



การขยายพันธุ์ส่่งฟ้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation of *Clausena guillauminii* Tanaka

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์* รุ่งอรุณ สินชู นิมมานรดี พรหมทอง และ ภาควิชา สืบบุญการณ

Karnchana Rungruchkanont*, Rungaroon Sinchoo, Nimmannoradee Promtong and Parkpoom Subnugarn

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University

*E-mail : kanjana.r@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

ส่่งฟ้าเป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ส้ม เป็นพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด และมีการเจริญเติบโตช้า งานวิจัยนี้จึงต้องการเพิ่มปริมาณต้นส่่งฟ้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณแคลลัส การชักนำยอดจากแคลลัส การชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อ การชักนำรากจากยอด ศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำยอดจากแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) + BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล โดยเปรียบเทียบสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว และสภาพอาหารกึ่งแข็ง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า แคลลัสที่นำไปเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราวสามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็วกว่าการเลี้ยงในสภาพอาหารกึ่งแข็ง เมื่อนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารกึ่งแข็ง MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่แตกต่างกัน 4 สูตร คือ 1. GA₃ 3 มก/ล + IAA 1 มก/ล (GI) 2. GA₃ 0.1 มก/ล + Zeatin 0.1 มก/ล (GZ) 3. adenine sulfate 1 มก/ล + IAA 1 มก/ล (AI) 4. BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล (BI) เป็นเวลา 45 วัน พบว่า สูตร GZ แคลลัสมีค่าคะแนนสูงสุด คือ 4.38 คะแนน แคลลัสส่วนใหญ่มีสีเขียวเข้ม และบางส่วนมียอดเกิดขึ้น เมื่อนำแคลลัสย้ายอาหารทุก 45 วัน จะทำให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมากโดยมียอดเฉลี่ย 21.3±4.5 ยอด/ก้อนแคลลัส ยอดมีความยาว 4-6 ซม. หลังจากตัดยอดออกแล้วก้อนแคลลัสนั้นสร้างยอดใหม่ได้ตลอด ประมาณ 10 รอบ ซึ่งวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณยอดใหม่ได้ปริมาณมากในอัตรา 21.3 × 10 = 213 ยอด/แคลลัส 1 ก้อน ศึกษาการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อนำชิ้นส่วนข้อมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่แตกต่างกัน 5 สูตร คือ 1. BA 2 มก/ล + 2,4-D 1 มก/ล 2. BA 5 มก/ล + 2,4-D 2.5 มก/ล 3. MS + BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล 4. BA 5 มก/ล + IAA 1 มก/ล 5. Thidiazuron 0.1 มก/ล + NAA 1 มก/ล เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า อาหารที่เติม BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล สามารถชักนำจำนวนยอดได้สูงสุด 8.75 ยอด และมีความยาวยอด 2.4 ซม. ศึกษาการชักนำรากจากยอด นำยอดใหม่มาชักนำรากในอาหารกึ่งแข็ง ½ MS ที่เติมสาร IBA, IAA หรือ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 มก/ล เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า อาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มก/ล สามารถชักนำรากได้ดี เมื่อนำออกปลูกมีอัตราการรอดชีวิต 97-100%

คำสำคัญ : การเพิ่มปริมาณแคลลัส การชักนำยอดจากแคลลัส การชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อ การชักนำราก

Abstract

Song Fa (*Clausena guillauminii* Tanaka) is a medicinal plant that belongs to the family Rutaceae. It can be propagated only by seeds and seedling grows very slowly. This study investigated for rapid multiplication of Song Fa by plant tissue culture techniques. The studies focus on callus proliferation, shoot induction from callus, shoot induction from node and root induction from shoot. The calluses were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium + 2 mg/L BA + 1 mg/L IAA with two difference conditions; liquid medium



with temporary immersion and semi-solid medium. After culture for 2 months, calluses cultured on liquid medium with temporary immersion could multiply more rapidly than those cultured on semi-solid medium. Then callus was induced to shoot on MS semi-solid medium with four treatments of different plant growth regulators; 1. 3 mg/l GA_3 + 1 mg/l IAA (GI) 2. 0.1 mg/l GA_3 + 0.1 mg/l Zeatin (GZ) 3. 1 mg/l adenine sulfate + 1 mg/l IAA (AI) 4. 2 mg/l BA + 1 mg/l IAA (BI). After culture for 45 days, the callus on GZ formula had the highest score of 4.38 points. Most calluses were dark green color and some callus produced new shoots. When the callus was subcultured every 45 days, a significant increase in new shoots was produced with an average of 21.3 ± 4.5 shoots/callus clump, 4-6 cm in length. After the shoots were cut off, the callus was able to produce new shoots throughout approximately 10 cycles. This method could increase the number of new shoots largely at the rate of $21.3 \times 10 = 213$ shoots/callus clump. The induction of shoots from node explants were studied in MS semi-solid medium with 5 treatments of different plant growth regulators; 1. 2 mg/l BA + 1 mg/l 2,4-D 2. 5 mg/l BA + 2.5 mg/l 2,4-D 3. 2 mg/l BA + 1 mg/l IAA 4. 5 mg/l BA + 1 mg/l IAA 5. 0.1 mg/l Thidiazuron + 1 mg/l NAA. After 3 months of culture, the best result was MS added with 2 mg/l BA + 1 mg/l IAA that induced 8.75 shoots with 2.4 cm in length. For root induction, the new shoots were rooted in $\frac{1}{2}$ MS semi-solid medium added with 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l of IBA, IAA or NAA. After 2 months of culture, media with 0.5-1.0 mg/l IBA were able to induce roots well with a survival rate of 97-100% after transplanting.

Keywords : Callus Proliferation, Shoot Induction From Callus, Shoot Induction From Node, Root Induction.

บทนำ

พืชสกุลส่องฟ้า (*Clausena* spp.) เป็นพืชสมุนไพร อยู่ในวงศ์ส้ม (Rutaceae) เป็นพืชที่มีชื่อตามท้องถิ่นแตกต่างกัน เช่น ส่องฟ้า (อุดรธานี) สมุยหอม (นครศรีธรรมราช) ส่องฟ้าดง (เลย) เหม็น (จันทบุรี) (อนันต์และคณะ, 2562) สกุลส่องฟ้า เป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก ใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ เรียงเวียนรอบกิ่ง ใบย่อยเรียงสลับ มีต่อมน้ำมัน ดอกสีขาวนวล ผลสุกสีชมพู การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ขยายพันธุ์โดยเมล็ด เป็นพืชที่เจริญเติบโตค่อนข้างช้า ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ส่องฟ้า (*Clausena guillauminii* Tanaka) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 20-25 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านเล็กน้อย ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อย 3-7 ใบ รูปไข่แกมวงรีขอบขนาน กว้าง 2.5-4 เซนติเมตร ยาว 4-8 เซนติเมตร แผ่นใบมีจุดน้ำมันกระจาย เมื่อส่องดูจะมองเห็นจุดโปร่งแสงเล็ก ๆ กระจายทั่วทั้งใบ ดอกออกเป็นช่อ ที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีขาวแกมเหลือง ผลสดรูปกลมรี ยัดออ่อนรับประทานเป็นผัก สรรพคุณทางยา ใช้ราก ต้มน้ำดื่ม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้ไข้ แก้ปวดศีรษะ แก้ผดผื่นคัน แก้หลอดลมอักเสบ ผสมสมุนไพรอื่น ต้มและทาตัว (ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2565)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและค้นพบองค์ประกอบทางเคมีและสารสำคัญในต้นส่องฟ้า พบว่าสารที่สกัดและน้ำมันหอมระเหย ที่ได้จากส่วนของใบ รากและเปลือกจากพืชวงศ์ Rutaceae เช่น ส่องฟ้า (*C. guillauminii*) ส่องฟ้าดง (*C. harmandiana* (Pierre) Pierre ex Guillaumin) และสันโสก (*C. excavate* Burm. f.) สามารถช่วยในการบรรเทาพยาธิวิทยาของการเกิดเบาหวานได้โดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ยับยั้งการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลดระดับน้ำตาลในเลือด รวมทั้งส่วนสกัดทุกส่วนของพืชดังกล่าวนี้ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (อนันต์และคณะ, 2562) และพบสารใหม่ในองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากรากส่องฟ้า กลุ่มคาร์บาโซลแอลคาร์ลอยด์ 2 สาร คือ guillauminines A และ B

และสารที่มีรายงานมาแล้วอีก 16 สาร นำสารที่แยกได้ไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด และมะเร็งในช่องปาก ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Auranwiwat et al., 2014) และยังพบสารใหม่จากกิ่งของสอฟ้าแดง ในกลุ่ม คาบาโรไลแอลคาร์ลอยด์ 3 สารคือ harmandianamines A-C และสารที่มีรายงานมาแล้ว 15 สาร นอกจากนี้ยังนำสาร ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISIR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 1466 และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1 พบว่าสาร clausamine B แสดงฤทธิ์ ในการยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Maneerat et al., 2012) เนื่องจากสารเหล่านี้ เป็นสาร ที่สามารถนำมาพัฒนาต่อได้ และมีแนวโน้มที่มีความต้องการที่มากขึ้น แต่เนื่องจากสอฟ้าเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด และ มีการเจริญเติบโตช้า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งเป็นวิธีที่สามารถขยายพันธุ์ได้รวดเร็วและได้ปริมาณที่มาก จึงเป็นแนวทาง ในการขยายพันธุ์ต้นสอฟ้า มีงานวิจัยศึกษาการขยายพันธุ์ *C. heptaphylla* จากชิ้นส่วนยอดและข้อในสภาพปลอดเชื้อและ ออกปลูกสำเร็จ (Majumder and Rahman, 2016) *C. guillauminii* (Kanjawattanawong and Singbumrung, 2020) *C. indica* (Suma et al., 1999) การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ *C. harmandiana* (Jumin, 2013) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อขยายพันธุ์สอฟ้า *C. guillauminii* โดยศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณแคลลัส การชักนำยอดจากแคลลัส การชักนำยอดจาก ชิ้นส่วนข้อ การชักนำรากจากยอดสอฟ้าในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการทดลอง

1. การฟอกฆ่าเชื้อ

นำส่วนยอดของสอฟ้าในสภาพธรรมชาติบริเวณป่ารังก่อ ในพื้นที่มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี มาทำความสะอาด ด้วยน้ำยาล้างจานและใช้แปรงเล็กถูตามซอกใบทิ้งไว้นาน 10 นาที ล้างน้ำและเปิดน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 10 นาที นำชิ้นส่วนพืชแช่ในสารแมนโคเซบ 1 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำประปา นำชิ้นส่วนพืชมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย สารไฮเตอร์® ความเข้มข้น 20% นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำชิ้นส่วนพืชแช่ ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ในสารละลาย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ตัดชิ้นส่วนยอดของสอฟ้าโดยนำส่วนข้อและส่วนยอดขนาด 1 ซม. ไปเลี้ยงในอาหารกึ่ง แข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) MS + Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 มก/ล + Indole acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 1 มก/ล เพื่อเป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำยอดจากแคลลัส

นำแคลลัสที่เกิดขึ้นบริเวณโคนชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS + BA ความเข้มข้น 2 มก/ล + IAA ความเข้มข้น 1 มก/ล ขนาดเริ่มต้น 1 ซม. มาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม โดยเปรียบเทียบอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว ให้อาหาร ทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที และอาหารกึ่งแข็ง โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือนเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการเปลี่ยนแปลง หลังจากนั้นนำแคลลัสที่เพิ่มปริมาณมากขึ้นมาชักนำให้เกิดยอดใหม่ ในอาหารกึ่งแข็ง 4 สูตร คือ

1. MS + Gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 3 มก/ล + IAA ความเข้มข้น 1 มก/ล (GI)
2. MS + GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มก/ล + Zeatin ความเข้มข้น 0.1 มก/ล (GZ)
3. MS + adenine sulfate ความเข้มข้น 1 มก/ล + IAA ความเข้มข้น 1 มก/ล (AI)
4. MS + BA ความเข้มข้น 2 มก/ล + IAA ความเข้มข้น 1 มก/ล (BI)

ทำสูตรละ 20 ข้ว ข้วละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน บันทึกคะแนนแคลลัส ดังตารางที่ 1



ตารางที่ 1 แสดงค่าคะแนนของแคลลัสตามลักษณะของแคลลัส

ค่าคะแนน	ลักษณะแคลลัส
0	แคลลัสสีน้ำตาล
1	แคลลัสสีเหลือง
2	แคลลัสสีเขียว + น้ำตาล
3	แคลลัสสีเขียวอ่อน
4	แคลลัสสีเขียวเข้ม
5	แคลลัสสีเขียวเข้มมียอดเกิดขึ้น

3. การเพิ่มจำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อ

นำชิ้นส่วนข้อจากต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ต่างกัน 5 สูตร คือ 1. MS + BA ความเข้มข้น 2 มก/ล + 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 1 มก/ล 2. MS + BA ความเข้มข้น 5 มก/ล + 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มก/ล 3. MS + BA ความเข้มข้น 2 มก/ล + IAA ความเข้มข้น 1 มก/ล 4. MS + BA ความเข้มข้น 5 มก/ล + IAA 1 ความเข้มข้น มก/ล 5. MS + Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.1 มก/ล + 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1 มก/ล สูตรละ 10 ข้ำ ข้ำละ 2 ชิ้น หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 3 เดือน ทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส โดยใช้เวอร์เนียร์คาลิเปอร์

4. การชักนำรากจากยอด

นำยอดใหม่ความยาว 2-3 ซม. มาชักนำรากในอาหารกึ่งแข็ง ½ MS ที่เติมสาร Indole-3-Butyric Acid (IBA) หรือ IAA หรือ NAA ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 มก/ล และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชเป็นชุดควบคุมรวม 10 ทริทเมนต์ ทริทเมนต์ละ 10 ขวด ขวดละ 4 ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกข้อมูล เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก นำต้นอ่อนที่ได้ ออกปลูก โดยใช้เวอร์มิคูไลท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุปลูก และควบคุมความชื้นโดยใช้ถุงพลาสติกคลุมเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ในที่ร่ม หลังจากนั้นค่อย ๆ เปิดถุงพลาสติกเพื่อลดความชื้นลงเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนหลังจากนำออกปลูกเป็นเวลา 1 เดือน

5. สภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,000 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน

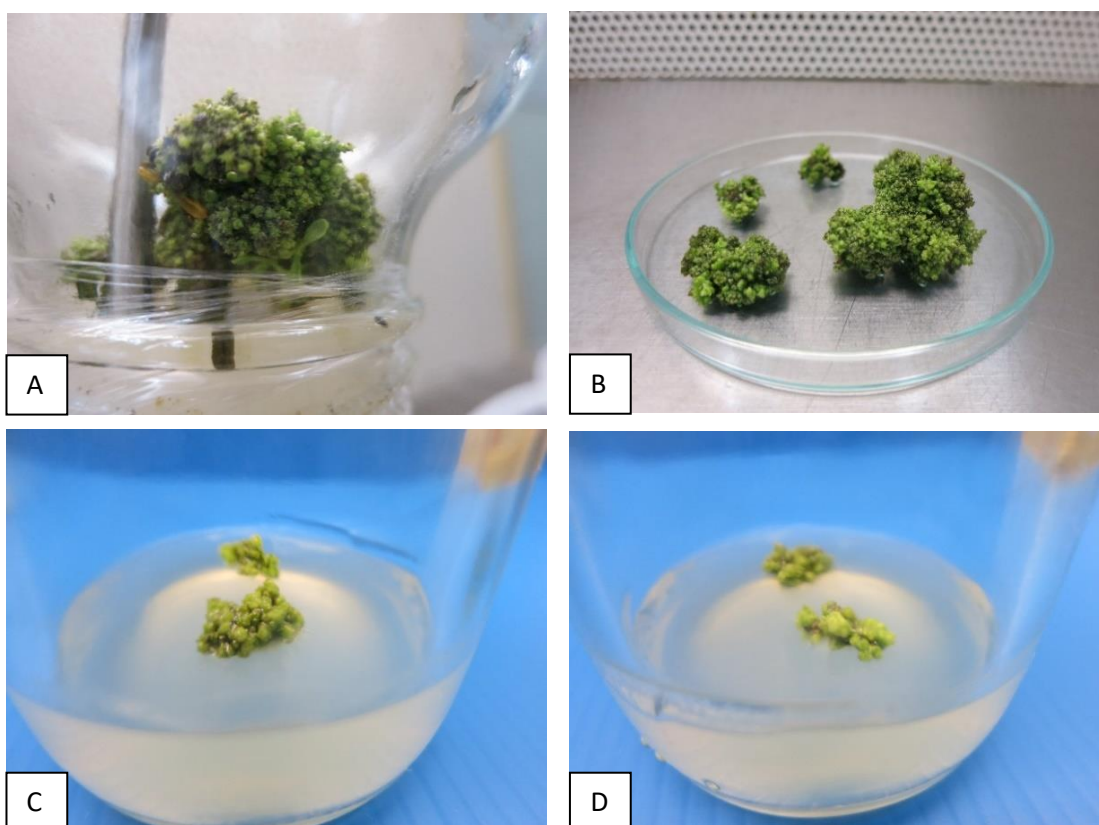
6. การวางแผนและวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยโปรแกรม SAS

ผลการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำยอดจากชิ้นส่วนแคลลัส

เมื่อนำแคลลัส ขนาดเริ่มต้น 1 ซม. เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล โดยเปรียบเทียบสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราวและสภาพอาหารกึ่งแข็ง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า แคลลัสที่นำไปเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราวสามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็วว่าการเลี้ยงในสภาพอาหารกึ่งแข็ง และแคลลัสมีลักษณะเขียว มีตุ่มเล็ก ๆ หนาแน่น ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในสภาพอาหารกึ่งแข็งมีสีเขียวอ่อนเพิ่มปริมาณอย่างช้า ๆ (ภาพที่ 1)

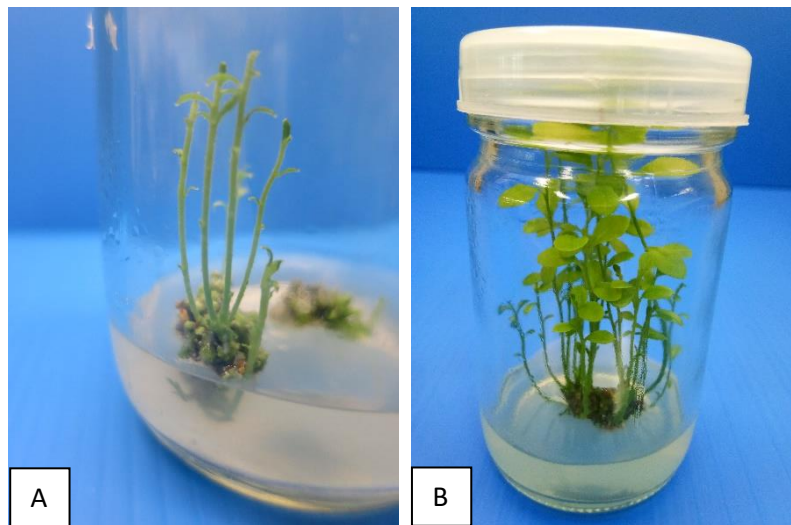


ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัสที่นำไปเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราวและสภาพอาหารกึ่งแข็ง เป็นเวลา 2 เดือน (A, B) แคลลัสที่นำไปเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว (C, D) แคลลัสที่นำไปเลี้ยงในสภาพอาหารกึ่งแข็ง

นำแคลลัสที่เพิ่มปริมาณในสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราวมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารกึ่งแข็ง 4 สูตร คือ GI, GZ, AI และ BI ทำเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน พบว่า อาหารสูตร GZ แคลลัสมีค่าคะแนนสูงสุด คือ 4.38 คะแนน ซึ่งแคลลัสส่วนใหญ่มีสีเขียวเข้ม และบางส่วนมียอดเกิดขึ้น ส่วนอาหารสูตร BI และ AI มีค่าคะแนน 3.88 และ 3.36 ตามลำดับ แคลลัสมีสีเขียวอ่อน-เขียวเข้ม ส่วนน้อยที่มียอดเกิดขึ้น อาหารสูตร GI มีค่าคะแนนน้อยที่สุด คือ 1.3 คะแนน แคลลัสส่วนใหญ่มีสีน้ำตาลและเหลือง มีส่วนน้อยที่แคลลัสมีสีเขียวอ่อน (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2A) จึงเลือกอาหารสูตร GZ ในการชักนำให้แคลลัสเกิดยอดต่อไป และพบว่าเมื่อตัดยอดออกจากแคลลัสและย้ายแคลลัสเลี้ยงในอาหารทุก 45 วัน จะทำให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมากโดยมียอดเฉลี่ย 21.3 ± 4.5 ยอด/ก้อนแคลลัสขนาด 1.5 ซม. ยอดมีความยาว 4-6 ซม. (ภาพที่ 2B) หลังจากตัดยอดออกแล้วก้อนแคลลัสนั้นสร้างยอดใหม่ได้ตลอด ประมาณ 10 รอบ ซึ่งวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณยอดใหม่ได้ปริมาณมากในอัตรา $21.3 \times 10 = 213$ ยอด/แคลลัส 1 ก้อน

ตารางที่ 2 การพัฒนาของแคลลัสจากสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง 4 สูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชแตกต่างกัน เป็นเวลา 45 วัน

รหัสเมนู	อาหารและชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช	ค่าคะแนน
GI	MS + GA ₃ 3 มก/ล + IAA 1 มก/ล	1.3
GZ	MS + GA ₃ 0.1 มก/ล + Zeatin 0.1 มก/ล	4.38
AI	MS + adenine sulfate 1 มก/ล + IAA 1 มก/ล	3.36
BI	MS + BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล	3.88



ภาพที่ 2 แคลลัสที่พัฒนามาจากอาหารกึ่งแข็งสูตร MS + GA₃ 0.1 มก/ล + Zeatin 0.1 มก/ล (GZ) หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน
(A) แคลลัสสีเขียวและเกิดยอด (B) เมื่อตัดยอดแล้วนำแคลลัสเลี้ยงต่อไปจะเกิดยอดใหม่จำนวนมาก

2. การเพิ่มจำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อ

ในการชักนำยอดจากชิ้นส่วนของข้อจากต้นอ่อนส่่งฟ้าในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าทุกทริทเมนต์สามารถชักนำให้เกิดยอดไม่แตกต่างกันคือ 80-100% ยกเว้นอาหารที่เติม BA 5 มก/ล + 2,4-D 2.5 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดน้อยที่สุด คือ 50% ส่วนอาหารที่เติม BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล สามารถชักนำจำนวนยอดได้สูงสุด 8.75 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากอาหารที่เติม BA 5 มก/ล + IAA 1 มก/ล และ TDZ 0.1 มก/ล + NAA 1 มก/ล มีจำนวนยอด 6.90 และ 4.95 ยอด ตามลำดับ และในอาหารที่เติม BA 5 มก/ล + 2, 4-D 2.5 มก/ล เกิดยอดน้อยที่สุดคือ 0.3 ยอด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติจากอาหารที่เติม BA 2 มก/ล + 2, 4-D 1 มก/ล และ TDZ 0.1 มก/ล + NAA 1 มก/ล โดยมีจำนวนยอด 0.7 ยอด และ 4.95 ยอดตามลำดับ ด้านความยาวยอด อาหารที่เติม BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 23.59 มิลลิเมตร และอาหารที่เติม BA 5 มก/ล + 2, 4-D 2.5 มก/ล มีความยาวยอดน้อยที่สุด 1.72 มิลลิเมตร นอกจากการเกิดยอดแล้วยังมีการพัฒนาของแคลลัส พบว่าทุกทริทเมนต์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100% และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสอยู่ระหว่าง 7.39-9.66 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3)

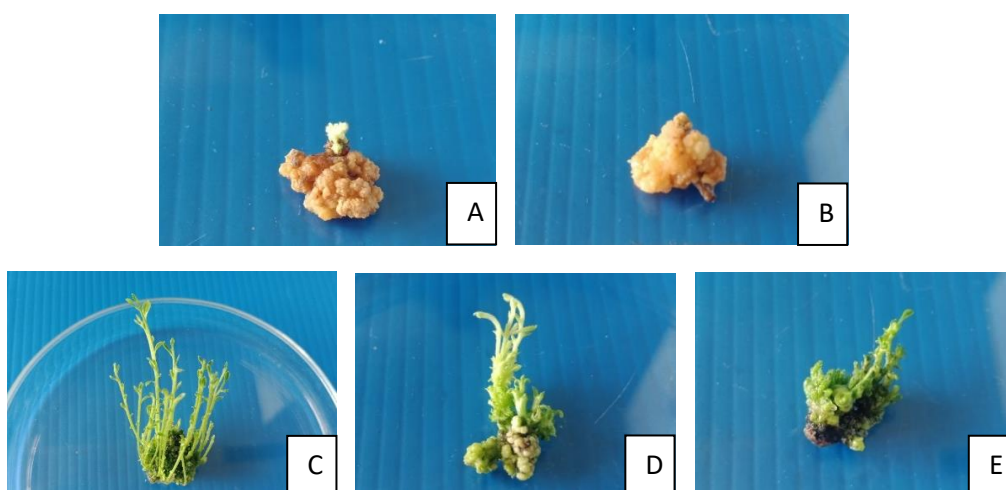
ตารางที่ 3 การพัฒนาขึ้นส่วนของข้อส่่งฟ้าบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 3 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช	การเกิดแคลลัส (%)	เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส (มม.)	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอด (ยอด)	ความยาวยอด (มม.)
BA 2 มก/ล + 2,4-D 1 มก/ล	100	7.39	100 ^a	0.70 ^b	4.74 ^{cd}
BA 5 มก/ล + 2,4-D 2.5 มก/ล	100	9.04	50 ^b	0.30 ^b	1.72 ^d
BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล	100	9.43	100 ^a	8.75 ^a	23.59 ^a
BA 5 มก/ล + IAA 1 มก/ล	100	9.66	100 ^a	6.90 ^a	12.43 ^b
TDZ 0.1 มก/ล + NAA 1 มก/ล	100	9.15	80 ^a	4.95 ^{ab}	7.79 ^{bc}
F-test	ns	ns	**	**	**

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 3 การชักนำยอดจากชิ้นส่วนของข้อส่่งฟ้าบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 3 เดือน

- (A) BA 2 มก/ล + 2,4-D 1 มก/ล
- (B) BA 5 มก/ล + 2,4-D 2.5 มก/ล
- (C) BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล
- (D) BA 5 มก/ล + IAA 1 มก/ล
- (E) TDZ 0.1 มก/ล + NAA 1 มก/ล

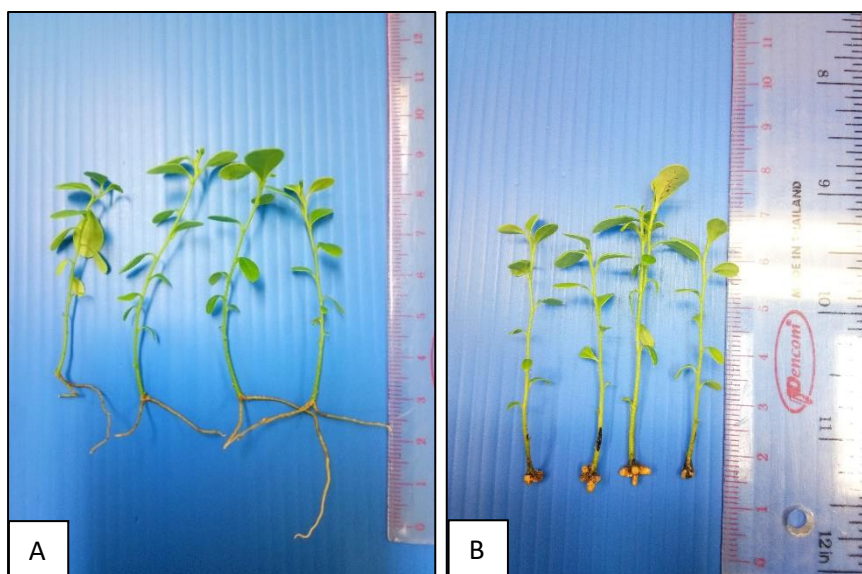


3. การชักนำรากจากยอด

การชักนำรากจากยอดในอาหารกึ่งแข็ง ½ MS ที่เติมออกซิน ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่า IBA 0.5-2.0 มก/ล IAA 0.5-2.0 มก/ล และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีการเกิดรากสูง 92.5-100% ขณะที่อาหารที่เติม NAA มีการเกิดรากได้น้อยลงเมื่อได้รับสารความเข้มข้นสูงขึ้น ด้านจำนวนราก พบว่า อาหารที่เติม NAA 0.5 มก/ล มีจำนวนรากมากที่สุด 2.52 ราก ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากอาหารที่เติม IAA 2.0 มก/ล แต่มากกว่าอาหารในทรีทเมนต์อื่นๆ โดยอาหารที่เติม NAA 2.0 มก/ล ชักนำจำนวนรากได้น้อยที่สุด 0.20 ราก ด้านความยาวราก อาหารที่เติม IBA IAA และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีความยาวรากมากตั้งแต่ 10.91-20.95 มม. ส่วนอาหารที่เติม NAA มีความยาวรากสั้น 0.16-2.71 มม. เมื่อนำต้นอ่อนออกปลูก ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IBA 0.5 มก/ล มีการรอดชีวิตสูงสุด 100% รองลงมา คือ อาหารที่เติม IBA 1 มก/ล มีการรอดชีวิต 97.4% ตามด้วยอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีการรอดชีวิต 85.7% อาหารที่เติม IAA มีการรอดชีวิตน้อย 29.7-37.5% และอาหารที่เติม NAA มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำที่สุด 0-15% เมื่อพิจารณาภาพรวมสรุปได้ว่า อาหารที่เติม IBA 0.5-1.0 มก/ล สามารถชักนำรากจากยอดของสอ่งฟ้าได้ดี มีอัตราการรอดชีวิตสูง และอาหารที่เติม NAA ยับยั้งความยาวรากของสอ่งฟ้า (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4) ต้นอ่อนที่ได้สามารถนำออกปลูกและรอดชีวิต (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 การชักนำรากจากยอดใหม่ในอาหารกึ่งแข็ง ½ MS ที่เติม IBA IAA NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลานาน 2 เดือน

ทรีทเมนต์ (มก / ล)	การเกิดราก (%)	จำนวนราก (ราก/ยอด)	ความยาวราก (มม.)	การรอดชีวิต (%)
0	97.2	1.52 ^{bc}	18.58 ^a	85.7
IBA 0.5	95	1.55 ^{bc}	20.95 ^a	100.0
IBA 1.0	92.5	1.30 ^{bc}	20.12 ^a	97.4
IBA 2.0	97.5	1.28 ^{bc}	13.28 ^{ab}	60.5
IAA 0.5	100	1.46 ^{bc}	13.48 ^{ab}	37.5
IAA 1.0	97.5	1.62 ^{bc}	10.91 ^b	36.4
IAA 2.0	100	1.96 ^{ab}	15.93 ^{ab}	29.7
NAA 0.5	77.5	2.52 ^a	2.71 ^c	15
NAA 1.0	22.5	0.98 ^c	0.87 ^c	0
NAA 2.0	5	0.20 ^d	0.16 ^c	0
F-test		**	**	



ภาพที่ 4 ลักษณะต้นและรากของส่อกฟ้าที่เลี้ยงในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มก/ล (A) และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก/ล (B)



ภาพที่ 5 ต้นอ่อนที่ออกปลูกในเวอร์มิคูไลต์ เป็นเวลา 1 เดือน

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การนำแคลลัสมาเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร MS + BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล โดยเปรียบเทียบสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราวและสภาพอาหารกึ่งแข็ง พบว่า แคลลัสที่นำไปเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราวสามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็วกว่าการเลี้ยงในสภาพอาหารกึ่งแข็ง และแคลลัสมีลักษณะเขียว มีตุ่มเล็ก ๆ หนาแน่น ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในสภาพอาหารกึ่งแข็งมีสีเขียวอ่อนเพิ่มปริมาณอย่างช้า ๆ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในระบบจุ่มชั่วคราวส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตได้มากกว่า เนื่องจากส่วนต่าง ๆ ของพืชสัมผัสอาหารเหลวได้อย่างทั่วถึง เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งแบบดั้งเดิม พืชจะดูดซึมสารอาหารเพียงบริเวณส่วนฐานเท่านั้น (Teisson and Alvard, 1995) มีพืชหลายชนิดที่เพาะเลี้ยง



ในระบบอาหารเหลวจุ่มหัวครวและได้ผลดี เช่น สับปะรด (Escalona et al., 1999) กาแฟ (Albarrán et al., 2005) มันฝรั่ง (Jiménez et al., 1999) เมื่อนำแคลลัสที่เพิ่มปริมาณในอาหารสภาพอาหารเหลวแบบจุ่มหัวครวมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารกึ่งแข็ง 4 สูตร คือ GI GZ AI และ BI เป็นเวลา 45 วัน พบว่า สูตร GZ แคลลัสมีค่าคะแนนสูงสุด ซึ่งแคลลัสส่วนใหญ่มีสีเขียวเข้ม และบางส่วนมียอดเกิดขึ้น โดยสูตร GZ มี GA_3 0.1 มก/ล + Zeatin 0.1 มก/ล เหมาะสมในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของ *C. harmandiana* พัฒนาเป็นยอดได้ดี (Jumin, 2013) ส่วนสูตร BI (BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล) เป็นสูตรที่เหมาะสมในการชักนำยอดหลายยอดจากชิ้นส่วนข้อ *C. heptaphylla* (Majumder and Rahman, 2016) และสูตร AI (adenine sulfate 1 มก/ล + IAA 1 มก/ล) เป็นสูตรที่ทำให้ยอดยืดยาวในการเพาะเลี้ยง *C. indica* (Suma et al., 1999) ซึ่งสูตร BI และ AI ชักนำแคลลัสมีสีเขียวอ่อน-เขียวเข้ม ส่วนน้อยที่มียอดเกิดขึ้น อาหารสูตร GI (GA_3 3 มก/ล + IAA 1 มก/ล) มีค่าคะแนนน้อยที่สุด แคลลัสส่วนใหญ่มีสีน้ำตาลและเหลือง (ตารางที่ 2) ดังนั้นอาหารสูตร GZ เป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำยอดจากแคลลัส หลังจากตัดยอดออกแล้วก้อนแคลลัสนั้นสร้างยอดใหม่ได้ตลอดประมาณ 10 รอบ ซึ่งวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณยอดใหม่ได้ปริมาณมากในอัตรา $21.3 \times 10 = 213$ ยอด/แคลลัส 1 ก้อน มีรายงานว่า GA_3 มีผลต่อการสร้างยอดในพืชวงศ์ส้ม (Jumin and Nito, 1996) การพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอของ *C. harmandiana* เป็นยอด (Jumin, 2013) และฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินส่งเสริมการพัฒนาเป็นยอดจากการเลี้ยงแคลลัสส้ม (Guo et al., 2007)

การชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อในอาหาร 5 สูตร ที่มีฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินและกลุ่มออกซิน ต่างชนิดและความเข้มข้น พบว่า BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล สามารถชักนำยอดได้สูงสุด 8.75 ยอด และมีความยาวยอด 24 มม. ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Majumder and Rahman (2016) ชักนำส่วนข้อของ *C. heptaphylla* ในอาหาร MS ที่เติม BAP 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล ให้ผลดีที่สุดสามารถชักนำยอดได้ 4.2 ยอด และการทดลองของ Kanjanawattanawong and Singbumrung (2020) ที่ชักนำชิ้นส่วนข้อของ *C. guillauminii* ในอาหาร MS ที่เติม BA 2 มก/ล ได้จำนวนยอดสูงสุด 3.7 ยอด การชักนำรากจากยอดส่องฟ้าในอาหารที่เติมออกซิน ชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า อาหารที่เติม IBA 0.5-1 มก/ล สามารถชักนำรากได้ดี และต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิต 97-100% ซึ่งสอดคล้องกับ Majumder and Rahman (2016) ชักนำราก *C. heptaphylla* โดยใช้ IBA 1.0 มก/ล + IAA 0.5 มก/ล ชักนำรากได้ดีและมีอัตราการรอดชีวิต 91% ส่วน Kanjanawattanawong and Singbumrung (2020) รายงานว่าการใช้ NAA 0.1 มก/ล สามารถชักนำราก *C. guillauminii* ได้ 3.81 ราก ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้

การเพิ่มปริมาณแคลลัส นำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล สภาพอาหารเหลวแบบจุ่มหัวครว ให้อาหารทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือนเป็นเวลา 2 เดือน การชักนำแคลลัสให้เกิดยอดในอาหารกึ่งแข็ง MS + GA_3 0.1 มก/ล + Zeatin 0.1 มก/ล เป็นเวลา 45 วัน แคลลัสส่วนใหญ่มีสีเขียวเข้ม และบางส่วนมียอดเกิดขึ้น เมื่อนำแคลลัสย้ายอาหารทุก 45 วัน จะทำให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมากโดยมียอดเฉลี่ย 21.3 ± 4.5 ยอด/ก้อนแคลลัสขนาด 1.5 ซม. ยอดมีความยาว 4-6 ซม. หลังจากตัดยอดออกแล้วก้อนแคลลัสนั้นสร้างยอดใหม่ได้ตลอด ประมาณ 10 รอบ ซึ่งวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณยอดใหม่ได้ปริมาณมากในอัตรา $21.3 \times 10 = 213$ ยอด/แคลลัส 1 ก้อน การชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อในอาหารที่เติม BA 2 มก/ล + IAA 1 มก/ล สามารถชักนำยอดได้สูงสุด 8.75 ยอด และมีความยาวยอด 2.4 ซม. การชักนำรากจากยอดในอาหารกึ่งแข็ง $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มก/ล สามารถชักนำรากจากยอดของส่องฟ้าได้ดีเมื่อนำออกปลูกมีอัตราการรอดชีวิต 97-100%

เอกสารอ้างอิง

ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (ม.ป.ป.). ส่องฟ้า.

<http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=122>.



- อนันต์ อธิพรชัย, ภาณี ศรีปรีชาศักดิ์ และสุวรรณา เสมศรี. (2562). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสกุล *Clausena* สำหรับการรักษาโรคเบาหวาน. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Albarrán, J., Bertrand, B., Lartaud, M. and Etienne, H. (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(1), 27-36.
- Auranwiwat, C., Laphookhieo, S., Trisuwan, K., Pyne, S. G. and Ritthiwigrom, T. (2014). Carbazole alkaloids and coumarins from the roots of *Clausena guillauminii*. *Phytochemistry Letters*, 9, 113-116.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y. and Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-748.
- Guo, W. W., Cheng, X. D., Grosser, J. W. and Deng, X. X. (2007). Protoplast technology and Citrus improvement. *Biological Sustainable Agriculture*, 121, 461-464.
- Jiménez, E., Pérez, N., De Fera, M., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M. and Pérez, J. C. (1999). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(1), 19-23.
- Jumin, H. B. (2013). Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplast of *Clausena harmandiana* (Engl.) Swing and M. Kell. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biology*, 1, 23-28.
- Jumin, H. B. and Nito, N. (1996). Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six plant species related to *Citrus*. *Plant Cell Reports*, 15, 332-336.
- Kanjanawattanawong, S. and Singbumrung, N. (2020). Establishment of a protocol for micropropagation of *Clausena guillauminii* Tanaka. *Acta Horticulturae*, 249-256.
- Majumder, S. and Rahman, M. (2016). Effects of different plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Clausena heptaphylla* (Roxb.) an aromatic and medicinal shrub. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(3), 58-63.
- Maneerat, W., Phakhodee, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Promgool, T., Yossathera, K., Deachathai, S. and Laphookhieo, S. (2012). Antibacterial carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana* twigs. *Fitoterapia*, 83, 1110-1114.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Suma, T. B., Thomas, S. and Muralidharan, E. M. (1999). *High frequency organogenesis in Clausena indica, a tree host of sandal*. In Kavi Kishor, P.B. *Plant Tissue Culture and Biotechnology: Emerging Trends*. Hyderabad: Universities Press.
- Teisson, C. and Alvard, D. (1995). *A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion*. In Terzi, M., Cella, R. and Falavigna, A. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Dordrecht: Springer.