การขยายพันธุ์อีหลืน (*Elsholtzia communis* (Collett&Hemsl.) Diels) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation of *Elsholtzia communis* (Collett&Hemsl.) Diels

บุณณดา ยอดแก้ว[1], ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา[1*], อังคณา อินตา[1], สิริพร โรจน์อารยานนท์[1], กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์[2], จิราภรณ์ ปาลี[3] และ ณัตฐิยา ชัยชนะ[3]

Boonnada Yodkeaw[1], Srisulak Dheeranupattana[1*], Angkhana Inta[1], Siriphorn Rotarayanont[1], Kittisak Chotikadachanarong[2], Jiraporn Palee[3] and Natthiya Chaichana[3]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

[2]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่*

[3]*โปรแกรมวิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย*

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

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

[3]*Science Program, Faculty of Education, Chiang Rai Rajabhat University.*

Received : 19 April 2019

Revised : 1 July 2019

Accepted : 26 August 2019

บทคัดย่อ

อีหลืน (*Elsholtzia communis* (Collett&Hemsl.) Diels) เป็นผักพื้นบ้านที่ชาวไทยภูเขา ในจังหวัดแม่ฮ่องสอน และจังหวัดเชียงใหม่ นำมาใช้เป็นเครื่องเทศซึ่งมีกรดอะมิโนสูง มีสรรพคุณในการต้านไวรัสและแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ โดยทั่วไปการขยายพันธุ์อีหลืนด้วยเมล็ดนั้นมักประสบกับปัญหาการพักตัวและเมล็ดมีอัตราการงอกต่ำ ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อการขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยนำชิ้นส่วนข้อที่ได้จากต้นอ่อนอีหลืนในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติม BA หรือ Kinetin ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 7.90±0.61 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และให้ความยาวยอดเฉลี่ย 2.95±0.16 เซนติเมตร ขั้นตอนที่สองการชักนำให้เกิดราก โดยย้ายยอดที่ได้จากขั้นตอนแรกไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 25.00±0.38 ราก/ชิ้นส่วนพืช ขั้นตอนที่สาม การปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูก โดยนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองย้ายปลูกในวัสดุปลูก 3 สูตร ได้แก่ 1) ดิน : เวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1 : 1, 2) ทราย : แกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 และ 3) พีทมอส พบว่าพีทมอสให้อัตราการรอดชีวิตได้สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ หลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 30 วัน

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, การปรับสภาพก่อนย้ายออกปลูก, อีหลืน, BA, IBA

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

Abstract

Elsholtzia communis (Collett&Hemsl.) Diels is a local plant in which hill tribe people in Mae Hong Son and Chiang Mai provinces traditionally use as spices. This plant contains high amount of amino acids and has anti-viral, anti-bacterial, anti-inflammatory, and antioxidant activities. Generally, seed propagation may encounter some difficulties, including seed dormancy and low rate of seed germination. Therefore, tissue culture technique was applied for mass propagation in short time period. There were 3 steps of the technique. For the first step (shoot multiplication), *in vitro* nodal explants were cultured on solid MS media (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with benzyladenine (BA) or kinetin at 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/L for 8 weeks. The results showed that MS media supplemented with 0.5 mg/L BA could induce 100% of shoot formation and provided the highest average shoot number of 7.90±0.61 shoots/explant with the average shoot length of 2.95±0.16 centimeters. The second step (root formation), shoots from first step was cultured on solid MS media supplemented with indolebutyric acid (IBA) or naphthaleneacetic acid (NAA) at 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/L for 8 weeks. It was found that MS media supplemented with 2.0 mg/L IBA could be induce 100% root formation, and the average was 25.00±0.38 roots/explant. The last step (acclimatization), *in vitro* plantlets were transferred into 3 different formulas of potting mix including 1) 1 : 1 of soil and vermiculite, 2) 1 : 1 : 1 of sand : rice husk : coconut dust, and 3) peat moss. The results revealed that peat moss was the best potting mix providing 90% of survival rate after 30 days of planting.

Key word: plant tissue culture, acclimatization, *Elsholtzia communis* (Collett&Hemsl.) Diels, BA, IBA

บทนำ

อีหลืน (*Elsholtzia communis* (Collett & Hemsl.) Diels) จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae ใบและช่อดอกมีกลิ่นหอม ลักษณะคล้ายต้นกะเพรา พบได้บางพื้นที่ของ จีน พม่า และทางภาคเหนือของไทย เช่น จังหวัดแม่ฮ่องสอน และจังหวัดเชียงใหม่ (Bongcheewin *et al*., 2015) ชาวไทยภูเขานิยมนำมาใช้ประกอบอาหาร (Trisonthi & Trisonthi, 2009) เป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูงเนื่องจากมีกรดอะมิโนสูงกว่ากะเพรา (Khomdram *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการต้านไวรัส ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ช่วยควบคุมสมดุลของร่างกายและลดสภาวะเครียด (Barua *et al*., 2016) พืชชนิดนี้มีการใช้ประโยชน์ในกลุ่มชาวไทภูเขาบางกลุ่ม โดยนำมาปลูกในไร่ข้าว อย่างไรก็ตามการบุกรุกพื้นที่ปลูกประกอบกับเมล็ดมีการพักตัวและเสื่อมสภาพสูง มีแนวโน้มส่งผลให้พืชชนิดนี้ลดลงอย่างรวดเร็ว และสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้เพื่อการขยายพันธุ์อีหลืนให้เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล

การขยายพันธุ์อีหลืนโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังไม่พบรายงาน จึงอ้างอิงจากพืชในวงศ์ Lamiaceae โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ประกอบด้วย ขั้นตอนแรก การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยชิ้นส่วนที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่ ชิ้นส่วนข้อ (nodal segment) ซึ่งพบในพืชหลายชนิด เช่น *Mentha piperita* (Ghanti *et al.,* 2004), *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Saha *et al.,* 2010), *Lavandula pedunculata* (Zuzarte *et al.,* 2010) ในขั้นตอนนี้

ต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืช เช่น BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดใน *L. pedunculata* (Zuzarte *et al.,* 2010) ขณะที่ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดใน *M. piperita* (Ghanti *et al.,* 2004), *O. kilimandscharicum* Guerke (Saha *et al.,* 2010) หรือ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำ *Mentha arvensis* L. (Chishti *et al.,* 2006) ให้เกิดยอดได้สูงสุด นอกจากนี้ยังพบการใช้ Kinetin เพื่อชักนำให้เกิดยอดในพืชหลายชนิด เช่น *Thymus hyemalis* Lauge. (Nordine *et al.,* 2013) และ *M. piperita* (Mehta *et al.,* 2012) เป็นต้น ขั้นตอนที่สอง การชักนำให้เกิดราก พบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เช่น IBA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงสุดใน *Ajuga bracteosa* (Kaul & Srivastava, 2013), *Salvia officinalis* L. (Tawfik & Mohamed, 2007) และ *Sedum sarmemtosum* Bunge. (Kim & Sivanessan, 2016) ตามลำดับ ขณะที่ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงสุดใน *Lavandula dentata* (Echeverrigaray *et al*., 2005) และ *Lavandula ver*a DC (Andrade *et al.,* 1999) ขั้นตอนที่สาม การปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูกมีผลต่อการรอดชีวิตของต้นอ่อนที่ออกจากขวด เนื่องจากต้นอ่อน (plantlet) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มีลักษณะเปราะบาง ระบบรากยังไม่แข็งแรง และการพัฒนาของคิวติเคลที่ผิวใบยังไม่สมบูรณ์ (Chandra *et al*., 2010) ดังนั้นการปรับสภาพทั้งลักษณะทางสัณฐาน และสรีระของพืช (Kumar & Rao, 2012) เพื่อให้เจริญเติบโตและมีอัตราการรอดชีวิตสูงในแปลงเพาะปลูก จึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย ได้แก่ สภาวะแวดล้อม เช่น แสง ความชื้น (Chandra *et al.,* 2010) และวัสดุปลูก (Clapa *et al.,* 2013) ชนิดและอัตราส่วนของวัสดุปลูก ส่งผลต่อการรอดชีวิต ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ส่วนใหญ่วัสดุปลูกที่ใช้มีดินเป็นองค์ประกอบ เช่น ดิน : ทราย : ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 2 : 1 : 1 ให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในพืช *Plectranthus edulis* (Yimam, 2018) ในขณะที่ ดิน : ทราย : พีทมอส (peat moss) อัตราส่วน 1 : 1 : 1 ให้อัตราการรอดชีวิต 79.10 เปอร์เซ็นต์ ใน *Origanum sipyleum* L. (Oluk & Cakir, 2009) และเมื่อใช้ ดิน : เวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1 : 1 ให้อัตราการรอดชีวิต 90, 86, 81 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใน *M. piperita* (Ghanti *et al.,* 2004) *Hoslundia opposita* (Prakash & Van, 2007) *O. kilimandscharicum* Guerke (Saha *et al.,* 2010) และ *M. arvensis* L. (Chishti *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุปลูกที่ไม่มีดินเป็นองค์ประกอบ เช่น พีทมอส: เวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) อัตราส่วน 2 : 3 ให้อัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ ใน *Thymus satureioides* Coss. (Aicha *et al.,* 2013) ขณะที่อัตราส่วน 1:1 ให้อัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ ใน *Ocimum sanctum* Linn. (Tyub & Kamili, 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากจำนวนมาก ตลอดจนวัสดุปลูกที่เหมาะสมในขั้นตอนการปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูก

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมต้นอ่อนในหลอดทดลอง

นำเมล็ดอีหลืนจาก บ้านแม่อูคอ ตำบลแม่อูคอ อำเภอขุนยวม จังหวัดแม่ฮ่องสอน มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween-20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS จำนวน 10 เมล็ดต่อขวด จำนวน 20 ขวด เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1500 ลักส์ 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้ต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้ออายุ 8 สัปดาห์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (shoot multiplication)

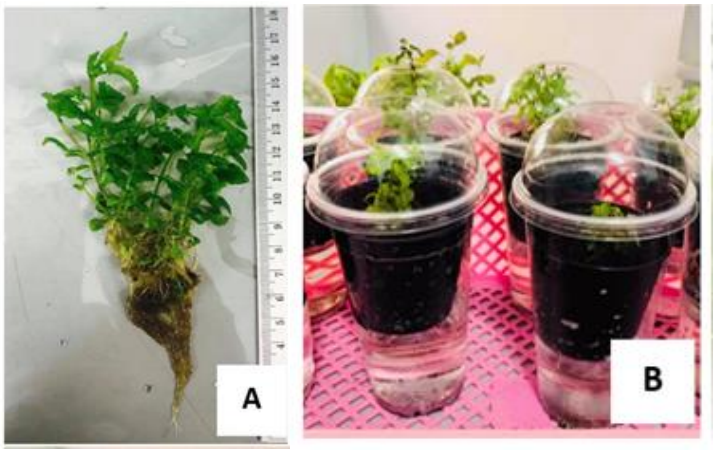
นำชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างซึ่งได้จากต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 8 สัปดาห์ มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA หรือ Kinetin ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) รวม 7 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/ชิ้นส่วนพืช และความยาวยอด

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดราก (root induction)

นำชิ้นส่วนยอดที่ได้จากขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก จากชุดการทดลองที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร อายุ 8 สัปดาห์ มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มของออกซิน ได้แก่ IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และชุดควบคุม (ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) รวมทั้งหมด 7 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และจำนวนราก/ชิ้นส่วนพืช

การทดลองที่ 3 การรอดชีวิตของต้นอีหลืนหลังการย้ายออกปลูก

นำต้นอ่อนอีหลืน (plantlet) ที่ผ่านการชักนำให้เกิดรากครบ 8 สัปดาห์ ซึ่งมีจำนวนยอด 3-5 ยอด ความยาวราก 5-10 เซนติเมตร ย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงอายุ 11 สัปดาห์ (ภาพที่ 1A) จากนั้นนำต้นอ่อนอีหลืนอายุ 11 สัปดาห์มาปรับสภาพก่อนออกปลูก (acclimatization) โดยล้างเอาวุ้นที่ติดกับรากออกด้วยน้ำประปา ย้ายลงในกระถางพลาสติกสีดำ ที่มีวัสดุปลูก 3 สูตร ได้แก่ 1) ดิน : เวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1 : 1, 2) ทราย : แกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 และ 3) พีทมอส แล้วนำกระถางพลาสติกดำใส่ลงในแก้วพลาสติกใสซึ่งมีน้ำอยู่ด้านล่าง ปิดฝาครอบแก้วพลาสติก (ภาพที่ 1B) เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้น้ำโดยการพ่นที่ต้นอีหลืนวันละ 1 ครั้ง เมื่อครบ 3 วัน เปิดฝาครอบแก้วพลาสติกออก เลี้ยงในห้องที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ได้รับแสง และรดน้ำทุกๆ 2 วัน สังเกตและบันทึกอัตราการรอดชีวิตของต้นอีหลืนทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นย้ายต้นอ่อนอีหลืนที่รอดชีวิตจากการปรับสภาพมาปลูกในกระถางที่มีดินผสมกับพีทมอส เลี้ยงต่อไปในโรงเรือน



ภาพที่ 1 ต้นอ่อนอีหลืนที่ผ่านการชักนำรากอายุ 11 สัปดาห์ (A) ต้นอ่อนที่ย้ายลงในวัสดุปลูกในขั้นตอนการปรับสภาพ(B)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's new multiple Rang test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

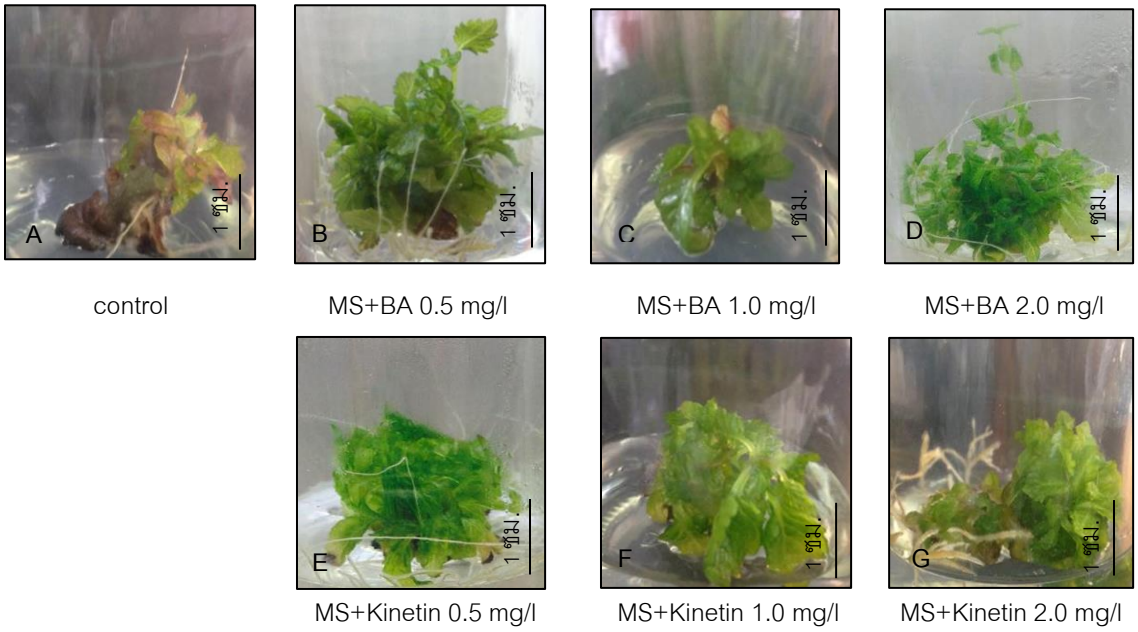
การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างของต้นอีหลืน บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA และ Kinetin ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และชุดควบคุม ดังตารางที่ 1 พบว่า ทุกชุดการทดลอง สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ชุดควบคุม ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่ำที่สุด 3.40±0.29 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และมีลักษณะยอดไหม้ (ภาพที่ 2A) ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.90±0.61 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และ 6.90±0.86 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่เมื่อพิจารณาความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.95±0.16 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 ดังนั้นเมื่อพิจารณาทั้งจำนวยอดและความยาวยอด สามารถสรุปได้ว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของอีหลืนได้ดีที่สุด (ภาพที่ 2B)

ตารางที่ 1 ผลของ BA และ Kinetin ต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมากของต้นอีหลืน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) Mean ± SE	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) Mean ± SE
MS (control)		100	3.40 ±0.29a	1.50±0.03a
MS + BA	0.5	100	7.90±0.61d	2.95±0.16d
	1.0	100	4.30±0.70ab	1.35±0.18a
	2.0	100	6.90±0.86cd	2.30±0.16bc
MS + Kinetin	0.5	100	5.60±0.67bc	2.40±0.29c
	1.0	100	4.90±0.50ab	1.80±0.11ab
	2.0	100	4.90±0.39ab	2.05±0.18bc

* *หมายเหตุ* : อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อทดสอบด้วย Duncan's new Multiple Rang Test (DMRT)



ภาพที่ 2 ลักษณะของต้นอีหลืนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ Kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

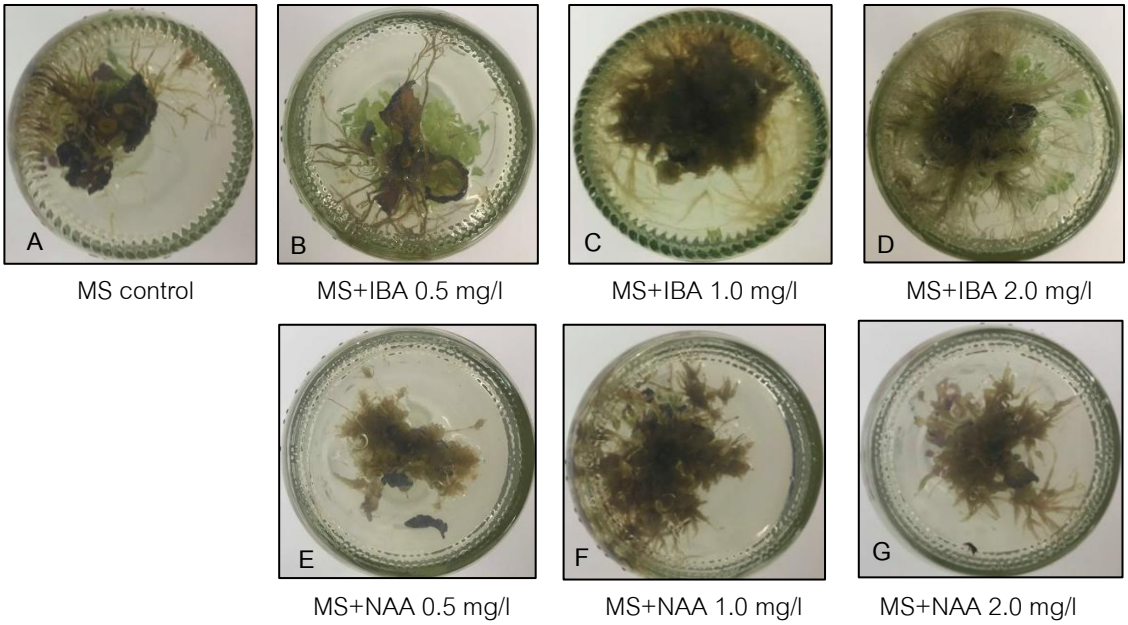
การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดราก

จากการเพาะเลี้ยงยอดอีหลืนบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และชุดควบคุม พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 25.00±0.38 ราก/ชิ้นส่วนพืช ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดรากของต้นอีหลืน ระหว่าง IBA และ NAA พบว่า IBA ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดรากของอีหลืนได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เติม NAA (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของ IBA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นอีหลืน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นส่วนพืช) Mean ± SE
MS (control)		100	11.80±0.75b
MS + IBA	0.5	100	16.40±0.46c
	1.0	100	19.60±0.35d
	2.0	100	25.00±0.38e
MS + NAA	0.5	80	6.80±0.84a
	1.0	80	11.00±1.39b
	2.0	100	10.60±0.87b

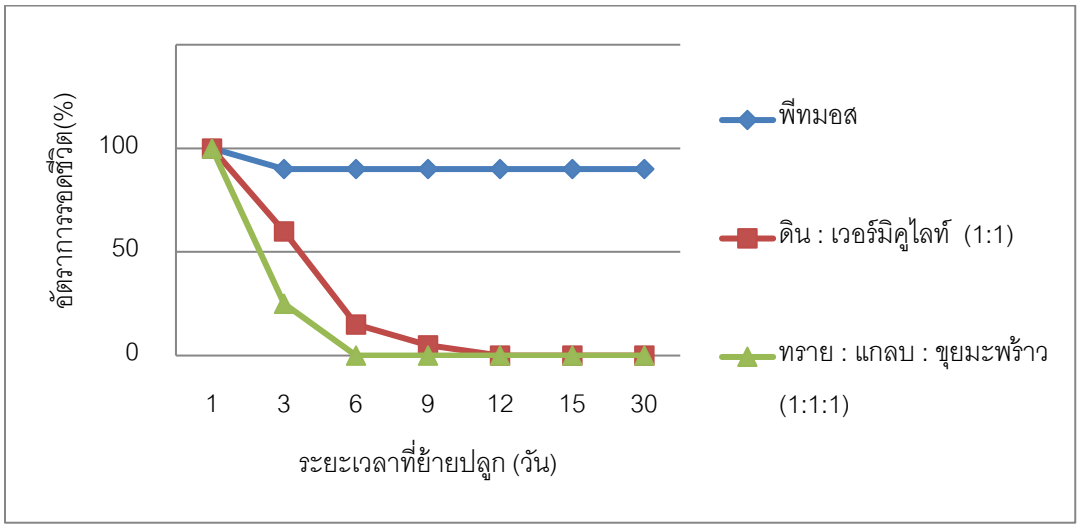
* *หมายเหตุ* : อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อทดสอบด้วย Duncan's new Multiple Rang Test (DMRT)



ภาพที่ 3 ลักษณะของรากอีหลืนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

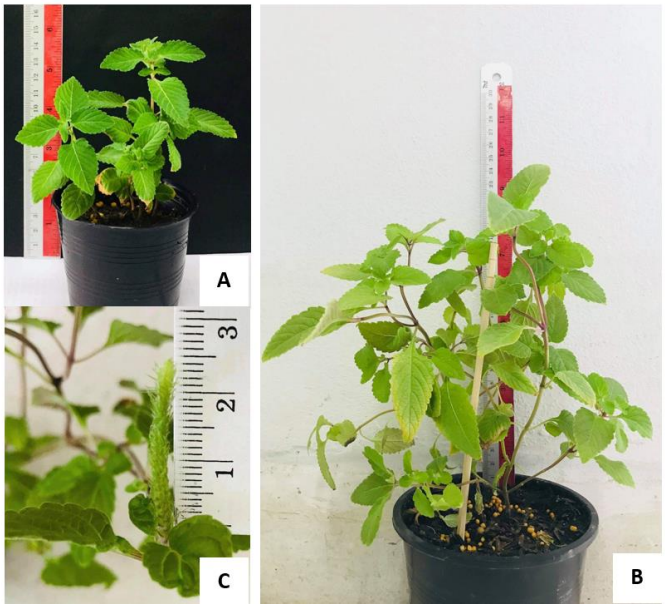
การทดลองที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของต้นอีหลืนหลังการย้ายออกปลูก

ในขั้นตอนการปรับสภาพ โดยนำต้นอ่อนอีหลืนที่ผ่านการชักนำราก ซึ่งมีลักษณะต้นที่แข็งแรง ย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกแตกต่างกัน 3 สูตร หลังจากย้ายออกปลูกเป็นเวลา 3 วัน พบว่าต้นอ่อนอีหลืนที่ปลูกในพีทมอสมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นอ่อนอีหลืนที่ปลูกใน ดิน : เวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1 : 1 และทราย : แกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 มีอัตราการรอดชีวิต 60 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 30 วัน ต้นอ่อนอีหลืนที่ปลูกในพีทมอสมีอัตราการรอดชีวิตคงที่ แต่ต้นอ่อนอีหลืนที่ปลูกใน ทราย : แกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 และ ดิน : เวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1 : 1 ไม่พบต้นอ่อนอีหลืนที่รอดชีวิต (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของต้นอีหลืนหลังย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน

เมื่อนำต้นอ่อนอีหลีนที่รอดชีวิต มาเลี้ยงต่อไปในดินที่ผสมกับพีทมอสเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 5A) และ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 5B) ต้นอีหลีนมีลำต้นสูงประมาณ 25-30 เซนติเมตร ใบมีความยาว 5-10 เซนติเมตร ความกว้าง 5-7 เซนติเมตร ใบและลำต้นมีขน และมีช่อดอกความยาว 2-5 เซนติเมตร (ภาพที่ 5C)



ภาพที่ 5 ต้นอีหลีนที่เลี้ยงในดินที่ผสมกับพีทมอสอายุ 3 สัปดาห์ (A) อายุ 8 สัปดาห์ (B) ช่อดอกอีหลีน (C)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของอีหลีน จากการทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนเฉลี่ยสูงสุด เช่นเดียวกับที่พบรายงานใน ฮาน (*Elsholtzia stachyodes*) (Srikum *et al*., 2018) เนื่องจาก BA มีบทบาทในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของยอดจากตาข้าง (axillary bud) โดยลดอาการข่มจากตายอด (apical dominance) (George *et al.,* 2008) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง BA และ Kinetin จากการทดลองนี้พบว่า BA สามารถกระตุ้นตาข้างให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดีกว่า Kinetin เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของ BA ในตำแหน่งที่ 6 ของอดีนีน มีไซด์เชนเป็นวงของเบนซิน ทำให้มีฤทธิ์ในการทำงานสูงขึ้น (Schmulling, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานสนับสนุนว่า BA มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดีกว่าสารตัวอื่นๆในกลุ่มไซโตไคนินด้วยกัน ในพืชหลายชนิดในวงศ์ Lamiaceae เช่น *M. piperita* (Ghanti *et al.,* 2004), *M. arvensis* L. (Chishti *et al.,* 2006), *H. opposita* (Prakash & Van, 2007), *Ocimum basilicum* L. (Siddique & Anis, 2008), *O. kilimandscharicum* Guerke. (Saha *et al.,* 2010), *Ocimum gratissimum* L. (Saha *et al*., 2012) และ *L. pedunculata* (Zuzarte *et al.,* 2010) นอกจากนี้ยังพบรายงานในพืชวงศ์ Moraceae เช่น Mulberry (*Morus alba* L.) (Saha *et al.,* 2016)

ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก จากการทดลองพบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากสูงสุด คืออาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด สอดคล้องกับการชักนำให้เกิดราก ใน *Sedum sarmentosum* Bunge. (Kim & Sivanessan, 2016) และ *Withania somnifera* (Autade *et al.,* 2016) นอกจากนี้

ยังพบว่า IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า NAA เช่นเดียวกับที่พบในพืชหลายชนิดในวงศ์ Lamiaceae เช่น *Ajuga bracteosa* (Kaul & Srivastava, 2013), *Thymus hyemalis* Lange (Nordine *et al.,* 2013), *Mentha viridis* L. (Raja & Arockiasamy, 2008), *Salvia fruticosa* Mill. *(*Arikat *et al.,* 2004), *Salvia officinalis* L. (Tawfik & Mohamed, 2007), *Salvia santolinifolia* (Jan & Khatoon, 2014) นั่นแสดงว่าการตอบสนองของพืชส่วนใหญ่ในวงศ์ Lamiaceae ต่อการชักนำให้เกิดรากนั้น IBA มีประสิทธิภาพดีกว่า NAA สอดคล้องกับรายงาน*ของ O. basilicum* L. (Siddique & Anis, 2008) เนื่องจาก IBA มีเสถียรภาพมากกว่า NAA (Han *et al.,* 2009) ซึ่ง IBA ที่มีความเสถียรนี้สามารถออกฤทธิ์ ส่งผลต่อกลไกทางสรีรวิทยาภายในเซลล์พืชมากกว่า NAA (Liu *et al.,* 2002) นอกจากนี้ IBA เป็นสารที่ไม่เคลื่อนย้าย หรือเคลื่อนย้ายได้น้อยจึงมีการสะสมอยู่ในบริเวณจุดกำเนิดราก และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดรากได้ดีกว่า NAA ซึ่งเป็นสารที่เคลื่อนย้ายไปยังบริเวณอื่น (Klein, 1960)

การปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูก จากการเปรียบเทียบวัสดุปลูก 3 แบบได้แก่ แบบที่ 1 ประกอบด้วย ดิน : เวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1 : 1 แบบที่ 2 ประกอบด้วย ทราย : แกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 และแบบที่ 3 พีทมอส พบว่าพีทมอส ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Mokhtarzadeh *et al.* (2013) รายงานว่าต้นอ่อน *Lavandula angustifolia* ที่ย้ายออกปลูกในพีทมอสให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบวัสดุปลูกทั้ง 3 แบบจะเห็นได้ว่าวัสดุปลูกแบบที่ 1 และ แบบที่ 2 ซึ่งมีดิน และทรายเป็นองค์ประกอบจะมีความแน่นทึบมากกว่าวัสดุปลูกแบบที่ 3 พีทมอส ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะโปร่ง ช่องว่างอากาศสูง ระบายน้ำได้ดี ขณะเดียวกันก็มีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้ดีด้วย จึงสามารถกักเก็บความชื้นไว้ (Kalawong *et al.,* 2019) ซึ่งเหมาะสมกับต้นอ่อนอีหลีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดซึ่งมีความชื้นสูง ประกอบกับต้นอ่อนอีหลีนมีระบบรากยังไม่แข็งแรง ด้วยโครงสร้างลักษณะโปร่งและช่องว่าอากาศสูงทำให้รากของต้นอ่อนอีหลีนที่ปลูกในพีทมอสได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และมีรากที่แข็งแรงกว่ารากที่ปลูกในวัสดุปลูกแบบที่ 1 และ 2 ดังนั้น พีทมอสจึงเป็นวัสดุปลูกที่เหมาะสมกับการปรับสภาพของต้นอ่อนอีหลีนที่ย้ายออกจากขวดก่อนนำไปปลูกในแปลงธรรมชาติ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาการขยายพันธุ์อีหลีนโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมาก คืออาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดได้มากสุด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.90±0.61 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.95±0.16 เซนติเมตร และอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากมากที่สุด คืออาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้จำนวนมากสุด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 25.00±0.38 ราก/ชิ้นส่วนพืช

สำหรับวัสดุปลูกที่เหมาะสมที่สุด ในขั้นตอนการปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูก พบว่า พีทมอสให้อัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ หลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 30 วัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ได้มอบทุนการศึกษาตลอดหลักสูตรภายใต้โครงการส่งเสริมการผลิตครู

ที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

เอกสารอ้างอิง

Aicha, N., Rachida, T. C., & Abdelmalek, E. M. (2013). Micropropagation of *Thymus satureioides* Coss. an endangered medicinal plant of Morocco. *Journal of Agricultural Technology*, *9*(2), 487-501.

Andrade, L. B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F., & Rota, L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC) plant cell. *Tissue and Organ Culture*, *56*, 79–83.

Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S., & Shibli, R. A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae, 100*(1-4), 193-202.

Autade, R. H., Fargade, S. A., Savant, A. M., & Gangurde, S. S. (2016). Micropropagation of Ashwagandha (*Withania somnifera*) *Biotechological Communication, 9*(1), 88-93.

Barua, C. C., Patowary, P., Bordoloi, M. J., Dutta, P. P., Dutta, D. J., & Purkayastha, A. (2016). Attenuating effect of *Elsholtzia communis* (Collett&Hemsl.) Diels. on Dysregulated HPA axis in stressful conditions. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016*, *8*(4), 651-658.

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

Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantets : from laboratory to land. *Biotecnology Letters, 32*(9), 1199-1205.

Chishti, N., Shawl, A. S., & Kaloo, Z. A. (2006). Clonal propagation of *Mentha arvensis* L. through nodal explant. *Pakistan Journal of Biological Science, 9*(8), 1416-1419.

Clapa, D., Fira, A., & Joshee, N. (2013). An efficient ex vitro rooting and acclimatization method for horticultural plant using float hydroculture. *Hortscience, 48*(9), 1159-1167.

Echeverrigaray, S., Basso, R., & Andrade, L. B. (2005). Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biologia Plantarum*, *49*(3), 439-442.

Epstein, E., & Muller, J. L. (1993). Indole-3-butyric acid in plant: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum*, 88, 382-389.

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

Ghanti, K., Kaviraj, C. P., Venugopal, R. B., Venugopal, R. B., & Rao, S. (2004). Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explant. *Indian Journal of Biotechnology, 3,* 594-598.

Han, H., Zhang, S., & Sun, X. (2009). A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. *African Journal of Biotechnology, 8*(3), 348-353.

Jan, T., & Khatoon, K. (2014). In vitro regeneration of *Salvia santolinifolia*. *Pakistan Journal of Botany, 46(1),* 325-328.

Kalawong, S., Bunthong, S., Luangsuwalai, K., Rungrueng, P., Srichuay, W., & Siangsuepchart, A. (2019). Factors influencing on root induction and acclimatization of Gloxinia (*Sinningia speciosa*) *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 6(1), 19-29 (in Thai).

Kaul, S., & Srivastava, PS. (2013). Micropropagation of *Ajuga bracteosa*, a medicinal herb. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 19*(2), 289-296.

Kim, D. H., & Sivanessan, I. (2016). Influence of benzyladenine and thidiazuron on shoot regeneration from leaf and shoot tip explants of *Sedum sarmentosum* Bunge*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 59, 1-6.*

Khomdram, S., Salam, J., & Singh, P. K. (2011). Estimation of nutritive indies in eight Lamiaceae plants of Manipur. *American Journal of Food Technology*, *6*(10), 924-931.

Klein, W. H. (1960). Plant Growth Substances. LJ Audus. Leonard Hill, London; (Eds.), (pp. 553). New York :Interscience.

Kumar, K., & Rao, I. U. (2012). Morphophysiologicals problems in acclimatization of micropropagated plants in ex- vitro conditions-a review. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants, 2*(4), 271-283.

Liu, C., Zhu, J., Liu, Z., Li, L., Pan, R., & Jin, L. (2002). Eogenenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. Plant Growth Regulation, 38, 37-42.

Mehta, J., Naruka, R., Sain, M., Dwivedi, A., Sharma, D., & Mirza, J. (2012). An efficient protocol micropropagation of *Mentha piperita L*. (pipperment). *Asian Journal of Plant Science and Research*, *2(4),* 518-523.

Mokhtarzadeh, S., Hajyzadeh, M., Ahmad, H. A., & Khawar, K.M. (2013). The problems in acclimatization of in vitro multiplied plants of *Lavandula angustifolia* Miller. under field condition. *In Proc. 5th IS on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants*. (pp. 71-76). Belgium : Acta Horticulturae.

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

Nordine, A., Bousta, D., Khanchoufi, A. E., & Meskaoui, A. E. (2013). An efficient and rapid in vitro propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, A wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region. *International Journal of Pharma Bioscience and Technology, 1*(3), 118-129.

Oluk, A. E., & Cakir, A. (2009). Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. *African Jounal of Biotechnology*, *8*(21), 5769-5772.

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

Raja, H. D., & Arockiasamy, D. I. (2008). In vitro propagation of *Mentha virids* L. from nodal and shoot tip explant. *Plant Tissue Culture & Biotechnology, 18*(1), 1-6.

Saha, S., Dey, T., & Ghosh, P. (2010). Micropropagation of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Labiatae). *ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52(2),* 50-58.

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. *American Journal of Plant Science, 3*, 64-74.

Saha, S., Adhikari, S., Dey, T., & Ghosh, P. (2016). RAPD and ISSR based evaluation of genetic stability of micropropagated plantlets of *Morus alba* L. variety S-1. *Meta Gene, 7*, 7-15.

Schmülling, T. (2004). Cytokinin. In W. Lennarz, & M.D. Lane. (Eds.), *Encyclopedia, Biological, Chemistry*. (pp. 1-7). Netherlands: Elsevier Science.

Siddique, I., & Anis, M. (2008). An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, *30*, 493-499.

Srikum, C., Dheeranupattana, S., Chotikadachanarong, K., Rotarayanont, S., & Inta, A. (2018). The effect of chloride on alleviation of in vitro shoot tip necrosis of *Elsholtzia stachyodes*. *Burapha Science Journal*, *23*(3), 1770-1778 (in Thai).

Tawfik, A. A., & Mohamed, M. (2007). Regeneraton of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 43*(1), 21-27.

Trisonthi, C., & Trisonthi, P. (2009). Ethnobotanical study in Thailand, and case study in Khun Yuam district Maehongson province. *Thai Journal of Botany, 1*(1), 1–23. (in Thai).

Tyub, A., & Kamili, A. N. (2008). Enhanced axillary shoot proliferation in *Ocimum sanctum* Linn. via shoot tip culture using various concentrations of BAP. *Journal of Research & Development, 8,* 80-85.

Yimam, T. (2018). Effect of solid and liquid media on in vitro propagation of *Plectranthus edulis* (Vatke)(Agnew). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 8*(3), 23-28.

Zuzarte, M. R., Dinis, A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., & Canhoto, J. M. (2010). Trichomes, essential oil and *in vitro* propogation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, *32*, 580-587.