

ผลของไคเนตินต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอด ของเมล็ดมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พรทิพย์ เทิดบารมี*, กนิษฐา อ่อนศิริ

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพมหานคร

*Corresponding author email: p_therdbaramee@hotmail.com

ได้รับบทความ: 23 มกราคม 2566

ได้รับบทความแก้ไข: 5 เมษายน 2566

ยอมรับตีพิมพ์: 4 พฤษภาคม 2566

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของไคเนติน (KIN) ต่อการชักนำให้เกิดการงอกและการเพิ่มจำนวนยอดของเมล็ดมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม KIN ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดครบ 4 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม KIN ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละของการงอกของเมล็ดสูงสุด ร้อยละ 100 เท่ากัน ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม KIN มีร้อยละของการงอกของเมล็ดมะกรูดต่ำสุด คือ ร้อยละ 85.71 นอกจากนี้สูตรอาหาร MS ที่เติม KIN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.86 ± 1.07 ยอดต่อเมล็ด และมีร้อยละของการเกิดรากร้อยละ 100

คำสำคัญ: มะกรูด / การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช / ไคเนติน

The Effect of Kinetin on Multiple Shoot Induction of Kaffir Lime Seeds (*Citrus hystrix* DC.) by Tissue Culture

Phonthip Terdbaramee*, Kanitta Onsiri

General Science Faculty of Science,
Chandrasakorn Rajabhat University, Bangkok

*Corresponding author email: p_terdbaramee@hotmail.com

Received: 23 January 2023

Revised: 5 April 2023

Accepted: 4 May 2023

Abstract

The aim of this study was used to investigate the effect of Kinetin (KIN) on multiple shoot induction of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) seeds from cultivation on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with KIN at various concentrations of 0, 1, 2 and 3 mg/L for 4 weeks. After 4 weeks of the Kaffir lime seeds cultivation, the MS medium supplemented with KIN at the concentration of 1, 2, and 3 mg/L produced the highest average number of the induced shoot which is 100 %. In contrast, MS medium without KIN was 85.71%. Additionally, it was found that the MS medium containing KIN at the concentration of 1 mg/L was able to induce the highest average number of shoots to 2.86 ± 1.07 shoots per seed and the percentage of root formation was 100%.

Keywords: *Citrus hystrix* DC. / Plant tissue culture / Kinetin

บทนำ

มะกรูดเป็นไม้ยืนต้นที่มีขนาดเล็กจัดอยู่ในวงศ์ (family) Rutaceae และอยู่ในสกุลส้ม (genus *Citrus*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus hystrix* DC. [1] มะกรูดเป็นสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ที่หลากหลายในชีวิตประจำวัน โดยเฉพาะการนำทั้งใบและผลมาประกอบอาหาร นอกจากนี้มะกรูดยังเป็นแหล่งสำคัญจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง โดยพบว่าสารสกัดจากใบมะกรูดมีฤทธิ์ดีที่สุดในการทำลายเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด คือ Promyelocytic leukemia (HL60), Lymphoblastic leukemia (Molt4), Chronic myelocytic leukemia (K562) และ Monocytic leukemia (U937) [2] จึงมีการนำสารสกัดจากใบมะกรูดซึ่งเป็นสมุนไพรธรรมชาติและคาดว่ามะกรูดน่าจะก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยมะเร็งน้อยกว่าการใช้ยาเคมีบำบัด [3] น้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดมีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของแชมพูและสบู่ ซึ่งใช้สำหรับทำความสะอาดร่างกาย รวมทั้งเป็นส่วนผสมในครีม โลชั่น และผลิตภัณฑ์เสริมความงามต่าง ๆ สำหรับใช้ในการบำรุงและฟื้นฟูผิวพรรณ นอกจากนี้สารหลายชนิดจากน้ำมันหอมระเหยมะกรูดมีสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในกลุ่ม coumarins รวมทั้งมีสารอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรีย และมีรายงานว่าสาร furanocoumarins สามารถสกัดจากเปลือกผลมะกรูดมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบได้ [4] ซึ่งพบว่าสารสำคัญจากใบมะกรูดที่สกัดจากเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ herpes virus ได้ [5] ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อมะกรูดจากเมล็ดเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชที่สามารถเพิ่มจำนวนพืชในระยะเวลาสั้นให้มีปริมาณสูงได้ โดยมีการใช้สารไคเนติน ซึ่งเป็นฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ ส่วนสูตรอาหาร MS เป็นสูตรที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เพื่อเป็นแนวทางการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช การพัฒนาคุณภาพของพืชจากการปรับปรุงพันธุ์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ตลอดจนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเกิดแคลลัส หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย สำหรับศึกษาปริมาณหรือวิธีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่กระตุ้นให้เซลล์ผลิตสารเมตาบอไลต์ในปริมาณสูงขึ้น เพื่อสกัดสารเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความเข้มข้นไคเนติน (KIN) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดจากเมล็ดมะกรูดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ล้างผลมะกรูดให้สะอาดแล้วปอกเปลือกออก
2. แช่ในเอทานอลร้อยละ 95 แล้วเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวของผลมะกรูด และรอให้ไฟดับผ่าผลมะกรูดเพื่อนำเมล็ดออกมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS [6] ที่เติมไคเนตินความเข้มข้นที่ระดับ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 3
3. ปรับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.7 แล้วจึงเติมน้ำจำนวน 9 กรัมต่อลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงที่มีความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) และวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ .05 โดยแต่ละกลุ่มทดลองทำ 7 ซ้ำ ดังนี้ กลุ่มทดลองที่ 1 สูตรอาหาร MS ที่เติมไคเนตินที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (กลุ่มควบคุม) กลุ่มทดลองที่ 2 สูตรอาหาร MS ที่เติมไคเนตินที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กลุ่มทดลองที่ 3 สูตรอาหาร MS ที่เติมไคเนตินที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กลุ่มทดลองที่ 4 สูตรอาหาร MS ที่เติมไคเนตินที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาครบ 4 สัปดาห์ สังเกตและศึกษาการเพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ ความสูง และจำนวนรากต้นกล้าของมะกรูด

ผลการวิจัย

จากการศึกษาการงอกของเมล็ดมะกรูดที่เติมไคเนตินความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ลงในสูตรอาหาร MS พบว่า การเติมไคเนตินที่ระดับความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละของการงอกสูงสุด คือ ร้อยละ 100 เท่ากัน รองลงมาคือสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมไคเนติน ซึ่งมีการงอกร้อยละ 85.71 ดังตารางที่ 1

จากการศึกษาความเข้มข้นของไคเนตินที่เหมาะสมที่เติมลงในสูตรอาหาร MS เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดมะกรูดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติมไคเนตินที่ความเข้มข้นระดับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 2.86 ± 1.07 ยอดต่อเมล็ด ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินที่ความเข้มข้น 0, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 1.71 ± 1.11 , 1.57 ± 0.53 และ 1.43 ± 0.79 ยอดต่อเมล็ด ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดมะกรูดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เมล็ดมะกรูดเกิดการเพิ่มจำนวนยอดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมโคเนดิน แสดงข้อมูลดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1 ภาพที่ 2

จากการศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนใบที่เกิดขึ้นโดยเรียงค่าเฉลี่ยจากมากไปน้อย ดังนี้ สูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินที่เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 3.69 ± 1.06 ใบต่อยอด รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินที่ระดับเข้มข้น 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดใบเฉลี่ยเท่ากับ 3.21 ± 1.19 และ 3.20 ± 0.67 ใบต่อยอด ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมโคเนดิน เกิดใบเฉลี่ยเท่ากับ 3.05 ± 1.66 ใบต่อยอด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดมะกรูดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีจำนวนใบเกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1 ภาพที่ 2

จากการศึกษาความเข้มข้นของโคเนดินที่เหมาะสมที่เติมลงในสูตรอาหาร MS มีผลต่อความสูงของยอดมะกรูดเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ ดังนี้ สูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดิน 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.47 ± 1.56 เซนติเมตร รองลงคือ สูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดิน 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ย 1.57 ± 0.82 และ 1.41 ± 1.09 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ยต่ำสุด คือ 1.14 ± 0.65 เซนติเมตร จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดมะกรูดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมโคเนดินความเข้มข้นระดับต่าง ๆ มีความสูงแตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1 ภาพที่ 2

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นไคเนตินที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ และความสูงเฉลี่ยของยอดมะกรูดเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดครบ 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น ไคเนติน (มิลลิกรัม:ลิตร)	การงอกของ เมล็ด (ร้อยละ)	จำนวนยอด เฉลี่ย* (ยอด:เมล็ด)	จำนวนใบ เฉลี่ย ^{ns} (ใบ:ยอด)	ความสูงเฉลี่ย ของยอด ^{ns} (เซนติเมตร)
0	85.71	1.71±1.11 ^b	3.05±1.66	2.47±1.56
1	100	2.86±1.07 ^a	3.20±0.67	1.57±0.82
2	100	1.57±0.53 ^b	3.21±1.19	1.41±1.09
3	100	1.43±0.79 ^b	3.69±1.06	1.14±0.65

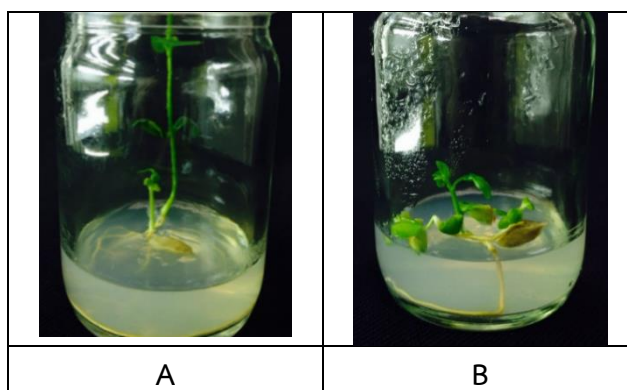
หมายเหตุ:

แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย (Mean)±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

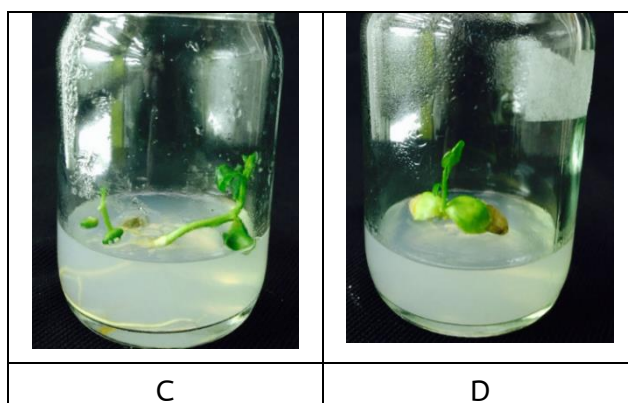
* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .05

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรที่กำกับอยู่บนค่าเฉลี่ยที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)



ภาพที่ 1 จำนวนยอดมะกรูดจากการชักนำยอดด้วยไคเนตินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ คือ ความเข้มข้นที่ระดับ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A), 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B)



ภาพที่ 2 จำนวนยอดมะกรูดจากการชักนำยอดด้วยไโคเนตินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ คือ ความเข้มข้นที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (D)

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดบนสูตรอาหาร MS โดยชักนำให้เกิดยอดด้วยไโคเนตินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลต่อการเกิดราก คือ ต้นกล้ามะกรูดที่ชักนำให้เกิดยอดด้วยไโคเนตินที่มีความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีร้อยละของการเกิดรากสูงสุดเท่ากัน คือ ร้อยละ 100 รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติมไโคเนตินที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละของการเกิดรากเท่ากับ ร้อยละ 85.71 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นไโคเนตินที่ชักนำให้เกิดยอดที่มีต่อร้อยละของการเกิดรากมะกรูดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดครบ 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นไโคเนติน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิดราก (ร้อยละ)
0	85.71
1	100.00
2	100.00
3	100.00

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาความเข้มข้นของโคเนดินที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ที่มีต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูด พบว่าความเข้มข้นของโคเนดินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ ความเข้มข้นที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอกของเมล็ดมะกรูดร้อยละ 100 และสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.86 ± 1.07 ยอดต่อเมล็ด ซึ่งแตกต่างจาก Goswami [7] ศึกษาเรื่องการขยายพันธุ์เลมอน (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) ไร้เมล็ดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และตรวจสอบความคงที่ทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดี (RAPD marker) พบว่าวิธีการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนข้อของเลมอนไร้เมล็ดสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่เติมโคเนดินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มเดียวกับโคเนดิน ซึ่งจัดเป็นกลุ่มไซโตไคนินเช่นกัน ได้แก่ การใช้ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-BAP) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาเป็นยอดสูงสุดและเมื่อเติม 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโคเนดินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดสูงสุด คือ 5.5 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช นอกจากนี้พรทิพย์ เทิดบารมี [8] ศึกษาผลของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่มีต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดของเมล็ดมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การนำเมล็ดมะกรูดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 3.30 ± 1.70 ยอดต่อเมล็ด ซึ่งสอดคล้องกับ Azim [9] รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดส้มเกลี้ยง (*Citrus sinensis*) ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับมะกรูด พบว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มเกลี้ยงแบบแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกสามารถเจริญพัฒนาของการเกิดยอดได้ดีกว่าไม่แกะเปลือกหุ้มเมล็ด โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดร้อยละของจำนวนยอดสูงสุด คือ ร้อยละ 70 ดังนั้นหากมีการเติมโคเนดินร่วมกับ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนน่าจะมีความสามารถในการชักนำให้เกิดจำนวนยอดเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมโคเนดินหรือ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนเพียงชนิดเดียว ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดดังกล่าวจัดว่าเป็นสารกลุ่มไซโตไคนิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ พัฒนากลุ่มเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อ การสร้างยอดของตาข้าง รวมไปถึงการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอเอ ตลอดจนการยับยั้งการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ช่วยชะลอความแก่ชราของพืช [10] และสอดคล้องกับ Handayani [11] ศึกษาผลของไซโตไคนินที่เพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อมะกรูด พบว่าการการเพาะเลี้ยงมะกรูดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 ppm. สามารถชักนำให้ร้อยละของการเจริญเติบโตสูงสุด สำหรับจำนวนยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดมะกรูด คือ เติบโตโคนดินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เกิดจำนวนใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้นของโคนดินในระดับอื่น ๆ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับความสูงเฉลี่ยของยอดซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามหากมีการนับใบรวมที่เกิดขึ้นทุกยอดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 เมล็ดต่อขวด พบว่าที่ความเข้มข้นโคนดินที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดสูงสุดแล้วมีผลให้เกิดจำนวนใบสูงสุด นอกจากนี้หากไม่เติมโคนดินลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ที่ระดับความเข้มข้นโคนดินที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าเกิดรากต่ำกว่าการเติมโคนดินที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากไม่มีโคนดินซึ่งเป็นสารชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด ในขณะที่การเติมโคนดินความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับทำให้เกิดการชักนำให้เกิดจำนวนยอดลดลงต่ำกว่าการเติมโคนดินที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของโคนดิน 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นความเข้มข้นของไซโตไคนินที่สูงเกินความต้องการของพืช จึงเป็นความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอด อีกทั้งภายในพืชก็มีการสังเคราะห์ไซโตไคนินขึ้นเองตามธรรมชาติสำหรับใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ในการดำรงชีวิต[10]

จากการศึกษาเพาะเมล็ดมะกรูดบนสูตรอาหารที่เติมโคนดินเพื่อชักนำให้เกิดยอดแล้วส่งผลต่อการเกิดราก ดังนี้ สูตรอาหาร MS ที่เติมโคนดินความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้เกิดรากสูงสุดเท่ากัน คือ ร้อยละ 100 การเกิดรากรองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติมโคนดินที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าการเกิดรากร้อยละ 85.71 ซึ่งการที่สูตรอาหาร MS ที่เติมโคนดิน 0 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้มีร้อยละการเกิดรากน้อยที่สุด เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ด ซึ่งหากเมล็ดไม่มีการงอกยอดแล้วก็จะไม่มีการงอกของรากเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าทุกความเข้มข้นของโคนดินที่มีการเติมลงในสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดพบว่าการเกิดจำนวนรากเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1-2 รากเท่านั้น ซึ่งเป็นการเกิดรากในระดับต่ำ เนื่องจากมะกรูดจัดเป็นประเภทไม้ยืนต้นซึ่งโดยทั่วไปมีการเกิดรากในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การเกิดรากของพืชล้มลุก นอกจากนี้การเติมไซโตไคนินซึ่งเป็นสารมีคุณสมบัติในการชักนำยอดเช่นเดียวกับโคนดินลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดยอดขึ้นอาจมีผลต่อการยับยั้งการเกิดรากได้ เนื่องจากการที่มีปริมาณของไซโตไคนินสูงกว่าออกซิน เซลล์พืชจะถูกกระตุ้นให้มีการเจริญพัฒนาไปเป็นยอดมากกว่าเกิดเป็นราก ดังนั้นการจะชักนำให้พืช

เกิดราก จึงควรมีการเติมสารชักนำให้เกิดราก คือ ออกซินให้มีอิทธิพลเหนือไซโตไคนินจึงสามารถชักนำให้เกิดรากได้ [12] และพบว่าหากเมล็ดมะกรูดมีการงอกเป็นต้นกล้าจะมีการเจริญและพัฒนาของรากแก้วจำนวน 1 รากทุกต้น ซึ่งมีต้นกล้ามะกรูดบางต้นเกิดรากแขนงขึ้น ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะกรูดจนกระทั่งสามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดแล้ว หากต้องการชักนำให้เกิดรากสามารถทำได้โดยการย้ายต้นกล้ามะกรูดไปเพาะเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่มีการเติมออกซินในปริมาณที่เหมาะสมจึงสามารถชักนำให้พืชเกิดรากได้สำเร็จ

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาความเหมาะสมของระดับความเข้มข้นโคเคนตินที่เติมลงในสูตรอาหาร MS เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดของเมล็ดมะกรูดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติมโคเคนตินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอกของเมล็ดมะกรูดร้อยละ 100 และสามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.86 ± 1.07 ยอดต่อเมล็ด โดยเกิดใบเฉลี่ยเท่ากับ 3.20 ± 0.67 ใบต่อยอด ความสูงยอดเฉลี่ยเท่ากับ 1.57 ± 0.82 เซนติเมตร และพบว่ามีร้อยละของการเกิดรากเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษมที่ให้เอื้อเฟื้อสถานที่และสนับสนุนการวิจัยนี้ ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. อลงกลด แทนอมทอง ที่ช่วยเหลือด้านต่าง ๆ งานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Kasuan N, Muhammad Z, Yusoff Z, Rahiman MHF, Taib MN, Haiyee ZA. Extraction of *Citrus hystrix* DC. (Kaffir Lime) essential oil using automated steam distillation process : Analysis of volatile compounds. Malaysian Journal of Analytical Sciences 2013;3:359–369.
2. Tunjung WAS, Cinatl JJr, Michaelis M, Smales CM. Anti-Cancer Effect of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC.) Leaf Extract in Cervical Cancer and Neuroblastoma Cell Lines. Procedia Chemistry 2015;14:465-468.

3. Chueahongthong F, Ampasavate C, Okonogi S, Tima S, Anuchapreeda, S. Cytotoxic effects of crude kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) leaf fractional extracts on leukemic cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011;14:3097-3105.
4. Kidarn S, Saenjum C, Hongwiset D, Phrutivorapongkul A. Furanocoumarins from Kaffir lime and their inhibitory effects on inflammatory mediator production. *Cogent Chemistry* 2018.
5. Dertyasasa DE, Tunjung AWS. Volatile Organic Compounds of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC.). Leaves Fractions and their Potency as Traditional Medicine. *Biosci., Biotech. Res. Asia* 2017;4:1235-1250.
6. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 1962;3:473-479.
7. Goswami K, Sharma R, Singh PK, Singh G. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 2013;1:137-145.
8. พรทิพย์ เทิดบารมี. ผลของ 6- เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่มีต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดของเมล็ดมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์* 2556;2:143-152.
9. Azim F, Rahman MM, Prodhan SH, Sikdar SU, Zobayer N, Ashrafuzzaman M. Development of Efficient Callus initiation of Malta (*Citrus sinensis*) through tissue culture. *Int. J. Agril. Res. Innov. & Tech* 2011;1&2: 64-68.
10. พรทิพย์ เทิดบารมี. เอกสารประกอบการสอนเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม; 2556.
11. Handayani RS, Yunus I, Tilla, N, Handayani I. Effect of Cytokines On The In Vitro of Sweet Kaffir Lime (*Citrus hystrix* Dc). *Journal of Tropical Horticulture* 2020;2:60-64.
12. Gadidasu K, Umate P, Aileni M, Kota SR, Kokkiral VR, Kasula K, Abbagani S. Micropropagation of a Valuable Ethnomedicinal Plant *Streblus asper* Lour. *Journal of Phytology* 2011;2:18-23.