ว.วิทย. มข. 44(3) 530-541 (2559) KKU Sci. J. 44(3) 530-541 (2016)

ผลของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดสลัดน้ำ (*Nasturtium officinale* R. Br.) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดและตาข้าง

The Effect of 6-Benzylaminopurine on *In vitro* Shoot Multiplication from Shoot and Lateral Bud Explants of Watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.)

พิสุทธิ์ พวงนาค

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพมหานคร 10900

E-mail: genscience@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-BAP) ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวยอด ของเนื้อเยื่อยอดและตาข้างสลัดน้ำ (*Nasturtium officinale* R. Br.) ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ด้วยการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบไม่ตัดแยกยอดออกจากต้น โดยการโน้มยอดลงแช่เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จึงตัดยอดสลัดน้ำแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ บนสูตรอาหาร MS เพื่อใช้เป็นพืชตั้งต้นสำหรับทดสอบผลของ 6-BAP ต่อไป โดยตัดส่วนยอดย้ายไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการศึกษา พบว่าการเพาะเลี้ยงยอดสลัดน้ำที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด (7.50±1.18 ยอดต่อชิ้นส่วน) มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นรวมทั้งหมดเฉลี่ยสูงสุด (29.40±2.46 ใบต่อชิ้นส่วน) และมีความยาวยอดเฉลี่ย (0.87±0.29 เซนติเมตร) ซึ่งไม่พบว่าเกิดราก สำหรับการเพาะเลี้ยงส่วนของตาข้างสลัดน้ำ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด (5.60±0.97 ยอดต่อชิ้นส่วน) มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นรวมทั้งหมดเฉลี่ยสูงสุด (25.10±0.88 ใบต่อชิ้นส่วน) และมีความยาวยอดเฉลี่ย (0.92±0.51 เซนติเมตร) และเกิดจำนวนรากเฉลี่ย (0.60±0.52 รากต่อชิ้นส่วน)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of 6-benzylaminopurine (6-BAP) *on In vitro* shoot, leaf, root and shoot length multiplication from shoot and lateral bud explants of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.*)* The explants had been cultured on Murashige and Skoog (MS) supplemented with 6-BAP in different concentrations (0, 1, 2 and 3 mg/l). The surface sterilization technique had been employed in the experiment. First, the shoot and lateral bud explants, which were pulled down without being taken apart from the stem, were sterilized by soaking in 70% (v/v) ethyl alcohol for one minute. Next, the shoots were cut and soaked in 2.5% (v/v) sodium hypochlorite for ten minutes, and cleaned for three times by sterilized water. After that, they were cultivated on MS medium for ten weeks in order to produce the sample plants. Then the sample shoots were cut and grown on MS medium of 6-BAP with different concentrations for four weeks. For *In vitro* shoot culture, it was found that the watercress propagation with 2 mg/l of 6-BAP increased the most average number of shoots (7.50±1.18 shoots/explant), of leaves (29.40±2.46 leaves/explant) and the average length of shoots (0.87±0.29 cm.).However, no root was detected. Regarding *In vitro* lateral bud culture, it was shown that the watercress propagation with 2 mg/l of 6-BAP induced the highest average number of shoots (5.60±0.97 shoots per explant), leaves (25.10±0.88 leaves per explant), with length (0.92±0.51 cm.) and roots growth rate at (0.60±0.52 roots per explant).

คำสำคัญ: สลัดน้ำ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน สูตรอาหาร MS

Keywords: *Nasturtium officinale* R. Br., Plant tissue culture, 6-Benzylaminopurine, MS medium

บทนำ

สลัดน้ำเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Brassicaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nasturtium officinale* R. Br. พบการแพร่กระจายบริเวณรอบ ๆ แหล่งน้ำ (Karami et al., 2015) สลัดน้ำสามารถผลิตสารทุติภูมิที่มีคุณค่าสูง เช่น 2-phenethyl glucosinolate เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ myrosinase โดยแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้จะเปลี่ยนให้เป็นสาร 2-phenethyl isothiocyanate ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์สำหรับใช้ป้องกันมะเร็ง (Kopsell et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบสารประเภท flavonoids และ phenolic compounds ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทในการต้านสารอนุมูลอิสระอีกด้วย สลัดน้ำเป็นพืชที่นิยมนำใบมารับประทานเป็นผัก เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เพราะอุดมไปด้วยวิตามินและเกลือแร่ โดยสลัดน้ำมีสรรพคุณช่วยขับเสมหะ ป้องกันการเกิดโรคลักปิดลักเปิด เพิ่มความอยากอาหาร ป้องกันการเกิดโรคกระเพาะ และโรคหัวใจ นอกจากนี้ยังสามารถช่วยป้องกันการอักเสบ ลดคอเลสเตอรอลในเลือด และลดการติดเชื้อแบคทีเรีย (Karami et al., 2015) มีรายงานว่ามีการนำสลัดน้ำมาประยุกต์ใช้เป็นพืชขจัดสารพิษ (phytoremediation) เพื่อบำบัดมลภาวะที่เกิดขึ้นในแหล่ง

น้ำต่าง ๆ เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถดูดสารพิษพวกโลหะหนักต่าง ๆ เข้าสู่ส่วนต่าง ๆ และสะสมไว้ในปริมาณสูงทั้งในใบ ลำต้น และราก จึงเรียกพืชชนิดนี้ว่า hyperaccumulator สลัดน้ำมีรากที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันการทำลายจากสารพิษและโลหะหนัก ปัจจุบันสลัดน้ำเป็นที่สนใจในการนำมาใช้กำจัดสารประเภท endocrine disrupting chemicals ตามแหล่งน้ำต่าง ๆ โดยสารเหล่านี้ล้วนมีความสัมพันธ์กับการนำไปใช้ในการผลิตอุปกรณ์ประเภทอิเล็กทรอนิกส์และยาปราบวัชพืช สารประเภทนี้ยังเป็นอันตรายต่อร่างกาย เนื่องจากมีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Ogita et al., 2009) ดังนั้นหากต้องการนำสลัดน้ำมาบริโภคจึงต้องคำนึงถึงแหล่งเพาะปลูกและสภาพแวดล้อมที่ต้องปราศจากสารพิษต่าง ๆ ด้วย นอกจากนี้ Ogita et al. (2009) นำส่วนข้อดีของสลัดน้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดแล้วจึงนำมาถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้เครื่องยิงยีน (particle bombardment) และอะโกรแบคทีเรียม (agrobacterium) เพื่อพัฒนาลักษณะพันธุกรรมของสลัดน้ำให้ได้ลักษณะที่ดีขึ้น สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุลจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ช่วยให้ประสบความสำเร็จในการทำให้เกิดลูกผสมซึ่งเป็นการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมให้เพิ่มขึ้น ดังนั้นหากมีการขยายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสลัดน้ำจะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว แข็งแรง ปลอดสารพิษ โรคและแมลงต่าง ๆ นอกจากนี้การศึกษาความเข้มข้นของ 6-BAP ที่เติมลงในสูตรอาหารในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสลัดน้ำจะเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์พืชสำหรับการบริโภค อนุรักษ์พันธุกรรม การผลิตสารที่ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น สารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ และสารเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน และอาจต่อยอดด้วยการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดนี้เพื่อนำไปเป็นพืชขจัดสารพิษที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ และพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้ลักษณะพันธุกรรมที่ดีมีประสิทธิภาพตามวัตถุประสงค์ข้างต้นให้สูงมากขึ้น ซึ่งการนำไปใช้ประโยชน์เหล่านี้จะนำไปสู่การสร้างพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ 6-BAP ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ ความยาวยอด และการเกิดรากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยอดและตาข้างสลัดน้ำในสูตรอาหาร MS

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์

นำตัวอย่างสลัดน้ำที่ได้จากศูนย์ศิลปาชีพ บางไทร ในสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ตำบลช้างใหญ่ อำเภอบางไทร จังหวัดอยุธยา มาปลูกในกระถางเพื่อขยายพันธุ์ คัดเลือกต้นที่มีส่วนประกอบที่สมบูรณ์ ส่งให้ผู้เชี่ยวชาญของพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อตรวจสอบรายชื่อวิทยาศาสตร์

2. การศึกษาผลของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดและตาข้าง

นำยอดสลัดน้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม 6-BAP เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยคัดยอดที่แข็งแรงมาเพาะเลี้ยงโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

2.1 ยอด ซึ่งเป็นยอดที่ประกอบด้วยตายอดและลำต้นที่มีใบ 4 ใบ (เพาะเลี้ยงส่วนยอด 1 ชิ้นส่วนต่อขวด)

2.2 ตาข้าง ซึ่งเป็นส่วนของตาข้างที่ประกอบด้วยลำต้นและใบ 2 ใบ (เพาะเลี้ยงส่วนของตาข้าง 1 ชิ้นส่วนต่อขวด)

นำส่วนของพืชข้อ 2.1 และ 2.2 ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบผลของการเติม 6-BAP ที่มีความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.6 และเติมวุ้น 7 กรัมต่อลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสรูปที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.01$) การทดลองมี 4 ทรีทเมนต์ (สิ่งทดลอง) และสิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ ดังนี้ สิ่งทดลองที่ 1 สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม 6-BAP (กลุ่มควบคุม), สิ่งทดลองที่ 2 3 และ 4 คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ ความยาวของยอด และการเกิดรากของสลัดน้ำ

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์

ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชพบว่าตัวอย่างพืชที่ศึกษามีชื่อไทยว่าสลัดน้ำมี ชื่อสามัญว่า watercress และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nasturtium officinale* R. Br. (Howard and Lyon, 1952; Sheridan et al., 2001)

2. ผลของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดและตาข้าง

2.1 ยอด

จากการเพาะเลี้ยงยอดสลัดน้ำโดยศึกษาผลของ 6-BAP ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ในระดับที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดและใบ พบว่าการเติม 6-BAP ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด (7.50±1.18 ยอดต่อชิ้นส่วน) รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 3 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.10±1.45 และ 3.00±1.15 ยอดต่อชิ้นส่วนตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ไม่เติม 6-BAP พบว่าชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้ต่ำสุด คือ 1.40±0.70 ยอดต่อชิ้นส่วน

นอกจากนี้การเติม 6-BAP ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตรวจนับจำนวนใบที่เกิดขึ้น พบว่ามีจำนวนใบรวมทั้งหมดเฉลี่ยสูงสุด (29.40±2.46 ใบต่อชิ้นส่วน) รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 3 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อตรวจนับจำนวนใบที่เกิดขึ้น พบว่ามีจำนวนใบรวมทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 13.60±2.07 และ 11.20±1.14 ใบต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ไม่เติม 6-BAP เมื่อตรวจนับจำนวนใบที่เกิดขึ้น พบว่ามีจำนวนใบรวมทั้งหมดต่ำสุด (8.90±1.66 ใบต่อชิ้นส่วน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ายอดสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ทำให้เกิดจำนวนยอดและใบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

สำหรับความยาวยอดพบว่าการเติม 6-BAP ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำ

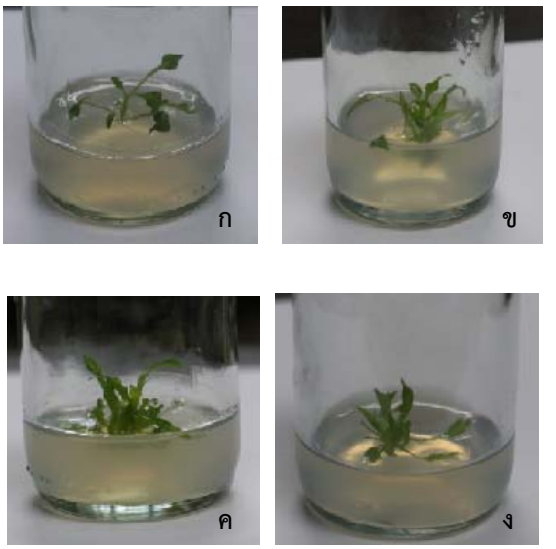
ให้เกิดยอดที่มีความยาวเฉลี่ยสูงสุด คือ 0.90±0.20 เซนติเมตร รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่ระดับความเข้มข้น 2 0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดความยาวยอดเฉลี่ย 0.87±0.29 0.68±0.32 และ 0.62±0.23 เซนติเมตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ายอดสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ มีความยาวไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของ 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ต่อการเกิดยอด ใบ และความยาวยอดของยอดสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วน)	จำนวนใบที่เกิดขึ้นรวมทั้งหมดเฉลี่ย (ใบ/ต่อชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
0	1.40±0.70[a]	8.90±1.66[a]	0.68±0.32[ns]
1	3.00±1.15[b]	11.20±1.14[b]	0.62±0.23[ns]
2	7.50±1.18[c]	29.40±2.46[c]	0.87±0.29[ns]
3	4.10±1.45[b]	13.60±2.07[d]	0.90±0.20[ns]

หมายเหตุ: [ns] = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±SD.) ที่ยกกำลังตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)



รูปที่ 1 จำนวนยอดสลัดน้ำที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดบนสูตร MS ที่เติม 6-BAP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

(ก) เติม 6-BAP 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ข) เติม 6-BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) เติม 6-BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ง) เติม 6-BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 ตาข้าง

จากการเพาะเลี้ยงตาข้างสลัดน้ำโดยศึกษาผลของ 6-BAP ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ในระดับที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดและใบ พบว่าการเติม 6-BAP ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด (5.60±0.97 ยอดต่อชิ้นส่วน) รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 3 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.50±0.85 และ 3.90±0.88 ยอดต่อชิ้นส่วนตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ไม่เติม 6-BAP พบว่าสามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดต่ำสุด คือ 2.10±0.57 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2)

นอกจากนี้การเติม 6-BAP ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดใบรวมทั้งหมดเฉลี่ยสูงสุด คือ 25.10±0.88 ใบต่อชิ้นส่วน รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดใบรวมทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 16.00±2.21 และ 15.60±1.17 ใบต่อชิ้นส่วนตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ไม่เติม 6-BAP พบว่าทำให้เกิดจำนวนใบรวมทั้งหมดต่ำสุด (11.80±1.23 ใบต่อชิ้นส่วน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าตาข้างสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ทำให้เกิดจำนวนยอดและใบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) (ตารางที่ 2)

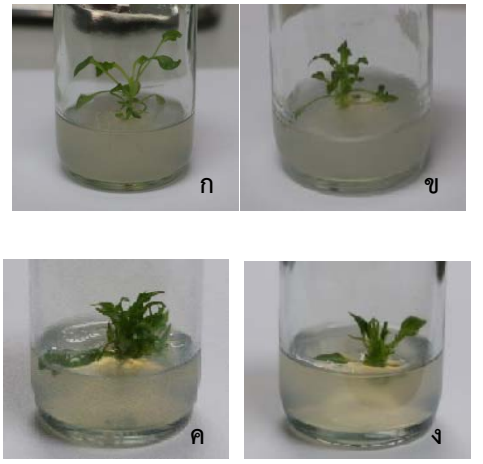
สำหรับความยาวของยอดพบว่าการทดลองที่ไม่เติม 6-BAP สามารถชักนำให้เกิดยอดมีความยาวเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.43±0.61 เซนติเมตร รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดความยาวยอดเฉลี่ย 0.92±0.51 และ 0.88±0.49 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีความยาวยอดเฉลี่ยต่ำสุด คือ 0.85±0.45 เซนติเมตร จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ายอดสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่างๆ มีความยาวไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของ 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ต่อการเกิดยอด ใบ และความยาวยอดของตาข้างสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วน)	จำนวนใบที่เกิดขึ้นรวมทั้งหมดเฉลี่ย(ใบ/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
0	$2.10±0.57^{a}$	$11.80±1.23^{a}$	$1.43±0.61^{ns}$
1	$3.90±0.88^{b}$	$16.00±2.21^{b}$	$0.85±0.45^{ns}$
2	$5.60±0.97^{c}$	$25.10±0.88^{c}$	$0.92±0.51^{ns}$
3	$4.50±0.85^{b}$	$15.60±1.17^{b}$	$0.88±0.49^{ns}$

หมายเหตุ: ^{ns} = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±SD.) ที่ยกกำลังตัวอักษรต่างกันแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)



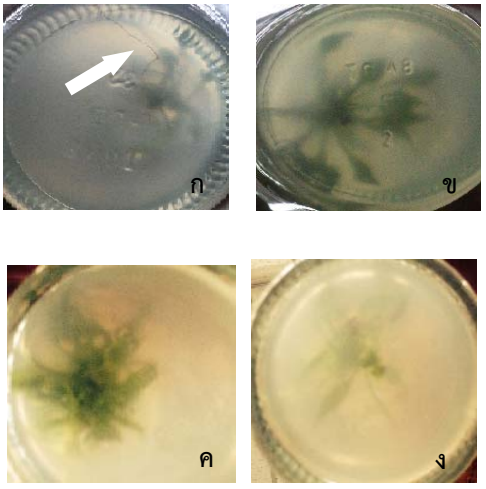
รูปที่ 2 จำนวนยอดสลัดน้ำที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตาข้างบนสูตร MS ที่เติม 6-BAP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
(ก) เติม 6-BAP 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ข) เติม 6-BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค) เติม 6-BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ง) เติม 6-BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างสลัดน้ำโดยชักนำให้เกิดยอดด้วย 6-BAP ที่ระดับต่าง ๆ ซึ่งเมื่อนำส่วนของยอดสลัดน้ำเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายอดสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงสามารถเกิดรากได้ในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม 6-BAP เพียงสูตรเดียว คือ เกิดรากเฉลี่ย 1.10±0.99 รากต่อชิ้นส่วน สำหรับสูตรอาหาร MS ที่เติม 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเกิดราก (ตารางที่ 3 และรูปที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของ 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ต่อการเกิดรากของยอดสลัดน้ำที่เพาะ เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นส่วน)
0	1.10±0.99 [a]
1	0.00±0.00 [b]
2	0.00±0.00 [b]
3	0.00±0.00 [b]

หมายเหตุ: ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±SD.) ที่ยกกำลังตัวอักษรต่างกันแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)



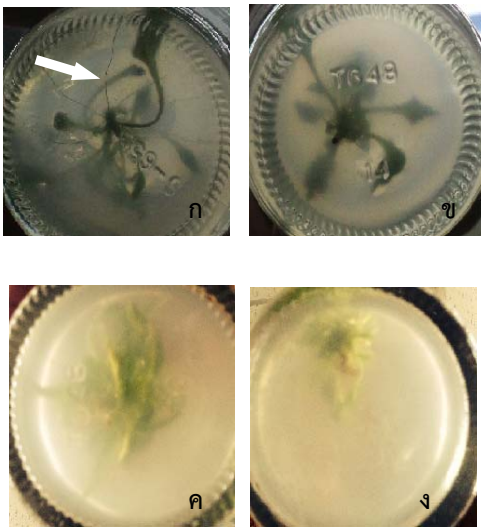
รูปที่ 3 การเกิดรากสลัดน้ำจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดบนสูตร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นต่างๆ
(ก) เติม 6-BAP 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ข) เติม 6-BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค) เติม 6-BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ง) เติม 6-BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
ลูกศรชี้ แสดงรากที่เกิดขึ้น

สำหรับการนำส่วนของตาข้างสลัดน้ำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าตาข้างสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงสามารถงอกยอดใหม่และเกิดรากได้ในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ เกิดรากเฉลี่ย 5.30±1.95 0.70±0.67 และ 0.60±0.52 รากต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเกิดราก (ตารางที่ 4 และรูปที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของ 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ต่อการเกิดรากของตาข้างสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นส่วน)
0	$5.30±1.95^{a}$
1	$0.70±0.67^{b}$
2	$0.60±0.52^{b}$
3	$0.00±0.00^{b}$

หมายเหตุ: ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±SD.) ที่ยกกำลังตัวอักษรต่างกันแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)



รูปที่ 4 การเกิดรากสลัดน้ำจากการเพาะเลี้ยงตาข้าง บนสูตร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นต่างๆ
(ก) เติม 6-BAP 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ข) เติม 6-BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ค) เติม 6-BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ง) เติม 6-BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
ลูกศรชี้ แสดงรากที่เกิดขึ้น

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างสลัดน้ำบนสูตรอาหาร MS พบว่าเมื่อเติม 6-BAP ในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงยอด คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงตาข้าง คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นกัน โดยสามารถชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนา คือ เพิ่มจำนวนยอดและใบสูงสุดซึ่งสอดคล้องกับ Nguyen et al. (2011) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงโดยเติม 6-BAP ความเข้มข้น 3.15 ไมโครโมลาร์ ในสูตรอาหาร MS ที่เติมวิตามิน B5 ซึ่งการเติม 6-BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโทไคนิน (cytokinin) ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ และเกิดการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) (Zhang et al., 2013) นอกจากนี้สามารถเพาะเลี้ยงปล้องของต้นกล้าที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส คือ สูตรอาหาร MS ที่เติมวิตามิน B5 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีแอซีติก (2,4-D) ความเข้มข้น 1.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 6-BAP ความเข้มข้น 3.94 ไมโครโมลาร์ (Nguyen et al., 2011) ส่วนการเพาะเลี้ยงยอดและตาข้างสลัดน้ำที่เติม 6-BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นสูงเกินไป จึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เพราะไซโทไคนินมีผลยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์นิวคลีเอส (มานี เตื้อสกุล, 2550) ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งมีหน้าที่ในการตรวจสอบความผิดปกติของ

การเรียงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่ รวมทั้งซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่มีการสังเคราะห์ผิดพลาด ดังนั้นความเข้มข้นของไซโตไคนินที่มากเกินไป จึงส่งผลต่อการขาดเอ็นไซม์ นิวคลีเอสที่มีหน้าที่ตัดโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติออกจากสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นในกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอให้ถูกต้องจึงทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ ได้ตามปกติ จนในที่สุดพืชอาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโต ในขณะที่ Ogita et al. (2009) รายงานว่ามีการนำส่วนข้อของสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½ MS ที่เติม 2,4-D เป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงสลัดน้ำที่เพิ่มจำนวนยอดขึ้นก็สามารถส่งผลให้มีจำนวนใบรวมทั้งหมดเพิ่มขึ้นด้วย แต่ไม่มีผลต่อความยาวของยอด สำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของยอดสลัดน้ำที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ลงในสูตรอาหาร MS เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดแล้วส่งผลต่อการเกิดราก คือ ไม่เกิดรากขึ้นในสูตรอาหารที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่เติม 6-BAP เกิดรากเฉลี่ย 1.10±0.99 รากต่อชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเมื่อศึกษาจำนวนรากที่เกิดขึ้นพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของตาข้างสลัดน้ำ พบว่าในสูตรอาหารที่ไม่เติม 6-BAP สามารถทำให้เกิดรากได้สูงสุดเฉลี่ย 5.30±1.95 รากต่อชิ้นส่วน ในขณะที่การเติม 6-BAP ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดรากเฉลี่ยเพียง 0.70±0.67 และ 0.60±0.52 รากต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ สำหรับที่ระดับความเข้มข้นของ 6-BAP เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเกิดราก ซึ่งสอดคล้องกับ Wattanawikkit et al. (2011) ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นกล้ากล้วยไม้รองเท้านารีบนสูตรอาหาร ½ MS ที่เติม 6-BAP พบว่า 6-BAP ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.30±1.42 และ 2.20±1.03 ยอดต่อต้นกล้าซึ่งเกิดจำนวนยอดสูงกว่าตัวควบคุมที่ไม่เติม 6-BAP แต่เมื่อศึกษาการเกิดรากพบว่าตัวควบคุมสามารถเกิดรากสูงสุด คือ 3.70±0.62 รากต่อยอด ส่วนสูตรอาหารที่เติม 6-BAP พบว่าทำให้เกิดรากลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นผลของการเติม 6-BAP ลงในสูตรอาหาร ½ MS เพื่อชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดได้แต่กลับส่งผลให้เกิดการงอกของรากในระดับต่ำ เนื่องจาก 6-BAP เป็นสารประเภทไซโทไคนินที่มีผลยับยั้งการเกิดรากได้ นอกจากนี้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยอดและตาข้างสลัดน้ำเป็นการเพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนพืชที่แยกจากต้นสลัดน้ำที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และหลังจากแยกชิ้นส่วนดังกล่าวในระยะแรกเป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด ดังนั้นเมื่อเกิดยอดแล้วควรมีการเพาะเลี้ยงต่อไปเพื่อศึกษาการงอกของราก เนื่องจากอาจมีการลดลงของปริมาณไซโทไคนินที่พืชใช้ไปเพื่อการเพิ่มจำนวนและเจริญพัฒนายอดให้มีความสมบูรณ์ จึงทำให้ผลของไซโตไคนินต่อการยับยั้งการงอกของรากลดลง ส่งผลให้ยอดพืชสามารถงอกรากได้ แต่หากยังไม่เกิดรากตามความต้องการ เมื่อมีการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดแล้วหลังจากนั้นควรย้ายไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีการเติมออกซินเพื่อชักนำให้เกิดรากขึ้น (Gaba, 2005)

สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าผลของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดและตาข้าง

1. ยอด

การเพาะเลี้ยงยอดสลัดน้ำบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด (7.50±1.18 ยอดต่อชิ้นส่วน) มีจำนวนใบที่เกิดขึ้นรวมทั้งหมดเฉลี่ยสูงสุด (29.40±2.46 ใบต่อชิ้นส่วน) และความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 0.87±0.29 เซนติเมตร โดยไม่พบการเกิดราก

2. ตาข้าง

การเพาะเลี้ยงตาข้างสลัดน้ำบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด (5.60±0.97 ยอดต่อชิ้นส่วน) และจำนวนใบที่เกิดขึ้นรวมทั้งหมดเฉลี่ยสูงสุด (25.10±0.88 ใบต่อชิ้นส่วน) และมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 0.92±0.51 เซนติเมตร และเกิดรากเฉลี่ยจำนวน 0.60±0.52 รากต่อชิ้นส่วน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อลงกลด แทนออมทอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่เป็นที่ปรึกษาและช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ มาโดยตลอด และขอขอบคุณพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยอนุเคราะห์ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

มานี เตื้อสกุล. (2550). เอกสารคำสอนสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 119-119.

Gaba, P. V. (2005). Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development. Plant Development and Biotechnology. Trigiano, N. R. and Gray, J. D. (eds) Boca Raton, Florida. pp. 87-99.

Howard, H.W. and Lyon, A.G. (1952). Biological flora of the British Isles : *Nasturtium officinale* R. B. & *Nasturtium microphyllum* Boenningh ex Rchb. Journal of Ecology.. 40(1): 228-245.

Karami, M., Nosrati, A., Naderi, M., Makhloogh, M. and Shahani, S. (2015). Protective effects of *Nasturtium officinale* against gamma-irradiation-induced hepatotoxicity in C57 mice. Research Journal of Pharmacognosy 2(2): 19-25.

Kopsell, D. A., Barickman, T. C., Sams, C. E. and Mcelroy, J. S. (2007). Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 10628-10634.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15(3) : 473-479.

Nguyen, H. L., Nguyen, V. S., Nguyen-Quang, D.T., Tang ,T. M., Phan-Thi, Q.N., Tae-Geum, K. and Moon-Sik, Y. (2011). Expression of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic watercress (*Nasturtium officinale* L.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 105(1): 39-45.

Ogita, S., Usui, M., Shibutani, N. and Kato, Y. (2009). A simple shoot multiplication procedure using internode explants, and its application for particle bombardment and Agrobacterium-mediated transformation in watercress. Journal of Plant Research 122(4): 455-63.

Sheridan, G. E. C., Claxton. J. R., Clarkson, J. M. and Blakesley, D. (2001). Genetic diversity within

commercial populations of watercress (*Rorippa nasturtium-aquaticum*), and between allied Brassicaceae inferred from RAPD-PCR.. Euphytica 122: 319-325.

Wattanawikkit, P., Bunn, E., Chayamarit, K., and Tantiwiwat, S. (2011). Effect of cytokinins (BAP and TDZ) and auxin (2, 4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*. Kasetsart Journal Natural Science 45(1): 12-19.

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

❑❑❑❑❑