อิทธิพลของไซโตไคนินร่วมกับนาโนชีทต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนยอดของไพล ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

Influence of Cytokinins Combining with Nanosheets on Growth and Shoot Production of Phlai under *In Vitro* Condition

ณัฐชนันท์ ดวงก้อน[1] และสุกัลยา ภู่ทอง[1*]

Nutchanan Duangkon[1] and Sukalya Poothong[1*]

Received: October 10, 2022

Revised: November 4, 2022

Accepted: November 7, 2022

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of cytokinins and nanosheet (NS) on growth and shoot multiplication of Phlai using MS medium as a basal medium supplemented with BAP, KN and TDZ at concentrations of 1, 2 and 4 mg/l supplemented with or without 10 mg/l NS for 4 weeks. The results showed that medium supplemented with 1 and 2 mg/l BAP improved shoot multiplication and provided the highest new shoot numbers as 2.78±0.46 and 2.78±0.43 shoots per explant, respectively. These shoot numbers were significantly different from control. While, adding with 2 mg/l KN obtained the highest height of new shoot as 3.61±0.20 cm. Adding 1 mg/l KN obtained the longest root length as 4.52±0.52 cm, but adding with 2 mg/l KN had the highest root number as 6.56±0.87 roots. However, the most suitable medium for *in vitro* multiplication of Phlai was MS medium supplemented with 1 mg/l BAP. Adding with 1 or 2 mg/l KN obtained highest leaf number, greenness scores, leaf and length including root number. Combined application of cytokinins and NS had no positive effect on growth.

Keywords: Phlai, Tissue culture, Plant growth regulator, Cytokinins

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ในครั้งนี้คือศึกษาผลของไซโตไคนินร่วมกับ Nano Sheet (NS) ต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนยอดของไพล โดยใช้อาหารสูตรพื้นฐาน Murashige and Skoog (MS) ที่เติม BAP, KN และ TDZ ความเข้มข้น 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NS ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากผลพบว่า สูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดใหม่มากที่สุด 2.78±0.46 และ 2.78±0.43 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยความสูงของต้นใหม่สูงที่สุดคือ 3.61±0.20 เซนติเมตร สูตรที่เติม KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ยดีที่สุดคือ 4.52±0.52 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตรที่มีการเติม KN ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจำนวนรากได้ดีที่สุดคือ 6.56±0.87 ราก เมื่อเทียบกับชุดควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนยอดของหน่อไพลมากที่สุด ส่วนสูตรที่เติม KN ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนใบ ค่าความเขียวของใบ ความกว้าง ความยาวของใบ และจำนวนรากสูงที่สุด การใช้ไซโตไคนินร่วมกับ NS ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของไพล

คำสำคัญ: ไพล การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต ไซโตไคนิน

[1] สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา 5600

[1] School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

*Corresponding author: sukalya_p@hotmail.com; sukalya.po@up.ac.th

คำนำ

ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) เป็นหนึ่งในพืชกลุ่มสมุนไพร Product Champion ของไทยที่มีศักยภาพ ในปัจจุบันไพลถูกนำไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายรูปแบบ เช่น เป็นยารักษาอาการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นอาการอักเสบ แก้เคล็ดขัดยอก ฟกช้ำ และแก้ปวด เนื่องจากมีสาร (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) ที่มีฤทธิ์ลดอาการปวดและการอักเสบ (Jeenapongsa *et al*., 2003) อีกทั้งยังถูกนำไปผลิตเครื่องสำอาง เช่น ผลิตภัณฑ์รักษาสิว ทำให้ผิวขาวและชะลอริ้วรอย เนื่องจากไพลมีสารเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งช่วยบำรุงผิวและทำให้ผิวขาว (Li *et al*., 2019; Rajkumari and Sanatombi, 2017, 2020; Zulkhairi *et al*., 2017) จึงทำให้ไพลเป็นสมุนไพรที่ต้องการมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การปลูกไพลให้ผลผลิตที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดและผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน คือการใช้แหล่งพันธุ์ที่มีโรคเน่าสะสม อาจมีการระบาดของเชื้อทำให้ผลผลิตลดลงหรือให้สารสำคัญในปริมาณที่ไม่คงที่ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) ดังนั้นการแก้ปัญหาเรื่องมาตรฐานการผลิตจึงจำเป็นต้องใช้ท่อนพันธุ์ไพลที่มีคุณภาพจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ เนื่องจากต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความปลอดโรคและคุณภาพสม่ำเสมอ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์ไพลส่วนใหญ่นิยมใช้อาหารพื้นฐานสูตร MS โดยปัจจัยสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยง คือ สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยมีตัวอย่างงานวิจัยดังนี้ อาหารสูตรเพาะเลี้ยงที่เติม N6-benzylaminopurine (BAP) ความความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้ และการใช้ BAP ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับการเติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้สูงถึง 7 - 8 ยอด (Chirangini and Sharma, 2005) นอกจากนี้ยังพบการใช้ นาโนชีท (Nano sheet: NS) ซึ่งเป็นอนุภาคหรือแผ่นที่มีขนาดเล็กระดับไมโครเมตรหรือนาโนเมตร ในการพัฒนารูปแบบการนำส่งสารสำคัญในเครื่องสำอางหรือใช้เป็นตัวพาสารและควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ทางยา (แมนมนัส และ สายันต์, 2563) โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้นาโนชีทของไทเทเนียมออกไซด์ ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาการใช้นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนชีทในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาพืช จากการศึกษาของ Mandeh *et al.* (2012) พบว่าการเติมอนุภาคนาโนไทเทเนียมออกไซด์สามารถกระตุ้นการเกิดแคลลัสของข้าวบาร์เลย์ แต่ยังไม่มีรายงานบทบาทของนาโนชีทต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (แมนมนัส และ สายันต์, 2563) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของไซโตไคนินร่วมกับการเติมนาโนชีทต่อการเพิ่มจำนวนยอดและการเจริญเติบโตของไพลในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืชทดลอง

โดยนำชิ้นส่วนของเหง้าไพลที่กำลังมีหน่อหรือแตกตา ตัดส่วนของหน่อมาให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนพืชมาเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0.9% พร้อมหยด tween 20 ประมาณ 3 หยด ฟอกเป็นเวลา 30 นาที ล้างหน่อไพลด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ จนได้ยอดที่มีความสูงมากกว่า 2 เซนติเมตร จำนวนมากเพียงพอต่อการทดลอง

ศึกษาผลของไซโตไคนินร่วมกับนาโนชีทต่อการเพิ่มจำนวนยอดและการเจริญเติบโตของไพล

ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ 6-Benzylaminopurine (BAP) Kinetin (KN) และ Thidiazuron (TDZ) ที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 9 กรรมวิธี โดยกรรมวิธีเหล่านี้ไม่เติม NS แต่ได้ใช้การเติมไซโตไคนินแบบดังกล่าวทั้ง 9 แบบร่วมกับการเติม NS ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้นเป็น 18 กรรมวิธี โดยเปรียบเทียบกับ

สูตรอาหารที่ไม่เติมไซโตไคนินและ NS วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) มีทั้งหมด 19 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 9 ซ้ำ แล้วนำต้นพืชเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการบันทึกผลการทดลองโดยวัดจำนวนยอดใหม่ (ยอด) ความสูงต้นใหม่ ซึ่งเป็นหน่อใหม่ที่ได้หรือแตกหน่อจากชิ้นส่วนพืชทดลอง (หน่อไพลขนาด 2 เซนติเมตร) (เซนติเมตร) จำนวนใบ (ใบต่อต้น) ค่าความเขียวของใบ (SPAD reading scores) ด้วยเครื่อง SPAD-502 meter ยี่ห้อ Konica Minolta (Japan) ความกว้างใบ (เซนติเมตร) ความยาวใบ (เซนติเมตร) ความยาวราก (เซนติเมตร) และจำนวนราก (ราก) จากนั้นนำข้อมูลที่บันทึกผลมาทำการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance: ANOVA) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของไซโตไคนินและนาโนซีทต่อการเพิ่มจำนวนและความสูงของยอดใหม่ของไพล

สูตรอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดยอดใหม่เฉลี่ยสูงที่สุด คือ 2.78±0.46 และ 2.78±0.43 ยอด ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Figure 1A) โดยจำนวนยอดใหม่ที่ได้แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การเติม KN ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นใหม่สูงที่สุดคือ 3.61±0.02 เซนติเมตร แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (Figure 2A) สูตรอาหารที่เติมไซโตไคนินร่วมกับนาโนซีทให้จำนวนยอดมากกว่าแต่ได้ยอดใหม่ที่ขนาดเล็กกว่าชุดการทดลองควบคุม (Figure 2A-2B) อาจเป็นผลจากการที่สารไซโตไคนินสามารถลำเลียงหรือเคลื่อนย้ายได้มากขึ้นเมื่อมีนาโนซีทเป็นตัวพาสารในสูตรอาหารดังกล่าว

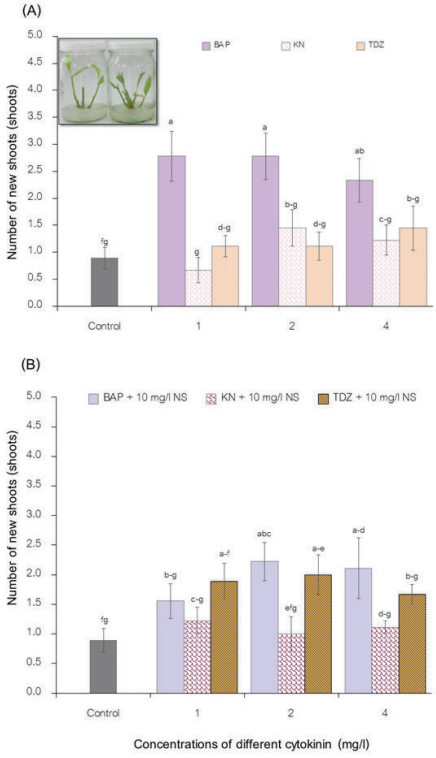

Figure 1 Effects of BAP, KN and TDZ at various concentrations (1, 2 and 4 mg/l) supplemented without NS (A) or with 10 mg/l NS (B) on number of new shoots after cultured for 4 weeks. Error bars indicated ± S.E. (n=9). Bars labeled with different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

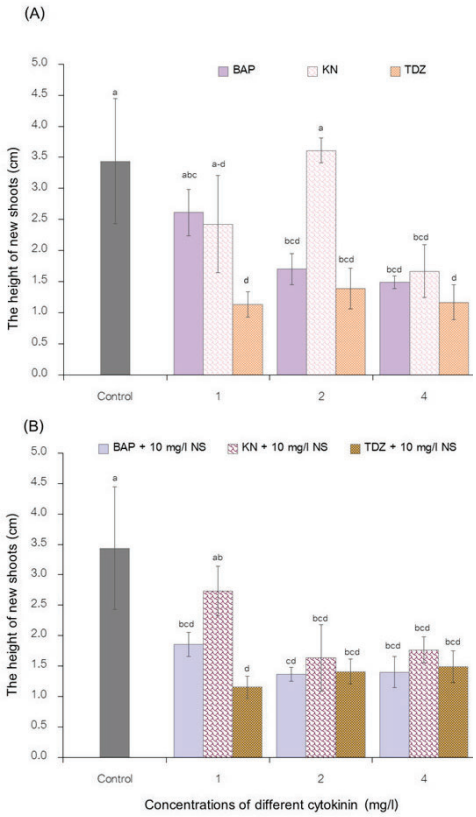

Figure 2 Effects of BAP, KN and TDZ at various concentrations (1, 2 and 4 mg/l) supplemented without NS (A) or with 10 mg/l NS (B) on the height of shoots after cultured for 4 weeks. Error bars indicated ± S.E. (n=9). Bars labeled with different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

ผลของไซโตไคนินและนาโนซีทต่อการเจริญเติบโตของไพล

จากผลการทดลองพบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนใบมากที่สุดคือ 3.56±0.56 และ 3.56±0.53 ใบต่อต้น แต่ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม โดยสูตรอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าความเขียวของใบดีที่สุดคือ 17.68±1.89 แต่เมื่อเทียบกับชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หน่อไพลที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดใบกว้างที่สุดคือ 0.97±0.07 เซนติเมตร แต่สูตรที่เติม KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ใบยาวที่สุดคือ 3.89±0.21 เซนติเมตร แต่และไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมเช่นเดียวกัน ในขณะที่ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม KN ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากมากที่สุดคือ 6.56±0.87 ราก และอาหารสูตรที่เติม KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากมากที่สุดรองลงมาคือ 6.11±1.16 ราก ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการศึกษาความยาวราก พบว่า หน่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากมากที่สุดคือ 4.52±0.52 เซนติเมตร และแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1)

Table 1 Growth responses of *in vitro* Phlai cultured on MS medium containing BAP, KN and TDZ at various concentrations (1, 2 and 4 mg/l) with additions or without 10 mg/l NS for 4 weeks.

Treatments	Leaf number (leaves)	Greenness (SPAD scores)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Root length (cm)	Root number (roots)
Control	2.67±0.47^{a-d}	9.04±2.50^{bc}	0.97±0.13^{a}	3.89±0.59^{a}	3.02±0.34^{bcd}	4.44±0.85^{bcd}
1 mg/l BAP	2.89±0.45^{ab}	15.19±2.01^{abc}	0.92±0.14^{ab}	2.78±0.39^{a-d}	2.88±0.43^{bcd}	4.78±0.83^{abc}
2 mg/l BAP	2.78±0.43^{abc}	11.44±1.96^{abc}	0.97±0.07^{a}	3.27±0.36^{ab}	1.84±0.31^{def}	2.22±0.49^{fgh}
4 mg/l BAP	2.11±0.31^{a-d}	14.79±3.04^{a-d}	0.90±0.04^{ab}	3.12±0.44^{abc}	0.90±0.37^{f}	1.22±0.64^{gh}
1 mg/l KN	3.56±0.56^{a}	14.01±1.00^{a-d}	0.77±0.05^{abc}	3.89±0.21^{a}	4.52±0.52^{a}	6.11±1.16^{ab}
2 mg/l KN	3.56±0.53^{a}	13.84±2.02^{a-d}	0.84±0.06^{abc}	3.32±0.35^{ab}	3.10±0.25^{bcd}	6.56±0.87^{a}
4 mg/l KN	2.0±0.50^{bcd}	10.12±1.98^{a-d}	0.61±0.12^{abc}	2.17±0.51^{bcd}	2.97±0.31^{bcd}	4.44±0.94^{bcd}
1 mg/l TDZ	1.33±0.33^{cd}	9.04±2.50^{bcd}	0.49±0.10^{c}	2.00±0.47^{bcd}	1.91±0.61^{def}	1.11±0.9^{gh}
2 mg/l TDZ	2.89±0.51^{ab}	17.68±1.89^{a-d}	0.88±0.13^{abc}	2.44±0.30^{a-d}	2.25±0.42^{c-f}	2.44±0.50^{d-g}
4 mg/l TDZ	1.67±0.47^{bcd}	8.27±2.13^{cd}	0.67±0.13^{abc}	2.26±0.50^{bcd}	1.26±0.42^{ef}	1.00±0.33^{gh}
1 mg/l BAP + 10 mg/l NS	2.22±0.32^{a-d}	12.41±2.74^{a-d}	0.86±0.10^{abc}	2.19±0.15^{bcd}	3.53±0.52^{abc}	2.78±0.22^{c-f}
2 mg/l BAP + 10 mg/l NS	1.33±0.44^{cd}	8.81±2.65^{bcd}	0.49±0.13^{c}	1.57±0.57^{d}	2.51±0.32^{cde}	2.56±0.41^{d-g}
4 mg/l BAP + 10 mg/l NS	2.44±0.50^{a-d}	6.88±1.89^{d}	0.69±0.14^{abc}	2.13±0.54^{bcd}	1.62±0.34^{def}	1.22±0.28^{gh}
1 mg/l KN + 10 mg/l NS	2.11±0.51^{a-d}	16.44±2.68^{a-d}	0.83±0.07^{abc}	2.92±0.24^{a-d}	2.67±0.40^{b-e}	4.44±0.84^{bcd}
2 mg/l KN + 10 mg/l NS	2.22±0.57^{a-d}	14.72±2.28^{a-d}	0.71±0.09^{abc}	3.37±0.52^{ab}	4.10±0.48^{ab}	4.33±0.71^{bcd}
4 mg/l KN + 10 mg/l NS	2.00±0.41^{bcd}	13.59±2.32^{a-d}	0.76±0.16^{abc}	2.48±0.52^{a-d}	2.30±0.59^{c-f}	3.56±0.77^{cde}
1 mg/l TDZ + 10 mg/l NS	1.22±0.28^{d}	7.31±2.36^{cd}	0.56±0.12^{bc}	1.49±0.39^{d}	2.68±0.44^{b-e}	2.00±0.41^{fgh}
2 mg/l TDZ + 10 mg/l NS	1.67±0.37^{bcd}	13.29±2.62^{a-d}	0.59±0.12^{abc}	1.69±0.46^{cd}	1.96±0.59^{def}	1.22±0.40^{gh}
4 mg/l TDZ + 10 mg/l NS	1.22±0.46^{d}	9.57±2.92^{bcd}	0.53±0.17^{bc}	1.57±0.52^{d}	1.24±0.61^{ef}	0.56±0.24^{h}
F-test (p value)	2.53 (**)	1.94 (*)	1.96 (*)	3.03 (**)	4.54(**)	7.75(**)

Mean±S.E. (n=9) followed by the same letters do not differ significantly at p≤0.05 according to Duncan's multiple range test. * Indicated significant at p value <0.05, ** p value <0.01.

ไพลที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดใหม่ที่ไม่ต่างกัน แต่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมสารในกลุ่มไซโตไคนิน พบว่าการเติม BAP สามารถทำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าการใช้ KN และ TDZ โดย BAP เป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนยอดใหม่ ประสิทธิภาพของการใช้ไซโตไคนินขึ้นอยู่กับชนิดของสาร ความเข้มข้น และพืช รวมทั้งลักษณะการเกิดยอดที่มีทั้งแบบการชักนำชิ้นส่วนพืชให้เกิดยอดโดยตรงและเกิดผ่านการสร้างแคลลัส ในการศึกษาพืชวงศ์ขิง พบว่าการใช้ BA หรือ BAP มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนหน่อได้ดีกว่าไซโคไคนินชนิดอื่น (Keng and Hing, 2004) โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BAP เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเพื่อเพิ่มจำนวนยอดได้ ในพืชแต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน (Zhang *et al*., 2013) จากงานวิจัยของรัตนา และ จิตรกร (2562) พบว่าการเพาะเลี้ยงไรโซมของไพลในสูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดต้นสูงสุดคือ 2.50±0.22 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ในขณะที่การทดลองในครั้งนี้พบว่า การใช้ BAP ความเข้มข้นเพียง 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดจำนวนยอดได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยข้างต้น คือประมาณ 2.78 ยอด เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า การใช้ BAP

ความเข้มข้นแตกต่างกัน สามารถชักนำการเกิดจำนวนยอดที่ใกล้เคียงกันได้ แต่การเติมไซโตไคนินควรใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำหรือเท่าที่จำเป็นต้องใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดเพราะการใช้สารในปริมาณที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติหรือกลายพันธุ์ได้ (Jafari *et al*., 2011; Asghari *et al*., 2012) ในการศึกษาผลของไซโตไคนินเพื่อเพิ่มปริมาณยอดของพืชชนิดอื่นในวงศ์ขิงข่า พบว่า มีรายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระชายดำ ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณคือ BA ความเข้มข้น 35.52 ไมโครโมลาร์ (8 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้จำนวนยอดใหม่ได้ 22.4±1.84 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์ (Labrooy *et al*., 2020) แต่จากงานของ Khairudin *et al*. (2020) พบว่า การใช้อาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยอดของกระชายดำโดยมีอัตราการเกิดยอด คือ 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ซึ่งงานวิจัยของทั้ง Labrooy *et al*. (2020) และ Khairudin *et al*. (2020) ที่แม้ศึกษาพืชชนิดเดียวกันแต่พบว่ามีผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยพบว่า มีการใช้ BAP หรือ BA ที่ความเข้มข้นต่างกันมากและมีจำนวนยอดที่ได้แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง นอกจากจำนวนยอดที่ได้แล้วความสูงของยอดเป็นสิ่งที่บ่งบอกคุณภาพของพืชที่ผลิตได้ พบว่า ยอดใหม่ของไพลจากสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงไม่ต่างกัน ในขณะที่ความสูงของยอดใหม่จากสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม แต่ความสูงของยอดใหม่จากอาหารสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความแตกต่างจากชุดควบคุม แม้สูตรอาหารที่เติม KN ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงของยอดใหม่มากที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากความสูงของยอดใหม่จากสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khairudin *et al*. (2020) ที่พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ยอดของกระชายดำมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด คือ 4.3 เซนติเมตร จากงานวิจัยนี้ที่เมื่อเปรียบเทียบผลของไซโตไคนินต่อความสูงของยอดใหม่ที่ได้พบว่าเมื่อใช้ KN ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้ยอดที่มีความสูงมากกว่าการใช้ BAP หรือ TDZ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขิงที่ศึกษาผลของไซโตไคนิน (BAP TDZ zeatin KN และ 2i-P) และรายงานว่า การเติม TDZ ความเข้มข้น 1 ppm (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งผลให้ยอดของขิงใหม่ที่ได้มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดคือ 1.58 เซนติเมตร (Sukarnih *et al*., 2021) จากการศึกษาผลของแกรฟีนออกไซด์ที่มีลักษณะคล้ายกับนาโนซีทต่อการเติบโตของต้นกล้าข้าวสาลี พบว่าการใช้สารที่ความเข้มข้นต่ำ (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งเสริมการเจริญเติบโตแต่ความเข้มข้นสูง (1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโต (Ren *et al.* 2020), นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้อนุภาคนาโนไทเทเนียมออกไซด์เพื่อกระตุ้นการเกิดแคลลัสของข้าวบาร์เลย์ พบว่า อาหารสูตรที่เติม 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร TiO_2 NP ชักนำการเกิดแคลลัสและให้ขนาดของแคลลัสที่ดีที่สุด (Mandeh *et al*., 2012) ซึ่งการใช้นาโนซีทในงานวิจัยนี้ยังไม่ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมแต่ได้ทำการอ้างอิงความเข้มข้นของนาโนซีทดังกล่าวจากการศึกษาอิสระของนิสิตระดับปริญญาตรีเท่านั้น ที่พบว่ามีผลต่อการกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิในปทุมมาพันธุ์แม่โจ้อิมเพลส (พิมปกาย และ ยุพา, 2564) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาผลของนาโนซีทในครั้งนี้ มีการใช้ร่วมกับไซโตไคนิน หลายชนิดที่ความเข้มข้นระดับต่างกัน จึงทำให้เกิดความซับซ้อนในการพิจารณาผลของนาโนซีท ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรทดสอบผลของนาโนซีทร่วมกับการใช้ไซโตไคนินเพียงชนิดเดียว

สรุป

การเติม BAP เพิ่มจำนวนยอดของไพลในสภาพปลอดเชื้อได้ดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติม KN ส่งผลต่อความสูงยอดใหม่ที่ได้ในขณะที่การเติมนาโนซีทไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดใหม่และความสูงของต้นใหม่ รวมถึงการเจริญเติบโตทางด้านอื่นๆ ของไพลในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ไพลด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ อาหาร MS สูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุกัลยา ภู่ทอง ที่ปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์และขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ในการให้ความอนุเคราะห์พื้นที่และเครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

พิมปกาย ใบยา และยุพา แซ่ย่าง. 2564. ผลของกรดจัสโมนิกและซาลิไซลิกต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารฟีนอลิกของปทุมมาที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ(การศึกษาค้นคว้าอิสระ). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา. 79 หน้า.

แมนมนัส ศรีแก้ว และสายันต์ แสงสุวรรณ. 2563. วัสดุมหัศจรรย์แกรฟีน: กลยุทธ์การสังเคราะห์สมบัติการพัฒนาการพิสูจน์เอกลักษณ์และการประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 22 (2): 39-49.

รัตนา ขามฤทธิ์ และ จิตรกร ปรีแม่น. 2562. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวและการชักนำให้เกิดต้นจากไรโซมของไพลในหลอดทดลอง. แก่นเกษตร 47 (1): 1393-1398.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2553. การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับไม้ดอกกลุ่มปทุมมาและกระเจียว. แหล่งที่มา: https://www.acfs.go.th/files/files/commoditystandard/20190608151819_815085.pdf., 5 กรกฎาคม 2565.

Asghari, F., B.Hossieni, A. Hassani and H. Shirzad. 2012. Effect of explants source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (*Ocimum basilicum* L.). Australian Journal of Agricultural Engineering 3(1): 12-17.

Chirangini, P. and G.J.Sharma. 2005. *In vitro* propagation and microrhizome induction in *Zingiber cassumunar* (Roxb.) an antioxidant-rich medicinal plant. Journal of Food, Agriculture and Environment 3(1): 139-142.

Jafari, N., R. Y. Othman, and N. Khalid. 2011. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. African Journal of Biotechnology 10(13): 2446-2450.

Jeenapongsa, R., K. Yoovathaworn, K.M. Sriwatanakul, U. Pongprayoon, and K. Sriwatanakul. 2003. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3, 4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. Journal of Ethnopharmacology 87(2-3): 143-148.

Keng, C. L., and T. W. Hing. 2004. *In vitro* propagation of Zingiberaceae species with medicinal properties. Journal of Plant Biotechnology 6(3): 181-188.

Khairudin, N. A., Z. Haida and M. Hakiman. 2020. In vitro shoot and root induction of *Kaempferia parviflora* (Zingiberaceae) rhizome using 6-Benzylaminopurine. Journal of Tropical Plant Physiology 12(2): 23-32.

Labrooy, C., T.L. Abdullah and J. Stanslas. 2020. Influence of N6-benzyladenine and sucrose on *in vitro* direct regeneration and microrhizome induction of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker, an important ethnomedicinal herb of Asia. Tropical Life Sciences Research 31(1): 123.

Li, M.-X., X. Bai, Y.-P. Ma, H.-X. Zhang, N. Nama, S.-J. Pei and Z.-Z. Du. 2019. Cosmetic potentials of extracts and compounds from *Zingiber cassumunar* Roxb.

rhizome. Industrial Crops and Products 141: 111764.

Mandeh, M., M. Omidi and M. Rahaie. 2012. *In Vitro* influences of TiO_2 nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare* L.). Tissue Culture. Biological trace element research 150: 376–380. https://doi.org/10.1007/s12011-012-9480-z

Rajkumari, S. and Sanatombi, K. 2017. Biotechnology of *Zingiber montanum* (Koenig) link ex A. Dietr.: A review. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 4: 1-4.

Rajkumari, S. and K. Sanatombi. 2020. Secondary metabolites content and essential oil composition of *in vitro* cultures of *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex A. Dietr. Biotechnology Letters 42 (7): 1237-1245.

Ren, W., H. Chang, L. Li. and Y. Teng. 2020. Effect of graphene oxide on growth of wheat seedlings: insights from oxidative stress and physiological flux. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 105: 139–145. https://doi.org/10.1007/s00128-020-02888-9

Sukarnih, T., Y. Rudiyana, N.F. Hanifah and N. Sa'adah. 2021. Micropropagation of red ginger (*Zingiber officinale* Rosc. Var. rubrum) using several types of cytokinins. In Journal of Physics: Conference Series 1751 (1): 012051. IOP Publishing.

Zhang, W., R. Swarup, M. Bennett, G. E. Schaller and J.J. Kieber. 2013. Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the Arabidopsis root apical meristem. Current Biology 23 (20): 1979-1989.

Zulkhairi, A.M., S.M. Aspollah, E. Lian and A.A. Bustamam. 2017. Phytochemicals and cytotoxic studies of *Zingiber cassumunar* Roxb. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 45: 187-197.