ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการลดอาการปลายยอดไหม้ของฮาน (*Elsholtzia stachyodes*) ในหลอดทดลอง

The Effect of Calcium Chloride on Alleviation of *in vitro* Shoot Tip Necrosis of *Elsholtzia stachyodes*

ชนกขวัญ ศรีคำ[1], ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา[1*], กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์[2], สิริพร โรจน์อารยานนท์[1], และ อังคณา อินตา[1]

Chanokkwan Srikum[1], Srisulak Dheeranupattana[1*], Kittisak Chotikadachanarong[2], Siriphorn Rotarayanont[1] and Angkhana Inta[1]

[1] *ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

[2] *ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่*

[1]*Biology Department, Faculty of Science, Chiang Mai University*

[2]*Biology Department, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University*

Received : 17 October 2018

Accepted : 29 November 2018

Published online : 3 December 2018

บทคัดย่อ

ฮาน (*Elsholtzia stachyodes*) จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae ชาวไทยภูเขาใช้ใบประกอบอาหาร เป็นพืชที่น่าสนใจเนื่องจากมีสารฟลาโวนอยด์ปริมาณมาก ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดมีข้อจำกัด เนื่องจากเมล็ดฮานมีความมีชีวิต และอัตราการงอกต่ำ ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อการขยายพันธุ์ฮานให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของฮานในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยอด มักพบปัญหาอาการปลายยอดไหม้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการลดอาการปลายยอดไหม้ในฮาน โดยเพาะเลี้ยงยอดของฮานที่ได้จากต้นอ่อนปลอดเชื้ออายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS (มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 440 มิลลิกรัมต่อลิตร) และอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 880 และ 1320 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เหมาะสมที่สุด คืออาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 880 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดยอดสูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ยอดมีลักษณะปกติสูงสุด 76.34 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.36 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ฮาน, ปลายยอดไหม้, แคลเซียมคลอไรด์, BA

***Corresponding author. E-mail** : srisulak@gmail.com

Abstract

Elsholtzia stachyodes is classified in the family of Lamiaceae. Its leaves are used as vegetables by hill tribe people in Thailand. This plant is interesting since it contains high content of flavonoids which possess anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory activities. However, seed propagation success is limited by low viability and germination of seed. Therefore, tissue culture technique is an alternative method to reach high quantity of the plant within a short period of time. For shoot multiplication, shoot tip necrosis is a major problem for *E. stachyodes*. Therefore, the current research aims to study effects of calcium chloride on reducing shoot tip necrosis by culturing the 4 week-old shoots of *E. stachyodes* on MS medium containing 440 mg/L of calcium chloride and the modified MS media containing 880 or 1320 mg/L of calcium chloride in combination with BA at 0, 0.5, or 1 mg/L for 4 weeks. The results showed that the most appropriate medium formula was the modified MS media containing 880 mg/mL of calcium chloride in combination with 0.5 mg/L of BA. This formulation resulted in 100% shoot induction with 76.34 % of normal shoot characteristics, and the average number of shoots was 2.36 shoots/explant.

Keywords : tissue culture, *Elsholtzia stachyodes*, shoot tip necrosis, calcium chloride, BA

บทนำ

ฮาน (*Elsholtzia stachyodes* (Link) Raizada & Saxena) เป็นพืชในวงศ์ Lamiaceae มีชื่อกะเหรี่ยงว่า เห่าพรุย (Trisonthi & Trisonthi, 2009) พบกระจายตัวในประเทศอินเดีย เนปาล จีน พม่า ในประเทศไทยพบในจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ และประจวบคีรีขันธ์ หรือพบตามพื้นที่ลาดชันในป่าดิบเขาระดับความสูงประมาณ 1000 – 1800 เมตร (Bongcheewin *et al*., 2015) ในรัฐมณีปุระประเทศอินเดียมีการเพาะปลูกและบริโภคฮานอย่างกว้างขวาง เนื่องจากฮานมีสารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยเฉพาะฟอสฟอรัส และสังกะสี ตลอดจนมีปริมาณโปรตีนมากกว่าคาร์โบไฮเดรต จึงมีคำแนะนำให้บริโภคทุกวันสำหรับผู้ป่วยที่ต้องการลดอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Khomdram *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบฟีนอลเป็นส่วนประกอบปริมาณมาก โดยเฉพาะฟลาโวนอยด์ (Khomdram & Singh, 2011) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ (Miyazawa *et al*., 2000) ในภาคเหนือของประเทศไทยพบการนำใบของฮานมาใช้ประกอบอาหาร (Bongcheewin *et al*., 2015) หรือชาวกะเหรี่ยงได้นำฮานทั้งต้นใส่ยุ้งข้าวกันมอดแมลง (Trisonthi & Trisonthi, 2009)

ปัจจุบันฮานยังไม่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชที่มีการบันทึกชนิดใหม่ (new record) โดย Bongcheewin & Chantaranothai (2008) สำหรับการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดนั้นมีข้อจำกัด เนื่องจากการงอกของเมล็ดขึ้นอยู่กับฤดูกาล ซึ่งชาวไทยภูเขาใช้วิธีหว่านเมล็ดในช่วงฤดูฝน ประกอบกับเมล็ดมีชีวิตและอัตราการงอกต่ำ ดังนั้นเพื่อขยายพันธุ์ฮานให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็วโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาลจึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของฮานอายุ 4 สัปดาห์ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมากในหลอดทดลอง พบว่าเกิดอาการปลายยอดไหม้ ซึ่งบริเวณปลายยอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด ลักษณะดังกล่าวพบ

ได้เช่นกันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เช่น ลาเวนเดอร์ (*Lavandula angustifolia* Mill.) ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Lamiaceae (Machado *et al*., 2014) นอกจากนี้ยังพบในพืชวงศ์อื่นๆ เช่น *Castanea sativa* Mill. (Piagnani *et. al*., 1996), *Harpagophytum procumbens* (Bairu *et. al*., 2009), *Soymida febrifuga* (Chiruvella *et. al*., 2011), *Trichosanthes dioica* Roxb. (Kishore *et. al*., 2015)

อาการปลายยอดไหม้เป็นความผิดปกติทางสรีรวิทยา และเป็นอุปสรรคสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Kishore *et al*., 2015) โดยอาการเริ่มแรกสังเกตได้จากตาและใบอ่อนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Bairu *et. al*., 2009) สันนิษฐานว่าเกิดจากการขาดธาตุอาหารที่เคลื่อนย้ายไม่ได้ เช่น แคลเซียม และโบรอน (Raven, 1977) การขาดธาตุดังกล่าวจึงปรากฏอาการครั้งแรกบริเวณเนื้อเยื่อเจริญและใบอ่อน (Barghchi & Alderson, 1996)

การแก้ปัญหาอาการปลายยอดไหม้ที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีรายงานว่า การปรับระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถช่วยลดอาการปลายยอดไหม้ได้ เช่น อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1320 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดอาการปลายยอดไหม้ และอาการฉ่ำน้ำในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของลาเวนเดอร์ (Machado *et al*., 2014) หรือการเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.68 มิลลิโมลาร์ (99.7 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในอาหารสูตร MS (มีแคลเซียมคลอไรด์ 440 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถลดอาการปลายยอดไหม้ได้ 90% ในขั้นตอนการชักนำยอดของ *T. dioica* Roxb. (Kishore *et. al*., 2015) นอกจากนี้ยังพบอาหารสูตร ½ MS ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ (880 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถลดอาการปลายยอดไหม้ของ *H. procumbens* ซึ่งให้จำนวนยอดไหม้เฉลี่ยเพียง 1.6±0.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ให้จำนวนยอดไหม้เฉลี่ย 4.8±2.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (Bairu *et. al*., 2009) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการลดอาการปลายยอดไหม้และเพิ่มจำนวนยอดของฮานในหลอดทดลอง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมต้นอ่อนฮานในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดฮานจากจังหวัดแม่ฮ่องสอนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15% เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1500 ลักส์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้ต้นอ่อนที่ปลอดเชื้อ เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในขั้นตอนต่อไป

การชักนำให้เกิดยอด และผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการลดอาการปลายยอดไหม้ของฮาน

นำต้นอ่อนฮานที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 4 สัปดาห์ มาตัดบริเวณชิ้นส่วนของยอดความยาว 2.0 เซนติเมตร ย้ายชิ้นส่วนของยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 440 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นมาตรฐานในอาหารสูตร MS) และอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 880 และ 1320 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 9 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 ขวด เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด เปอร์เซ็นต์ของยอดปกติ เปอร์เซ็นต์ของยอดไหม้ จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช และความยาวยอดปกติเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช

การวิเคราะห์ผล

งานวิจัยนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

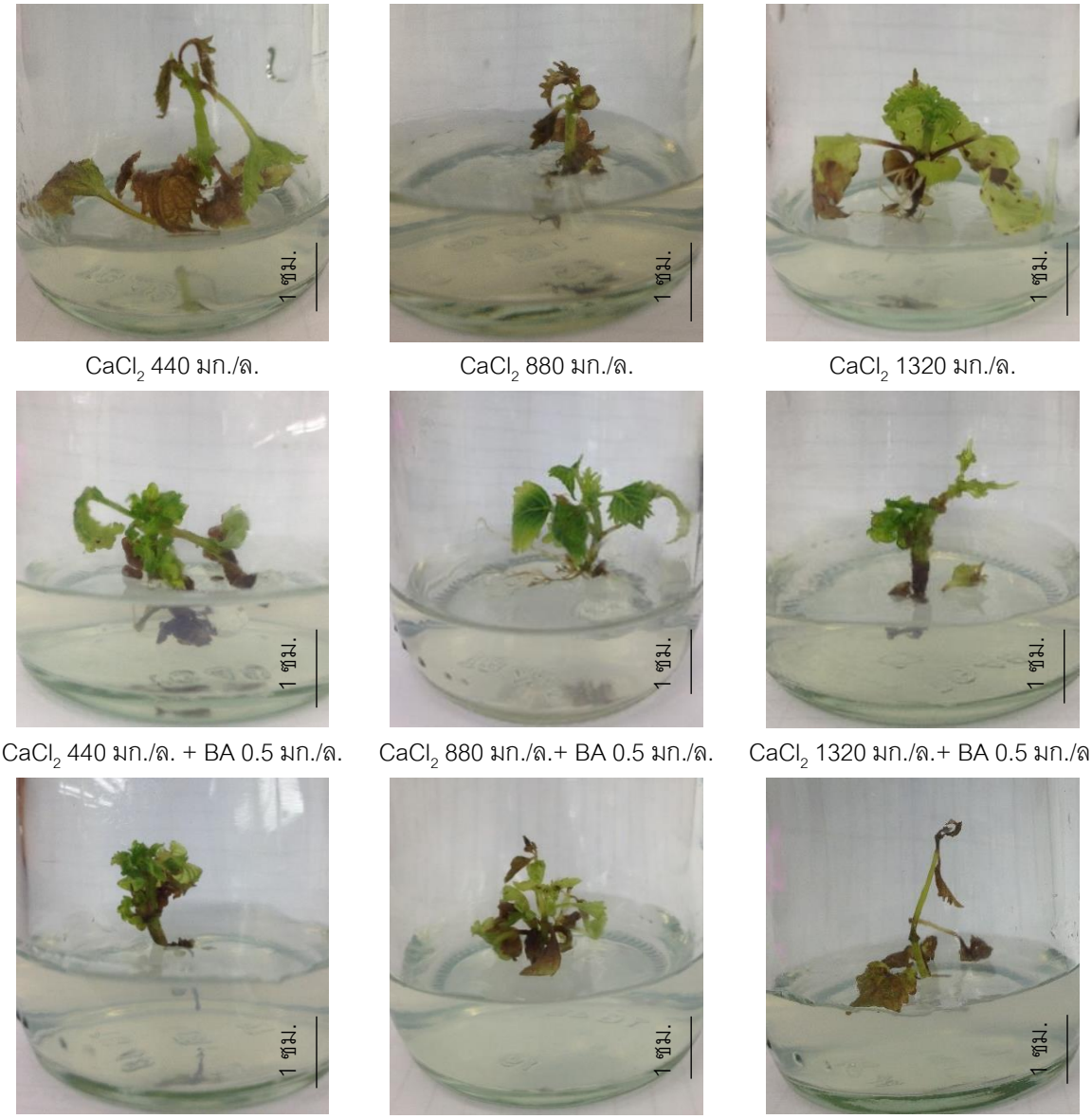
ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงยอดฮานที่ปลอดเชื้ออายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS (มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 440 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ พบอาการปลายยอดไหม้ค่อนข้างสูงคือ 44.44±29.40 - 61.11±20.03 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดอยู่ในช่วง 38.89±5.56 - 69.45±2.78 โดยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดต่ำสุด (ตารางที่ 1) ในขณะที่อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 880 และ 1320 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองยังคงพบลักษณะอาการปลายยอดไหม้ซึ่งมีความรุนแรงแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของแคลเซียมคลอไรด์และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดยอดและอาการปลายยอดไหม้ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของฮานบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชุดการทดลองที่	ความเข้มข้น (มก./ล.)		เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด*	เปอร์เซ็นต์ของยอดปกติ*	เปอร์เซ็นต์ของยอดไหม้*	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช^{ns}	ความยาวยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช (ซม.)*
	$CaCl_2$	BA					
1.	440	0	38.89±5.56c	38.89±20.03ab	61.11±20.03ab	3.00±1.53	2.35±0.50a
2.	440	0.5	69.45±2.78b	47.64±14.14ab	52.36±14.14ab	3.11±1.15	2.27±0.04ab
3.	440	1.0	69.45±2.78b	55.56±29.40ab	44.44±29.40ab	2.44±0.29	2.21±0.01b
4.	880	0	72.22±14.70b	45.00±22.91ab	55.00±22.91ab	2.06±0.53	2.24±0.04b
5.	880	0.5	100.00±0.00a	76.34±7.42a	23.66±7.42b	2.36±0.22	2.30±0.04ab
6.	880	1.0	61.11±5.56bc	55.56±5.56ab	44.44±5.56ab	2.50±0.76	2.19±0.01b
7.	1320	0	80.56±10.01ab	54.17±11.02ab	45.83±11.02ab	2.00±0.39	2.26±0.03ab
8.	1320	0.5	80.56±10.01ab	62.27±18.64ab	37.73±18.64ab	2.50±0.68	2.27±0.04ab
9.	1320	1.0	80.56±10.01ab	13.33±6.67b	86.67±6.67a	1.78±0.11	2.20±0.00b

หมายเหตุ: ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันโดย Duncan's new Multiple Rang Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%



$CaCl_2$ 440 มก./ล. $CaCl_2$ 880 มก./ล. $CaCl_2$ 1320 มก./ล.

$CaCl_2$ 440 มก./ล. + BA 0.5 มก./ล. $CaCl_2$ 880 มก./ล.+ BA 0.5 มก./ล. $CaCl_2$ 1320 มก./ล.+ BA 0.5 มก./ล.

$CaCl_2$ 440 มก./ล. + BA 1.0 มก./ล. $CaCl_2$ 880 มก./ล.+ BA 1.0 มก./ล. $CaCl_2$ 1320 มก./ล.+ BA 1.0 มก./ล.

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการปลายยอดไหม้ของฮานที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

อย่างไรก็ตามพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไหม้ลดลง เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ โดยอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 880 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไหม้ต่ำสุด 23.66±7.42 และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุดเป็น 100 ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1320 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไหม้สูงสุด 86.67±6.67 และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด

80.56±10.01 นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารทั้ง 9 ชุดการทดลองให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืชอยู่ในช่วง 1.78± 0.11 – 3.11±1.15 ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 1)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลจากการเพาะเลี้ยงยอดฮานบนอาหารสูตร MS (มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 440 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ไม่มีการเติม BA พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดต่ำสุด 38.89±5.56 แต่เมื่อมีการเติม BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเพิ่มขึ้นเป็น 69.45±2.78 ซึ่งความเข้มข้นของ BA ดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานในพืชชนิดอื่นๆ ในวงศ์ Lamiaceae เช่น *Hoslundia opposita* (Prakash & Van Staden, 2007), *Mentha piperita* (Saha *et al*., 2010), *Ocimum gratissimum* (Saha *et al*., 2012), *Ocimum canum* (Saha *et al*., 2014) และ *Ocimum basilicum* (Kumari *et al*., 2017) นั่นแสดงว่า BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก โดยกระตุ้นการสร้างตาพิเศษ (adventitious bud) นอกจากนี้เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า BA มีบทบาทในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของยอดจากตาข้าง (axillary bud) โดยลดอาการข่มจากตายอด (apical dominance) (George *et al*., 2008)

จากผลการเพาะเลี้ยงยอดฮานบนอาหารสูตร MS (มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 440 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ไม่มีและมีการเติม BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบอาการปลายยอดไหม้ค่อนข้างสูง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงยอดฮานบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 880 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุดเป็น 100 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไหม้ต่ำสุด 23.66±7.42 ซึ่งการลดอาการปลายยอดไหม้ โดยการปรับระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น การเพาะเลี้ยงลาเวนเดอร์ (*L. angustifolia* Mill.) บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1320 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดอาการปลายยอดไหม้จาก 21 เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (Machado *et al*., 2014) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงกล้วยบนอาหารสูตร MS ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดอาการปลายยอดไหม้ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Martin *et al*., 2007) ทั้งนี้การเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มากเกินไป ส่งผลให้อาการปลายยอดไหม้เพิ่มขึ้น ดังการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงยอดของฮานบนอาหารสูตร MS ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1320 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไหม้สูงสุดเป็น 86.67±6.67 แสดงให้เห็นว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีไซโตไคนินความเข้มข้นสูงร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงสามารถส่งเสริมการเกิดอาการปลายยอดไหม้เพิ่มขึ้น ดังนั้นความสมดุลของปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ และ BA จึงมีความสำคัญในการควบคุมอาการปลายยอดไหม้ (Piagnani *et al*., 1996)

ลักษณะอาการปลายยอดไหม้เกิดจากการตายของเซลล์ (necrosis) เนื่องมาจากการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ จึงมีการปล่อยองค์ประกอบภายในเซลล์ เกิดการเสื่อมสลายของโพรโทพลาสต์ (Van Doorn *et al*., 2011) ซึ่งแคลเซียมมีบทบาทสำคัญในการลดอาการปลายยอดไหม้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากแคลเซียมช่วยให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรง และควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนต่ำ ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนและสารเมแทบอไลท์ (Hepler, 2005) นอกจากนี้ แคลเซียมไอออนยังทำหน้าที่ควบคุมการสื่อสารของเซลล์ (cell signaling) ส่งผลให้เมแทบอลิซึมภายในเซลล์เกิดขึ้นได้ตามปกติ (Harmon *et al*., 2001; Zhang & Lu, 2003) รวมทั้งควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์ (Zhang *et al*., 1992) การเพิ่มความเข้มข้นของ

แคลเซียมคลอไรด์ในอาหารส่งผลให้กระบวนการแบ่งเซลล์บริเวณปลายยอด กระบวนการเมแทบอลิซึม และการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เกิดได้ตามปกติ จึงลดการตายของเซลล์ ส่งผลให้อาการปลายยอดไหม้ลดลง

การทดลองครั้งนี้ใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบในอาหาร เพื่อช่วยบรรเทาอาการปลายยอดไหม้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้แคลเซียมในรูปอื่นๆเช่น การเพาะเลี้ยง *Pistacia vera* L. บนอาหารสูตร MS ที่มีแคลเซียมอะซีเตท ซึ่งแคลเซียมในรูปดังกล่าวมีผลยับยั้งความยาวยอดอย่างรุนแรง (Barghchi & Alderson, 1996) แต่การเติมแคลเซียมไนเตรท หรือ แคลเซียมแพนโทธีเนท ในอาหารสูตร ½ MS สามารถลดอาการปลายยอดไหม้ของ *S. febrifuga* ให้กลับมาปกติได้มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ (Chiruvella *et al*., 2011)

อย่างไรก็ตามปัญหาการเกิดอาการปลายยอดไหม้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น นอกจากสาเหตุอันเนื่องมาจากความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์แล้ว ยังมีสาเหตุมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของโบรอน (Bairu *et. al*., 2009) ชนิดของอาหาร (Sita & Swamy,1993) ความเข้มข้นของเกลือ (Jain *et. al*., 2009) ค่า pH ในอาหาร (De Block, 1990) ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (Bairu *et. al*., 2009) รวมถึงระยะเวลาการย้ายเลี้ยงพืชไปยังอาหารใหม่จาก 3 สัปดาห์ เป็น 1 หรือ 2 สัปดาห์ สามารถลดอาการปลายยอดไหม้ได้เช่นกัน (Kishore *et al*., 2015) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอาจเป็นแนวทางในการพิจารณาเพื่อเป็นข้อเสนอแนะในการวิจัยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

อาหารสูตร MS ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 880 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดอาการปลายยอดไหม้ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดปลายยอดไหม้น้อยที่สุด 23.66±7.42 (เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดปกติสูงสุด 76.34±7.42) และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุดเป็น 100 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารสูตร MS ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 440 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้เปอรเซ็นต์การเกิดยอดไหม้ 61.11±20.03 และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดต่ำสุดเป็น 38.89±5.56

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ได้มอบทุนการศึกษาตลอดหลักสูตรภายใต้โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

เอกสารอ้างอิง

Bairu, M. W., Jain, N., Stirk, W. A., Doležal, K., & Van Staden, J. (2009). Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany*, *75*(1), 122-127.

Barghchi, M., & Alderson, P. G. (1996). The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, *20*(1), 31-35.

Bongcheewin, B., & Chantaranothai, P. (2008). Two New Records of *Elsholtzia* Willd.(Lamiaceae) for Thailand. *Tropical Natural History*, *8*(1), 1-5.

Bongcheewin, B., Chantaranothai, P., & Paton, A. (2015). *Elsholtzia* (Lamiaceae) in Thailand. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, *59*(3), 209-214.

Chiruvella, K. K., Mohammed, A., Dampuri, G., & Ghanta, R. G. (2011). *In vitro* shoot regeneration and control of shoot tip necrosis in tissue cultures of *Soymida febrifuga* (Roxb.) A. Juss. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *21*(1), 11-25.

De Block, M. (1990). Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiology*, *93*(3), 1110-1116.

George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and Antagonists, *Plant propagation by tissue culture*. (pp. 205-226). Dordrecht: Springer.

Harmon, A. C., Gribskov, M., Gubrium, E., & Harper, J. F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, *151*(1), 175-183.

Hepler, P. K. (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, *17*(8), 2142-2155.

Jain, N., Bairu, M. W., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2009). The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. *South African Journal of Botany*, *75*(1), 117-121.

Khomdram, S. D., Salam, J. S., & Singh, P. K. (2011). Estimation of nutritive indices in eight Lamiaceae plants of Manipur. *Am. J. Food Technol*, *6*(10), 924-931.

Khomdram, S. D., & Singh, P. K. (2011). Polyphenolic compounds and free radical scavenging activity in eight Lamiaceae herbs of Manipur. *Notulae Scientia Biologicae*, *3*(2), 108-113.

Kishore, K., Patnaik, S., & Shukla, A. K. (2015). Optimization of method to alleviate *in vitro* shoot tip necrosis in *Trichosanthes dioica* Roxb. *Indian Journal of Biotechnology*, *14*, 107-111.

Kumari, M., Agnihotri, D., Chanotiya, C. S., Mathur, A. K., Lal, R. K., & Mathur, A. (2017). Chemical and genetic stability of methyl chavicol-rich Indian basil (*Ocimum basilicum* var. CIM-Saumya) micropropagated *in vitro*. *South African Journal of Botany*, *113*, 186-191.

Machado, M. P., Silva, A. L. L. D., Biasi, L. A., Deschamps, C., Bespalhok Filho, J. C., & Zanette, F. (2014). Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tip necrosis of *in vitro* regenerated shoots of *Lavandula angustifolia* Mill. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *57*(5), 636-643.

Martin, K. P., Zhang, C. L., Slater, A., & Madassery, J. (2007). Control of shoot necrosis and plant death during micro-propagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *88*(1), 51-59.

Miyazawa, M., Okuno, Y., Nakamura, S. I., & Kosaka, H. (2000). Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *48*(3), 642-647.

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

Piagnani, C., Zocchi, G., & Mignani, I. (1996). Influence of Ca^{2+} and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis. *Plant Science*, *118*(1), 89-95.

Prakash, S., & Van Staden, J. (2007). Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl—a valuable medicinal plant. *South African Journal of Botany*, *73*(1), 60-63.

Raven, J. A. (1977). H^{+} and Ca^{2+} in phloem and symplast: relation of relative immobility of the ions to the cytoplasmic nature of the transport paths. *New Phytologist*, *79*(3), 465-480.

Saha, S., Dey, S. T., Adhikari, S., & Ghosh, P. D. (2010). *In vitro* multiple shoot regeneration and analysis of genetic fidelity of *Mentha piperita* L. *Bionature, 30*(2), 71-81.

Saha, S., Kader, A., Sengupta, C., & Ghosh, P. (2012). *In vitro* propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and its evaluation of genetic fidelity using RAPD marker. *Am J Plant Sci*, *3*(1), 64-74.

Saha, S., Roy, S., Sengupta, C., & Ghosh, P. (2014). Micropropagation and analysis of genetic stability in regenerated plantlets of *Ocimum canum* Sims. *Indian Journal of Plant Physiology*, *19*(2), 174-183.

Sita, G. L., & Swamy, B. R. (1993). Regeneration of plantlets from leaf disc cultures of rosewood: control of leaf abscission and shoot tip necrosis. *Plant Science*, *88*(1), 107-112.

Trisonthi, C., & Trisonthi, P. (2009). Ethnobotanical study in Thailand, a case study in Khun Yuam District Maehongson Province. *Thai Journal of Botany, 1*(1), 1-23. (in Thai)

Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., & Mur, L. A. J. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation*, *18*(8), 1241-1246.

Zhang, D. H., Wadsworth, P., & Hepler, P. K. (1992). Modulation of anaphase spindle microtubule structure in stamen hair cells of *Tradescantia* by calcium and related agents. *Journal of Cell Science*, *102*(1), 79-89.

Zhang, L., & Lu, Y. T. (2003). Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends in plant science*, *8*(3), 123-127.