งเป็นจำนวนยอดใหม่ที่สูงสุดจากทั้ง 24 ชุดการทดลอง ผลการทดลองในอาหารที่เติม BA ร่วมกับ NAA ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ในอาหารกลุ่มนี้ ส่งผลให้ได้

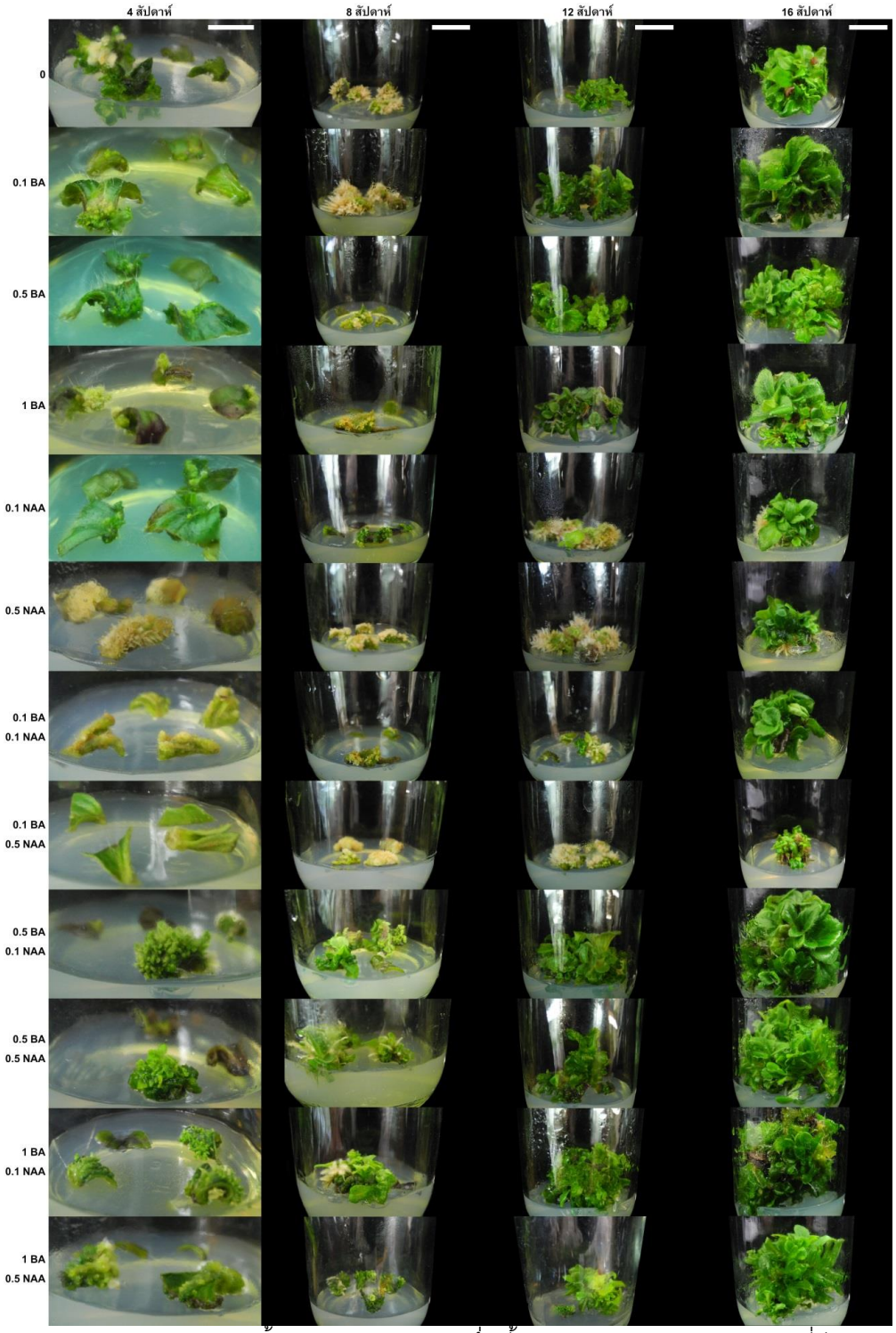
จำนวนยอดใหม่ลดลง เช่น ในอาหารที่มี BA เข้มข้น 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร หากเพิ่มความเข้มข้นของ NAA เป็น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ายอดใหม่มีจำนวนลดลง เป็นต้น (ภาพที่ 4, ตารางที่ 1) ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่จากทั้ง 12 ชุดการทดลองของชิ้นใบจากบริเวณกลางใบอยู่ที่ 10.3 ยอด/ชิ้นพืช

สำหรับชิ้นส่วนใบจากบริเวณโคนใบ ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่จากทั้ง 12 ชุดการทดลอง หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชครบ 16 สัปดาห์อยู่ที่ 9.1 ยอด/ชิ้นพืช โดยชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีการเติม BA หรือ NAA ให้จำนวนยอดใหม่ที่ 8.9 ยอด/ชิ้นพืช นอกจากนี้ ผลการทดลองของชิ้นพืชส่วนนี้คล้ายคลึงกับการเลี้ยงชิ้นส่วนใบจากกลางใบ กล่าวคือ อาหารที่มี BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว หากใช้ความเข้มข้นเกินกว่าระดับ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร หรือหากใช้ความเข้มข้นของ NAA ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารที่มี BA ร่วมกับ NAA ส่งผลให้จำนวนยอดใหม่ลดลง โดยพบว่าอาหารที่มี BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนยอดใหม่เพียง 2.8 ยอด/ชิ้นพืช ซึ่งเป็นจำนวนยอดใหม่ที่น้อยที่สุดของการใช้ชิ้นส่วนใบจากบริเวณโคนใบเป็นพืชทดลอง ขณะที่อาหารที่มี BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร พบจำนวนยอดใหม่ 13.1 ยอด/ชิ้นพืช ซึ่งเป็นจำนวนยอดใหม่สูงสุดของการใช้ชิ้นใบจากส่วนโคนใบ (ภาพที่ 5, ตารางที่ 1)

จากข้อมูลทั้งหมดสามารถกล่าวได้ว่าชิ้นส่วนใบจากบริเวณกลางใบที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เหมาะสมต่อการนำมาใช้เพื่อขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลอง เนื่องจากชุดการทดลองนี้ให้จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืชสูงที่สุดจากทั้ง 24 ชุดการทดลอง (ภาพที่ 4, ตารางที่ 1)



ภาพที่ 4 การเจริญของยอดใหม่จากชิ้นส่วนใบบริเวณกลางใบซึ่งเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA และ NAA เข้มข้นต่างกัน นาน 16 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4, 2 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 8 – 16)



ภาพที่ 5 การเจริญของยอดใหม่จากชิ้นส่วนใบบริเวณโคนใบซึ่งเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA และ NAA เข้มข้นต่างกัน นาน 16 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4, 2 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 8 – 16)

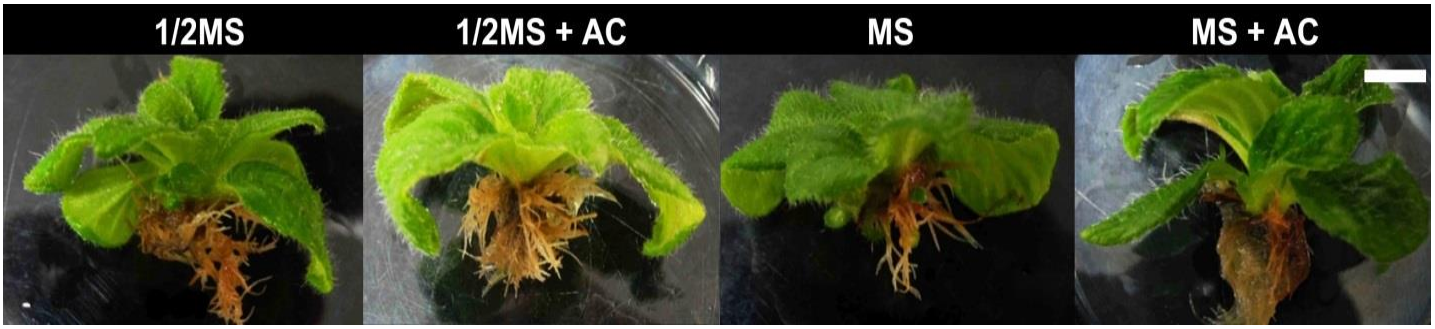
ตารางที่ 1 ผลของการเลี้ยงชิ้นส่วนใบซึ่งตัดจากบริเวณกลางใบหรือโคนใบบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA และ NAA แตกต่างกันนาน 16 สัปดาห์

ชิ้นส่วนใบ	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัม/ลิตร)		ร้อยละการชักนำให้เกิดยอดใหม่	จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช
	BA	NAA		
ส่วนกลางใบ	0	0	100	10.7 ± 3.5^{CDE}
	0.1	0	100	11.1 ± 2.8^{C}
	0.5	0	100	10.2 ± 1.8^{CDEFG}
	1	0	100	10.4 ± 2.1^{CDEF}
	0	0.1	100	11.1 ± 2.3^{C}
	0	0.5	100	4.3 ± 2.7^{I}
	0.1	0.1	100	10.6 ± 2.4^{CD}
	0.1	0.5	100	1.8 ± 1.1^{K}
	0.5	0.1	100	12.6 ± 2.5^{B}
	0.5	0.5	100	10.5 ± 4.0^{CDEF}
	1	0.1	100	17.5 ± 2.3^{A}
	1	0.5	100	12.6 ± 3.9^{B}
ส่วนโคนใบ	0	0	100	8.9 ± 2.8^{H}
	0.1	0	100	9.7 ± 2.1^{EFGH}
	0.5	0	100	9.5 ± 2.9^{FGH}
	1	0	100	9.1 ± 2.9^{GH}
	0	0.1	100	9.6 ± 2.4^{EFGH}
	0	0.5	100	3.2 ± 1.9^{J}
	0.1	0.1	100	9.8 ± 2.4^{EFGH}
	0.1	0.5	100	2.8 ± 2.0^{J}
	0.5	0.1	100	13.1 ± 4.3^{B}
	0.5	0.5	100	11.0 ± 2.5^{C}
	1	0.1	100	12.2 ± 2.6^{B}
	1	0.5	100	9.9 ± 3.1^{DEFGH}
F-test			NS	*

หมายเหตุ : ข้อมูล = ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. N = 20 ชิ้นพืช/ชุดทดลอง ทำซ้ำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง NS และ * แสดงความแตกต่างอย่างไม่มีและมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย F-test ตามลำดับ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามแนวตั้งของตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี DMRT (p<0.05)

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นจอกหินตะนาวศรี

หลังจากกอของยอดใหม่ซึ่งเจริญจากชิ้นส่วนใบบริเวณกลางใบที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มาแยกให้เป็นยอดเดี่ยว แล้วเลือกยอดเดี่ยวที่มีความสูง 1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารแตกต่างกัน ร่วมกับการเติมหรือไม่เติม AC เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ให้จำนวนรากใหม่ (10.9 ราก/ยอด) และความยาวรากใหม่ (0.5 เซนติเมตร) น้อยที่สุดจากทั้ง 4 ชุดการทดลอง ทั้งนี้การเติม AC ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS พบว่ามีรากใหม่จำนวน (11.8 ราก/ยอด) และความยาว (0.7 เซนติเมตร) เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ขณะที่การลดความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเป็น ½MS พบว่าได้จำนวนรากใหม่ (13.3 ราก/ยอด) และความยาวรากใหม่ (0.8 เซนติเมตร) ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่าการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร ½MS และเติม AC ร่วมด้วย ส่งผลให้รากของต้นจอกหินตะนาวศรีมีจำนวน (15.6 ราก/ยอด) และความยาวของรากใหม่ (2.1 เซนติเมตร) ที่สูงสุดจากทั้ง 4 ชุดการทดลอง ทั้งนี้ต้นพืชที่ได้จากอาหารสูตรนี้มีความพร้อมที่จะถูกนำไปอนุบาลออกปลูกต่อไป (ภาพที่ 6, ตารางที่ 2)



ภาพที่ 6 การเจริญของรากของต้นจอกหินตะนาวศรีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ซึ่งมีความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน และมีการเติมหรือไม่เติม AC ร่วมด้วย นาน 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ตารางที่ 2 การเกิดรากใหม่ของต้นจอกหินตะนาวศรี เมื่อนำยอดเดี่ยว ซึ่งเจริญจากชิ้นใบส่วนกลางใบบน อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มาเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน และมีการเติมหรือไม่เติม AC ร่วมด้วย นาน 8 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนรากใหม่/ยอด	ความยาวรากใหม่ (เซนติเมตร)
½MS	13.3 ± 2.6 ^{B}	0.8 ± 0.3 ^{B}
½MS + AC ปริมาณ 2.0 กรัม/ลิตร	15.6 ± 2.4 ^{A}	2.1 ± 0.3 ^{A}
MS	10.9 ± 1.7 ^{C}	0.5 ± 0.2 ^{C}
MS + AC ปริมาณ 2.0 กรัม/ลิตร	11.8 ± 1.1 ^{C}	0.7 ± 0.1 ^{B}
F-test	*	*

หมายเหตุ : ข้อมูล = ค่าเฉลี่ย ± S.D. N = 20 ยอด/ชุดทดลอง ทำซ้ำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย F-test ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามแนวตั้งของตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี DMRT (p<0.05)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้เพื่อชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อปลอดเชื้อในหลอดทดลองซึ่งสามารถกำหนดความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดนั้น เป็นขั้นตอนแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีความสำคัญและความละเอียดอ่อนอย่างยิ่ง โดยใบ (Khan *et al*., 2007; Tang *et al*., 2007; Ma *et al*., 2010, 2011; Takagi *et al*., 2011; Yang *et al*., 2012; Li *et al*., 2013; Prameela *et al*., 2015; Chen *et al*., 2016; Ouyang *et al*., 2016; Blinstrubiene *et al*., 2020) ยอดอ่อน (Herath, 2013) ข้อ (Padmanabhan *et al*., 2014) และตาดอก (Pang *et al*., 2006) เป็นชิ้นส่วนพืชที่ถูกนำมาใช้ในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายรายงาน จากการนำส่วนใบของต้นจอกหินตะนาวศรีมาฟอกฆ่าเชื้อผิวในการศึกษานี้ พบว่าชิ้นส่วนใบทุกชิ้นเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใบของพืชชนิดนี้มีขนขนาดเล็กปกคลุมทั่วทั้งใบ ประกอบกับลักษณะการเติบโตตามธรรมชาติของต้นจอกหินตะนาวศรีที่ใบจะเจริญใกล้ชิดกับผิวดิน (ภาพที่ 1ก) ลักษณะข้างต้นนี้จึงส่งผลให้ใบของต้นจอกหินตะนาวศรีเป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลชีพได้สูงและทำให้ยากต่อการฟอกบริเวณผิวใบให้ปลอดเชื้อ ดังนั้นใบจึงไม่ใช่แหล่งของชิ้นพืชเริ่มต้น (starting explant source) ที่ดีสำหรับต้นจอกหินตะนาวศรีหากฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการในการศึกษานี้ แต่สำหรับชิ้นพืชส่วนผลของต้นจอกหินตะนาวศรีซึ่งมีขนขนาดเล็กปกคลุมเช่นกันนั้น พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพเพียง 33% เมื่อเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อครบ 1 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพืชชนิดนี้มีก้านชูผลที่ยาว (ภาพที่ 1ข) จึงทำให้มีโอกาสสัมผัสกับผิวดินน้อยกว่าส่วนใบ ถึงแม้ว่าผลของต้นจอกหินตะนาวศรีจะมีขนาดเล็กและไม่สามารถแยกเมล็ดออกจากผลได้ชัดเจนจึงจำเป็นต้องเลี้ยงส่วนของผลที่มีเมล็ดติดไปด้วยนั้น ชิ้นพืชส่วนผลนี้ก็สามารถเจริญและพัฒนาให้ยอดใหม่ได้ตามปกติเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นพืชส่วนนี้ในหลอดทดลองครบ 16 สัปดาห์ ผลการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae บางชนิดที่ชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อปลอดเชื้อในหลอดทดลองโดยใช้เมล็ด (Godo *et al*., 2010; Park *et al*., 2012; Yang *et al*., 2014;

Emer *et al*., 2018; Wang *et al*., 2018) ด้วยเหตุนี้ ชิ้นพืชส่วนผลซึ่งมีเมล็ดอยู่จึงเหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งชิ้นพืชเริ่มต้นสำหรับชักนำให้เกิดยอดปลอดเชื้อในหลอดทดลองของต้นจอกหินตะนาวศรี เนื่องจากมีอัตราการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพที่ต่ำกว่าชิ้นพืชส่วนใบภายหลังขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิว อย่างไรก็ตาม จากการที่อายุและความสมบูรณ์ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นสามารถส่งผลต่อปริมาณและความสามารถในการเกิดยอดใหม่ปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนพืชภายหลังขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิว (George *et al*., 2008; Hu *et al*., 2020) ดังนั้นหากไม่มีข้อจำกัดต่อการได้มาซึ่งตัวอย่างผลหรือเมล็ดของต้นจอกหินตะนาวศรี จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในด้านอายุหรือช่วงพัฒนาการของผล/เมล็ดที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ปลอดเชื้อภายหลังขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิว ซึ่งจะทำให้วิธีการขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลองมีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น

การชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชวงศ์ Gesneriaceae พบรายงานจำนวนมากที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ผ่านกระบวนการ direct organogenesis ขณะที่รายงานบางส่วนชักนำให้เกิดพืชผ่านกระบวนการ direct embryogenesis (Tang *et al*., 2007; Padmanabhan *et al*., 2014; Ouyang *et al*., 2016) หรือชักนำให้เกิดยอดใหม่ผ่านกลุ่มเซลล์แคลลัส (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Khan *et al*., 2007; Godo *et al*., 2010; Ma *et al*., 2010; Takagi *et al*., 2011; Padmanabhan *et al*., 2014; Chen *et al*., 2016) ซึ่งการจะเกิดยอดใหม่ผ่านกระบวนการใดนั้นจะขึ้นกับชนิดและพันธุกรรมของต้นพืช ตลอดจนสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งพืชในวงศ์ Gesneriaceae บางชนิด เช่น *Dayaoshania cotinifolia* ที่สามารถเกิดยอดใหม่ผ่านกระบวนการ direct organogenesis พร้อมกับมีแคลลัสเกิดขึ้น เมื่อนำใบไปเลี้ยงบนอาหารที่มี BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว หรือมีสารทั้งสองชนิดร่วมกัน (Yang *et al*., 2014) หรือ *Saintpaulia ionantha* ที่พบการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารที่มี NAA เพียงอย่างเดียว (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Khan *et al*., 2007) เป็นต้น ซึ่งตลอดการศึกษานี้พบว่าทั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณพืชทดลองโดยใช้ส่วนยอดหรือการหาชิ้นพืชและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลองโดยใช้ชิ้นพืชส่วนใบ พบว่ายอดใหม่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชโดยตรงผ่านกระบวนการ direct organogenesis โดยไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น ซึ่งคล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายชนิดที่พบผลการทดลองในลักษณะเดียวกัน (Herath, 2013; Emer *et al*., 2018; Wang *et al*., 2018; Blinstrubiene *et al*., 2020) ทั้งนี้ข้อดีของการเกิดพืชผ่านกระบวนการ direct organogenesis คือได้ต้นพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับต้นแม่ (Prameela *et al*., 2015) ขณะที่ต้นพืชซึ่งเกิดผ่านกระบวนการ direct embryogenesis หรือผ่านแคลลัสอาจทำให้พันธุกรรมไม่เหมือนเดิม (Bairu *et al*., 2011) เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น *Lysionotus pauciforus* (Godo *et al*., 2010) และ *Titanotrichum oldhamii* (Takagi *et al*., 2011) ที่พบว่าต้นพืชบางส่วนที่เกิดผ่านแคลลัสมีระดับพลอยดีเป็น 4X ซึ่งแตกต่างจากต้นแม่ซึ่งเป็นพืช 2X ทั้งนี้พืช 4X ที่ได้มีลักษณะและสีของใบที่เปลี่ยนแปลงไป ทั้งยังมีขนาดดอกที่เล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นแม่ (Takagi *et al*., 2011) หรือต้น *Metabriggsia ovalifolia* ซึ่งเกิดผ่านกระบวนการ direct somatic embryogenesis พบว่าต้นพืชบางส่วนมีดอกที่มีลักษณะผิดปกติไปจากต้นแม่ โดยพบโครงสร้างคล้ายใบเจริญขึ้นที่บริเวณกลีบดอกและอับเรณู (Ouyang *et al*., 2016) เป็นต้น นอกจากนี้ Chen *et al*. (2016) ยังพบว่าการขยายพันธุ์ต้น *Chirita swinglei* ผ่านกระบวนการ direct

organogenesis เป็นการช่วยลดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงอีกด้วย เพราะใช้ระยะเวลาเลี้ยงต้นพืชเพียง 110 – 115 วัน ขณะที่การชักนำให้เกิดยอดใหม่ผ่านแคลลัสอาจต้องใช้เวลาสูงถึง 160 – 195 วัน

การเพิ่มปริมาณต้นพืชในรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae รายงานจำนวนมากใช้ใบเป็นชิ้นพืชทดลอง เนื่องจากชิ้นพืชส่วนดังกล่าวสามารถตอบสนองให้ยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่ง Herath (2013) พบว่า ส่วนใบของต้น *C. moonii* สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากกว่าการใช้ชิ้นพืชส่วนข้อ หรือ Ma *et al*. (2011) พบว่าการเลี้ยงส่วนใบของต้น *M. ovalifolia* ให้ปริมาณยอดใหม่ที่สูงกว่าการใช้ชิ้นส่วนก้านใบหรือยอดอ่อน ดังนั้นจากที่ใช้ส่วนยอดเป็นชิ้นพืชในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณพืชทดลอง ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้ส่วนใบในขั้นตอนการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลอง โดยใช้ใบตำแหน่งที่ 2 และ 3 (นับจากบริเวณยอดลงมา) ซึ่งเป็นใบที่มีอายุไม่อ่อนหรือแก่เกินไปมาทำการทดลอง อย่างไรก็ตาม รายงานการขยายพันธุ์พืชวงศ์ Gesneriaceae บางรายงานพบว่าการใช้ชิ้นพืชส่วนเดียวกันแต่ต่างบริเวณกันให้ผลการชักนำยอดใหม่ที่แตกต่างกัน โดย Pang *et al*. (2006) นำตาดอกของต้น *S. speciosa* มาตัดแบ่งออกเป็นส่วนปลาย ส่วนกลาง และส่วนล่าง และพบว่าตาดอกส่วนปลายสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด ขณะที่ Tang *et al*. (2007) พบว่าส่วนกลางใบของต้น *C. longgangensis* สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าส่วนโคนใบ ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยนี้จึงศึกษาบริเวณของใบร่วมด้วยเพื่อหาชิ้นพืชที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรีในหลอดทดลอง โดยนำใบมาตัดแบ่งออกเป็นบริเวณกลางใบและโคนใบเท่านั้น สำหรับบริเวณปลายใบที่มักม้วนงอลงและส่งผลให้มีขนาดเล็กกว่า 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร นั้นไม่ถูกนำมาใช้เป็นชิ้นพืชทดลอง จากการศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ (histological study) ของชิ้นส่วนใบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายรายงานได้อธิบายว่า ชิ้นพืชส่วนใบสามารถทำให้เกิดยอดใหม่ได้โดยเซลล์ที่บริเวณผิวใบจะเกิดการแบ่งเซลล์ขึ้น ทำให้เห็นเป็นเซลล์ขนาดเล็กจำนวนมากกระจุกกันแน่น จากนั้นเซลล์เหล่านี้จะมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) และขยายขนาดขึ้น ทำให้เห็นเป็นโครงสร้างคล้ายรูปโดม (dome-like structure) ออกมาจากผิวใบ จากนั้นเนื้อเยื่อเจริญเหล่านี้จะพัฒนากลายเป็นยอดซึ่งสามารถมองเห็นโครงสร้างใบเริ่มเกิด (leaf primodium) ได้ในเวลาต่อมา (Takagi *et al*., 2011; Li *et al*., 2013; Yang *et al*., 2012, 2014; Chen *et al*., 2016) ผลการทดลองของการเลี้ยงชิ้นส่วนใบจากบริเวณที่ต่างกันของต้นจอกหินตะนาวศรีพบว่าชิ้นส่วนใบจากบริเวณกลางใบสามารถให้จำนวนยอดใหม่ในภาพรวม (เฉลี่ย 10.3 ยอด/ชิ้นพืช) สูงกว่าชิ้นส่วนใบจากบริเวณโคนใบ (เฉลี่ย 9.1 ยอด/ชิ้นพืช) ซึ่งเป็นผลจากอิทธิพล topophysical effects (George *et al*., 2008) โดยชิ้นส่วนใบจากบริเวณกลางใบอาจมีปัจจัยภายใน เช่น การสะสมของธาตุอาหาร สารชีวเคมี หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เอื้อต่อการเกิดยอดใหม่มากกว่า จึงสามารถชักนำให้ได้ปริมาณของยอดใหม่ที่สูงกว่าชิ้นส่วนโคนใบ ทั้งนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายรายงานพบว่าการใช้ด้านบนใบ (adaxial surface) หรือด้านท้องใบสัมผัสอาหารส่งผลต่อการเกิดยอดใหม่ได้ (Ma *et al*., 2010; Padmanabhan *et al*., 2014; Blinstrubiene *et al*., 2020) ซึ่งการกลับด้านของใบอาจส่งผลต่อทิศทางการเคลื่อนที่ของสารควบคุมการเจริญเติบโตในชิ้นพืช (Yamaguchi *et al*., 2012) หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงปริมาณพื้นที่ของผิวใบที่ได้สัมผัสกับอาหาร (Bhatia *et al*., 2005) จึงส่งผลให้เกิดปริมาณยอดใหม่ที่แตกต่างกัน ซึ่งควรมีการศึกษาประเด็นนี้เพิ่มเติมในอนาคตต่อไป

สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชเป็นสารที่ใส่เพิ่มเติมลงในอาหารสังเคราะห์ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้ชิ้นพืชเกิดการพัฒนาไปในทิศทางที่ผู้เพาะเลี้ยงต้องการ โดยงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ไซโทไคนินชนิด BA และออกซินชนิด NAA ในระหว่างการทดลอง เนื่องจากเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์พืชต่ำ (Thomas, 1982) อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการชักนำและเพิ่มปริมาณยอดใหม่ได้ดีดังพบจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายรายงาน (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Khan *et al*., 2007; Tang *et al*., 2007; Ma *et al*., 2010; Godo *et al*., 2010; Takagi *et* al., 2011; Park *et al*., 2012; Yang *et al*., 2014; Chen *et al*., 2016; Ouyang *et al*., 2016; Wang *et al*., 2018) การศึกษานี้พบว่าเมื่อนำชิ้นพืชส่วนใบของต้นจอกหินตะนาวศรีไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบทุกชิ้นเกิดยอดใหม่ได้ หากแต่มีจำนวนยอดใหม่ที่แตกต่างกัน โดยชุดการทดลองควบคุมพบจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 8.9 และ 10.7 ยอด/ชิ้นพืช ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae บางรายงานที่พบว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้ชิ้นพืชส่วนใบเกิดยอดใหม่ได้ (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Ma *et al*., 2011; Takagi *et al*., 2011; Li *et al*., 2013; Padmanabhan *et al*., 2014; Prameela *et al*., 2015; Ouyang *et al*., 2016; Wang *et al*., 2018) ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องจากที่ชิ้นพืชส่วนใบมีการสะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับมากพอที่สามารถทำให้เกิดยอดใหม่ได้ (Prameela *et al*., 2015) ขณะที่พืชวงศ์ Gesneriaceae บางชนิดไม่สามารถเจริญให้ยอดใหม่ได้เมื่อเลี้ยงใบบนสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Herath, 2013; Blinstrubiene *et al*., 2020) สำหรับการเลี้ยงส่วนใบของต้นจอกหินตะนาวศรีบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA เพียงอย่างเดียวนั้น พบยอดใหม่เฉลี่ย 9.1 – 11.1 ยอด/ชิ้นพืช การที่ยอดใหม่สามารถเจริญขึ้นจากชิ้นพืชส่วนใบเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ได้ เพราะ BA เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินซึ่งมีคุณสมบัติเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (Fuadi *et al*., 2014) อันเป็นแหล่งสร้างอาหารและพลังงานหลักของต้นพืช ไซโทไคนินยังกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน RNA และคลอโรฟิลล์ ตลอดจนกระตุ้นการทำงานและกิจกรรมของเอนไซม์ และควบคุมการเกิดและพัฒนาอวัยวะใหม่ จึงเป็นผลให้เกิดยอดใหม่ขึ้น (George *et al*., 2008) การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Gesneriaceae หลายรายงานที่พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้จากการใช้ BA เสริมลงในอาหารสังเคราะห์เพียงอย่างเดียว (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Pang *et al*., 2006; Tang *et al*., 2007; Ma *et al*., 2010, 2011; Takagi *et al*., 2011; Park *et al*., 2012; Herath, 2013; Li *et al*., 2013; Padmanabhan *et al*., 2014; Yang *et al*., 2014; Prameela *et al*., 2015; Chen *et al*., 2016; Ouyang *et al*., 2016; Emer *et al*., 2018; Wang *et al*., 2018) การเลี้ยงชิ้นพืชส่วนใบของต้นจอกหินตะนาวศรีบนอาหารที่มี NAA เพียงอย่างเดียวพบการเจริญของรากเป็นจำนวนมากควบคู่ไปกับการเจริญของยอดใหม่ โดยพบจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 3.2 – 11.1 ยอด/ชิ้นพืช ถึงแม้ NAA เป็นสารกลุ่มออกซินซึ่งมีบทบาทหลักต่อการชักนำให้เกิดราก แต่สารกลุ่มนี้สามารถทำหน้าที่ร่วมกับไซโทไคนินในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ผ่านการควบคุมกระบวนการชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่ กระบวนการแบ่งและขยายขนาดเซลล์ (George *et al*., 2008) และการชักนำ/พัฒนาให้เกิดเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (Vanneste & Friml, 2009) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายรายงานก็สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่จากการใช้ NAA เพียงอย่างเดียวเช่นกัน (Tang *et al*., 2007; Ma *et al*., 2011; Takagi *et al*., 2011; Yang *et al*., 2014; Prameela *et al*., 2015; Chen *et al*., 2016; Wang *et al*., 2018) ถึงแม้สูตรอาหารชุดควบคุมและการใช้ BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว

สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ของต้นจอกหินตะนาวศรีได้ แต่ผลการทดลองพบว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ในปริมาณเพิ่มสูงขึ้น โดยผลการทดลองการเลี้ยงชิ้นพืชส่วนใบของต้นจอกหินตะนาวศรีบนอาหารที่มี BA ร่วมกับ NAA จำนวน 6 สูตร พบว่าอาหารจำนวน 3 สูตร ในกรณีของชิ้นพืชส่วนกลางใบ และอาหารจำนวน 5 สูตร ในกรณีของชิ้นพืชส่วนโคนใบ สามารถชักนำให้จำนวนยอดใหม่ในปริมาณที่สูงกว่าชุดควบคุมและสูตรอาหารที่มี BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว โดยชุดการทดลองที่มีจำนวนยอดใหม่สูงสุด (17.5 ยอด/ชิ้นพืช) พบจากการเลี้ยงชิ้นพืชส่วนกลางใบบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการทดลองนี้เป็นข้อบ่งชี้ให้เห็นว่าหากใช้ไซโทไคนินร่วมกับออกซินในปริมาณที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดอิทธิพลร่วมระหว่างกัน (synergistic effects) ทำให้สมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ต้นพืชมีการพัฒนาให้อวัยวะใหม่มากขึ้นกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเพียงชนิดเดียว (George *et al*., 2008) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายรายงานที่พบว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA ในความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ในปริมาณที่สูงกว่าการใช้ BA หรือ NAA เพียงอย่างเดียว (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Tang *et al*., 2007; Ma *et al*., 2010; Park *et al*., 2012; Herath, 2013; Yang *et al*., 2014; Chen *et al*., 2016) ทั้งนี้การใช้ BA และ NAA ต้องคำนึงถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย เนื่องจากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดไปจากระดับที่เหมาะส่งผลให้ได้จำนวนยอดใหม่ของต้นจอกหินตะนาวศรีลดลง ซึ่งเป็นเพราะสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ความเข้มข้นสูงจะแสดงผลกระทบด้านลบต่อต้นพืช (George *et al*., 2008) ทั้งยังลดการสังเคราะห์ด้วยแสง (Fuadi *et al*., 2014) และกิจกรรมการแบ่งเซลล์ในเนื้อเยื่อเจริญได้ (Wernicke *et al*., 1986) เป็นผลให้การเกิดอวัยวะหรือยอดใหม่ลดลง (George *et al*., 2008) การเพิ่มความเข้มข้นของ BA และ NAA จากระดับที่เหมาะสมนอกจากจะส่งผลให้ได้จำนวนยอดใหม่ลดลงแล้ว (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Tang *et al*., 2007; Park *et al*., 2012; Herath, 2013; Padmanabhan *et al*., 2014; Prameela *et al*., 2015; Chen *et al*., 2016; Ouyang *et al*., 2016) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Gesneriaceae บางรายงานยังระบุว่าการใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สูงเกินไปทำให้ชิ้นพืชตาย (Prameela *et al*., 2015) และพืชต้นใหม่ที่ได้มีลักษณะที่ผิดปกติหรือฉ่ำน้ำ (hyperhydric) เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย (Li *et al*., 2013; Yang *et al*., 2014)

สารกลุ่มออกซินเป็นสารที่ใช้อย่างแพร่หลายในขั้นตอนการชักนำให้เกิดรากใหม่ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Tang *et al*., 2007; Ma *et al*., 2010, 2011; Takagi *et al*., 2011; Yang *et al*., 2012; Herath, 2013; Li *et al*., 2013; Padmanabhan *et al*., 2014; Yang *et al*., 2014; Chen *et al*., 2016; Ouyang *et al*., 2016; Blinstrubiene *et al*., 2020) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae บางชนิดพบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารกลุ่มออกซินลงในอาหาร (Khan *et al*., 2007; Godo *et al*., 2010; Park *et al*., 2012; Prameela *et al*., 2015; Emer *et al*., 2018) ซึ่งการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงในอาหารสังเคราะห์เป็นการช่วยลดผลกระทบของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต้นพืชได้รับจากภายนอก ทั้งยังช่วยปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นพืชให้เหมาะสมต่อการออกรากมากยิ่งขึ้น (George *et al*., 2008) ดังนั้น การชักนำให้เกิดรากในหลอดทดลองของต้นจอกหินตะนาวศรีในการศึกษานี้จึงเลือกใช้อาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของปริมาณธาตุอาหารที่ต่างกัน (Sunpui &

Kanchanapoom, 2002; Tang *et al*., 2007; Herath, 2013; Prameela *et al*., 2015) รวมถึงการใช้หรือไม่ใช้ AC สามารถส่งผลต่อการเกิดรากได้ (Tang *et al*., 2007; Ma *et al*., 2010, 2011) ซึ่งการศึกษานี้พบว่าการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ทำให้ได้จำนวนและความยาวของรากใหม่ที่สูงกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายรายงานที่พบผลการทดลองในลักษณะเดียวกัน (Sunpui & Kanchanapoom, 2002; Herath, 2013; Prameela *et al*., 2015) ทั้งนี้การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารอาจทำให้ต้นพืชในหลอดทดลองได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ สภาวะดังกล่าวจึงกระตุ้นให้ต้นพืชสร้างและแผ่ขยายรากเพิ่มขึ้นเพื่อให้สามารถหาอาหารได้มากขึ้น นอกจากนี้ การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารยังเป็นการลดแรงดันออสโมติกของอาหารสังเคราะห์ลง จึงทำให้เซลล์รากสามารถดูดซับน้ำจากอาหารสังเคราะห์เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของรากได้ง่ายขึ้น (Irshad *et al*., 2018) ด้วยเหตุนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Gesneriaceae จำนวนมาก จึงมุ่งใช้อาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดรากใหม่ในหลอดทดลอง (Chen *et al*., 2006, Godo *et al*., 2010; Ma *et al*., 2011; Takagi *et al*., 2011; Park *et al*., 2012; Yang *et al*., 2014; Ouyang *et al*., 2016; Blinstrubiene *et al*., 2020) การศึกษานี้ยังพบว่าการเติม AC ปริมาณ 2 กรัม/ลิตร ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS หรือ ½MS ร่วมด้วย ทำให้รากใหม่เจริญได้มากกว่าอาหารสังเคราะห์ที่ไม่ได้ใส่ AC โดยอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มี AC ร่วมด้วย พบการเจริญของรากใหม่ดีที่สุด ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ma *et al*. (2010) ที่พบว่ารากของต้น *Primuinla tabacum* สามารถเกิดรากได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีกรดอินโดลบิวทาริกเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ แต่การเติม AC ปริมาณ 2 กรัม/ลิตร ร่วมด้วย ส่งผลให้ทุกยอดสามารถเกิดรากใหม่ได้ นอกจากนี้ Ma *et al*. (2011) ยังพบว่าการเติม AC ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS สามารถทำให้ต้น *M. ovalifolia* มีอัตราการรอดชีวิตหลังนำออกปลูกนอกหลอดทดลองอยู่ที่ 90.4% ขณะที่อาหารสังเคราะห์สูตร ½MS พบอัตราการรอดชีวิตของต้นพืชอยู่ที่ 89.5% การที่ AC สามารถปรับปรุงการเกิดรากได้นั้น เป็นเพราะ AC มีบทบาทช่วยควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงให้มีไนโตรเจนในรูปที่ต้นพืชสามารถดูดซับได้ (available form) ทั้งในรูปของไนเตรท (NO_3^-) และแอมโมเนียม (NH_4^+) ขณะที่อาหารซึ่งปราศจาก AC จะไม่สามารถรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างได้ดีเท่า ส่งผลให้ไนโตรเจนในรูปที่ต้นพืชสามารถนำไปใช้ได้มีปริมาณลดลง จึงเป็นผลให้ต้นพืชสามารถเจริญให้รากใหม่ได้น้อยลง (Eymar *et al*., 2000) นอกจากนี้ AC ช่วยสร้างสภาวะที่ใกล้เคียงกับในดินซึ่งเป็นสภาวะที่มืดหรือมีแสงน้อย จึงเป็นการช่วยให้ต้นพืชเกิดรากเพิ่มมากขึ้น (Dumas & Monteuuis, 1995) ทั้งนี้ สูตรอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดรากใหม่ในหลอดทดลองของพืชวงศ์ Gesneriaceae หลายชนิดมีการเติม AC ร่วมด้วยเช่นกัน (Ma *et al*., 2010, 2011; Yang *et al*., 2012, 2014; Ouyang *et al*., 2016)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้หาวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นจอกหินตะนาวศรีโดยชักนำให้เกิดยอดใหม่ผ่านกระบวนการ direct organogenesis ได้ในเวลา 48 สัปดาห์ โดยหลังจากฟอกฆ่าเชื้อผลแล้ว จึงนำมาตัดตามขวางยาว 1 เซนติเมตร และผ่าครึ่งตามยาว ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 24 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดปลอดเชื้อในหลอดทดลอง นำใบตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของยอดอ่อนปลอดเชื้ออายุ 16 สัปดาห์ ที่ยาว 3.5 – 4 เซนติเมตร และกว้าง 1.5 – 2 เซนติเมตร มาตัดชิ้นส่วนใบจากบริเวณกลางใบให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี

BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 16 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่ นำกอของยอดใหม่ที่ได้มาตัดแยกแบ่งออกเป็นยอดเดี่ยว แล้วนำยอดที่มีความสูง 1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มี AC ปริมาณ 2 กรัม/ลิตร นาน 8 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดราก โดยต้นพืชที่ได้มีความสมบูรณ์และพร้อมต่อการนำไปอนุบาลออกปลูกต่อไป วิธีที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ต้นจอกหินตะนาวศรี ซึ่งจะเป็นการช่วยอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุ์พืชของประเทศไทยอีกทางหนึ่ง และอาจนำวิธีการนี้ไปผลิตพืชชนิดนี้ให้ได้จำนวนมากเพื่อการศึกษาในด้านอื่น ๆ ต่อไป เช่น การวิเคราะห์ศักยภาพในการเป็นไม้ประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ การหาแนวทางการใช้ประโยชน์ เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยมหิดล สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ. ดร. สาโรจน์ รุจิสรรค์สกุล จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการเอื้อเฟื้อภาพต้นจอกหินตะนาวศรีจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

Bairu, M.W., Aremu, A.O., & van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, *63*(2), 147–173.

Benson, E.E. (1999). Plant Conservation Biotechnology. London: Taylor & Francis.

Bhatia, P., Ashwath, N., & Midmore, D.J. (2005). Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *41*, 457–464.

Blinstrubiene, A., Burbulis, N., Jonytiene, V., & Masiene, R. (2020). Evaluation of factors affecting direct organogenesis in a somatic tissue culture of *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern. *Agronomy*, *10*, 1783. (DOI 10.3390/agronomy10111783)

Chen, Y., Zhang, Y., Cheng, Q., Niu, M., Liang, H., Yan, H., Zhang, X., Teixeira da Silva, J.A., & Ma, G. (2016). Plant regeneration *via* direct and callus-mediated organogenesis from leaf explants of *Chirita swinglei* (Merr.) W.T. Wang. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *52*, 521–529.

Chotthong, B., Kaeojunla, W., Tanawat, T., & Klung-ngoen, W. (2019). *Progress on Biodiversity Management in Thailand*. Retrieved July 24, 2021, from https: / / www. th. undp. org/ content/ thailand/ en/ home/ library/ environment_energy/Progres-on-biodiversity-management-in-Thailand.html

Dumas, E., & Monteuuis, O. (1995). *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants—influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, *40*, 231–235.

Emer, A.A., Winhelmann, M.C., Grzeça, G.T., Fior, C.S., & Schafer, G. (2018). *In vitro* multiplication of *Codonanthe devosiana*. *Ornamental Horticulture*, *24*(1), 58–62.

Eymar, E., Alegre, J., Toribio, M., & Lopez-Vela, D. (2000). Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, *63*. 57–65.

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.

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

Godo, T., Lu, Y., & Mill, M. (2010). Micropropagation of *Lysionotus pauciflorus* Maxim. (Gesneriaceae). In S.M. Jain, & S.J. Ochatt. (Eds.), *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*. (pp. 127–139). New York: Humana Press.

Herath, H.M.I. (2013). *In vitro* propagation of *Chirita moonii* Gardn. (Gesneriaceae), a potential ornamental plant endemic to Sri Lanka. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, *88*(5), 638–642.

Hu, X., Tan, J., Chen, J., Li, Y., & Huang, J. (2020). Efficient regeneration of *Hedychium coronarium* through protocorm-Like Bodies. *Agronomy*, *10*(8), 1068. (DOI 10.3390/agronomy10081068)

Irshad, M., Rizwan, H. M., Debnath, B., Anwar, M., Li, M., Liu, S, He, B., & Qiu, D. (2018). Ascorbic acid controls lethal browning and Pluronic F-68 promotes high-frequency multiple shoot regeneration from cotyldonary node explant of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *HortScience*, *53*(2), 183–190.

Khan, S., Naseeb, S, & Ali, K. (2007). Callus induction, plant regeneration and acclimatization of African violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. *Pakistan Journal of Botany*, *39*(4), 1263–1268.

Li, Q., Deng, M., Zhang, J., Zhao, W., Song, Y., Li, Q., & Huang, Q. (2013). Shoot organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Lysionotus serratus* D. Don. *The Scientific World Journal*, 280384. (DOI 10.1155/2013/280384)

Ma, G.H., He, C.X., Ren, H., Zhang, Q.M., Li, S.J., Zhang, X.H., & Eric, B. (2010). Direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum*. *Biologia Plantarum*, *54*(2), 361–365.

Ma, G.H., Teixeira da Silva, J.A., Lu, J., Zhang, X., & Zhao, J. (2011). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Metabriggsia ovalifolia*. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, *105*, 355–361.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497.

Mycock, D.J., Watt, M.P., Hannweg, K.F., Naicker, K., Makwarela, M., & Berjak, P. (1997). Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. limifolia* and *H. koelmaniorum*). *South African Journal of Botany*, *63*(6), 345–350.

Ouyang, Y., Chen, Y., Lü, J., Teixeira da Silva, J.A., Zhang, X., & Ma, G. (2016). Somatic embryogenesis and enhanced shoot organogenesis in *Metabriggsia ovalifolia* W.T. Wang. *Scientific Reports*, *6*, 24662. (DOI 10.1038/srep24662)

Padmanabhan, P., Murch, S.J., Sullivan, J.A., & Saxena, P. (2014). Development of an efficient protocol for high frequency in vitro regeneration of a horticultural plant *Primulina tamiana* (B.L. Burtt) Mich. Möller & A. Webber. *Canadian Journal of Plant Science*, *94*(7), 1281–1287.

Pang, J.L., Wang, L.L., Hu, J.Q., Xiang, T.H., & Liang, H.M. (2006). Synergistic promotion of gibberellin and cytokinin on direct regeneration of floral buds from *in vitro* cultures of sepal segments in *Sinningia speciosa* hiern. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *42*, 450–454.

Park, E.H., Bae, H., Park, W.T., Kim, Y.B., Chae, S.C., & Park, S.U. (2012). Improved shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*) using silver nitrate and putrescine treatment. *Plant Omics Journal*, *5*(1), 6–9.

Prameela, J., Ramakrishnaiah, H., Krishna, V., Deepalakshmi, A.P., Kumar, N.N., & Radhika, R.N. (2015). Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Henckelia incana*: an endemic and medicinal Gesneriad of south India. *Physiology & Molecular Biology of Plants*, *21*, 441–446.

Puglisi, C., & Middleton, J.D. (2017). A revision of *Dorcoceras* (Gesneriaceae) in Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, *45*(1), 10–17.

Sunpui, W., & Kanchanapoom, K. (2002). Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, *24*(3), 357–364.

Takagi, H., Sugawara, S., Saito, T., Tasaki, H., Yuanxue, L., Kaiyun, G., Han, D.S., Godo, T., & Nakano, M. (2011). Plant regeneration *via* direct and indirect adventitious shoot formation and chromosome-doubled somaclonal variation in *Titanotrichum oldhamii* (Hemsl.) Solereder. *Plant Biotechnology Reports*, *5*,187–195.

Tang, Z., Lin, H., Shi, L., & Chen, W. (2007). Rapid *in vitro* multiplication of *Chirita longgangensis* W.T. Wang: an endemic and endangered Gesneriaceae species in China. *HortScience*, *42*(3), 638–641.

Thomas, T.H. (1982). Plant Growth Regulator Potential and Practice. Croydon: British Crop Protection Council.

Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, *136*(6), 1005–1016.

Wang, D., Li, X., Cheng, Z., & Long, C. (2018). *In vitro* preservation and micropropagation of *Oreocharis mileense* (W.T. Wang) M. Möller & A. Weber (Gesneriaceae) through shoot organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *54*, 606–611.

Wernicke, W., Grost, J., & Molkovits, L. (1986). The ambiguous role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in wheat tissue culture. *Physiologia Plantarum*, *68*(4), 597–602.

Yamaguchi, T., Nukazuka, A., & Tsukaya, H. (2012). Leaf adaxial–abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant & Cell Physiology*, *53*(7), 1180–1194.

Yang, G., Lü, J., Teixeira da Silva, J., Chen, H., & Ma, G. (2014). Shoot organogenesis from leaf explants of *Dayaoshania cotinifolia* W.T. Wang. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *50*, 451–457.

Yang, X., Lü, J., Teixeira da Silva, J.A., & Ma, G. (2012). Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum*. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, *109*, 213–221.