ผลของไทโรซีนและสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of tyrosine and plant growth regulators on growth and development of *Gloriosa superba* Linn. *In vitro*

บุญยืน กิจวิจารณ์, จารุวรรณ นกไม้, และ หนูเดือน เมืองแสน[1*]

Boonyuen Kijwijan, Jaruwan Nokmai, and Nooduan Muangsan[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนไทโรซีนและสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเหง้าของดองดึงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS พบว่า อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้นต่างกันในที่มีแสงและที่มืด พบว่า ส่วนของเหง้าที่เพาะเลี้ยงในที่มืดที่มีไทโรซีน 50 มก./ล. ชักนำให้ส่วนเหง้าเกิดแคลลัสได้ 100% และในที่มีแสงเกิดแคลลัสได้ 85% เมื่อศึกษาการเจริญของแคลลัสในอาหารเดิมเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่ามีน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 6.25 กรัม การชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นโดยการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่าง NAA และ BA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 36 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่นำไปเลี้ยงบนอาหารที่มี BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 4 มก./ล. เกิดต้นได้ 100% เมื่อทดลองเฉพาะอิทธิพลของ BA หรือ kinetin เพียงอย่างเดียวในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า BA 4 มก./ล. ชักนำให้เกิดต้นได้ 83% และ kinetin 4 มก./ล. ชักนำให้เกิดต้นได้ 50% ส่วนการศึกษาจำนวนโครโมโซมของรากดองดึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบจำนวนโครโมโซม 2n=22 (**คำสำคัญ:** ดองดึง, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ไทโรซีน, วงศ์ Liliaceae, ไรโซม)

ABSTRACT: Effects of tyrosine and plant growth regulators on rhizome cultures were carried out on modified Murashige and Skoog's medium. The sterile rhizomes were cut and cultured on MS medium supplemented with 1 mg./l. 2,4-D, 1 mg./l. BA and various concentrations of tyrosine under the light and dark condition. The experimental data showed that the highest percentage of callus formation 100% was on the medium added with 50 mg./l. tyrosine in the dark condition and 85% in the light condition. The average fresh weight of callus cultured in the dark for 16 weeks was 6.25 g. Shoot induction was performed using the combination of NAA and BA for 36 weeks. The experimental data revealed that the shoot regeneration from callus was 100% on the medium added with 4 mg./l. BA and 4 mg./l. NAA. Comparison among various concentrations of BA and NAA, it was shown that shoot formation was 83% and 50% on the medium containing 4 mg./l. BA and 4 mg./l. kinetin, respectively. The chromosome number from root tip obtained from tissue culture was 2n = 22. (**Keywords:** glory lily, tissue culture, tyrosine, Liliaceae, rhizome)

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 40002

Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: nooduan@kku.ac.th

บทนำ

ดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) อยู่ในวงศ์ Liliaceae เป็นสมุนไพรและไม้ดอกกึ่งไม้เลื้อยที่มีสีสันสวยงาม มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาแต่ได้นำมาปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อนทั่วๆ ไป ในประเทศไทยได้มีการนำเอาดองดึงมาใช้เป็นสมุนไพรแผนโบราณ หัวหรือเหง้าของดองดึงใช้ต้มกินแก้ทองอืด ท้องเฟ้อ ขับลม ขับเสมหะ โรค ไขข้อ โรคเรื้อน นอกจากประโยชน์ทางสมุนไพรของพืชชนิดนี้ ดองดึงมีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด สารที่สำคัญคือ โคลชิซีน (Colchicine) โดยพบสารนี้ในส่วนของลำต้น เมล็ดและเหง้าปริมาณมาก (นุชนาฏ, 2536) โคลชิซินเป็นสารที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ใช้ในการรักษาโรคเกาต์ ไขข้ออักเสบ มะเร็ง เป็นต้น ในทางการเกษตรใช้ในการช่วยชักนำให้พืชเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์ (กนิษฐา, 2542) ดองดึงยังมีดอกที่สวยงามแปลกตาและดองดึงบางพันธุ์มีการนำมาปลูกสำหรับเป็นไม้ตัดดอกที่ส่งออกต่างประเทศในราคาที่สูง

ดองดึงที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลาย จึงมีนักวิจัยสนใจขยายพันธุ์ดองดึงโดยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว และไม่จำกัดเรื่องฤดูกาล ได้มีการนำส่วนต่างๆ ของดองดึง ได้แก่ เหง้า ดอก ใบ และเมล็ดมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเพื่อสกัดสารโคลชิซิน วรากรณ์ (2529) พบว่าสูตรอาหารดัดแปลงของ MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1 มก./ล. สามารถชักนำเหง้าให้เจริญเป็นแคลลัสได้ดีและสามารถใช้เพิ่มปริมาณแคลลัสได้ ส่วน BA และ kinetin อย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อาหารที่เติม NAA หรือ NAA ร่วมกับ kinetin สามารถชักนำเหง้าให้เกิดแคลลัสและรากได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3 มก./ล. Finnie and Staden (1991) ศึกษาการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเหง้า ดอก ใบและเมล็ด พบว่าอาหารที่เติม 2,4-D 0.01-1 มก./ล. หรือ 2,4-D 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและมีขนาดเพิ่มเป็นสองเท่า Custer et al. (1994) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเหง้าดองดึงบนอาหารสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้น 10 มก./ล. ทำให้เนื้อเยื่อมีขนาดโตขึ้น 4-7 เท่าภายใน 18 สัปดาห์

ส่วนในการชักนำแคลลัสให้เกิดต้น Finnie and Staden (1991) พบว่าการเปลี่ยนถ่ายอาหาร โดยใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงสลับต่ำมีผลต่อการเจริญของดองดึง Custer et al. (1994) ศึกษาที่ความเข้มข้นของ BA 1 มก./ล. และ 10 มก./ล. พบว่า ถ้ามีการเปลี่ยนอาหารที่เพาะเลี้ยงจากระดับความเข้มข้นสูงและต่ำสลับกันสามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์และพบว่าชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึงมากกว่าส่วนอื่นคือ ส่วนปลายเหง้า

กรดอะมิโนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในการสังเคราะห์โปรตีน มีความสำคัญโดยเฉพาะการกระตุ้นการเติบโตของเซลล์ เป็นบัฟเฟอร์ช่วยรักษาสภาวะพีเอชภายในเซลล์ เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานรวมทั้งปกป้องพืชจากการติดโรค กรดอะมิโนยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่น เช่น โปรตีน เอมีน พิวรีนและไพริมิดีน อัลคาลอยด์ วิตามิน เอนไซม์ เป็นต้น

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยการใช้กรดอะมิโนไทโรซีนและสารเร่งการเจริญเติบโต ศึกษาปัจจัยในการชักนำให้เกิดต้น รวมทั้งการศึกษาจำนวนโครโมโซม เพื่อแน่ใจว่าการขยายพันธุ์ดองดึงที่ได้ในครั้งนี้มีจำนวนโครโมโซมเท่าเดิมเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุกรรมดองดึงในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

การชักนำให้เกิดแคลลัส

ผลของกรดอะมิโนไทโรซีนต่อการชักนำเหง้าให้เกิดแคลลัสในที่มีแสงและที่มืด

เพาะเลี้ยงเหง้าของดองดึงโดยนำเหง้ามาล้างให้สะอาดด้วยน้ำสบู่ ปล่อยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง นำมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย

โซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1.57%, 1.05% และ 0.525% ขั้นตอนละ 20, 25 และ 30 นาทีตามลำดับ เติม tween 2-3 หยดเขย่าเป็นครั้งคราว นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำเหง้าขนาด 1 เซนติเมตร ในสภาพปลอดเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มี 2,4-D มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้นต่างกันดังนี้ คือ 0, 1, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 มก./ล. จำนวนทั้งหมด 24 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ละ 24 ขวด ขวดละ 1 ชิ้น จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืดและที่มีแสง 1,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 24 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญและจำนวนที่เกิดแคลลัส

การชักนำให้เกิดต้น

ผลร่วมของ NAA และ BA ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้น

แบ่งการทดลองเป็นสองชุด โดยในชุดการทดลองแรก นำแคลลัสจากอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้น 50 มก./ล. น้ำหนัก 1 กรัมมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 0, 0.25, 1.25, 2.5 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 0, 0.25, 1.25, 5 และ 10 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยจัดทรีทเมนต์แบบ 5x5 Factorial รวมทั้งหมด 25 ทรีทเมนต์ๆ ละ 10 ขวด ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 นำแคลลัสน้ำหนัก 1 กรัมมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโต เป็นเวลา 20 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 0, 0.1, 2, 4 และ 8 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 0, 0.1, 2, 4, 8 และ 10 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยจัดทรีทเมนต์แบบ 5x6 Factorial รวมทั้งหมด 30 ทรีทเมนต์ๆ ละ 10 ขวด จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มีแสง 1,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยการย้ายเปลี่ยนอาหารในสูตรเดิมทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 36 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญและเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น

ผลของ BA และ kinetin ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้น

นำแคลลัสจากอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้น 50 มก./ล. น้ำหนัก 1 กรัมมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโต เป็นเวลา 20 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA หรือ kinetin เข้มข้น 0, 0.1, 1, 2, 4, 8 และ 10 มก/ล วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยอัดทรีทเมนต์แบบ 2x7 Factorial รวมทั้งหมด จำนวนทั้งหมด 14 ทรีตเมนต์ๆ ละ 12 ขวด จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มีแสง 1,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยการย้ายเปลี่ยนอาหารในสูตรเดิมทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 24 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญและเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น

การศึกษาโครโมโซมดองดึงจากราก

ศึกษาโครโมโซมดองดึงจากรากโดยวิธี Feulgen stain technique โดยนำปลายรากดองดึงจากอาหารสูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.25 มก./ล. ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย α-Bromonapthalene ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อหยุดการแบ่งนิวเคลียสให้อยู่ในระยะเมทาเฟส จากนั้นนำมาแช่ในกรดแอซิติกแอลกอฮอล์ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำมาล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เก็บรากไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทำการไฮโดรไลด์ด้วยกรดเกลือ 1 N HCl ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำมาวางบนสไลด์ หยดสีอะซีโตออซีน 2-3 หยด ทิ้งไว้ 10-60 นาที ทำให้เซลล์กระจายแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และทำการถ่ายภาพ

ผลการศึกษา

การชักนำให้เกิดแคลลัส

การเพาะเลี้ยงเหง้าดองดึงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 150,

200, 250 และ 300 มก./ล. เป็นเวลา 24 สัปดาห์ในที่มีแสงพบว่า ในอาหารที่มีกรดอะมิโนไทโรซีนเข้มข้น 1-50 มก./ล. ช่วยส่งเสริมการเกิดแคลลัสและที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. ช่วยชักนำเหง้าให้เกิดแคลลัสสูงสุด 85% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีนพบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง (**Figure 1**) ส่วนในที่มืดพบว่าบนอาหารที่มีไทโรซีน เข้มข้น 1-50 มก./ล. ช่วยส่งเสริมการเกิดแคลลัสและที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. ช่วยชักนำเหง้าให้เกิดแคลลัสสูงสุด 100% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลงเช่นกัน (**Figure 1**) และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในที่มีแสงและที่มืด พบว่า ในที่มืดเกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มีแสง และลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในทุกทรีทเมนต์จะเป็นแบบเกาะกันแน่นมีสีขาวหรือขาวปนเหลืองหรือสีน้ำตาลอ่อน และเมื่อนำแคลลัสจากสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกรดอะมิโนไทโรซีนเข้มข้น 50 มก./ล. น้ำหนัก 1 กรัมมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้เลี้ยงโดยในสัปดาห์ที่ 16 มีน้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 6.27±1.48 กรัม (**Table 1**)

การชักนำให้เกิดต้น

ผลร่วมของ NAA และ BA ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้น

นำแคลลัสจากสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนเข้มข้น 50 มก/ล น้ำหนัก 1 กรัมมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 0, 0.25, 1.25, 2.5 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 0, 0.25, 1.25, 5 และ 10 มก./ล. เป็นเวลา 32 สัปดาห์ พบว่า เฉพาะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA 5 มก./ล. ร่วมกับ BA 10 มก./ล. เท่านั้นสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 50% ส่วนทรีทเมนต์อื่นไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้แต่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

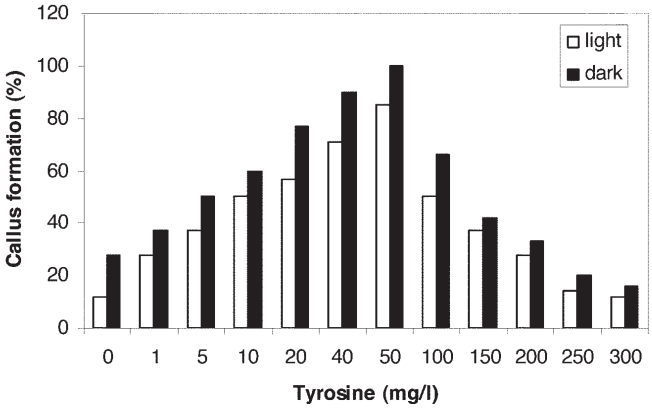

Figure 1 Effect of tyrosine on callus induction from rhizomes of *G. superba* Linn. on MS medium supplemented with 1 mg/l 2, 4-D and 1 mg/l BA under the light and dark condition after 24 weeks of culture.

Table 1 The average fresh weight of callus of *G. superba* Linn. grown on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BA and 50 mg/l tyrosine in the dark condition after 16 weeks of culture.

Week no.	Average fresh weight of callus (g)
4	1.95 ± 1.83
8	2.32 ± 1.56
12	3.36 ± 1.74
16	6.27 ± 1.48

(**Table 2**) ส่วนแคลลัสที่นำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโต เป็นเวลา 20 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 0, 0.1, 2, 4 และ 8 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 0, 0.1, 2, 4, 8 และ 10 มก./ล. เป็นเวลา 36 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 0, 0.1, 2, 4 และ 8 มก./ล. อย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี BA 0.1, 2, 4, 8 และ 10 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ และแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA 4 มก./ล. ร่วมกับ BA 4 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดต้นสูงสุด 100% (**Table 3**) ลำต้นมีลักษณะเรียวยาว ใบมีสีเขียว

Table 2 Percentage of shoot formation from callus of *G. superba* Linn. grown on MS medium supplemented with various concentrations of BA and NAA after 32 weeks of culture.

Concentrations		Shoot formation	Shoot formation	Average fresh weight of
BA (mg/l)	NAA (mg/l)	(no.)	(%)	callus (g)
0	0	0/30 , R	0	1.91 ± 0.67 cde
	0.25	0/13, R	0	1.92 ± 0.14 bcde
	1.25	0/7 , R	0	1.93 ± 0.18 bcde
	2.5	0/10 , R	0	2.95 ± 0.98 bcd
	5	0/9	0	1.95 ± 0.35 bcde
0.25	0	0/16 , R	0	2.07 ± 0.50 bcd
	0.25	0/20 , R	0	2.08 ± 0.68 bcd
	1.25	0/15 , R	0	2.09 ± 0.51 bcd
	2.5	0/5 , R	0	2.15 ±1.03 ab
	5	0/8 , R	0	2.11 ± 0.51 bcd
1.25	0	0/20 , R	0	1.90 ± 0.59 bcde
	0.25	0/14 , R	0	1.93 ± 0.18 bcde
	1.25	0/12 , R	0	1.92 ± 0.19 bcde
	2.5	0/8	0	1.91 ± 0.11 bcde
	5	0/9 , R	0	1.87 ± 0.42 cde
2.5	0	0/19 , R	0	2.02 ± 0.40 bcd
	0.25	0/28 , R	0	2.16 ± 0.97 a
	1.25	0/11 , R	0	2.04 ± 0.21 bcd
	2.5	0/7 , R	0	2.01 ± 0.90 bcd
	5	0/14 , R	0	1.17 ± 0.55 e
5	0	0/2 , R	0	2.08 ± 0.41 bcd
	0.25	0/4 , R	0	2.13 ± 0.51 bc
	1.25	0/20, R	0	1.98 ± 0.83 bcd
	2.5	0/3	0	1.92 ± 0.81 bcde
	5	0/10	0	1.91 ± 0.17 bcde
10	0	0/9 , R	0	1.87 ± 0.22 cde
	0.25	0/19 , R	0	2.01 ± 0.26 bcd
	1.25	0/12 , R	0	2.07 ± 0.91 bcd
	2.5	0/11	0	1.85 ± 0.12 de
	5	8/16	50	1.95 ± 0.20 bcde

R = Root

Means followed by the different letters are significantly different according to DMRT ($P<0.05$).

ผลของ BA และ kinetin ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดต้น

นำแคลลัสจากสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนเข้มข้น 50 มก./ล. น้ำหนัก 1 กรัมมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโต เป็นเวลา 20 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA หรือ kinetin เข้มข้น 0, 0.1, 2, 4, 8 และ 10 มก./ล. เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารเร่งการเจริญไม่สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้ ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร ที่มี BA หรือ kinetin เข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นต่ำ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA หรือ kinetin 4 มก./ล. สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดต้น

Table 3 Percentage of shoot formation from callus of *G. superba* Linn. grown on MS medium supplemented with various concentrations of BA and NAA after 36 weeks of culture.

Concentrations		Shoot formation	Shoot formation	Average fresh weight of
BA (mg/l)	NAA (mg/l)	(no.)	(%)	callus (g)
0	0	0/9	0	1.19 ± 0.74 e
	0.1	0/8	0	1.23 ± 0.93 cde
	2	0/6	0	1.67 ± 0.75 cde
	4	0/4 , R	0	1.75 ± 0.43 cde
	8	0/8	0	2.38 ± 0.86 bcd
0.1	0	1/4	25	1.50 ± 0.50 cde
	0.1	2/7	28	1.67 ± 0.75 cde
	2	3/10	30	1.90 ± 0.83 cde
	4	4/9 , R	44	2.11 ± 0.92 bcd
	8	2/8	25	2.18 ± 0.86 bcd
2	0	1/3	33	1.32 ± 0.48 cde
	0.1	2/6	33	1.33 ± 0.47 cde
	2	3/7	42	1.71 ± 0.71 cde
	4	3/8	37	2.25 ± 0.66 bcd
	8	2/8	25	2.31 ± 0.99 bcd
4	0	4/9	44	1.81 ± 0.47 cde
	0.1	5/10	50	2.10 ± 0.83 bcd
	2	6/9	66	2.89 ± 0.57 bcd
	4	10/10	100	3.38 ± 1.21 ab
	8	5/8	62	2.75 ± 0.43 bcd
8	0	2/4	50	2.75 ± 0.43 bcd
	0.1	2/3	66	3.33 ± 0.46 de
	2	3/7	42	2.57 ± 0.49 bcd
	4	4/8	50	3.37 ± 0.70 ab
	8	2/8	25	3.25 ± 0.66 abc
10	0	4/10	40	2.33 ± 0.47 bcd
	0.1	4/8	50	2.75 ± 0.43 bcd
	2	3/7	42	3.00 ± 0.82 abc
	4	4/8	50	3.32 ± 0.47 ab
	8	3/9	33	3.39 ± 0.50 a

R = Root

Means followed by the different letters are significantly different according to DMRT ($P<0.05$).

ได้ 83% และ 50% ตามลำดับ ลักษณะลำต้น อวบน้ำ ใบมีสีเขียวเข้ม (**Figure 2**) และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นลดลง ลักษณะต้นยาวเรียว ใบมีสีเขียวปนเหลือง พบว่าอาหารที่มี BA 4 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดต้นมีความยาวเฉลี่ยสูงสุด 4 เซนติเมตร เทียบกับอาหารสูตรอื่นหรืออาหารที่มี kinetin ความเข้มข้นต่างๆ (**Table 4**)

โครโมโซมดองดึง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมดองดึงจากรากของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี feulgen stain technique พบว่า จำนวนโครโมโซม 2n = 22

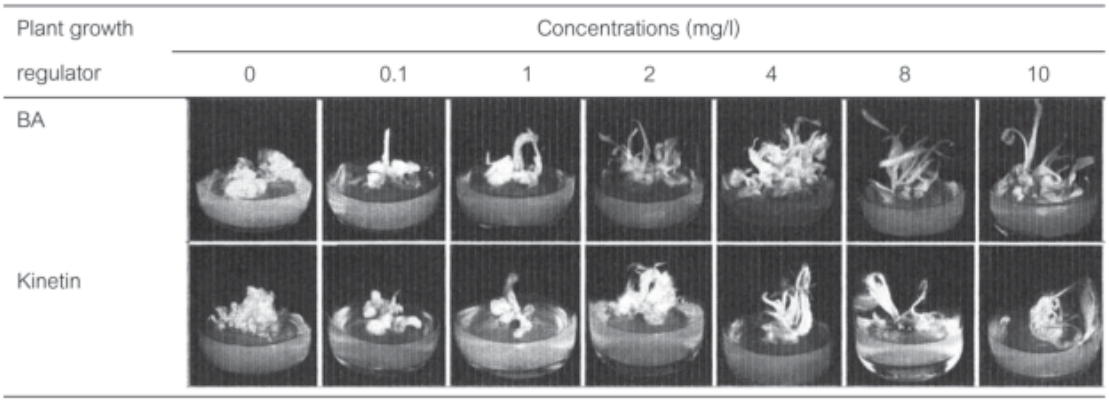

Figure 2 In vitro propagation of *G. superba* Linn. on MS medium containing various concentrations of BA or kinetin after 24 weeks of culture.

Table 4 Effect of BA or kinetin on shoot formation of *G. superba* Linn. after 24 weeks of culture.

Concentrations (mg/l)	Shoot formation (no.)	Shoot formation (%)	Average shoot length (cm)
BA			
0	0/12	0	0 ± 0.00
0.1	1/12	8	2 ± 0.00 c
1	2/11	18	2 ± 0.45 bc
2	6/12	50	2 ± 0.63 bc
4	**10/12**	**83**	**4 ± 0.41 a**
8	6/12	50	3 ± 0.85 b
10	4/10	40	3 ± 0.95 b
Kinetin			
0	0/10	0	0 ± 0.00
0.1	1/12	8	2 ± 0.00 c
1	2/11	18	2 ± 0.42 bc
2	4/12	33	2 ± 0.81 bc
4	**5/10**	**50**	**3 ± 0.70 a**
8	3/10	30	3 ± 0.30 ab
10	3/10	30	3 ± 0.72 a

Means followed by the different letters within group of BA or Kinetin are significantly different according to DMRT ($P<0.05$).

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนไทโรซีนต่อการเจริญของเหง้าดองดึง พบว่า เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้น 50 มก./ล. ในที่มีแสงสามารถชักนำเหง้าให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด 85% ส่วนในที่มืดบนสูตรอาหารเดียวกันสามารถชักนำเหง้าให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด 100% จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มืดสามารถสร้างแคลลัสได้ดีกว่าที่มีแสง ซึ่งเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่มีแสงจะเกิดแคลลัสบริเวณด้านล่างที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแสงทำให้ออกซินไม่เคลื่อนย้ายไปยังส่วนบนของเนื้อเยื่อจึงเกิดแคลลัสได้น้อยกว่าในที่มืด ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรากรณ์ (2529) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงเหง้าในที่มืดเกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มีแสง เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของกรดอะมิโนไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้นต่างกันต่อการสร้างแคลลัส พบว่าอาหารที่มีไทโรซีน 50 มก./ล. ช่วยส่งเสริมการเจริญของแคลลัสได้ดีที่สุด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน กรดนิวคลีอิก คลอโรฟิลล์ พอร์ไพริน โคเอนไซม์ และฮอร์โมนบางชนิด และยังช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน แต่จากการทดลองการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีนเป็น 100-300 มก./ล. การสร้างแคลลัสจะลดลงเป็นลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญของแคลลัสดองดึงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ร่วมกับกรดอะมิโนไทโรซีนที่ระดับความเข้มข้น 50 มก./ล. มีการเจริญของแคลลัสปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาโดยในสัปดาห์ที่ 16 มีน้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ย 6.27 กรัม

ผลของสารเร่งการเจริญออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า บนอาหารที่มี NAA 4 มก./ล. ร่วมกับ BA 4 มก./ล. สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้ 100% ทั้งนี้อาจเนื่องจากการนำแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโตอย่างน้อยเป็นเวลา 20 สัปดาห์ ทำให้แคลลัสปรับความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน ที่เหมาะสมได้ เมื่อนำแคลลัสเหล่านั้นมาเลี้ยงในอาหารที่มีออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมจึงสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และจากการศึกษาผลของ BA หรือ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดต้น พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA หรือ kinetin 4 มก/ล สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้สูงสุด 83% และ 50% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า อาหารสูตร MS ที่มี BA สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้ดีกว่าอาหารที่มี kinetin ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sayeed Hassan and Roy (2005) ที่พบว่า อาหารที่มี kinetin อย่างเดียว และ kinetin ร่วมกับ NAA ไม่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้น ส่วน Jadhav and Hegde (2001) พบว่า หากจะชักนำต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดดองดึง อาหารสูตรที่เหมาะสมคือ อาหารสูตร MS ที่มี BAP 5 มก./ล. Cacasein hydrolysate 50 มก./ล. และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 20% แสดงให้เห็นว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นกับชนิดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง มีรายงานจำนวนมากที่พบว่า BA สามารถชักนำให้เกิดต้นดีกว่า kinetin ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่า BA มีฤทธิ์ (active) สูงกว่า kinetin และโมเลกุลมีขนาดเล็กกว่า อาจทำให้พืชสามารถดูดซึมได้ง่าย

จำนวนโครโมโซมของรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบกับรากที่ได้จากธรรมชาติ จากการศึกษาของสมนึก (2538) และ Vijayavalli and Mathew (1992) พบว่า จำนวนโครโมโซมของดองดึงเท่ากับ 22 เท่ากับจำนวนโครโมโซมของรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แสดงว่าสารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของดองดึงเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กนิษฐา คุ้มวณิชย์. 2542. ผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง *Gloriosa superba* Linn. ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโม *Citrullus lanatus* Mats & Nakai ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นุฏนาฏ กิจเจริญ. 2536. การศึกษาโคลชีซีนในเมล็ดดองดึง. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วรากรณ์ ฉลองกิตติศักดิ์. 2529. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมนึก ผู่กระโทก. 2539. การศึกษาสัณฐานวิทยากายวิภาคและเรณูวิทยาของดองดึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร, กรุงเทพฯ.

Custer, J.B.M., and J.H.W. Bergervote. 1994. Micropropagation of Gloriosa; Toward a practical protocol.' Scientia Horticulturae. Netherland. 57(4): 323-334.

Finnei, J.F., and J. Staden. 1991. Isolation of cochicine from *Sandersoria aurtiaca* and *Gloriosa superba* Linn. Scientia Horticulture. 138(6): 691-695.

Jadhave, S.Y., and B.A. Hegde. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gloriosa* L. Indian J Exp. Biol. 39(9): 943-946.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-479.

Sayeed Hassan, A.K.M., and S. K. Roy. 2005. Micropropagation of *Gloriosa superba* L. through high frequency shoot proliferation. Plant Tissue Culture. 15(1): 67-74.

Vijayavalli, B., and P.M. Mathew. 1992. Cytology of species of *Gloriosa superba* Linn. Nucleus Calcutta. 35(1): 55-58.