NU Science Journal 2011; 8(1): 87 - 100

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของใบหยาดน้ำค้าง (*Drosera communis* St.Hil.) ในสภาพปลอดเชื้อ

อนุพันธ์ กงบังเกิด สมจิตต์ หอมจันทร์ และคงศักดิ์ พร้อมเทพ

Effects of plant growth regulators and plant growth retardants on growth and development on *in vitro* leaf culture of *Drosera communis* St.Hil.

Anupan Kongbangkerd, Somjit Homchan and Kongsak Promthep

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

Corresponding author: E-mail: anupank73@hotmail.com

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงต้นชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง *Drosera communis* St.Hil. บนอาหารสูตรดัดแปลง Murashige and Skoog (MS) 1962 ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เจลไลท์ 2.0 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA , Kinetin, TDZ, NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม ต่อลิตร และ NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตสูงที่สุด (100 %) ในขณะที่อาหารสูตรที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกกลับเป็นต้นใหม่ (80 %) และจำนวนต้นต่อชิ้นส่วน (34.7 ต้น) จำนวนรากต่อชิ้นส่วน (3.7 ราก) และเส้นผ่านศูนย์กลางของกอ (1.49 เซนติเมตร) สูงสุดตามลำดับ และจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม paclobutrazol และ uniconazole ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบจะให้เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตสูงสุดไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม พบว่า อาหารสูตรที่เติม paclobutrazol ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/l สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่มากที่สุด (เฉลี่ย 82 ยอดต่อใบ) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรควบคุม

คำสำคัญ: สารควบคุมการเจริญเติบโต หยาดน้ำค้าง การเพาะเลี้ยงใบ *in vitro*

Abstract

In vitro leaf of *Drosera communis* St.Hil. was cultured on Murashige and Skoog (MS) 1962 medium supplemented with 30 g/l sucrose and various plant growth regulators; BA, Kinetin, NAA and TDZ at 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l and a combination of NAA and BA at 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l for 6 weeks. The results indicated that highest percentage of survival (100 %) was obtained when explants were cultured on the medium supplemented with a combination of 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA. While the highest percentage of shoot regeneration (80 %), number of new shoots per explant (34.7 shoots), number of roots per shoot clump (3.7 roots) and diameter of shoot clump (1.49 cm) could obtain on the medium with no hormone. *In vitro* leaf explants were cultured on medium supplemented with Paclobutrazol, Uniconazole at 0, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/l for 6 weeks. The results found that highest percentage of survival of leaf explants showed no significantly different. However, the results clearly evidenced that the medium with either 0.1 mg/l or 0.5 mg/l of paclobutrazol could induce highest number of shoots (82 shoot per leaf explants) and significantly different from the control medium.

Keywords: Plant Growth Regulators, Sundew, Leaf culture, *in vitro*

บทนำ

หยาดน้ำค้าง *Drosera communis* เป็นพืชกินแมลงในวงศ์ Droseraceae ที่ขึ้นกระจายในพื้นที่เขตอบอุ่นถึงเขตหนาวของทวีปยุโรป *D. communis* เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นยาจึงถูกนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรในการรักษาโรคบางอย่าง เช่น รักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัส เป็นต้น (Ferreira *et al.*, 2004, Wawrosch *et al*., 2005) อย่างไรก็ตาม หยาดน้ำค้าง *D. communis* นี้ถูกทำลายจากธรรมชาติอย่างรวดเร็ว เนื่องจากป่าที่ถูกทำลายมากขึ้น และการเก็บนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมมากขึ้น จึงทำให้ต้นพืชในธรรมชาติลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปแล้วพืชชนิดนี้สามารถขยายพันธุ์ได้โดยอาศัยเมล็ด อย่างไรก็ตามวิธีการปกติโดยอาศัยเมล็ดนั้น มีอัตราการขยายพันธุ์ต่ำ ดังนั้น การนำเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้เพื่อขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ จึงมีแนวโน้มที่ดีในการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ได้ในปริมาณมากอย่างรวดเร็ว และประสบความสำเร็จในพืชสกุล Drosera หลายสกุล ดังตัวอย่างรายงานการทดลองของ Bobák และคณะ (1995) ที่ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. rotundifolia* บนอาหารสูตร MS (1962) ที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA พบว่า อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม NAA ความเข้มข้น 10^{-8} โมลาร์ จะชัก

นำให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้ดีที่สุด Ichiishi และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน *D. spathulata* ลงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม NH_4NO_3 10.31 mM และ KNO_3 9.40 mM โดยไม่ใส่น้ำตาล พบว่า ยอดมีการเจริญโดยมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีสีเขียวเข้ม นอกจากนี้ยังทำให้เกิดขนสีแดงขึ้นที่ใบอ่อนอีกด้วย Jang และ Park (1999) ได้ทำการทดลองศึกษาการเพาะเมล็ดของ *D. rotundifolia* บนอาหารสูตร MS (1962) โดยยอดสามารถงอกใหม่ได้ภายในเวลา 3 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด และพบว่า ยอดจากต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ MS จะมีจำนวนยอดมากกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MS และถ้ามีการเติมฮอร์โมน Kinetin หรือ BA ลงไปในอาหารสูตร 1/2 MS จะทำให้ยับยั้งการเจริญของยอด ซึ่ง BA จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของยอดมากกว่า Kinetin ในอาหารสูตร 1/2 MS และจากรายงานของ Jang (2003) ได้ทำการทดลองศึกษาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของ *Dionaea muscipula* Ellis บนอาหารสูตร MS (1962) ที่แปรผันความเข้มข้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร ชนิดของฮอร์โมนไซโตไคนิน และออกซิน เพื่อศึกษาถึงการเจริญของยอดและราก เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ยอดจะมีการเจริญสูงสุดบนอาหารสูตร 1/3 MS ที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 2.3 µM และมีค่า pH 5.5 ในขณะที่รากจะมีการเจริญสูงสุดบนอาหารสูตร 1/3 MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 µM ในขณะที่ Kawiak และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *Drosera angelica* และพบว่า *D. angelica* จะมีอัตราการงอกกลับเป็นต้นใหม่สูงสุดเมื่อเติม BA ความเข้มข้น 0.05 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.005 µM บนอาหาร Fast medium ในขณะที่ *D. cuneifolia* จะมีอัตราการงอกกลับเป็นต้นใหม่ปกติในอาหาร 1/2 MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2 µM ร่วมกับ NAA 0.2 µM ต่อมา Kim และ Jang (2004) ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด *Drosera peltata* โดย พบว่า ยอดจะมีการเจริญและเกิด tuber มากที่สุดในอาหารสูตร 1/2 MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเนื้อเยื่อคือ 5.7 รวมไปถึงรายงานของ Goncalves และ Romano (2005) ที่ทำการศึกษาเพาะ เลี้ยงชิ้นส่วน *Drosophyllum lusitanicum* บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/l และ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 mg/l พบว่า รากจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นและเจริญได้ดีใน อาหารสูตร ¼ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.2 mg/l

อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ *D.communis* ให้คงอยู่และช่วยเพิ่มปริมาณต้นให้มากขึ้น นั้น ยังมีรายงานไม่มากนัก ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการ ศึกษาในครั้งนี้เพื่อต้องการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของใบหยาดน้ำค้าง *D. communis* ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลในการต่อยอดการขยายพันธุ์หยาดน้ำค้าง *D. communis* อย่างรวดเร็วต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของไซโตไคนิน และออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง *D. communis* โดยตัดชิ้นส่วนใบในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) 1962 ที่ดัดแปลงโดยเติม BA, Kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 14 สูตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารให้มีค่า 5.2

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง *D. communis* โดยนำชิ้นส่วนใบวางเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (1962) ที่ดัดแปลงโดยเติมสาร Paclobutrazol (PAC) และ Uniconazole (UNZ) ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 9 สูตร ปรับความเป็นกรด–ด่างของอาหารให้มีค่า 5.2

สภาวะของการเพาะเลี้ยง

ทั้งสองการทดลองจะวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบจำนวน 20 ชิ้นส่วน บนจานแก้วที่เติมอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละสูตรทำการทดลอง 5 ซ้ำ วางเลี้ยงในห้องที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันที่ความเข้มแสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

สังเกต และบันทึกผลการทดลองต่างๆ ได้แก่ จำนวนยอด จำนวนราก จำนวนใบ จำนวนหน่อใหม่ ความยาวยอด ความยาวราก รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ โดยทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) และมีการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของไซโตไคนินและออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงใบ *D. communis* โดยเมื่อนำใบ *D. communis* ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่มีการเติม BA, Kinetin และ TDZ และ NAA หรือเติมร่วมกัน (NAA ร่วมกับ BA) ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อเพาะใบ *D. communis* ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่ไม่มีการเติมสาร

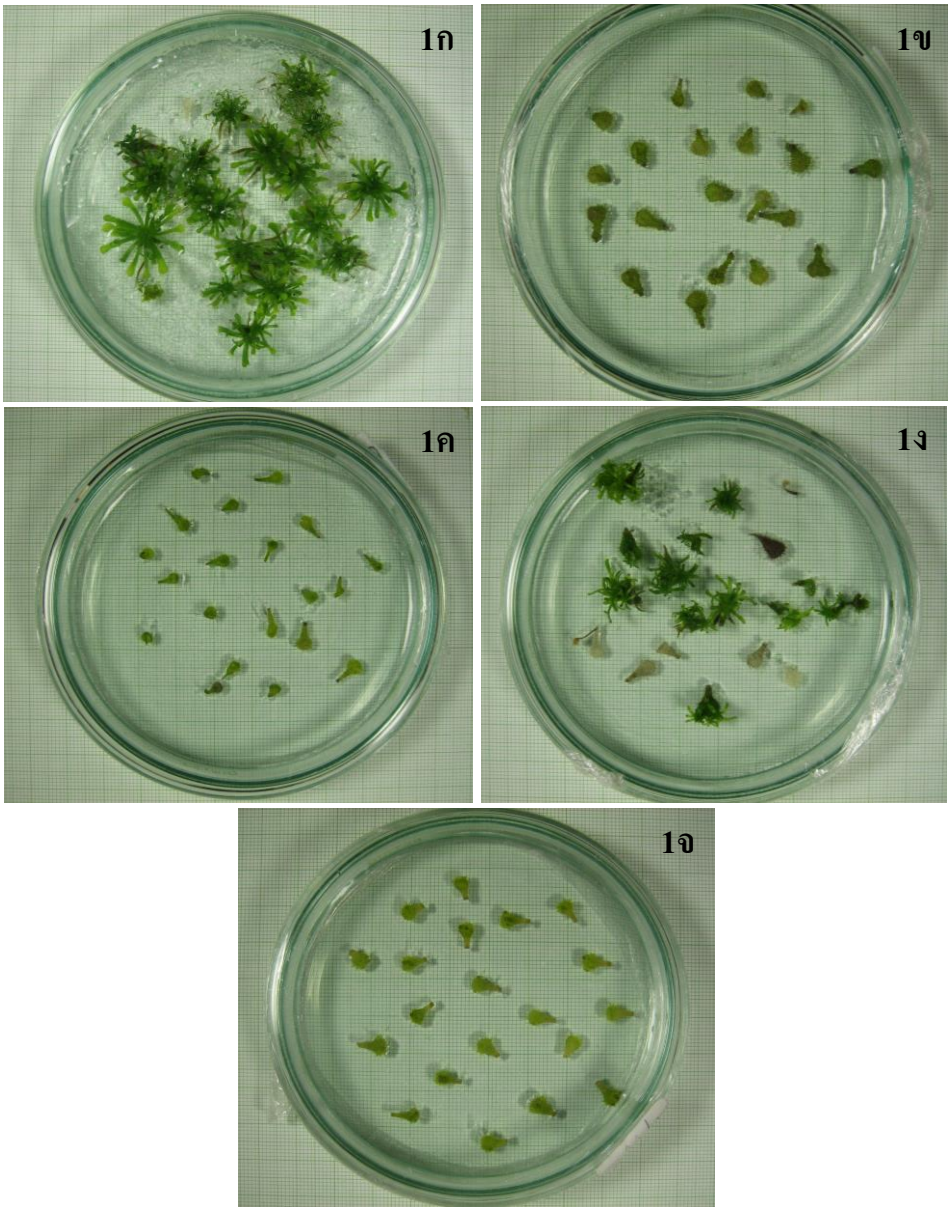
ควบคุมการเจริญเติบโตจะมีการเจริญเติบโตรวดเร็วมาก มีใบขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม และให้เปอร์เซ็นต์การงอก (80.0 %) จำนวนต้นต่อชิ้น (34.72 ต้นต่อชิ้น) จำนวนรากต่อชิ้นส่วน (3.74 รากต่อชิ้น) ความยาวราก (1.14 ซม) และเส้นผ่านศูนย์กลาง (1.49 ซม.) นั้น จะให้ผลการทดลองดีที่สุด ซึ่งรากจะมีขนาดใหญ่และยาวโดยเฉลี่ยดีที่สุดอีกด้วย ดังแสดงในตาราง 1 และภาพ 1(ก-ง) และจากผลการ ทดลอง เลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตรที่เติม BAในปริมาณที่แตกต่างกัน (0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อใบจะมีลักษณะโป่งพอง เจริญเติบโตช้าและมียอดขึ้นเล็กน้อย และจากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว นอกจากจะไม่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ แล้วยังทำให้ชิ้นส่วนใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนแดงและกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มจนเนื้อเยื่อตายในที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำที่สุด คิดเป็น 3 % และจากการสังเกตและบันทึกผลการทดลองเติม TDZ ลงในอาหารที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.1, 0.5 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าต้นที่งอกออกมาจากชิ้นส่วนใบนั้นจะเกิดเป็นแคลลัสก่อน ซึ่งแคลลัสจะมีลักษณะเป็นปุ่มๆ นูนขึ้นสีน้ำตาลปนเขียว ลักษณะเหมือนตายอดขนาดเล็กจำนวนมาก และต่อมาจึง กลายเป็นต้นอ่อนขนาดเล็ก ส่วนใบที่ขึ้นจะมีขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน มีลักษณะขึ้นรวมกันเป็นกระจุก รากมีขนาดเล็กและปริมาณเล็กน้อย สำหรับสูตรอาหารที่เติม Kinetin ความเข้มข้นที่ต่างกัน (0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าชิ้นส่วนใบนั้นจะมีสีเขียว ลักษณะม้วนงอและโป่งพองขึ้น ซึ่งไม่เจริญ เป็นต้น และจากการทดลองผลของ NAA ร่วมกับ BA ต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนใบ *D. communis* พบว่าใบมีการเจริญและพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสในทุกสูตรอาหาร โดยสูตรอาหารที่เติม NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เจริญกลายเป็นแคลลัสได้มากที่สุดโดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะนูนเป็นสีเขียวปนน้ำตาลซึ่งไม่เจริญพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ และขนาดของ แคลลัสจะขยายใหญ่ขึ้น

และจากการทดลองศึกษาผลของ Paclobutrazol และ Uniconazole ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของใบ *D. communis* ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่เติมพาโคบิวทาโซลหรือเติมยูนิโคนาโซล ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบ *D. communis* ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่เติม Uniconazole 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตสูงสุด ส่วนเปอร์เซ็นต์การงอกนั้น พบว่า ทุกสูตรอาหารให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สูตรอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนใดๆ และสูตรอาหารที่เติม Paclobutrazol 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด สูตรที่เติม Paclobutrazol 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุด หรือต้นต่อชิ้นสูงที่สุด (82.67 ต้นต่อชิ้น) โดยอาหารสูตรที่เติม Uniconazole 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนรากต่อกอ (2.05 รากต่อกอ) และความยาวของราก (0.77 ซ.ม.) ดีที่สุดในขณะที่สูตรที่เติม Paclobutrazol 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มต้นที่เกิดขึ้นใหม่โดยเฉลี่ยใหญ่ที่สุด ดังตาราง 2 ภาพ 2(ก-ฉ)

ตาราง 1 แสดงผลของไซโตไคนินและออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงใบ *D. communis* เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ฮอร์โมน	(mg/l)	% การรอดชีวิต	% การเกิดต้นใหม่	จำนวนต้นเฉลี่ย	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
No hormone		83.50 ± 7.69abc	80.00 ± 20.0a*	34.72 ± 4.19a	3.74 ± 1.04a	1.14 ± 0.27a
BA	0.5	93.00 ± 0.93ab	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
	1.0	98.00 ± 2.00a	1.00 ± 1.00b	0.20 ± 0.20c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
	2.0	86.50 ± 3.84abc	2.50 ± 2.50b	0.20 ± 0.20c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
Kinetin	0.5	99.50 ± 0.50a	0.00 ± 0.00b	0.07 ± 0.07c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
	1.0	81.70 ± 7.92abc	1.11 ± 1.11b	0.06 ± 0.07c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
	2.0	74.00 ± 15.91bc	1.00 ± 1.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
TDZ	0.1	98.25 ± 0.94a	31.25 ± 20.34b	8.13 ± 7.97bc	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
	0.5	72.75 ± 10.09 c	18.00 ± 10.32b	9.93 ± 4.98bc	0.01 ± 0.01b	0.04 ± 0.04b
	1.0	77.25 ± 4.55bc	29.71 ± 18.44b	12.67 ± 4.93b	0.56 ± 0.36b	0.18 ± 0.13b
NAA	0.5	3.00 ± 2.00d	20.00 ± 20.00b	0.47 ± 0.29c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
NAA 0.5 + BA 0.5		100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
NAA 1.0 + BA 1.0		99.00 ± 1.00a	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
NAA 1.0 + BA 2.0		98.00 ± 2.00a	0.00 ± 0.00b	1.40 ± 1.40c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b

หมายเหตุ* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

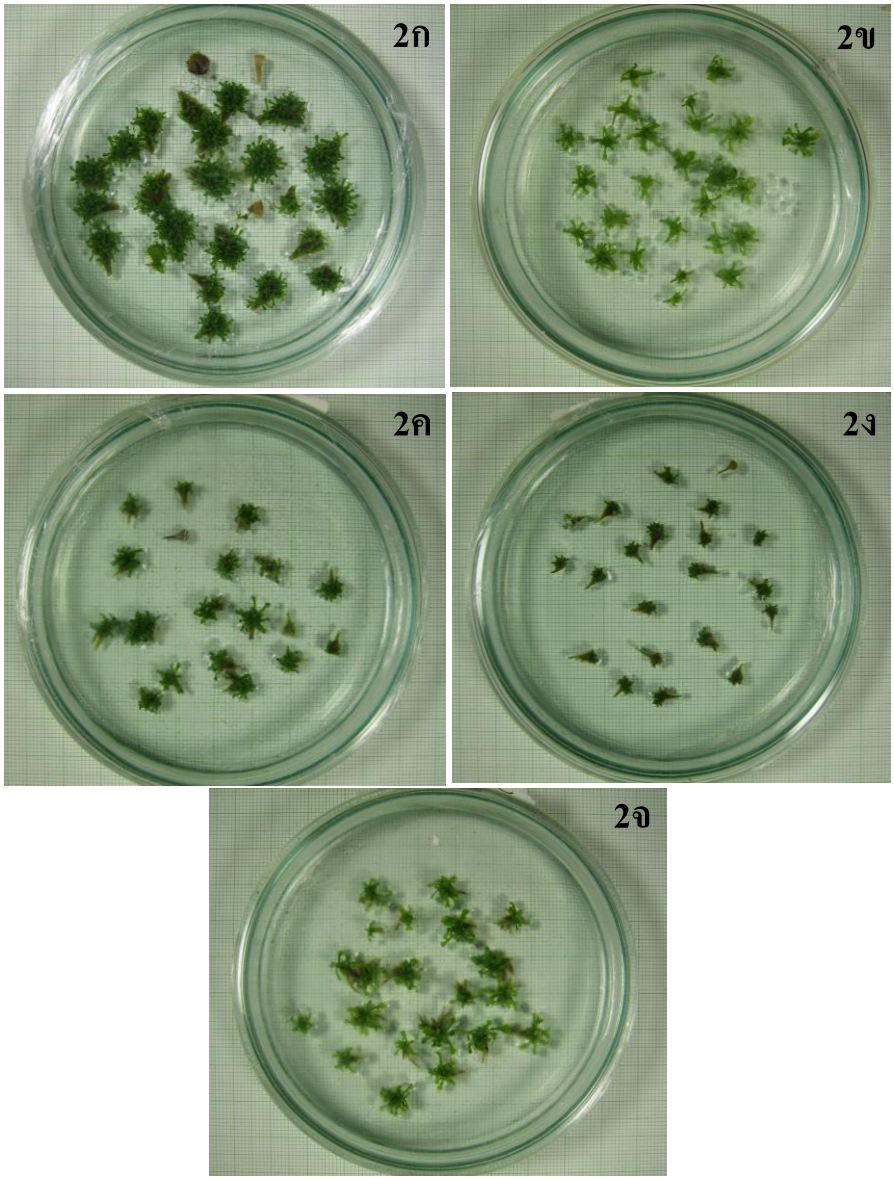


ภาพ 1(ก-จ) แสดงการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของใบ *Drosera communis* บนอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (1ก) และเติม BA 2.0 mg/l (1ข) Kinetin 0.5 mg/l (1ค) TDZ 1.0 mg/l (1ง) และสูตรที่เติม NAA 1.0 mg/l + BA 1.0 mg/l (1จ) ที่อายุ 6 สัปดาห์

ตาราง 2 ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงใบ *Drosera communis* ที่เลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารชะลอการเจริญเติบโต (mg/l)		% การรอดชีวิต	% การงอก	จำนวนต้นเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย	ความยาวราก (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)
No hormone		99.00 ± 1.00a*	100.00 ± 0.00a	24.80 ± 2.81bc	0.62 ± 0.26cd	0.36 ± 0.18bc	1.46 ± 0.33a
Paclobutrazol	0.1	98.75 ± 0.40ab	87.00 ± 9.43a	82.67 ± 6.91a	1.25 ± 0.48abcd	0.27 ± 0.04bcd	1.52 ± 0.11a
Paclobutrazol	0.5	99.25 ± 0.75a	100.00 ± 0.00a	82.13 ± 3.95a	0.93 ± 0.33abcd	0.22 ± 0.08bcd	1.28 ± 0.06ab
Paclobutrazol	1.0	98.75 ± 1.25ab	90.00 ± 5.24a	32.87 ± 4.24b	0.69 ± 0.22bcd	0.10 ± 0 .03cd	0.59 ± 0.07cd
Paclobutrazol	2.0	98.75 ± 0.97ab	99.00 ± 1.00a	38.20 ± 3.73b	1.64 ± 0.63abc	0.43 ± 0.14b	1.18 ± 0.11ab
Uniconazole	0.1	99.75 ± 0.25a	82.15 ± 6.63a	36.07 ± 5.21b	1.86 ± 0.58ab	0.23 ± 0.08bcd	0.92 ± 0.00bc
Uniconazole	0.5	99.25 ± 0.75a	82.00 ± 9.03a	16.20 ± 6.21c	0.06 ± 0.04d	0.01 ± 0.00d	0.71 ± 0.08cd
Uniconazole	1.0	98.50 ± 1.00ab	85.22 ± 7.23a	29.07 ± 6.59bc	0.23 ± 0.16d	0.02 ± 0.01d	0.49 ± 0.12d
Uniconazole	2.0	95.55 ± 2.08b	95.00 ± 3.87a	39.40 ± 5.06b	2.05 ± 0.10a	0.77 ± 0.11a	1.25 ± 0 06ab

หมายเหตุ* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพ 2(ก-ง) แสดงการเกิดต้นใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *Drosera communis* บนอาหารสูตรที่เติม Paclobutrazol 0.1 mg/l (2ก), Paclobutrazol 0.5 mg/l (2ข), Uniconazole 0.1 mg/l (2ค) Uniconazole 0.5 mg/l (2ง) และสูตรที่ไม่เติมฮอร์โมน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ *Drosera communis* St.Hil.ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS (1962) ที่เติมฮอร์โมนไซโตไคนิน (BA Kinetin และ TDZ) ออกซิน (NAA) และ/หรือเติม NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงใบของ *D. communis* ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตสูงสุด ซึ่งในช่วงสองสัปดาห์แรกที่ทำการทดลองนั้น ชิ้นส่วนใบของ *D. communis* จะมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา โดยอาหารที่เติม TDZ (ในทุกระดับความเข้มข้น) จะพัฒนาเป็นแคลลัสก่อนแล้วจึงพัฒนาเกิดเป็นพืชต้นใหม่ สำหรับอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงจะมีการพัฒนาจะเกิดเป็นแคลลัส แต่จะไม่มีการเจริญและพัฒนาเป็นต้นส่วนในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด (80 %) ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาโดย Bobák และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. rotundifolia* บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมนไซโตไคนิน (BA) ร่วมกับออกซิน (NAA) และพบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน หรือเติม NAA ความเข้มข้น 10^{-8} โมลาร์ จะชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่ว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง *Drosera communis* ตอบสนองต่อฮอร์โมนต่างๆ ได้ในอัตราที่ต่ำ จึงทำให้การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาเกิดขึ้นได้น้อยและช้า และจากการบันทึกผลการทดลองเติม TDZ ลงในอาหารที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และสังเกตพบว่าต้นที่งอกออกมาจากชิ้นส่วนใบนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างคล้ายแคลลัสที่มีลักษณะเป็นปุ่มๆ นูนขึ้นสีน้ำตาลปนเขียว ลักษณะเหมือนตายอดขนาดเล็กจำนวนมาก และต่อมาจึงกลายเป็นต้นอ่อนขนาดเล็กนั้น พบว่ามีรายงานที่แสดงให้เห็นถึงผลของ TDZ ต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงให้กลายเป็นเนื้อเยื่อเจริญและกลุ่มของตายอดขนาดเล็ก เมื่อได้รับความเข้มข้นที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน (Huetteman and Preece, 1993)

จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *D. communis* บนอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS (1962) ที่เติม Paclobutrazol หรือ Uniconazole ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อเพาะใบ *D. communis* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม Uniconazole 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่นั้น พบว่า ในทุกสูตรอาหารให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากชิ้นส่วนใบจะเกิดการงอกในระยะเวลาใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่เติม Paclobutrazol 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ดีที่สุด สารชะลอการเจริญเติบโตนั้น ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อวัตถุประสงค์

ที่แตกต่างกันออกไป เช่น การชักนำให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเกิดการสร้างอวัยวะที่จำเพาะ ดังตัวอย่างรายงานการศึกษาการสร้างหัวย่อย (cormlet) จากการเลี้ยงชิ้นส่วนหัว (corms) ของแกลดิโอลัส (Ziv, 1989) การสร้างหัวย่อยจากชิ้นส่วนต้นของมันฝรั่งชนิดต่างๆ (Simko, 1993) รวมไปถึงการชักนำให้เกิดการสร้างเหง้าจิ๋ว (microrhizome) ขึ้นจากชิ้นส่วนต้นของขมิ้นชัน (อนุพันธ์ กงบังเกิด และวีระชน ยานะฝั่น, 2005) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการนำเอาสารชะลอการเจริญเติบโตมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างตายอดและต้นใหม่ในพืชหลายชนิด (Escalona *et al*., 1999; Malagorzata and Agnieszka, 2003; Reichling *et al.*, 1995 และ Tefera and Wannakrairoj, 2006) ซึ่งจากรายงานผลการทดลอง พบว่า การเติมสารชะลอการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Paclobutrazol มีผลทำให้ชิ้นส่วนใบ *D. communis* ที่เพาะเลี้ยง สามารถสร้างยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจาก Paclobutrazol มีผลกระตุ้นและ/หรือส่งเสริมการทำงานของไซโตไคนินทั้งที่เป็น endogenous และ exogenous hormone โดยเฉพาะ endogenous hormone จึงทำให้ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมสารชะลอการเจริญเติบโตในปริมาณที่เหมาะสม สามารถเกิดยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งเคยมีรายงานที่ให้ผลการทดลองปรากฏในทำนองเดียวกัน (Veltcheva and Svetleva, 2005; Tefera and Wannakrairoj, 2006)

และจากผลการเติม Paclobutrazol 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในอาหาร พบว่า จะชักนำให้ชิ้นส่วนใบ *D. communis* เกิดจำนวนยอดมากที่สุด หรือมีจำนวนต้นต่อชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงสูงที่สุด เนื่องจากเมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่ง ปริมาณต้นที่เกิดขึ้นสามารถขยายขนาดและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว ตามระดับการตอบสนองต่อสารชะลอการเจริญเติบโตดังกล่าว ในขณะที่สูตรอาหารที่เติม Uniconazole 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า จะทำให้ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงมีจำนวนรากต่อกอ (2.05 รากต่อกอ) และมีความยาวราก (0.77 ซ.ม) สูงที่สุด แต่ขนาดของรากนั้นจะค่อนข้างเล็ก ทั้งนี้ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกับรายงานการวิจัยหลายฉบับที่พบว่า สารชะลอการเจริญเติบโตนั้น มีผลส่งเสริมและกระตุ้นการสร้างรากจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงได้เป็นอย่างดี (McKinless and Anderson, 1991; Bouza *et al*., 1994; Kucharskaand and Orlikowska, 2008; Nizam and Te-chato, 2009)

จากการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง *D. communis* St.Hil.บนอาหารสูตรดัดแปลง Murashige and Skoog (MS) 1962 ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เจลไลท์ 2.0 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA, Kinetin, TDZ, NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ สามารถสรุปได้ว่าชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมไซโตไคนิน และออกซิน มีแนวโน้มที่จะไม่ทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง *D. communis* เปลี่ยนแปลงและแตกต่างจากอาหารสูตรควบคุมแต่อย่างใด แต่การใช้สารชะลอการเจริญเติบโตกลับให้ผลตรงกันข้าม กล่าวคือ มี

ผลกระตุ้นให้เนื้อเยื่อใบของ *D.communis* สามารถเกิดการสร้างยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมาก ถ้ามีการเติมสารชะลอการเจริญเติบโตในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติกับอาหารสูตรควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

อนุพันธ์ กงบังเกิด และวีระชน ยานะฝั่น. (2005). ผลของแสง น้ำตาล และสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดเหง้าจิ๋วของขมิ้นชันในหลอดทดลอง. *NU Science J., 2*(1), 73-86.

Bobák, M., Blehova, A., Kristin, J., Samaj, J. and Ovecka, M. 1995. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult, *43,* 43 - 49.

Bobák, M. Šamaj, J. Hlinková, E. Hlava**č**ka, A. and Ove**č**ka, M. (2003). Extracellular matrix in early stages of direct somatic embryogenesis in leaves of *Drosera spathulata*. *Biologia Plant., 47*(2), 161-166.

Bouza, L. Jacques M. and Miginiac, E. (1994). Requirements for in vitro rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry'. *Scientia Hortic, 58*(3), 223-233.

Escalona, M., Lorenzo, J.C., Gonzalez, B., Daquinta, M. Gonzalez, J.L. Desjardins, Y. and Borrotol, C.G.(1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporar immersion systems. *Plant Cell Reps., 18*(9), 743-748.

Ferreira, D.T., Andrei, C.C., Saridakis, H.O., de Jesus Faria, T., Vinhato, E., Carvalho, K.E., Daniel, J.F.S., Machado, S.L., Saridakis, D.P. and Braz-Filho, R. (2004). Antimicrobial activity and chemical investigation of Brazilian Drosera. Mem Inst Oswaldo Cruz, *Riode Janeiro*, *9*(7), 753-755.

Goncalves, S. and Romano, A. (2005). Micropropagetion of *Drosophyllum lusitanicum* (Dewy pine), an endangered West Mediterranean endemic insectivorous plant. *Biodiversity and Conservation, 14*, 1071-1081.

Huetteman, A. and Preece, E.J. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell. *Tiss. Org. Cult., 33*, 105-119.

Ichiishi, S., Nagamitsu, T., Kondo, Y., Iwashina, T., Kondo, K. and Tagashira, N. (1999). Effects of macro-components and sucrose in the medium on in vitro red-color-pigmentation in *Dionaea muscipula* Ellis and *Drosera spathulata* Labill. *Plant Biotechnol, 16*(3), 235-238.

Jang, J.W.(2003). Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 72*, 95-98.

Jang, J.W. and Park, R.D. (1999). Mass propagation of sundew, *Drosera rotundifolia* L. through shoot culture. *J. Plant Biotechnol., 1*(2), 97-100.

Kawiak, A., Królicka, A. and Lojkowska, W. (2003). Direct regeneration of Drosera from leaf explants and shoot tips. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 75*, 175–178.

Kim, K.S. and Jang, G.W. (2004). Micropropagation of Drosera peltata, a tuberous sundew, by shoot tip culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 77*(2) , 211-214.

Kucharskaand, D. and Orlikowska, T. (2008). The influence of paclobutrazol in the rooting medium on the quality of Chrysanthemum vitro plants. *J. Fruit, Ornamental Plant res., 16*, 417-424.

Malagorzata, P. and Agnieszka, M. (2003). Effects of thidiazuron and paclobutrazol on regeneration potential of tulip flower stalk plants in vitro and subsequent shoot multiplication. *Acta Societatis Botanicorum, Poloniae, 72*(3), 181-190.

McKinless, J. and Anderson, P.G. (1991). An anatomical study of rhizome bud formation induced by paclobutrazol and adventitious root formation in *in vitro* cultures of *Lapageria rosea* (Ruiz et Pav.). *Ann Bot., 67*, 331-338.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. *Plant. Physiol., 15*, 473-497.

Nizam, K. and Te-chato, S. (2009). Optimizing of root induction in oil palm plantlets for acclimatization by some potent plant growth regulators (PGRs). *J.Agric. Technol., 5*(2), 371-383.

Reichling, J., Sauerwein, M. and Wink, M. (1995). Naphthochinonproduktion in in vitro Kulturen von *Drosera communis* St.Hil. *Drogenreport, 8*, 26-27,

Simko, I. (1993). Effect of kinetin, paclobutrazol and their interaction on the microtuberization of the stem segments cultured *in vitro* in the light. *Plant Growth Regul., 12*, 23-27.

Tefera, W. and Wannakrairoj, S. (2006). Synergistic effects of some plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen). *African J. Biotechnol., 5*(10), 1894-1901.

Veltcheva, M.R. and Svetleva, D.L. (2005). *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. viaorganogenesis from petiole explants. *J. Central European Agric., 6*(1), 53-58.

Wawrosch, C., Vackar, E., Grauwald, B. and Krenn, L. (2005). Variations of naphthoquinone levels in micropropaqated *Drosera* species in vitro, under greenhouse and outdoor growth conditions. *Scientia Pharmaceutic, 73*(4), 251-262**.**

Ziv, M. (1989). Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 17*, 101-110.