การชักนำให้เกิดแคลลัสและการตรวจสอบหาระดับพลอยดีจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหยาดน้ำค้าง (*Drosera indica* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ

Induction of Callus and Ploidy Level Inspection from Tissue Culture of Sundew (*Drosera indica* L.) in Sterile Condition

ชาตรี ตุ้มคำ และ ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร*

Chatree Toomkum and Sirasatiyakorn Junkasiraporn*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 1 May 2019

Revised : 3 June 2019

Accepted : 21 June 2019

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและการตรวจสอบหาระดับพลอยดีจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหยาดน้ำค้าง (*Drosera indica* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างบนอาหารสูตร ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุด และชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l มีการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสมากที่สุด จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่ นำยอดมาตัดแบ่งเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนข้อขนาด 2 ± 0.2 เซนติเมตร แล้วนำมาจุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติมสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, และ 1.0 mg/l เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นส่วนข้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่จุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่ไม่มีการเติมโคลชิซีน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด และจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซีนและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่มากขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ พบว่า ในทุกชุดการทดลองมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ ซึ่งเมื่อนำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาย้ายปลูกในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสในอัตราส่วน 1 : 2 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด

คำสำคัญ : แคลลัส, โคลชิซิน, โพลไซโทรมิเตอร์, พลอยดี, หยาดน้ำค้าง

*Corresponding author. E-mail : siripan@go.buu.ac.th

Abstract

The purpose of this study was to induce callus and determine ploidy level from tissue culture of *Drosera indica* L. in sterile conditions. The leaf explants of Sundew were cultured on ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) media supplemented with BA and NAA at different concentrations for 4 weeks. From the results, it was found that leaf explants cultured on ½ MS media containing 0.5 mg / l BA with NAA 0.1 mg / l could induce callus well and gave the highest callus induction percentage and callus fresh weight. On the other hand, leaf explants cultured on MS media supplemented with 1.0 mg / l BA in combination with 0.1 mg / l NAA had the highest number of shoot induction from callus. Then, the callus was cultured on ½ MS media without plant growth regulators for 4 weeks to induce new shoot. After that, cut the shoot to get the node explant size 2 ± 0.2 cm, then dipped in the ½ MS liquid media with the addition of 0, 0.1, 0.5, and 1.0 mg / l colchicine at period of 24, 48 and 72 hours. Then node explants were cultured on ½ MS solid media for 4 weeks. It was found that node explants immersing in liquid MS media without adding colchicine had the highest survival percentage. Furthermore, it could be seen that the survival percentage decreased as the concentration of colchicine increased as well as the immersion period increased. When analyzing ploidy levels with the flow cytometry technique, it was found that there were a number of chromosomes in the diploid. Then, the seedlings from tissue culture were transplanted in peat moss together with the sphagnum moss in the ratio of 1 : 2 for 4 weeks. The result showed that seedlings had the highest survival percentage.

Keywords : callus, colchicine, flow cytometry, ploidy, *Drosera indica* L.

บทนำ

หยาดน้ำค้าง (*Drosera indica* L.) เป็นพืชกินแมลงอยู่ในวงศ์ Droseraceae จัดเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการเพาะเลี้ยงคือ ลักษณะใบมีน้ำหยาดเหนียวปกคลุมทั่วแผ่นใบ เมื่อแสงแดดส่องลงมากระทบกับแผ่นใบ จะเกิดเป็นประกายเป็นสีสันสวยงาม มีความแปลก เป็นเอกลักษณ์เหมาะแก่การเพาะปลูก และจัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชกรรม ซึ่งมีรายงานการพบสาร plumbagin (Didry *et al*., 1998) ซึ่งสารนี้เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ (Jararam & Prasad, 2007 ; Juengwatanatrakul *et al*., 2011) ในการขยายพันธุ์ของ *D. indica* L. นั้นสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ด (Chiang, 2010) แต่ในสภาวะปกติพบการติดเมล็ดน้อยและมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำ หนึ่งในวิธีการที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวคือการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้เพื่อลดปัญหาดังกล่าว (Lee, 2008) นอกจากนี้ยังมีความพยายามที่จะปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์เพื่อให้ได้เกิดการกลายให้ได้ลักษณะพิเศษที่ต่างจากเดิม ซึ่งในการชักนำให้เกิดการกลายนั้นมีปัจจัยที่สำคัญหลายอย่าง ปัจจัยแรกคือการเลือกใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น ข้อ ยอด ตา หน่อ หรือแคลลัส เป็นต้น ปัจจัยต่อมาคือการเลือกใช้วิธีในการชักนำ วิธีที่นิยมนำมาใช้การชักคือการใช้สารเคมี เพื่อชักนำการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดี โดยสารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ สารโคลชิซีน (Colchicine) ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ ที่ทำให้พืชมีการพัฒนาเป็นโพลีพลอยด์ โดยวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบผลของการเกิดโพลีพลอยด์ คือการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์

(flow cytometer) สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างพืชที่เป็นดิพพลอยด์และโพลีพลอยด์ได้อย่างชัดเจน ข้อมูลแม่นยำ (Hanson *et al.,* 2004) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ได้นำชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและออกซินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส นำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดเป็นยอดและต้น จากนั้นนำยอดมาตัดให้ได้ชิ้นส่วนข้อ แล้วจุ่มแช่ในโคลชิซีน เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโคลชิซีนที่ใช้ร่วมกับระยะเวลาการจุ่มแช่ ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และตรวจสอบระดับพลอยดีด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี จากนั้นย้ายปลูกต้นกล้าในวัสดุปลูกและในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์การขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ของหยาดน้ำค้าง และประโยชน์ในด้านการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. indica* L.

นำชิ้นส่วนต้นของ *D. indica* L. มาแช่ในสารละลาย NaDCC 1.7 เปอร์เซ็นต์ (V/W) ที่เติม Tween 20 แช่ทิ้งไว้นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที ย้ายชิ้นส่วนลำต้นลงในสารละลาย H_2O_2 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที จากนั้นนำไปวางบนกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อดูดซับน้ำออกตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาด 1 ± 0.1 ตารางเซนติเมตร เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลทราย 30 g/l ค่า pH 5.8 เติมผงวุ้น 7 g/l และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, และ 1.0 mg/l วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design : CRD) โดยมีทั้งหมด 16 ชุดการทดลองๆ ละ 10 ซ้ำๆ ละ 4 ชิ้นๆ ละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึก เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส น้ำหนักสดของแคลลัส จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนแคลลัส ลักษณะของแคลลัส การเกิดสีของแคลลัส

การตรวจสอบระดับพลอยดีและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อจากการจุ่มแช่โคลชิซีนในระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่ต่างกัน

ทำการเตรียมสารละลายจากเม็ดยาโคลชิซีน โดยให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/l ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 ml จากนั้นกรองผ่านตัวกรอง ใช้หลอดฆ่าเชื้อขนาด 30 มิลลิเมตร ชนิดไส้กรองไนลอนโดยรูมีขนาด 0.2 μM จากนั้นนำมาเติมในอาหารสูตร ½ MS ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีน 0, 0.1, 0.5 และ 1 mg/l (สารละลายโคลชิซีนเข้มข้น 0 mg/l เป็นอาหารสูตร ½ MS เพียงอย่างเดียว) จากนั้นเลือกแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ± 0.1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จนครบ 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดเป็นยอด จากนั้นนำส่วนยอดมาตัดให้ได้ชิ้นส่วนข้อขนาด 2 ± 0.2 เซนติเมตร แล้วจุ่มแช่ลงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l ที่เตรียมไว้ วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาพมืด เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยมีทั้งหมด 12 ชุดการทดลองๆ ละ 10 ซ้ำๆ ละ 4 ชิ้นๆ ละ 1 ขวด เมื่อครบตามเวลา จึงนำชิ้นส่วนข้อหลังการจุ่มแช่ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและตรวจสอบระดับพลอยดี

การทดสอบระดับพลอยดีด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี

วิเคราะห์การสร้างโพลีพลอยด์ โดยใช้ชุดทดสอบ Cystain UV Preciese P : high resolution DNA staining kit ที่ประกอบด้วย Extraction buffer และ Staining buffer ซึ่งใช้สี DAPI ในการย้อมสี จากการนำชิ้นส่วนข้อหลังการจุ่มแช่โคลชิซินของแต่ละชุดทดลอง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ชนิดแข็งที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ครบ 4 สัปดาห์ จะเกิดการพัฒนาเป็นยอดและต้น แล้วคัดเลือกต้นที่มีความสูงต้น 4 เซนติเมตรทั้งหมด 5 ต้น วางบนจานพลาสติก (plastic petridish) ผสมในสาร Crytal UV ploidy 0.5 มิลลิลิตร ใช้ใบมีดโกนหั่นเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของเซลล์ในการวัดหาปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสของแต่ละเซลล์ จากนั้นเติมสาร Crytal UV ploidy 1.5 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที กรองสารแขวนลอยนิวเคลียส ผ่านตัวกรอง Cell Trics ขนาด 30μm จากนั้นย้อมสารแขวนลอยนิวเคลียสด้วยสีย้อม DNA (staining buffer) ปริมาตร 1,000ไมโครลิตร เป็นเวลานาน 4 นาที แล้วดูดสารละลายผ่านแผ่นกรองเดิม นำมาตรวจวัดปริมาณของ DNA ด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ (เครื่อง Partec รุ่น PA II ของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม) โดยใช้ DNA ของปลาเทราส์เป็นมาตรฐานซึ่งทราบปริมาณ DNA ที่แน่นอนแล้ว

การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้า หลังการย้ายปลูก

นำต้นกล้าที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ที่พัฒนาเป็นยอด และรากที่สมบูรณ์โดยมีความสูงต้นไม่เกิน 0.5 ± 0.20 เซนติเมตร อายุ 4 สัปดาห์ นำมาปรับสภาพก่อนการย้ายปลูก โดยย้ายขวดเพาะเลี้ยงที่มีต้นกล้าจากห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 25±2 °C มาไว้ในห้องเตรียมอาหารที่มีอุณหภูมิสูงกว่า คลายฝาเกลียวขวดเพาะเลี้ยงออก ตั้งทิ้งไว้ 15 วัน จากนั้นนำต้นกล้าออกจากขวด และล้างวุ้นที่ติดอยู่บริเวณรากออกให้หมด นำไปย้ายปลูกในกระถางพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร โดยมีวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน คือ พีทมอสเพียงอย่างเดียว สแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว และพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสในอัตราส่วน 1:1, 2:1 และ 1:2 ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยมีทั้งหมด 5 ชุดการทดลอง ทำการทดลองละ 10 ซ้ำๆ ละ 4 ต้น วางกระถางไว้ในบริเวณที่ได้รับแสง และให้น้ำอย่างสม่ำเสมอในช่วงเช้าและเย็น ปริมาตร15 มิลลิลิตรต่อครั้ง เพาะปลูกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึก เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และความยาวราก

การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ซึ่งผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA)และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มโดยวิธี Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab version version 17

ผลการวิจัย

ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D. indica* L.

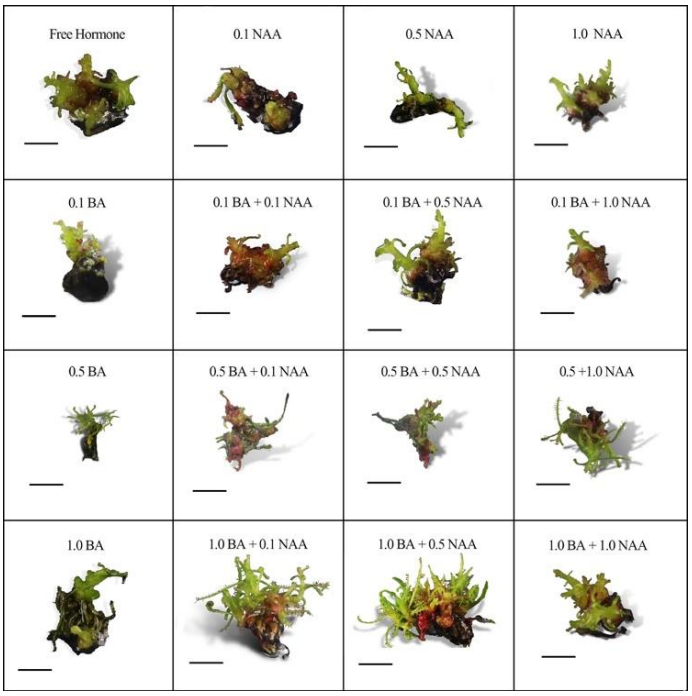
จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 mg/l พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหารมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณขอบใบ และจะเห็นได้ชัดว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำ

ให้เกิดแคลลัสสูงสุดเท่ากับ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้น นอกจากนี้จะเห็นชัดได้ว่าอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ1.542 ± 0.649 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของแคลลัสที่เกิดขึ้นในคราวเดียวกัน จะเห็นว่าแคลลัสที่เกิดจาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA มีการชักนำให้สร้างยอดเกิดขึ้นได้ โดยแคลลัสที่เจริญบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l มีจำนวนยอดมากที่สุดเท่ากับ 5.30 ± 3.063 ยอดต่อชิ้นส่วนแคลลัส แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA 0.5 mg/l และอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l เพียงอย่างเดียว ตามลำดับ (4.85 ± 3.183 และ 4.55 ± 1.356 ยอดต่อชิ้นส่วนแคลลัส) สำหรับลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น จะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว แคลลัสที่เกิดขึ้นโดยส่วนใหญ่ จะเกาะกันอย่างหลวมๆ (Friable) และมีสีเขียว แต่เมื่อเติม BA ร่วมกับ NAA โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA ให้มากขึ้น พบว่าแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น (Compact) และมีสีแดง (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและการสร้างยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัมน้ำหนักสด)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส	
					ลักษณะของแคลลัส	ลักษณะสี
0	0	37.50 ± 13.18^{d}	0.265 ± 0.032^{de}	3.10 ± 1.165^{abcde}	Friable	เขียว
	0.1	60.00 ± 12.91^{c}	0.820 ± 0.127^{bcde}	3.40 ± 1.759^{abcd}	Friable	เขียว
	0.5	57.50 ± 12.08^{bc}	0.190 ± 0.086^{e}	0.95 ± 0.887^{ef}	Friable	เขียว
	1.0	72.50 ± 18.45^{bc}	0.678 ± 0.279^{bc}	1.65 ± 0.745^{def}	Friable	เขียว
0.1	0	57.50 ± 12.08^{c}	0.272 ± 0.094^{de}	1.65 ± 1.694^{def}	Friable	เขียว
	0.1	82.50 ± 12.08^{ab}	0.467 ± 0.116^{bcde}	4.00 ± 3.539^{abc}	Compact	แดง
	0.5	62.50 ± 13.18^{c}	0.305 ± 0.189^{cde}	3.75 ± 3.447^{abcd}	Compact	แดง
	1.0	75.50 ± 11.79^{bc}	0.567 ± 0.301^{bcde}	0.65 ± 0.671^{f}	Compact	แดง
0.5	0	87.50 ± 13.18^{ab}	0.615 ± 0.177^{bcd}	1.75 ± 1.552^{cdef}	Friable	เขียว
	0.1	100 ± 0.00^{a}	1.542 ± 0.649^{a}	3.10 ± 2.337^{abcde}	Compact	แดง
	0.5	72.50 ± 14.19^{bc}	0.505 ± 0.322^{bcde}	2.70 ± 2.319^{bcdef}	Compact	แดง
	1	90.00 ± 12.91^{ab}	0.474 ± 0.140^{bcde}	0.45 ± 0.510^{f}	Compact	แดง
1	0	75.00 ± 11.79^{bc}	0.523 ± 0.313^{bcde}	4.55 ± 1.356^{ab}	Friable	เขียว
	0.1	95.00 ± 10.54^{a}	0.698 ± 0.254^{bc}	5.30 ± 3.063^{a}	Compact	แดง
	0.5	97.50 ± 7.91^{a}	0.821 ± 0.204^{b}	4.85 ± 3.183^{ab}	Compact	แดง
	1	95.00 ± 10.54^{a}	0.655 ± 0.220^{bcd}	3.25 ± 1.372^{abcd}	Compact	แดง

***หมายเหตุ** ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การตรวจสอบระดับพลอยดีและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อจากการจุ่มแช่โคลชิซีนในระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่ต่างกัน

จากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อ ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่มีโคลชิซีนในระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 mg/l เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนข้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่จุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารโคลชิซีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดเท่ากับ 100.00 ± 00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ กับชิ้นส่วนข้อที่จุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารโคลชิซีน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 96.67 ± 10.54 เปอร์เซ็นต์) และชิ้นส่วนข้อที่จุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตร ½ MS เที่ไม่เติมสารสารโคลชิซีนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 90.00 ± 16.10 เปอร์เซ็นต์) รวมถึงชิ้นส่วนข้อที่จุ่มแช่ในโคลชิชินความเข้มข้น 0.1 mg/l เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 86.66 ± 17.22 เปอร์เซ็นต์) และ48 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 80.00 ± 17.22 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 2)

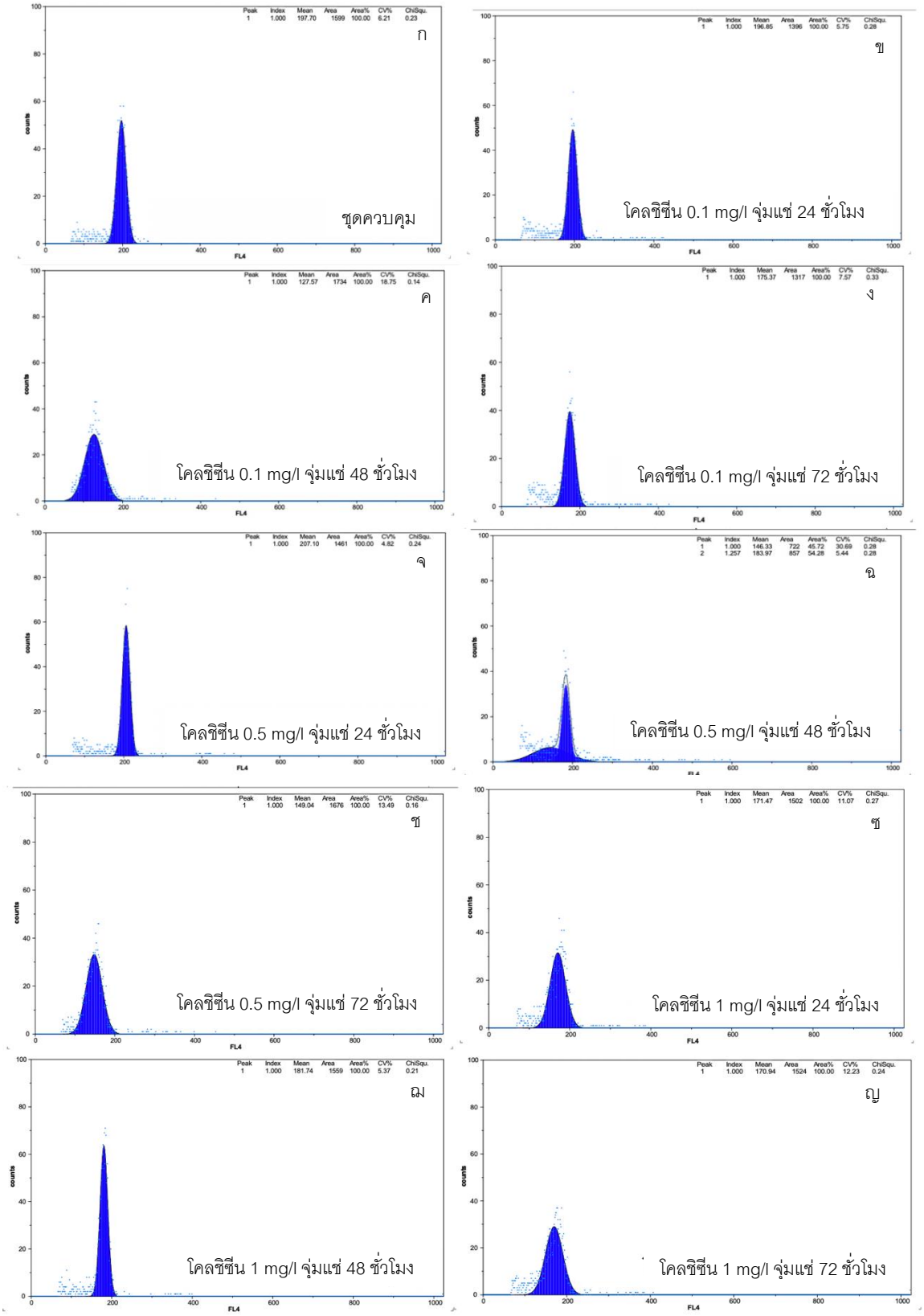
ตารางที่ 2 ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการจุ่มแช่โคลชิซีนของชิ้นส่วนข้อในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและระดับพลอยดี

ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (mg/l)	เวลาจุ่มแช่ (ชั่วโมง)	การรอดชีวิต (%)	ระดับพลอยดี
0 (control)	24	100.00 ± 0.00[a]	ดิพลอยด์
	48	96.67 ± 10.54[a]	ดิพลอยด์
	72	90.00 ± 16.10[ab]	ดิพลอยด์
0.1	24	86.66 ± 17.22[abc]	ดิพลอยด์
	48	80.00 ± 17.22[abcd]	ดิพลอยด์
	72	73.33 ± 14.06[bcde]	ดิพลอยด์
0.5	24	66.66 ± 0.00 def[cdef]	ดิพลอยด์
	48	59.99 ± 14.05[def]	ดิพลอยด์
	72	53.33 ± 17.21[efg]	ดิพลอยด์
1.0	24	53.33 ± 17.21[efg]	ดิพลอยด์
	48	46.66 ± 17.21[fg]	ดิพลอยด์
	72	33.33 ± 0.00[g]	ดิพลอยด์

***หมายเหตุ** ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

การตรวจสอบระดับพลอยดีด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี

ผลจากการวิเคราะห์ระดับพลอยดีของหยาดน้ำค้างด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี พบว่าต้นหยาดน้ำค้างที่เกิดจากการพัฒนาของชิ้นส่วนข้อ ในชุดควบคุมและชุดที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 mg/L ที่ระยะเวลาจุ่มแช่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีสำหรับผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ ทั้งที่มี 2 peak และ peak เดียว สำหรับผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ ที่มี 2 peak นั้นคือ peak ที่ 1 แสดงเศษชิ้นส่วนต่างๆ ที่มีอยู่ในเซลล์รวมทั้งเศษชิ้นส่วนที่แตกหัก และ peak ที่ 2 แสดงระดับพลอยดีที่เกิดขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบการแสดงทั้งสอง peak ในชุดการทดลองที่แช่โคลชิซีนความเข้มข้น 0.5 mg/l นาน 48 ชั่วโมงเท่านั้น (ภาพที่ 2, ฉ) ส่วนชุดการทดลองอื่นๆ พบเพียง peak เดียวคือ peak ที่ 2 ที่แสดงระดับพลอยดี (ภาพที่ 2, ก- จ และ ช-ญ) ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมด จะเห็นว่าใน peak ที่ 2 แสดงระดับพลอยดีที่เหมือนกันในทุกชุดทดลอง โดย peak ที่ 2 แสดงถึงปริมาณ DNA ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ มี peak สูงสุดที่ตำแหน่ง 200 มีระดับพลอยดีเป็น 2n = 2 x ซึ่งในทุกชุดการทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงชุดของโครโมโซม และที่ระดับความเข้มข้นของโคลชิซีนสูงรวมถึงระยะเวลาการจุ่มแช่ที่นานขึ้น พบว่าชิ้นส่วนข้อของ *D. indica* L. มีการดูดซับสารโคลชิซินไว้ปริมาณมากจนทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำและส่งผลต่อระดับพลอยดีที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในการทดลองครั้งนี้



ภาพที่ 2 ผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของหยาดน้ำค้างที่ได้จาก flow cytometry

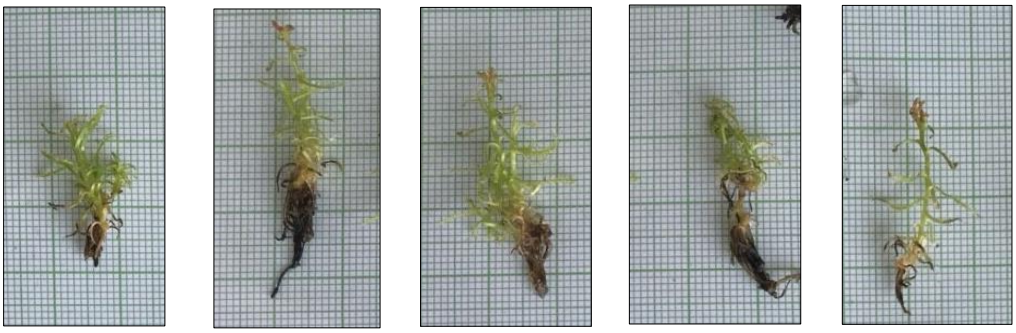
การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าหลังการย้ายปลูก

เมื่อนำต้นกล้าที่พัฒนาจากชิ้นส่วนข้อที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่สารโคลชิซีน อายุ 4 สัปดาห์ มาย้ายปลูกลงในวัสดุปลูกที่แตกต่างกันคือ พีทมอสเพียงอย่างเดียว สแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว และพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสในอัตราส่วน 1:1, 2:1 และ1:2 ตามลำดับ แล้วนำไปไว้ในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่า ต้นกล้าที่ย้ายปลูกในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสในอัตราส่วน 1:2 มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตมากที่สุด เท่ากับ 73.33 ± 14.05 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นกล้าที่ย้ายปลูกในสแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 69.99 ± 10.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาถึงการเจริญเติบโตของต้นกล้า จะเห็นว่าต้นกล้าที่เจริญในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสในอัตราส่วน 2:1 มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.00±1.651 ยอด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองอื่น ๆ สำหรับต้นกล้าที่เจริญในสแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว ต้นกล้ามีความยาวต้นเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 3.607 ± 1.332 เซนติเมตร และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากชุดการทดลองอื่นๆ รวมถึงมีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 18.57 ±7.02 ใบ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากต้นกล้าที่เจริญในวัสดุปลูกผสม ในทางตรงกันข้ามจะเห็นได้ว่า ต้นกล้าที่เจริญในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอส ในอัตราส่วน 1:1 ต้นกล้ามีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 1.628 ± 1.307 เซนติเมตร แต่ไม่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหยาดน้ำค้างหลังการย้ายปลูก 4 สัปดาห์

วัสดุปลูก	การรอดชีวิต (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวต้นเฉลี่ย (cm)	จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น	ความยาวรากเฉลี่ย (cm)
พีทมอสเพียงอย่างเดียว	33.33 ± 27.21^{c}	1.70 ± 1.25^{a}	0.850 ± 0.327^{c}	11.00 ± 5.16^{b}	0.579 ± 0.480^{a}
สแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว	69.99 ± 10.54^{ab}	2.38 ± 2.26^{a}	3.607 ± 1.332^{a}	18.57 ± 7.02^{a}	1.618 ± 1.225^{a}
พีทมอส : สแฟคนัมมอส (1 : 1)	49.99 ± 17.57^{bc}	2.80 ± 2.00^{a}	1.692 ± 0.203^{bc}	14.00 ± 7.01^{ab}	1.628 ± 1.307^{a}
พีทมอส : สแฟคนัมมอส (2 : 1)	40.00 ± 14.05^{c}	3.00 ± 1.65^{a}	2.147 ± 0.892^{b}	14.58 ± 7.79^{ab}	0.979 ± 0.740^{a}
พีทมอส : สแฟคนัมมอส (1 : 2)	73.33 ± 14.05^{a}	2.13 ± 1.61^{a}	2.121 ± 0.553^{b}	14.59 ± 6.83^{ab}	1.263 ± 1.036^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ก ข ค ง จ

ภาพที่ 3 ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกล้าหยาดน้ำค้าง โดย (ก) ปลูกในพีทมอสเพียงอย่างเดียว,(ข) ปลูกในสแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว และ ปลูกในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสอัตราส่วนคือ 1 : 1, (ง) 2 : 1และ (จ) 1 : 2

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลของระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของ *D. indica* L.

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0. 0.1, 0.5 และ 1 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบเกิดแคลลัสได้มากที่สุด เท่ากับ 100.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้น ซึ่งจะเห็นได้ว่า การเติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีแสดงให้เห็นว่า การเติม BA และ NAA ร่วมกันมีผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่นเดียวกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินร่วมกับออกซินชนิดอื่นๆ เช่น TDZ และ BA ร่วมกับ NAA และ 2,4 D (Tungsunan *et al*., 2015) โดยสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินและไซโตไคนินมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเซลล์ หากสัดส่วนดังกล่าวมีความสมดุลจะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Buddharaksa, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kongbangkerd *et al*. (2011) ที่ได้รายงานการใช้ BA ร่วมกับ NAA ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบหยาดน้ำค้าง (*D. communis* St.Hil.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.5 mg/l พบว่า สามารถชักนำให้ใบเจริญเป็นแคลลัสได้สูงที่สุด นอกจากนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ และจากการศึกษาของ Dhar & Joshi (2005) Joshi & Dhar (2005) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของบัวหิมะ (*Saussurea obvallata*) โดยศึกษาผลของ BA ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันพบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเจริญของแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.5 μM ร่วมกับ NAA 10 μM จะให้น้ำหนักสดแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 0.88 ± 0.21 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งจากอิทธิพลของ BA ที่เติมร่วมกัน NAA ในปริมาณที่เหมาะสมต่อชนิดของพืชและชิ้นส่วนของพืช จะไปมีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม Auxin ได้แก่ NAA และ 2,4 D หรือกลุ่มไซโตไคนิน เช่น TDZ และ BA (Tungsunan *et al*., 2015) สำหรับการชักนำให้เกิดยอด จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้น ซึ่งจะเห็นว่า การเติม BA ในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ (1.0 mg/l) มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดมากกว่าการเติม BA ในระดับความเข้มข้นต่ำ เนื่องจาก BA เป็น strong cytokinin สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ดี และได้จำนวนยอดที่มากกว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินชนิดอื่น เช่น ไคนิติน (Kinetin) และน้ำมะพร้าว (Neera *et al*., 2014) และจากการศึกษาของ Jayarum & Prasad (2007) ที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างและปลายยอดของ *D. indica* L. บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน สามารถเพิ่มการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ แต่หากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้ยอดไม่เจริญเติบโต

สำหรับลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นจากการทดลองครั้งนี้ จะเห็นได้ว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการเติม BA ร่วมด้วย แคลลัสที่เกิดขึ้น มีการเกาะกันอย่างหลวมๆ (Friable) และมีสีเขียว แต่เมื่อเติม BA ร่วมกับ NAA โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA ให้มากขึ้น พบว่าแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น

(Compact) และมีสีแดง ซึ่งจากรายงานวิจัยของ Jala & Paitoon (2013) ที่ได้ศึกษาระดับสีของแคลลัสและการเกาะกลุ่มของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกาบหอยแครง (*Dionaea muscipula* Ellis) พบว่า เมื่อเติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l เพียงอย่างเดียว แคลลัสมีระดับความเข้มของสีแดงมากที่สุดและมีการเกาะกลุ่มของแคลลัสมากที่สุด และจากรายงานวิจัยของ Yusoh & Te-chato (2014) ในการเพาะเลี้ยงคัพภะของข้าวหอมกระดังงาบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 -D 1.0 mg/l ร่วมกับ BA 1.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อน เกาะกันแน่น ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่า ชนิดและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและออกซิน ในปริมาณที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนแคลลัสได้ อย่างไรก็ตามพืชต่างชนิดกันมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันเพื่อใช้ในการเจริญของแคลลัส (Thengane *et al*., 1994) ดังนั้นจากการชักนำให้เกิดแคลลัสของหยาดน้ำค้างในครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ในการชักนำให้เกิดยอด ราก หรือการเกิดเป็นพืชต้นใหม่ เพื่อช่วยส่งเสริมในการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวน รวมถึงการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการผลิตสารสำคัญทางยาหรือสารทุติยภูมิได้ต่อไป

ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาของการจุ่มแช่ในโคลชิซีนที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการตรวจสอบระดับพลอยดี

เมื่อนำชิ้นส่วนข้อที่ได้จากการชักนำให้เกิดเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ไปจุ่มแช่ในโคลชิซีนที่มีระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำชิ้นส่วนข้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าชิ้นส่วนข้อที่ไม่ได้รับสารโคลชิซีน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะลดลงตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ในโคลชิซีนที่มากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนข้อ มีการดูดซับสารโคลชิซีนไว้ปริมาณมากจนทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำ สอดคล้องกับรายงานของ Balla *et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์จากเนื้อเยื่อมันเทศประดับด้วยสารละลายโคลชิซีนชนิดเม็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยต้นที่ได้รับโคลชิซีนที่ปริมาณสูงขึ้นจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง รวมถึงรายงานวิจัยของ Dermen (1940) พบว่าโคลชิซีนไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะการแบ่งเซลล์ แต่การแพร่เข้าไปภายในเซลล์มีผลทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ เซลล์อาจตายได้และส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ลดลง สำหรับการทดลองในครั้งนี้พบว่า ทุกชุดทดลองที่จุ่มแช่โคลชิซีน แล้วนำไปตรวจสอบระดับพลอยดีโดยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีนั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดี เนื่องจากการที่ชิ้นส่วนข้อได้รับโคลชิซีน ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งยาวนานสุดใช้เวลา 72 ชั่วโมงหรือ 3 วัน อาจไม่เพียงพอในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดี ควรมีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารที่เติมสารโคลชิซีนร่วมด้วย ซึ่งจากรายงานการศึกษาในพืชกินแมลงร่วมกับการใช้โคลชิซีนนั้น จะเห็นว่าการเลือกใช้ระดับความเข้มข้นและชิ้นส่วนที่เหมาะสมของแต่ละชนิดพืชนั้นมีส่วนสำคัญ ซึ่งในงานวิจัยของ Samala *et al.* (2015) ที่ได้ทดลองจุ่มแช่สิ้นส่วนต้นอ่อนของจอกบ่วาย (*D. burmannii*) ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้นระหว่าง 0 - 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 - 48 ชั่วโมงพบว่า ทุกชุดการทดลองให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ความกว้างและความยาวของปากใบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีนมากขึ้น นอกจากนี้จากการศึกษาในหยาดน้ำค้างชนิด *D. spatulata* Labill โดยใช้ชิ้นส่วนทั้งต้นจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้น 0, 6, 12 mg/l บนเครื่องเขย่าในสภาวะมืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ค่า pH 5.6 เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีจากดิพลอยด์กลายเป็นเตตระพลอยด์ได้สำเร็จ ซึ่งใช้การยืนยันการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีจากโดยการนับจำนวนโครโมโซมและการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของปากใบซึ่งพบว่าระดับความ

เข้มข้นของโคลชิซีนที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กันกับขนาดของปากใบที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Charoenwattana, 2014) รวมถึงการศึกษาผลของสารโคลชิซีนต่อลักษณะทางสันฐานวิทยาของ *D. burmannii* ในหลอดทดลอง ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้ชิ้นส่วนต้นของ *D. burmannii* มาจุ่มแช่ส่วนต้นในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติมสารละลายโคลชิซีน เข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของโคลชิซีนที่เพิ่มสูงขึ้นสามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความยาวของปากใบได้ (Samala *et al*., 2015) สำหรับการศึกษาในพืชชนิดอื่นที่เลือกใช้ความเข้มข้นของสารโคลชิชิน และชิ้นส่วนที่เหมาะสม ในการศึกษาของ Balla *et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์จากเนื้อเยื่อมันเทศประดับด้วยสารละลายโคลชิซีนชนิดเม็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมความเข้มข้นของโคลชิซีนแตกต่างกัน พบว่าความเข้มข้นของ โคลชิชิน 2.5 mg/l และ 5 mg/l ที่แช่ระยะเวลานาน 2 วันสามารถชักนำให้มันเทศเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโพลีพลอยด์ เป็น mixoploid ได้ นอกจากงานที่กล่าวมาแล้วนั้นยังมีการรายงานถึงผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของการจุ่มแช่โคลชิซีนที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดี รวมถึงชนิดของสารที่เลือกใช้ก็มีส่วนสำคัญเช่นเดียวกัน สำหรับการศึกษาสารชนิดอื่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีของหยาดน้ำค้าง เช่น ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีของหยาดน้ำค้างชนิด *D. capensis* L. โดยใช้ชิ้นส่วนใบในการจุ่มแช่ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารออรีซาลินที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าที่ ความเข้มข้นออรีซาลิน 20 μM, 60 μM และ 80 μM ที่จุ่มแช่นาน 48, 24, และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นโพลีพลอยด์ได้ (Pavla *et al*., 2013) จากรรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีคือ ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ วิธีการจุ่มแช่หรือการเติมสารโคลชิซีนลงในอาหารเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง หากเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของพืช สามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีได้

การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *D. indica* L.

จากการนำต้นกล้าที่พัฒนาจากชิ้นส่วนข้อที่รอดชีวิตจากการจุ่มแช่สารโคลชิชิน อายุ 4 สัปดาห์ มาย้ายปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน คือ พีทมอสเพียงอย่างเดียว สแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว และพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอส ผลการทดลองพบว่า การย้ายปลูกในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสในอัตราส่วน 1 : 2 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต้นกล้ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด นอกจากนี้จะเห็นว่า ต้นกล้าที่ปลูกในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอส ในทุกอัตราส่วน มีผลทำให้ต้นกล้ามีจำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุด และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ รวมถึงการปลูกในสแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว ชักนำให้ต้นกล้ามีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งจะเห็นได้ว่า การปลูกหยาดน้ำค้างในสแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียวหรือการใช้วัสดุปลูกสองชนิดคือสแฟคนัมสอสและพีทมอสร่วมกัน สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ดี ซึ่งสแฟคนัมมอสมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี และเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงถิ่นที่อยู่อาศัยของพืชกินแมลง โดยมีรายงานการใช้สแฟคนัมมอสเป็นวัสดุปลูกของพืชกินแมลง ที่สามารถส่งเสริมให้ต้นหยาดน้ำค้างรอดชีวิตได้สูงสุดถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ (Chuntaratin, 2013) ซึ่งสแฟคนัมมอสนั้นจัดเป็นวัสดุปลูกที่ดูดซับน้ำได้ดี และระบายน้ำได้ดี และจากการทดสอบการสลายตัวหลังการปลูกพบว่าย่อยสลายได้ดี และมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นวัสดุปลูกในพืชหลายชนิด (Aubé *et al.,* 2015) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Petchang (2013) ที่ได้ศึกษาการขยายพันธุ์ผักพื้นบ้าน (ดีกระทิง, กระเฉดต้น, ผักหวานบ้าน, ขลู่, กุ่มบก และ มะรุม) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำออกปลูกเปรียบเทียบระหว่างการปลูกในสแฟคนั่มมอสและแกลบดำเพียงอย่างเดียว พบว่าต้นกล้ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 70-100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจาก สแฟคนั่มมอสจะทำให้รากมีความชื้นสูง รากชอนไชได้ดี ส่วนแกลบดำเมื่อรดน้ำเนื้อจะแน่นแข็ง รวมถึงในการศึกษา

วัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าปิด พบว่าเอื้องกุหลาบกระเป๋าปิดที่ย้ายลงปลูกเป็นเวลา 1 เดือน เมื่อปลูกในสแฟคนัมมอส ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือในวัสดุปลูกอื่นๆ (พีทมอส, กาบมะพร้าวสับ, ขุยมะพร้าว และเพอไลท์) ที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่เท่ากันคือ 88.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความชื้นที่ได้รับจากสแฟคนัมมอสเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช (Promchan *et al*., 2016) และจากรายงานของ Kauth *et al.* (2006) พบว่า ต้นกล้าของ *Calapogon tuberosus* ที่ปลูกใน สแฟคนัมมอส ให้จำนวนใบเฉลี่ย ความยาวใบ ความยาวราก และน้ำหนักแห้งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกใน เวอร์มิคูไลต์ พีทมอสผสมทราย และ ดินผสม สำหรับพีทมอส เป็นวัสดุปลูกที่มีความเป็นกรดอ่อน ไม่ผุพังเร็ว แต่ข้อเสียคือวัสดุปลูกจะแฉะมาก (Pimsuwan, 2012) แต่จากการทดลองอื่นๆ จะเห็นได้ว่า มีการใช้พีทมอสร่วมกับวัสดุอื่นๆ ในการเพาะปลูกพืชกินแมลง เช่นจากการศึกษาของ Kim & Jang (2004) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงหยาดน้ำค้างชนิด *D. peltata* ซึ่งจัดเป็นหยาดน้ำค้างที่มีหัวใต้ดิน (Tuberous sundews) เมื่อนำหัวใต้ดินที่ได้ออกปลูกในกระถางพลาสติกที่ใช้วัสดุปลูกคือ พีทมอสร่วมกับทราย ในสัดส่วน 1 : 1 พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ของต้นอ่อนที่ออกปลูก และจากการศึกษาของ Taweerodjanakarn *et al.* (2018) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์หยาดน้ำค้าง (*D. burmannii* Vahl.) ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยนำต้นกล้าที่ได้มาย้ายออกปลูกเพื่อศึกษาอิทธิพลของวัสดุปลูก พบว่าการใช้ พีทมอสร่วมกับดินแดง ในอัตราส่วน 1:1 มีผลทำให้ต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดถึง 64.44 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการวิจัย

จากการนำชิ้นส่วนใบ ที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย NaDCC 1.7 เปอร์เซ็นต์ (V/W) และสารละลาย H_2O_2 0.1 เปอร์เซ็นต์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส มากที่สุด และอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดจากชิ้นส่วนแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบได้ในคราวเดียวกัน และเมื่อเติม BA ร่วมกับ NAA โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA ให้มากขึ้น พบว่าแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น และมีสีแดง สำหรับการศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังจากเพาะเลี้ยงพบว่าเกิดการพัฒนาของแคลลัสเป็นยอดและเป็นต้นเกิดขึ้น จึงนำต้นที่ได้มาตัดให้ได้ชิ้นส่วนข้อซึ่งพัฒนาจากแคลลัสไปจุ่มแช่โคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการจุ่มแช่ที่แตกต่างกัน พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่ไม่ได้จุ่มแช่ในโคลชิซีน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด โดยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะลดลงตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่มากขึ้น และเมื่อนำชิ้นส่วนข้อที่จุ่มแช่ในสารโคลชิซีนไปตรวจสอบระดับพลอยดี พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดี ซึ่งให้ผลการทดลองเป็นดิพลอยด์ทั้งหมด และเมื่อย้ายปลูกต้นกล้าที่ได้ลงในวัสดุปลูกที่แตกต่างกันพบว่า ต้นกล้าที่ย้ายปลูกในพีทมอสร่วมกับสแฟคนัมมอสในอัตราส่วน 1: 2 และการย้ายปลูกในสแฟคนัมมอสเพียงอย่างเดียว เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดในช่วง 70-73 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้ามีการเจริญเติบโตดี โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ยและความยาวรากที่ไม่แตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่มอบทุนการศึกษาเพื่อสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์สำหรับการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aubé, M. Quenum, M. & Ranasinghe, L. (2015). Characteristics of Eastern Canadian cultivated sphagnum and potential use as a substitute for perlite and vermiculite in peat-based horticultural substrates. *Mires and Peat*, *16*, 1–18.

Balla, N., Taychasinpitak, T. & Thanananta, T. (2007). Induce Polyploid Ornamatal Sweet Potato *in Vitro* by Colchicine. *Thai Science and Technology Journal*, *25*, 261–266. (in Thai)

Buddharaksa, P. (2013). *Plant Tissue Culture*. Chiang mai: Nopburee Press Company Printing Design in Chiang mai. (in Thai)

Charoenwattana, P. (2014). Invitro Cultures and Colchicin – Induced Tetraploidy of Sundew (*Drosera spatulate* Labill.). *International Journal of Enviromental and Rural Development*, *5* (2), 80-85.

Chuntaratin, P. (2013). *Collection and Production of Carnivorous Plants in the Genus Drosera by Plant Tissue Culture Technique*. Bangkok: Agricultural Technology Program, Bangkok Thonburi University. Retrieved July 1, 2018, from http://qa.bkkthon.ac.th/qa/qa56/132144099.pdf. (in Thai)

Chiang, C.P. (2010). *Growing Carnivorous Plants in the Topics*. Singapore : Celestial.

Dermen, H. (1940). Colchicine polyploidy and technique. *The Botanical Review*, *6*,(11), 599-635.

Dhar, U. & Joshi, M. (2005). Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Report, 24,* 195-200.

Didry, N., Dubreuil, L., Trotin, F. & Pinkas, M. (1998). Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Snith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, *60*, 91-96.

Hanson, L., Mcmahon, K., Johnson, M. & Bennett, M. (2001). First nuclear DNA C – values for 25 angiosperm families. *Annals of Botany*, *87*, 251-258.

Jala, A. & Paitoon, S. (2013). Micropropagation of *Dionaea muscipula* by Tissue culture. *Thai Journal of Science and Technology, 2*(2), 134-139. (in Thai)

Jayaram, K. & Prasad, M. (2007). Rapid in vitro multiplication of *Drosera indica* L.: a vulnerable, medicinally important insectivorous plant. *Plant Biotechnology Reports*, *1*(2), 79-84.

Juengwatanatrakul, T., Sakamoto, S., Tanaka, H. & Putalun, W. (2011). Eliciation effect on production of plumbagin *in vitro* of *Drosera indica* L.. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(19), 4949-4953.

Kauth, P.J., Vendrame, W.A. & Kane, M.E. (2006). *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *85*, 91–102.

Kim, K.S. & Jang, G.W. (2004). Micropropagation of *Drosera peltata* , a tuberous sundew, by shoot tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 211-214.

Kongbangkerd, A., Homchan, S. & Promthep, K. (2011). Effect of plant growth regulators and plant growth retardants on growth and development on *in vitro* leaf culture of *Drosera communis* St.Hil. *NU Science Journal*, *8*(1), 87 - 100. (in Thai)

Lee, L. (2008). Carnivorous plants: new ornamentals. *Chronica Horticulturae*, *48*(4), 11-14.

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

Neera, S., Soonthorn, W., Mongkolpun, P. & Hongpukdee, P. (2014). Effect of cytokinins and coconut water on in vitro shoot induction of Kaentawan (*Helianthus tuberous* L.). *khon kaen agriculture journal, 42*(3), 328-334. (in Thai)

Pavla, Z., Barbora, S., Ales, H. & Eloy, C. (2013). In vitro Induced Mitotic Polyploidy in *Drosera capensis* L.. *Agricultura tropica et subtropica*, *46*(4), 107-110.

Petchang, R. (2013). Propagation of some local plants by tissue culture in Tumbon Nanokkok, Lablae, Uttaradit. *Naresuan University Journal: Science and Technology, 19*(3), 35-42. (in thai)

Pimsuwan, S. (2012) *Research report Effect of Various Type of Growing Media on Growth of Venus Flytrap, (Dionaea muscipula)*, Faculty of Agricultural Technology Rajamangala University of Technology Thanyaburi. 64 pp. (in thai)

Promchan, T., Ramasoot, S. & Bunwest, P. (2016) Effects of Activated Charcoal and Growing Media on Seedling Growth and Survival Rate of *Aeridesodorata. Wichcha Journal, 35*(2), 53-61. (in Thai)

Samala, S., Jansedom, H. & Saehan, O. (2015). Effect of Colchicin on Morphological Characteristics of *In Vitro Drosera burmannii. Songklanakarin Journal of plant Science, 2*(1), 24 - 28. (in Thai)

Taweerodjanakarn, S., Kongton, K., Thongyai. K. & Samala, S. (2018). Invitro Micropropagation *of Drosera burmanni* Vahl. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, *5*(3). 18-26. (in Thai)

Thengane, S. R., Joshi, M. S., Khuspe, S. S. & Mascarenhas, A. F. (1994). Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. *Plant cell reports*, *13*(3-4), 222-226.

Tungsunan, T., Chotikadachanarong, S. & Pichai, K. (2015). Invitro propagation of stevia (*stevia rebaudiana* Bertoni.). *Journal of Thai Interdisciplinary Resarch*, *10*(1), 8-16. (in Thai)

Yusoh, A. & Te-chato, S. (2014). Effect of Sucrose and Dicamba on Callus Induction from Mature Seeds and Young Leaves Culture of Hom Kra-Dang-Nga Rice *(Indica)*. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, *1*(3), 28-31. (in thai)