การเกิดยอดของยาสูบในสภาพปลอดเชื้อที่ตอบสนองต่อสเปกตรัมของแสงและไซโตไคนิน

The *In Vitro* Shoot Regeneration of Tobacco in Response to Light Spectra and Cytokinin

ภัทธิรา วิยาสิงห์[1] อดิศักดิ์ แก้วคำ[1] กาญจนาพร สินช่วยปราบ[2] และเสริมศิริ จันทร์เปรม[1,3*]

Pattira Wiyasing[1], Adisak Kaewkam[1], Kanchanaphon Sinchuyprab[2]
and Sermsiri Chanprame[1,3*]

Received: May 15, 2023
Revised: June 23, 2023
Accepted: June 26, 2023

Abstract: The effects of light spectra and plant growth regulator, BA, on tobacco tissue were determined by incubated leaf blade and node explants obtained from tissue culture on solid MS media supplemented with 0, 1 and 2 mg/L BA. The cultures were incubated under cool white fluorescent and white, yellow, blue and red+blue LEDs for 4 weeks. The results demonstrated that BA had a significant effect on shoot proliferation and medium containing 2 mg/L BA yielded the highest number of shoots. For the effect of light spectra, in the case of leaf blade explant, yellow LED yielded the highest number of shoots but was not significantly different from white LED and fluorescent. The positive interaction between BA and light spectra was also observed. Similar results were observed in single node tissue explant but only the significant difference in the response of BA was observed and no interaction of BA and light spectra was found.

Keywords: plant tissue culture, artificial light, plant growth and development

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของสเปกตรัมของแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อยาสูบ ทำโดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบและข้อยาสูบที่ได้จากต้นในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ชนิด cool white และแสงจากหลอดแอลอีดีสีขาว เหลือง น้ำเงิน และ แดง+น้ำเงิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า BA ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อแผ่นใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด โดยอาหารที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด ส่วนสเปกตรัมของแสงนั้น การใช้เนื้อเยื่อแผ่นใบพบว่าแอลอีดีสีเหลืองชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับแอลอีดีสีขาวและหลอดฟลูออเรสเซนต์ และยังพบปฏิสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความเข้มข้นของ BA กับแสงด้วย สำหรับการเพาะเลี้ยงข้อนั้น พบว่าให้ผลในทำนอง

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900

[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครปฐม 73140

[2] Program in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

[3] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครปฐม 73140

[3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

Agricultural Science and Management J. 7 (2) : 38-48 (2024)

เดียวกันกับเนื้อเยื่อแผ่นใบ แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะความเข้มข้นของ BA เท่านั้น และไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BA กับแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, แสงเทียม, การเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช

คำนำ

ปัจจุบัน ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการผลิตแสงเทียมด้วยแอลอีดี (LED; Light – emitting diode) ได้รับการพัฒนาเพิ่มขึ้นอย่างมาก เทคโนโลยีนี้นอกจากจะช่วยประหยัดพลังงาน มีการปลดปล่อยความร้อนน้อย และหลอดแอลอีดีมีอายุการใช้งานได้นานแล้ว ยังสามารถปรับเปลี่ยนสเปกตรัมของแสงได้ตามต้องการอีกด้วย ซึ่งมีประโยชน์มากต่อการผลิตพืช โดยปัจจุบันแอลอีดีได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการเพาะเลี้ยงพืชในระบบปิด ซึ่งรวมถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการนำหลอดแอลอีดีมาใช้ทดแทนหลอดฟลูออเรสเซนต์ในห้องเพาะเลี้ยงด้วย ทั้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสำหรับการขยายพันธุ์และการผลิตสารทุติยภูมิจากพืชสมุนไพร และจากการที่แอลอีดีสามารถปรับเปลี่ยนสเปกตรัมของแสงได้ตามต้องการนั้น ทำให้สามารถเลือกช่วงคลื่นของแสงที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดหรือแต่ละช่วงวัยได้ อีกทั้งช่วงคลื่นแสงยังมีผลต่อการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิชนิดต่างๆ อีกด้วย (Karatas *et al*., 2016) แสงที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตพืชทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่อยู่ในช่วงคลื่นของสีแดงและสีน้ำเงิน ซึ่ง Gupta and Jatothu (2013) รายงานว่า แสงที่ช่วงคลื่นต่างๆ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะปลูกพืชได้ดี เนื่องจากรงควัตถุคลอโรฟิลล์ของพืชสามารถดูดซับช่วงแสงสีแดง (430-460 นาโนเมตร) และช่วงแสงสีน้ำเงิน (630-660 นาโนเมตร) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น การเลือกใช้ช่วงคลื่นแสงที่เหมาะสมจึงจำเป็นต้องมีข้อมูลประกอบการตัดสินใจ

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น มีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์และแสงจากแอลอีดีที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ *Doritaenopsis* นั้น Shin *et al*. (2008) รายงานว่าคุณภาพของสเปกตรัมของแสงจากแอลอีดี มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและสรีระของต้นอ่อน โดยพบว่า สีน้ำเงินช่วยส่งเสริมการสะสมคาร์โบไฮเดรตและคลอโรฟิลล์อย่างมีประสิทธิภาพ และสีแดงทำให้เกิดการยืดและการขยายตัวของยอด Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016) รายงานว่าแสงแอลอีดีสีแดงสามารถชักนำให้เกิดยอดในหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana*) ได้ดีกว่าแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ และเมื่อใช้แอลอีดีที่เป็นแสงผสมระหว่างสี น้ำเงิน:แดง ที่สัดส่วน 1:1 ทำให้ได้ยอดที่มีความยาว มีจำนวนใบและมีปริมาณรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงมากกว่าแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ด้วยเช่นกัน และยังพบว่าช่วยให้ต้นกล้าสามารถปรับสภาพเมื่อนำออกปลูกในโรงเรือนได้ดีขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากสเปคตรัมของแสงจะส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ก็มีรายงานว่าสามารถส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วย เช่น งานวิจัยในบลูเบอรี (*Vaccinium corymbosum* L.) ของ Hung *et al*. (2016) ที่พบว่าแสงจากแอลอีดีสีน้ำเงินทำให้มีการสะสมคลอโรฟิลล์ในใบสูงที่สุด แต่แสงแอลอีดีสีแดงกลับยับยั้งการสะสมคลอโรฟิลล์ ดังนั้นการศึกษาการตอบสนองของพืชภายใต้สเปกตรัมของแสงสีต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในระยะต่างๆ จะช่วยให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้อย่างจำเพาะมากขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของสเปกตรัมต่างๆ ของแสงจากแอลอีดี ที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อส่วนใบและข้อเดี่ยวของยาสูบในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเหตุผลที่ทดลองกับยาสูบนั้น เนื่องจากยาสูบเป็นพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่าย มีการเจริญเติบโตเร็ว สามารถตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ดีและเห็นผลชัดเจน ซึ่งจะทำให้แปลผลได้ง่าย โดยผลที่ได้รับจะสามารถนำไปเป็นแนวทางในการพิจารณาเลือกใช้แสงให้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดอื่นๆ ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองนี้ใช้ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) อายุ 1 เดือน โดยการตัดเนื้อเยื่อแผ่นใบตำแหน่งที่ 2 - 3 จากยอด ตัดใช้เฉพาะส่วนแผ่นใบโดยไม่ให้ติดเส้นกลางใบ ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร สำหรับเนื้อเยื่อส่วนข้อนั้น ตัดแยกเนื้อเยื่อเป็นข้อเดี่ยวที่ไม่มีใบติด ขนาดยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และ สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6 - benzyl aminopurine (BA) ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ชนิด cool white และแสงจากหลอดแอลอีดีสีต่างๆ ได้แก่ สีขาว, สีเหลือง, สีน้ำเงิน และสีแดง+น้ำเงิน โดยมีรายละเอียดของสเปกตรัมและปริมาณแสงที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งวัดด้วยเครื่องวัดสเปกตรัมและปริมาณแสง (UPRtek PG-200N Handheld Spectral PAR Meter) แสดงใน (Table 1) และ (Figure 1) เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ และบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้น

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จัดสิ่งทดลองแบบ factorial ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชิ้นเนื้อเยื่อ โดยเพาะเลี้ยงขวดละ 1 ชิ้น วิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองด้วยวิธี ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Table 1 Spectral data of fluorescent and LED light sources measured by UPRtek PG-200N Handheld Spectral PAR Meter. (PPFD: 400-700 nm; PFD-B: 400-500 nm; PFD-G: 500-600 nm; PFD-R: 600-700 nm)

Light sources	R:B ratio	Photosynthetically Active Radiation (PAR) (μmol/m^2/s)			
		PPFD	PFD-B	PFD-G	PFD-R
Fluorescent (cool white)	1:1	35.18	10.96	14.81	9.419
White LED	2:2	76.20	21.57	35.43	19.20
Yellow LED	2:1	54.92	10.8	21.91	22.20
Blue LED	1:6	65.28	52.83	4.531	7.913
Red+Blue LED	2:1	41.73	12.62	5.005	24.10

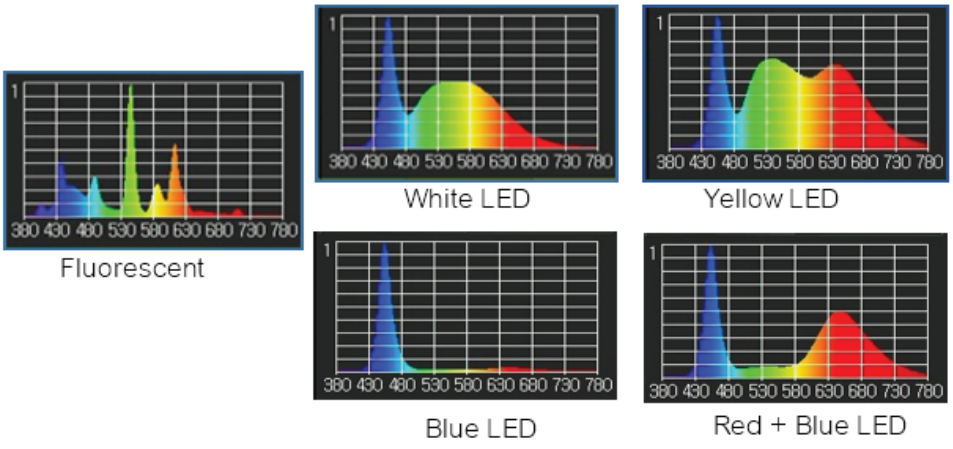

Figure 1 Light spectra of fluorescent lamp and white, yellow, blue and red+blue LEDs using in this experiment (measured by UPRtek PG-200N Handheld Spectral PAR Meter).

Agricultural Science and Management J. 7 (2) : 38-48 (2024)

ผลการทดลอง

รูปแบบการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ

การเกิดยอดจากเนื้อเยื่อแผ่นใบและข้อเดี่ยวของยาสูบ พบว่า แผ่นใบขยายขนาด มีการโค้งงอ รูปร่างบิดเล็กน้อย ในอาหารที่ไม่เติม BA นั้น แผ่นใบจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวซีด และไม่มีการพัฒนาต่อ แต่สำหรับเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA พบว่าแผ่นใบมีการโค้งงอมากขึ้นทำให้เกิดการปริแตกบริเวณกลางชิ้นใบ และมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดและรอยแตกเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานประมาณ 10 วัน จากนั้น แคลลัสเริ่มพัฒนาเป็นยอดใหม่เมื่อเพาะเลี้ยงนานประมาณ 2 สัปดาห์ และเห็นเป็นยอดชัดเจนขนาดเล็ก ที่อายุ 3 สัปดาห์ โดยมีจำนวนยอดใหม่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น ยอดที่เกิดใหม่นี้มีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อย โดยยอดที่พัฒนาขึ้นมาก่อนในช่วงสัปดาห์ที่ 2-3 จะมีขนาดใหญ่กว่ายอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ในช่วงสัปดาห์ที่ 3-4 เนื่องจากยอดที่ได้มีขนาดเล็ก ทำให้ไม่สามารถวัดขนาดได้ชัดเจน แต่ในภาพรวมพบว่ายอดมีขนาดใกล้เคียงกัน (Figure 2)

สำหรับการเกิดยอดจากข้อเดี่ยวนั้น มีลักษณะการเกิดยอดที่แตกต่างจากการเกิดยอดจากแผ่นใบมาก เนื่องจากบริเวณซอกใบของแต่ละข้อมีตาอยู่ด้วย ดังนั้นเมื่อมีการตัดยอดแล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร จะเป็นการกระตุ้นให้ตาข้างพัฒนาขึ้นมาก่อน โดยพบว่าตาข้างพัฒนาเป็นยอดใหม่ จำนวน 1 ยอด ในช่วง 7-10 วันแรก โดยอาหารที่ไม่เติม BA ยอดเดี่ยวนี้เจริญเป็นยอดขนาดใหญ่เพียงยอดเดียว (Figure 3) แต่ในอาหารที่เติม BA พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณโคนชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นรอยตัดและแคลลัสนี้พัฒนาขึ้นเป็นต้นขนาดเล็กจำนวนมาก จึงทำให้เห็นว่ามียอดขนาดใหญ่ 1 ยอดตรงกลางและมียอดเล็กๆ จำนวนมากเกิดขึ้นอยู่รอบๆ (Figure 2, Figure 3)

รูปแบบของการเกิดยอดของแผ่นใบและข้อนี้เกิดขึ้นในลักษณะคล้ายกันในทุกสภาพแสง แต่จำนวนยอดที่เกิดขึ้นแตกต่างกันตามแสงที่ใช้เพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่พืชได้รับ ยกเว้นกรณีการเพาะเลี้ยงข้อภายใต้สภาพแสงเท่านั้นที่แม้ว่าจะมีจำนวนยอดต่างกันแต่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

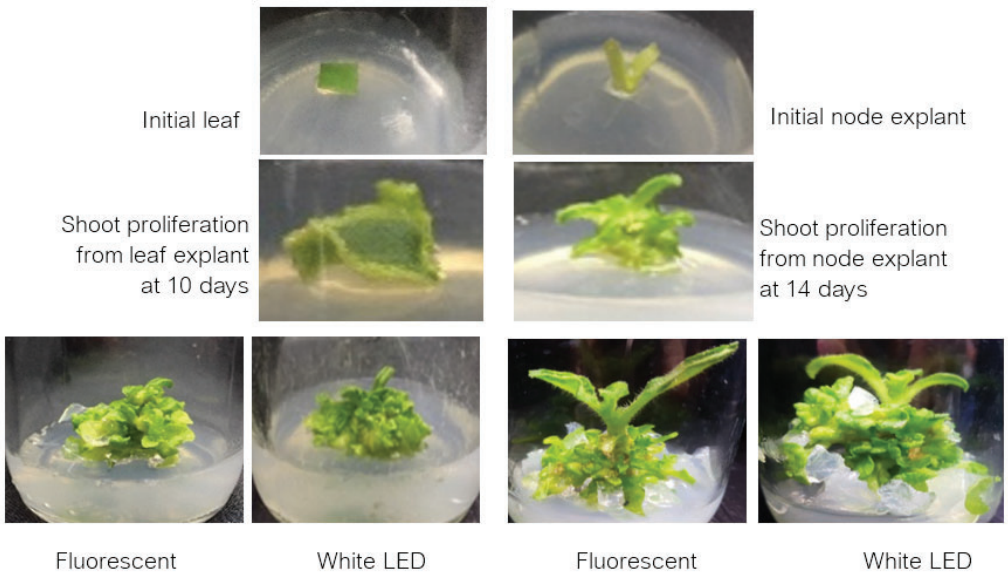

Figure 2 The *in vitro* shoot regeneration from leaf blade and single node explants of *Nicotiana tabacum* that were cultured on MS solid medium supplemented with 2 mg/L BA under cool white fluorescent and white LED for 4 weeks.

การเกิดยอดจากเนื้อเยื่อแผ่นใบ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบยาสูบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์และแสงจากแอลอีดีที่มีสเปกตรัมแตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่า ทั้งปัจจัยเรื่องแสงและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ส่งผลต่อการพัฒนายอดจากเนื้อเยื่อแผ่นใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อพิจารณาแยกเฉพาะปัจจัยด้านแสงนั้น พบว่า แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ และแสงจากหลอดแอลอีดีสีขาวและสีเหลือง ให้ผลดีไม่แตกต่างกัน คือให้จำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 7 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งมากกว่าที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากแอลอีดี สีน้ำเงิน หรือสีแดงผสมน้ำเงิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2)

สำหรับปัจจัยความเข้มข้นของ BA นั้น พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแผ่นใบยาสูบด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีจำนวนยอดเกิดขึ้นเฉลี่ยมากที่สุด คือ 11.19 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (Table 3) รองลงมาคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมียอดเฉลี่ย 8.29 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนการไม่เติม BA นั้น พบว่า เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนาเป็นยอดในทุกสภาพแสง (Table 3)

นอกจากนี้ยังพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างแสงกับความเข้มข้นของ BA อีกด้วย (Table 4) โดยชิ้นส่วนใบยาสูบจะพัฒนาเป็นยอดได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากแอลอีดีสีขาวและสีเหลือง รองลงมาคือที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากแอลอีดีสีน้ำเงิน และ แดง:น้ำเงิน นั้นมีการเกิดยอดน้อย

การเกิดยอดจากเนื้อเยื่อข้อเดี่ยว

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อยาสูบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงแอลอีดี ที่มีสเปกตรัมแตกต่างกัน พบว่า มีเพียงปัจจัยการเติม BA เท่านั้นที่มีผลต่อจำนวนยอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 3) ส่วนการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงต่างกันไม่ทำให้การเกิดยอดต่างกัน (Table 2) และทั้งสองปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (Table 4) โดยอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 17.32 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย14.08 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

สำหรับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เติม BA พบว่า มียอดขนาดใหญ่เกิดขึ้นเพียงยอดเดียว (Table 4 and Figure 3) และยอดเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยอดเดี่ยวที่ได้จากแต่ละสภาพแสงมีลักษณะแตกต่างกัน (Figure 4) โดยพบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ มีขนาดเล็กกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากแอลอีดี และใบมีขนาดเล็กกว่ารวมทั้งมีความเขียวน้อยกว่าด้วย แสงที่ทำให้ใบสีเขียวเข้มมากคือแสงจากแอลอีดีสีขาว ส่วนแสงจากแอลอีดีสีเหลืองทำให้ใบขยายใหญ่ได้มาก มีก้านใบยาวและใบมีสีอ่อน น้ำหนักสดเฉลี่ยของยอดที่เพาะเลี้ยงในแต่ละสภาพแสงเรียงลำดับจากน้อยไปมาก คือ หลอดฟลูออเรสเซนต์: 2.36±0.20 แอลอีดีสีน้ำเงิน: 2.56±0.17 แอลอีดีสีขาว: 3.05±0.38 แอลอีดีสีแดง:น้ำเงิน: 3.61±0.45 และแอลอีดีสีเหลือง: 3.64±0.36 กรัมต่อยอด

Table 2 The average number of shoots per explant that were proliferated from leaf blade and node explants of *Nicotiana tabacum* cultured on solid MS medium supplemented with 0-2 mg/L BA incubated under fluorescent and LED light sources. The cultures were incubated at 16 h/d light at 25±2ºC for 4 weeks.

Light sources	Number of shoots per explant	
	Leaf blade tissue[1/]	Node tissue
Fluorescent (cool white)	7.13 ± 6.02a	11.26 ± 2.32
White LED	7.50 ± 6.46a	10.26 ± 2.14
Yellow LED	7.79 ± 6.02a	11.00 ± 2.22
Blue LED	4.79 ± 4.50b	9.73 ± 1.94
Red+Blue LED	5.08 ± 4.84b	10.04 ± 2.20
F-test	*	ns

ns = non-significant difference

[1/] Means (±SE) with different letters within each column are significantly different at $p<0.05$ according to DMRT.

Table 3 The average number of shoots per explant that were proliferated from leaf blade and node explants of *Nicotiana tabacum cultured* on solid MS and MS medium containing1 or 2 mg/L BA under various light sources. The cultures were incubated at 16 h/d light at 25±2ºC for 4 weeks.

BA (mg/L)	Number of shoots per explant	
	Leaf blade tissue[1/]	Node tissue[1/]
0	0.00 ± 0.00c	1.00 ± 0.00c
1	8.29 ± 3.50b	14.08 ± 0.55b
2	11.19 ± 4.15a	17.32 ± 1.04a
F-test	*	*

[1/] Means (±SE) with different letters within each column are significantly different at $p<0.05$ according to DMRT.

Table 4 The average number of shoots per explant that were proliferated from leaf blade and node explants of *Nicotiana tabacum* cultured on solid MS medium supplemented with 0, 1 and 2 mg/L BA and incubated under fluorescent and LED light sources. The cultures were incubated at 16 h/d light at 25±2ºC for 4 weeks.

Light sources	BA (mg/L)	Number of shoots per explant[1/]	
		Leaf blade tissue	Node tissue
Cool white fluorescent	0	0.00 ± 0.00e	1.00 ± 0.00d
	1	9.50 ± 4.86bc	13.20 ± 1.62bc
	2	11.90 ± 2.23ab	19.60 ± 3.05a
White LED	0	0.00 ± 0.00e	1.00 ± 0.00d
	1	8.88 ± 0.63bcd	12.80 ± 1.39c
	2	13.63 ± 0.63a	18.00 ± 1.84ab
Yellow LED	0	0.00 ± 0.00e	1.00± 0.00d
	1	10.75 ± 2.19abc	14.80 ± 1.15abc
	2	12.63 ± 2.88a	18.20 ± 1.98ab

Table 4 (continued).

Light sources	BA (mg/L)	Number of shoots per explant[1/]	
		Leaf blade tissue	Node tissue
Blue LED	0	0.00 ± 0.00e	1.00 ± 0.00d
	1	6.00 ± 2.62d	14.80 ± 1.31abc
	2	9.25 ± 4.43bc	14.4 ± 1.60bc
Red+Blue LED	0	0.00 ± 0.00e	1.00 ± 0.00d
	1	6.00 ± 1.69d	14.80 ± 0.73abc
	2	8.38 ± 4.60cd	16.40 ± 3.09abc
Light sources		*	ns
BA concentration		*	*
Light source * BA concentration		*	ns
% CV		43.79	77.87

ns = non-significant difference

[1/] Means (±SE) with different letters within each column are significantly different at $p<0.05$ according to DMRT.

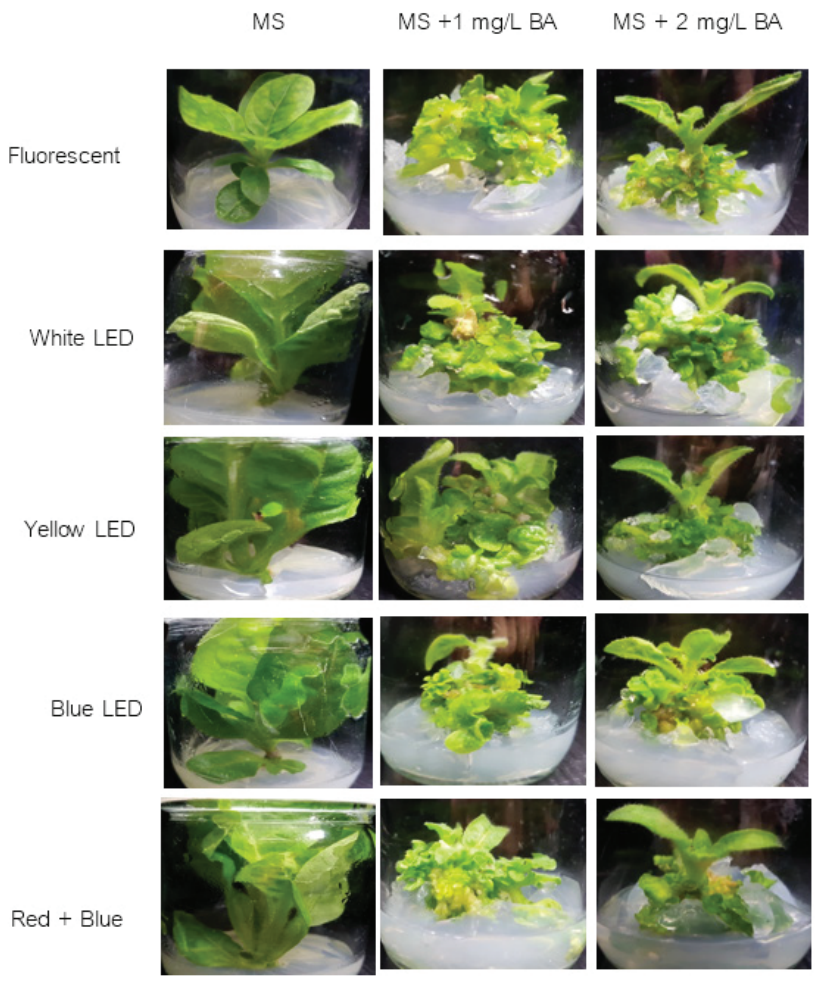

Figure 3 Shoot proliferation from a single node explant of *Nicotiana tabacum* cultured on solid MS medium supplemented with 0, 1 and 2 mg/L BA and incubated under various light sources at 16 h/d light, 25±2°C for 4 weeks.

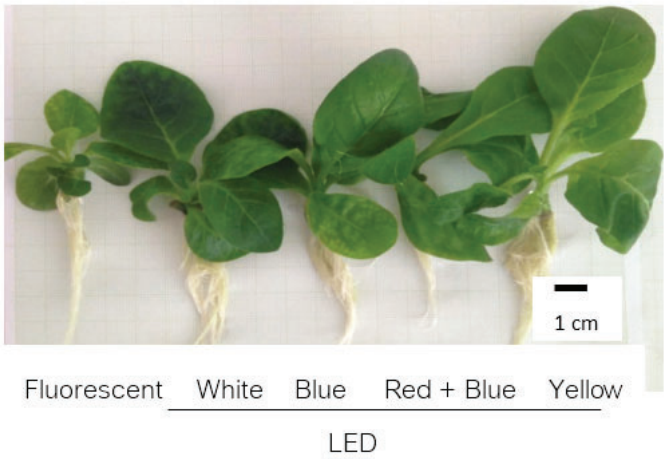

Figure 4 Plantlets of *Nicotiana tabacum* derived from single node tissue cultured on solid MS medium without plant growth regulator under various light sources.

วิจารณ์

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบในงานทดลองนี้ ใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นสองชนิดคือ เนื้อเยื่อแผ่นใบ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่มีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) และชิ้นส่วนข้อซึ่งมีเนื้อเยื่อเจริญบริเวณตาข้าง ผลการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดมีการตอบสนองต่อ BA อย่างชัดเจนและเป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือ ความเข้มข้นของ BA ที่มากขึ้นส่งผลให้เกิดยอดใหม่จำนวนมากขึ้น ทั้งนี้ BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน เป็นสารสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมการเจริญและพัฒนาของพืช มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้างแคลลัส ส่งผลต่อเนื้อเยื่อเจริญคือกระตุ้นการแตกตาข้างและการชักนำให้เกิดยอด ปริมาณที่เหมาะสมของไซโตไคนินที่ส่งผลต่อการพัฒนาที่ดีของเนื้อเยื่อพืชนั้น นอกจากจะขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินเองแล้วยังขึ้นกับชนิดพืชและเนื้อเยื่อพืชอีกด้วย (George *et al*., 2008) ในการทดลองนี้ พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดยอดมากกว่าการใช้ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งในแผ่นใบและข้อ ส่วนการไม่เติม BA ลงในอาหารนั้น เนื้อเยื่อแผ่นใบไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้เลย แต่เนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาข้างอยู่นั้น เมื่อถูกตัดแยกออกจากส่วนยอดทำให้สภาวะการข่มของตายอดหมดไป ตาข้างจึงสามารถแตกออกมาเป็นยอดเดี่ยวๆ ได้ นอกจากนี้เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารที่เติม BA ก็พบว่ามีลักษณะการเกิดยอดใหม่ที่แตกต่างจากเนื้อเยื่อแผ่นใบ คือตาข้างจะพัฒนาเป็นยอด 1 ยอด ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากการข่มของตายอดหมดไป และจากนั้นจะมียอดเล็ก ๆ เกิดขึ้นตามมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งต่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบที่มียอดใหม่ที่เกิดขึ้นเกิดในเวลาใกล้เคียงกันจึงทำให้ยอดที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกันด้วย (Figure 3) ลักษณะการเกิดยอดที่ต่างกันของเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดนี้พบได้ในทุกสภาพแสงที่ทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลอย่างมากของ BA ต่อการกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ ซึ่งการเกิดยอดในลักษณะนี้ มีรายงานว่าพบได้ในพืชชนิดอื่นๆ ด้วยเช่นกัน (George *et al*., 2008; Shama *et al*., 2015)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบและข้อของยาสูบ ภายใต้แสงจากแอลอีดีที่มีช่วงคลื่นและความเข้มแสงแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาวชนิด cool white พบว่า แสงทำให้เกิดยอดต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในกรณีของการใช้แผ่นใบเท่านั้น โดยแสงที่ให้ผลดีใกล้เคียงกันคือแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ และแสงจากแอลอีดีสีขาวและสีเหลือง ส่วนที่ให้ผลไม่ดี

คือที่ใช้แสงจากแอลอีดีสีน้ำเงิน และสีแดง+น้ำเงิน ส่วนการเพาะเลี้ยงข้อในทุกสภาพแสงให้จำนวนยอดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 9.73-11.26 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ แสดงว่าอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์ที่เพิ่มลงไปในอาหาร เมื่อรวมกันกับไซโตไคนินที่มีอยู่เดิมในเนื้อเยื่อส่วนข้อ อาจส่งเสริมกันและส่งผลให้ให้ตาข้างพัฒนาเกิดขึ้นได้มากยิ่งขึ้น (George *et al*., 2008) ซึ่งการทำงานร่วมกันของไซโตไคนินเหล่านี้ทำให้มีอิทธิพลต่อการแตกตาข้างมากกว่าอิทธิพลของแสง

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณารายละเอียดของแสงที่ใช้ โดยพิจารณาค่าจาก (Table 1) พบว่า แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ และ แสงจากแอลอีดีสีขาวและสีเหลือง มีค่าสัดส่วนของแสงสีแดง:น้ำเงิน (R:B) คือ 1:1 2:2 และ 2:1 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาเฉพาะ 3 สภาพแสงนี้ จะพบว่า แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ มีค่าสัดส่วนของแสง สีแดง:น้ำเงิน น้อยที่สุด และมีค่า PPFD ต่ำสุดด้วย และเมื่อพิจารณารูปแบบของสเปกตรัมที่ตรวจวัดได้จาก PAR meter ที่แสดงใน Figure 1 จะเห็นได้ว่า กราฟของแสงจากฟลูออเรสเซนต์มีความไม่สม่ำเสมอ ซึ่งต่างจากที่พบในแสงจากแอลอีดีสีขาวและสีเหลือง ซึ่งมีความสม่ำเสมอและต่อเนื่องอย่างชัดเจน ดังนั้น ประเด็นความแตกต่างเหล่านี้ จึงอาจเป็นผลให้จำนวนการเกิดยอดจากแผ่นใบภายใต้แสงจากฟลูออเรสเซนต์ มีค่าน้อยกว่าที่ได้จากแออีดีสีขาวและสีเหลือง และเมื่อพิจารณาแสงจากแอลอีดีสีเหลืองและสีแดง:น้ำเงิน ที่พบว่ามีสัดส่วนของสีแดง:สีน้ำเงิน ใกล้เคียงกัน คือที่ประมาณ 2:1 แต่แสงสีเหลืองมีค่า PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) และค่า PFD-G ที่สูงกว่า จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้การชักนำให้เกิดยอดภายใต้แสงสีเหลืองในการทดลองนี้เกิดขึ้นได้ดีกว่าการใช้แสงสีแดง:สีน้ำเงิน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Seibert *et al*. (1975) ที่พบว่าเมื่อความเข้มแสงเพิ่มมากขึ้นในช่วงหนึ่งส่งผลให้แคลลัสยาสูบพัฒนาไปเป็นยอดได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม หากความเข้มแสงมากเกินไปก็อาจเริ่มส่งผลเชิงลบต่อการเกิดยอดได้

สำหรับผลของแสงสีแดง (600-700 นาโนเมตร) และ สีน้ำเงิน (400-500 นาโนเมตร) ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชในสภาพเพาะเลี้ยงนั้น มีรายงานว่า แสงสีแดงทำให้ต้นพรมมิ (*Bacopa monnieri*) เกิดยอดใหม่ได้ดี (Aasim *et al*., 2018) และบลูเบอรี (*Vaccinium corymbosum*) แตกกิ่งแขนงได้มากและใบขยายขนาดได้มาก (Hung *et al*., 2016) ส่วนแสงสีน้ำเงินมีรายงานว่าส่งผลในทางตรงข้ามคือทำให้เนื้อเยื่อแตกแขนงน้อย แต่ทำให้มีการสร้างและสะสมคลอโรฟิลล์มาก ซึ่งมีรายงานในพืชหลายชนิดเช่น Zantedeschia jucunda, Cymbidium และฝ้าย (Gupta and Jatothu, 2013) แต่เมื่อให้แสงสีแดงพบว่ากลับทำให้การสะสมคลอโรฟิลลดลง อย่างไรก็ตาม มีการใช้แสงผสมระหว่างแสงสีแดงและสีน้ำเงินในสัดส่วนต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้วพบว่าให้ผลดีกว่าการใช้แสงสีแบบเดี่ยว (monochromatic) และดีกว่าการใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เช่น ในบลูเบอรี มีรายงานว่า การใช้แสงสีแดง (R) และแสงสีน้ำเงิน (B) ในสัดส่วน R5B5 และ R8B2 ทำให้ยอดยืดยาวที่สุด และมีจำนวนใบและมีพื้นที่ใบมากที่สุด (Hung *et al*., 2016) ในพรมมิ มีรายงานว่า สัดส่วน R1B1 และ R2B1 ทำให้เกิดยอดได้ดีกว่าที่เพาะเลี้ยงด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (Karatas *et al*., 2018) ซึ่งสอดคล้องกับผลการชักนำยอดจากแผ่นใบยาสูบในการทดลองนี้ ที่พบว่า การใช้แอลอีดีสีเหลือง (R2B1) และแอลอีดีสีขาว (R2B2) ให้ค่าจำนวนยอดมากกว่าที่เพาะเลี้ยงด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (R1B1) และผลจากการชักนำยอดจากข้อในอาหารที่ไม่เติม BA ที่แม้จะมียอดเกิดขึ้นเพียงยอดเดียว แต่ยอดที่เพาะเลี้ยงใต้แสงจากแอลอีดีมีขนาดใหญ่กว่าที่เพาะเลี้ยงด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (Figure 4) และยังพบว่ายอดจากแอลอีดีสีเหลืองมีใบขนาดใหญ่ก้านใบยืดยาว แต่สีใบอ่อนลงซึ่งแสดงว่ามีการสะสมคลอโรฟิลล์น้อย ส่วนที่เพาะเลี้ยงใต้แอลอีดีสีขาวใบไม่ยืดยาวมากแต่ใบมีสีเข้มชัดเจนมาก ซึ่งแสดงถึงการมีคลอโรฟิลล์อยู่มาก

นอกจากนี้ ในการทดลองนี้พบปฏิสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง BA และสภาพแสงที่ใช้เพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อแผ่นใบยาสูบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในพรมมิ (Karatas *et al*., 2016, Karatas *et al*., 2018) ที่พบว่าจำนวนยอดและความยาวยอดขึ้นกับสภาพแสง ความเข้มข้นของไซโตไคนิน และพบปฏิสัมพันธ์เชิงบวกในทั้งสองปัจจัยด้วยเช่นกัน

สรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบและข้อยาสูบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์และแสงจากแอลอีดีสีต่างๆ พบว่า BA ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อแผ่นใบ โดย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด ส่วนสเปกตรัมของแสงนั้น พบว่า แอลอีดีสีเหลืองชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แต่ใกล้เคียงกับสีขาวและหลอดฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งดีกว่าการใช้แอลอีดีสีน้ำเงินและสีแดง:น้ำเงิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบปฏิสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความเข้มข้นของ BA กับแสงด้วย สำหรับการเพาะเลี้ยงข้อนั้น พบว่า ให้ผลในทำนองเดียวกันกับเนื้อเยื่อแผ่นใบ แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะความเข้มข้นของ BA เท่านั้น และไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BA กับแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ บริษัท แอดวานซ์ อิเลคทริค แอนด์ อีเลคทรอนิค จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์หลอดแอลอีดีและเครื่องวัดสเปกตรัมและปริมาณแสง

เอกสารอ้างอิง

Aasim, M., M. Karatas S. Bakirci and C. Sevinc. 2018. *In vitro* adventitious shoot regeneration of water hyssop (*Bacopa monnieri* L. PENNEL) under light emitting diodes (LEDs). Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences 6(4): 129-133.

George, E.F. M.A. Hall and G.-J.D. Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background. 3rd ed. Springer, The Netherlands. 502 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3.

Gupta S.D. and B. Jatothu. 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnology Reports 7: 211-220. DOI 10.1007/s11816-013-0277-0.

Hung, C.D. C.-H. Hong S.-K. Kim K.-H. Lee J.-Y. Park M.-W. Nam D.-H. Choi and H.-I. Lee. 2016. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Acta Physiologiae Plantatum 38(6): 152-160. DOI 10.1007/s11738-016-2164-0

Karatas, M., M. Aasim and M. Dazkirli. 2016. Influence of light-emitting diodes and benzylaminopurin on adventitious shoot regeneration of water hyssop (*Bacopa monnieri* (L.) PENNEL) *in vitro.* Archives of Biological Sciences 68(3): 501-508. DOI:10.2298/ABS150803039K

Karatas, M., M. Aasim and M. Dazkirili. 2018. Efficacy of light emitting diodes (LEDs) lighting system for *in vitro* shoot regeneration of medicinal water hyssop (*Bacopa monnieri* L. PENNEL). Romanian Biotechnological Letters 23(1): 13197-13204.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-487. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Ramírez-Mosqueda, M.A., L.G. Iglesias-Andreu and J.R. Bautista-Aguilar. 2016. The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Sugar Tech 19(3): 331-336. https://doi.org/10.1007/s12355-016-0459-5

Seibert, M., P.J. Wetherbee and D.D. Job. 1975. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. Plant Physiology 56(1): 130-139. DOI: 10.1104/pp.56.1.130

Sharma, G.M., S. Jagetiya and R. Dashora. 2015. General Techniques of Plant Tissue Culture. Lulu Press Inc., Raleigh, North Carolina, USA. 28 p.

Shin, K.S., H.N. Murthy, J.W. Heo, E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2008. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. Acta Physiologiae Plantarum 30: 339-343. DOI 10.1007/s11738-007-0128-0.